PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3638-88

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA

(22) Přihlášeno: **27. 05. 88**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.05.87**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **87/8712540**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 07 K 4/12
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(71) Přihlášovatel:
UCB S. A., Brusel, BE;

(72) Původce:
Bollen Alex dr., Itterbeek, BE;
Gobert Jean dr., Brusel, BE;
Wülfert Ernst dr., Brusel, BE;

(74) Zástupce:
Koreček Ivan JUDr., Na baště sv. Jiří 9, Praha 6, 16000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu

(57) Anotace:
Pěstuje se za příslušných podmínek buněčná kultura nebo mikroorganismus, tramsformovaný vektorem, obsahujícím řetězec, který je kodem pro lidský proapolipoprotein, v němž byla část přírodního kodového řetězce nahrazena fragmentem DNA, který je kodem pro tytéž aminokyseliny, avšak na základě jiného nukleotidového sledu, a takto produkovaný lidský proapolipoprotein A-I se izoluje.

CZ 3638-88 A3

3638-00
Tisk

JUDr. Ivan KOREČEK
Advokátní a patentová kancelář
160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6
Česká republika

Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu pomocí nových rekombinantních sledů DNA, které obsahují kód pro proapolipoprotein A-I lidského původu, pomocí vektorů pro klonování a expresi, které tuto DNA obsahují a pomocí hostitelských buněk, transformovaných těmito vektory pro expresi.

Dosavadní stav techniky

Proapolipoprotein A-I (apo A-I) lidského původu je hlavní proteinovou složkou lipoproteinů s vysokou specifickou hmotností (LDH) a chylomikronů v lymfě. Játra a tenké střevo jsou primárními místy pro syntézu apo-A-I. Tato látka se v uvedených orgánech systetizuje ve formě bílkovinového prekursoru, nazývaného ~~pro~~pre-proapo A-I. Ke štěpení tohoto preparátu dochází uvnitř buněk a proapo A-I je pak vylučován do plasmy a lymfy.

Proapo A-I obsahuje navíc šest aminokyselin (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln), které jsou vázány na aminoterminální zakončení apo A-I. Jakmile se tato látka dostane do krve, dochází k jejímu rozštěpení

in vivo specifickým proteolytickým enzymem apo A-I-propeptidázou za vzniku apo A-I.

Apo A-I je neglykosylovaný polypeptid se známým sledem, který je složen z 243 aminokyselin, jak bylo uvedeno v publikaci H.B. Brewer a další, Biochem, Biophys. Res. Commun. 80 (1978), str. 623-630. Tato látka je kofaktorem pro plasmatický enzym lecitinu cholesterolacyltransferázu, která je zodpovědná za vznik většiny esterů cholesterolu v krevní plasmě. Při vzniku poruch ve struktuře nebo v biosyntéze spolipoproteinu může dojít také k poruchám v transportním systému plasmatických lipidů a tím i k onemocnění koronárních tepen. Bylo prokázáno, že i když jsou množství apo A-I a LHD v krevní plasmě poměrně nízká, představují změny v množství těchto látek důležité riziko vzniku srdečních krisí (infarktu myokardu) i pro vznik jiných arteriosklerotických onemocnění cév.

Mutace genu, který je kódem pro apo A-I byly spojeny se snížením množství LHD v krvi a také se snížením předčasných onemocnění koronárních tepen.

Apo A-I a LHD jsou hlavními složkami, které se v krevní plasmě účastní transportu choleste-

rolu do periferních tkání, zejména do arterií směrem k játrům, což bývá také nazýváno inversním transportem cholesterolu, pro jeho vylučování z organismu. Vzhledem k tomu, že nahromadění cholesterolu v cévní tkání arterií je charakteristickým mechanismem vzniku arteriosklerózy, mělo by být možné stimulací inversního transportu cholesterolu působením apo A-I zpomalit nebo léčit arteriosklerotický proces a tím také snížit výskyt srdečních krisí.

Štěpení prekursoru proapo A-I na apo A-I může kvantitativně probíhat mimo buňku po dosažení krevního řečiště za dobu kratší než 12 hodin. Vzhledem k tomu, že proapo A-I je hlavním, ne-li jediným prekursorem zralého apo A-I, bylo by patrně možno tuto látku využít k substituční léčbě ve všech případech, při nichž dochází ke snížení množství LHD, například při vrozených nebo získaných deficiencích této látky. V případě, že by měl být obecně využit apo A-I k léčebným účelům, bylo by zapotřebí navrhnout způsob, jímž by tuto látku bylo možno získat ve velkých množstvích. Až dosud se uvedená látka získávala čištěním apo A-I z krevní plasmy.

V celé řadě publikací, například P. Cheung a L. Chan, Nucleic Acids Res. 11 (1983), 3703-3715, J.J.Seilhammer a další, DNA 3 (1984) 309-317 a v japonské patentové přihlášce č.96 998/86 bylo prokázáno, že je možno připravit komplementární DNA, která je kódem pro prepro-apo A-I způsoby, kterých se používá v genetickém inženýrství.

R. Lorenzetti a další v FEBS Lett. 194 (1986) 343-346 ukázali, že je možno dosáhnout exprese apo A-I v E. coli ve formě bílkoviny, která je vázána na β-galaktosidázu a není odštěpitelná. Až dosud pak byly snahy o expresi zralé bílkoviny apo A-I, nenavázané na další látku neúspěšné.

V japonské patentové přihlášce č. 96 998/86, uvedené svrchu se popisuje exprese bílkoviny, která je podobná apolipoproteinu A-I lidského původu. K expresi došlo v E. coli, která byla transformována při použití plasmidu pHAIE-I, obsahujícího gen se strukturou genu pro apo A-I pod řízením promotoru tac. Struktura uvedeného genu však nebyla úplná, gen sestával z kodonů pro aminokyseliny +4 až +243, tyto kodony předcházel kodon ATG pro počátek translace. V důsledku

toho obsahoval získaný produkt exprese N-terminální methionin (odpovídající kodonu ATG), který může vyvolat vznik sekundárních účinků v případě, že by tato látka byla použita k léčbě.

V publikaci J.B. Mallory a další, J. Biol. Chem. 262 (1987) 4241-4247 a v patentových spisech PCT WO 86/04920 a WO 87/02062 se popisuje exprese lidského apolipoproteinu A-I v ovariálních buňkách čínského křečka (tkáňová kultura). Při použité konstrukci bylo využito úplného genu pro pre-pro-apolipoprotein A-I lidského původu. Ovariální buňky čínského křečka jsou pravděpodobně schopné transformovat prekursor na zralý apo A-I, protože pouze 5 až 10 % vylučované bílkoviny uvedeného typu je pro-apo-A-I, kdežto zbytek je zralá bílkovina apo A-I. Produktivita získaného systému je však poměrně velmi nízká, protože množství $0,5 \times 10^6$ buněk vyloučí pouze 25 až 30 /ug/ml apo A-I v průběhu 24 hodin. V patentovém spisu PCT WO č. 87/02062 se několik příkladů provedení vztahuje k expresi apolipoproteinu A-I lidského původu v buňkách jiných hostitelů, například v buňkách bakterií (E. coli), v buňkách kvasnic (S. cerevisiae) a podobně.

Přesto však ani v jedné ze svrchu uvedených konstrukcí nebylo použito informace pro formu proapo a proteinem, k jehož expresi došlo, nebyl v žádném z uvedených případů lidský proapolipoprotein A-I.

Vynález se týká prostředků a metod pro získání lidského proapolipoproteinu A-I použitím rekombinantní DNA tak, aby byl získán zralý.proapo A-I, který je možno štěpit specifickým proteolytickým enzymem apo A-I propeptidázou. Pod pojmem " zralý" se v průběhu přihlášky nerozumí pouze lidský proapo A-I jako takový, nýbrž také odpovídající bílkovina, v níž je první aminokyselinou methionin, jehož přítomnost je důsledkem použití iniciačního kodonu ATG pro počátek translace při konstrukci vektoru pro expresi.

Vynález se rovněž týká konstrukce vektorů pro klonování a pro expresi, které obsahují sled SNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu tak, že získaná konstrukce umožňuje amplifikaci a v důsledku toho také expresi zralého lidského proteinu proapo A-I, jakož i met-proapo A-I, přičemž takto získané látky mohou být konjugovány fúzí nebo mohou být konjugovány s N-terminálním signálem. Vynález se rovněž

~~rovněž~~ využívá životaschopných tkáňových kultur, různých buněk nebo mikroorganismů, které byly geneticky pozměněny včleněním svrchu uvedených vektorů a jsou proto schopny produkovat lidský polypeptid proapo A-1. Mimo to by mělo být způsobem podle vynálezu možno získat uvedenou látku v poměrně čistém stavu bez dalších bílkovin, jeko je tomu při izolaci z přírodního prostředí. Vzhledem ke specifickému způsobu přípravy je tedy možno získat lidský proapo A-I, který je v podstatě prostý obvyklých endogenních bílkovin a jiných materiálů obvykle obsažených při jiných způsobech výroby.

Vynález se tedy týká způsobu výroby proapo A-I lidského původu při použití techniky s rekombinantní DNA. Tento způsob není omezen na specificky popsané příklady, které ho toliko objasňují.

Podstata vynálezu

Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu spočívá podle vynálezu v tom, že se 1) pěstuje za příslušných podmínek buněčná kultura nebo mikroorganismus ze skupiny E. coli, Saccharomyces cerevisiae nebo buněk Spodoptera frugiperda, transformovaný vektorem pro expresi, který obsahuje řetězec rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský proapolipoprotein A-I, vázaný operativním způsobem na řídící sled DNA a zavzatý mezi signály pro iniciaci a pro ukončení translace, přičemž ve sledu řetězce rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský apolipoprotein A-I, je vypuštěn fragment přírodního kódového řetězce pro aminokyseliny -6 až +14 a je nahrazen fragmentem DNA

5´-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGAC-TTG-3´

který je kódem pro tytéž aminokyseliny, přičemž tento sled obsahuje navíc iniciační kodon ATG a modifikované kodony pro aminokyseliny v polohách -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 a +12,

čímž dochází ke snížení nebo vyloučení tvorby struktur s dvojitým řetězcem a 2) takto získaný lidský apolipoprotein A-I se izoluje.

Podstatou vynálezu je tedy způsob výroby bílkoviny, která sestává ze zralého proapo A-I lidského původu nebo tuto látku obsahuje, přičemž tuto látku je možno převést in vitro nebo in vivo na zralý lidský apo-A-I působením proteolytických en-

zymů, zejména apo A-I-propeptidázy. Produkt této reakce, kterým je lidský proapo A-I je možno využít jako takový pro léčebné účely. Stejně dobře je možno využít také met-proapo A-I vzhledem k tomu, že přítomnost methionylového zbytku je z farmaceutického hlediska přijatelná, protože tento produkt je možno převést za přírodních podmínek a s velkou účinností v krevním oběhu působením přírodní propeptidázy na autentický zralý lidský apo A-I. Je-li to žádoucí, je možno získat lidský proapo A-I v mikroorganismech nebo ve zvolených tkáňových kulturách buněk, které jsou schopné odstraňovat methionin na N-terminálním zakončení a v důsledku toho i produkovat lidský proapo A-I ve formě, která již neobsahuje N-terminální methionin. Je také možno postupovat tak, že jak v případě, že tato látka obsahuje N-terminální methionin, tak v případě, že jej neobsahuje, může být lidská proapo A-I in vitro rozštěpen za získání zralého lidského apo A-I, který je možno využít k léčebným účelům. Stejně v případě, že je tato látka konjugována fúzí a konjugát obsahuje N-terminální signál proapo A-I, je možno štěpením získat autentický lidský apo A-I, prostý N-terminálního methioninu.

Další důležité hledisko způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se jako kódpro alespoň část molekuly lidského proapo A-I užije modifikovaného kódového sledu. Tanto modifikovaný sled, který je kódem pro uvedenou látku zlepšuje účinnost translace vzhledem k tomu, že snižuje nebo úplně zabraňuje vzniku struktury s dvojitým řetězcem. Ja pravděpodobné, že R. Lorenzetti a další v publikaci FEBS Letters 194 (1986) 343-346 nemohli pozorovat expresi zralé bílkoviny apo A-I bez fúze proto, že jejich konstrukce DNA vytvářela struktury s dvojitým řetězcem, což mohlo vést k neúčinné expresi. Bylo s překvapením zjištěno, že je možno dosáhnout účinné exprese tak, že se provede příslušná modifikace některých kodonů ve sledu, který je kódem pro aminokyseliny -6 až +14 řetězce proapo A-I. Pojem " příslušná modifikace" , tak jak je zde používán znamená, že se některé z přírodních kodonů v uvedené oblasti nahradí jinými kodony, které jsou podle genetického kódu kódem pro tytéž aminokyseliny, přičemž mimoto všechny takto provedené modifikace ve svém celku vedou ke snížení nebo dokonce k potlačení možnosti vzniku struktury s dvojitým řetězcem. Je také důležité, že všechny uvedené modifikace nemají naprosto žádný vliv na mís-

to, v němž je uvedená látka štěpena enzymem propeptidázou, protože místo v řetězci DNA, kde se uvedené změny provádějí jsou uskutečněny na jiném místě, takže sled aminokyselin, vytvářející místo působení enzymu zůstává zachován.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno získat proapo A-I lidského původu jako produkt buněčné kultury nebo geneticky modifikovaného mikroorganismu. Tento proapo A-I lidského původu může být získán jako zralý proapo A-I, ve formě proapo A-I, před nímž je uložen zbytek methioninu, ve formě složené bílkoviny, K kterou může být například beta-galaktosidáza-proapo A-I a ve formě sloučeniny preproapo A-I. Takto získaný produkt je v podstatě prostý obvyklých endogenních bílkovin a dalších látek, které se obvykle vyskytují v materiálech získaných z přírodních zdrojů, jako je krevní plasma v případě svrchu získávané bílkoviny. Tkáňové kultury pro toto použití nebo mikroorganismy, využívané k produkci uvedených látek nejsou omezeny na použité buněčné linie nebo na specifické organismy. K uvedenému účelu je možno použít jak buňky eukaryotických, tak buňky prokaryotických organismů, což znamená

i možnost použití živočišných a lidských buněčných linií. Pouze jako příklad je možno uvést možnost exprese v mikroorganismu Escherichia coli (jako představitel prokaryotických buněk), dále kvasinky saccharomyces cerevisiae a také hmyzí buňky, infikované bakulovirem jako representanty eukaryotických buněk.

Na bílkovinné úrovni se vynález týká způsobu výroby apo A-I lidského původu, který je možno získat tak, že se působí na proapo A-I lidského původu enzymem apo A-I-propeptidázou. Takto získaný apo A-I z lidského proapo A-I, získaného způsobem podle vynálezu je identický s autentickou formou zralého, lidského apo A-I a je také prostý methininového zbytku na N-terminálním zakončení.

Pokud jde o použití takto získaných látek, je možno proapo A-I, lidského původu, získaný způsobem podle vynálezu a/nebo lidský apo A-I zpracovat na farmaceutické prostředky, které budou kromě svrchu uvedených účinných látek obsahovat ještě alespoň jeden nosič, přijatelný z farmaceutického hlediska, rozpouštědlo, ředidlo a podobně podle předpokládaného způsobu podání a podle pomocných látek, obvykle ve framacii k uvedenému účelu užívaných.

Na úrovni DNA se vynález týká získání rekombinantního sledu DNA s obsahem řetězce, který je kódem peo lidský proapolipoprotein A-I, v němž byla část přirozeného kódového sledu pro tuto látku nahrazena fragmentem DNA, který je kódem pro tytéž aminokyseliny jako přírodní sled, avšak sestává z odlišného sledu nukleotidů tak, aby byla snížena nebo zcela vyloučena tvorba struktur s dvojitým řetězcem. Podle jednoho z velmi výhodných provedení se přírodní sled, který je kódem pro aminokyselina v polohách - 6 až +14 v proapo A-I nahradí následujícím sledem:

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGA-
GTTAAGGACTTG-3',

přičemž tento sled obsahuje navíc iniciační kodon ATG pro translaci a modifikované kodony pro zbytky aminokyselin a polohách -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 a +14.

Vynález se rovněž vztahuje k získání vektorů pro klonování s obsahem uvedené rekombinantní DNA a vektorů pro expresi, které obsahují svrchu uvedený sled, který je kódem pro lidský proapo A-I. Vynález se zvláště týká způsobu získání rekombinantních plasmidů

pULB9292,
pULB9291, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 a pNIV1612, jejichž konstrukce bude dále popsána. První z uvedených plasmidů, pULB9291 a pULB9292 obsahují gen s modifikovanou strukturou genu pro proapo A-I, před nímž se nachází kodon ATG pod řízením promotoru P_L z fágu lambda. Tyto plasmidy jsou vektory pro expresi, které je možno použít v případě E. coli a které řídí syntézu lidského proapo A-I, který může být štěpen propeptidázou za vzniku zralého lidského apo A-I v autentické formě. V případě, že se tento plasmid včlení do E. coli řídí plasmid pULB9296 expresi bílkoviny, která je vázána na beta-galaktosidázu pod řízením oblastí lac promotoru z E.coli. Vzhledem k tomu, že takto získaný produkt, obsahující lidský proapo A-I a beta-galaktosidázu obsahuje také řetězec, v němž dochází ke štěpení působením propeptidázy, je možno jej rozštěpit za vzniku zralého autentického lidského apo A-I.

Plasmid pULB9299 je vektor pro expresi, který je vhodný pro použití u kvasinek a obsahuje oblasti promotoru a terminátoru transkripce pro zajištění účinné exprese u kvasinek. Takto získaný lidský proapo A-I je opět možno rozštěpit působením propeptidázy a získat tak zralý autentický lidský apo A-I.

Jako terminátoru transkripce se v případě kvasinek s výhodou užije ARG3 k zajištění účinné exprese.

Plasmid pNIV1612 obsahuje gen pro strukturu proapo A-I, spojeného se sledem DNA signálního peptidu pro bílkovinu OmpA z E. coli pod řízením promotoru lpp (lipoprotein) a promotoru operátoru lac. V této konstrukci předchází sled, který je kódem pro signální peptid OmpA sled pro proapo A-I bez kodonu ATG pro počátek translace. Plasmid je příslušným vektorem pro sekreci pro E. coli a řídí syntézu lidského proapo A-I, který může být vylučován do periplasmatu bez N-terminálního methioninového zbytku. Plasmid pNIV1613 je vektor pro,přenos a včlenění sledu DNAc pro proapo A-I lidského původu do bakuloviru. Obsahuje polyhedrinový promotor bakuloviru a gen, který je kódem pro strukturu proapo A-I a obsahuje kodon ATG pro počátek translace. Ve spojení s kmene, který je zdrojem bakuloviru (Autographa californica polyhdrosis virus, AcNPV) řídí plasmid pNIV1613 syntézu proapo A-I v buňkách hmyzu a vzhledem ke změnám, k nimž dochází v hmyzích buňkách je možno jej tímto způsobem získat bez N-terminálního methioninového zbytku.

Vynález se konečně také týká způsobu získávání buněčných kultur a mikroorganismů, které byly transformovány vektorem pro klonování nebo vektorem pro expresi, tak jak byly svrchu popsány, vynález se zvláště týká způsobu pěstování buněčných kultur a mikroorganismů, transformovaných a schopných produkovat proapo A-I lidského původu. Pod pojmem " transformovaný" , tak jak je v průběhu přihlášky používán se rozumí v širokém smyslu organismus " geneticky modifikovaný", takže není účelem přihlášky se omezit pouze na úzký pojem " bakteriální transformace". Podle povahy použitého vektoru a podle zvoleného hostitele je možno použít jakoukoliv vhodnou techniku, která se v současné době v oboru genetiky používá, jako je například, transfekce, transdukce a podobně.

Kultury buněk mikroorganismů které byly získány způsobem podle vynálezu je možno využít k produkci proapolipoproteinu A-I lidského původu tak, že se uskuteční fermentace pozměněných mikroorganismů v průmyslovém měřítku.

Účelu, který si vynález klade za úkol je zásadně možno dosáhnout také při použití různých

kmenů mikroorganismů, například kmene MM 294 mikroorganismu E. coli K12 (endoA thi$^-$, hsdR, supE); tento kmen byl uložen ve veřejné sbírce kultur American Type Culture Collection (ATCC č. 33 625) kde je k disposici bez omezení, pokud jde o jeho dostupnost. Je však možno využít ještě další mikrobiální kmeny, například některé známé kmeny E. coli, jako E. coli B, E. coli x 1776 ((ATCC č. 31537, kmen uložen 3. července 1979, dostupný bez omezení), dále E. coli AR58, který je odvozený od kmene N99 (ATCC č. 33956) s cIII$^-$, cI 857, bio$^-$ funkce delta H-zbavený lambda (dodává PL-Pharmacia), mikroorganismus byl popsán v publikaci J.E. Mott a další, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82 (1985),88-92, G.Devare a další, Cell 36, (1984), 43-49, dále je možno užít kmen E. coli JM101 (ATCC č. 33876), popsaný v publikaci Messing a další, Nucleic Acids Res 9 (1981), 309-321 nebo E. coli JA221 (lpp$^-$, hdsM$^+$, trpE5, leuB6, LacY, recAI/F', lacI$^-$, lac$^+$, pro$^+$), tento kmen byl popsán v publikaci J. Ghrayeb a další, EMBO J. 3 (1984), 2437-2442 nebo ještě další mikrobiální kmeny, jichž byla řada uložena do sbírek a jsou dostupné v různých veřejných sbírkách mikroorganismů, jako například sbírka American

Type Culture Collection (ATCC), která vydává katalogy mikroorganismů, které v ní jsou uloženy. Z dalších mikroorganismů by bylo možno uvést například některé Bacilli, například Bacillus subtilis a další Enterobacteriaceae, z nichž je možno uvést například Salmonella typhimurium nebo Serratia marcescens, u nichž je možno dosáhnout replikace a exprese řetězců heterologních genů.

Plasmidy pro expresi pro použití u bakterií, například v případě E. coli se obvykle získávají tak, že se vychází z plasmidu pBR322, který se užije jako vektor (je uložen ve sbírce ATCC pod číslem 37017) a do tohoto plasmidu se pak včleňují příslušným způsobem sledy heterologních genů a současně také signály pro počátek a ukončení translace v příslušné fázi s funkčním promotorem, přičemž se využívá výhod přítomnosti přirozeně se vyskytujících míst pro působení restrikčních enzymů nebo se taková místa syntheticky vytvoří. Vektor může nést jeden nebo větší počet genů, které jsou charakterizovány svým výběrem fenotypu a počátkem replikace pro zajištění amplifikace v buňkách hostitele. Heterologní včleněný sled je možno uložit tak, aby docházelo k jeho expresi současně s předběžným sledem, s nímž je požadovaný sled spojen, jako je tomu například v případě genů systému lac.

Vektory pro expresi pro bakulovirus, například plasmidy pAcRP6 nebo pAcYM1, popsané v publikaci Y. Matsuura a další, J. Gen. Virol. 68 (1987), 1233-1250 a pro Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) je rovněž možno široce použít. Tyto vektory jsou podrobně popsány v literatuře a je možno je získat z Texas Agricultural Experiment Station.

Při provádění způsobu podle vynálezu je možno jako hostitelských buněk pro kompatibilní vektory využít také různých hmyzích buněk, například buněk Spodoptera frugiperda Sf9, popsaných v publikaci M.D. Summer a G.E. Smith: A manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas University College Station (1987). Kmen byl uložen jako ATCC CRL 1711.

Při provádění způsobu podle vynálezu je rovněž možno využít vektorů pro expresi, které jsou kompatibilní s různými kmeny kvasinek, například plasmid YRp7, popsaný v publikaci D.T.Stinchcomb a další, Nature 282 (1979), 39-43, který je schopný selekce a replikace v E. coli i v kvasinkách, zejména v Saccharomyces cerevisiae.

Kvasinkové kmeny, které je možno k uvedeným účelům použít jsou kmen RH218, popsaný v publikaci G. Miozzari a další, J. Bacteriol. 134 (1978), 48-59, který byl uložen do American Type Culture Collection bez omezení pod číslem ATCC 44076, dále kmen 10S44c, popsaný v publikaci T. Cabezon a další, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 81 (1984), 6594-6598, který je genotypem leu2-3, leu2-112, pep4-3 a byl popsán v publikaci M. Hoylaerts a další, FEBS Lett. 204 (1986), 83-87 a dále kmen Ic 1697d (argJ, leu2-1), bradytrofní pro arginin (ATCC 20 631).

V případě, že je zapotřebí dosáhnout exprese heterologního genu, jako je DNAc pro proapo A-I lidského původu v buňkách kvasinek, je zapotřebí zkonstruovat vektor, kterým je obvykle plasmid s obsahem čtyř složek.

První složkou je fragment, který dovoluje transformaci jak E. coli, tak kvasinek a který proto musí obsahovat gen pro selekci, původem z každého z těchto organismů. Může to být gen pro odlnost proti ampicillinu z E. coli ("AmpA") a gen leu2 z kvasinek. Pak vyžaduje uvedená konstrukce ještě počátek repli-

kace, původem z každého z uvedených organismů, který je možno zachovat jako plasmidovou DNA v obou uvedených organismech. Může ~~ní~~ jít o počátek z E. coli z plasmidu pBR322 a o počátek arsl z chromosomu III kvasinek nebo o počátek pro replikaci cirkulárního typu DNA 2 /u.

Druhou složkou plasmidu sled, uložený v poloze 5' kvasinkového genu, u něhož dochází k silné expresi za uskutečnění transkripce genu se strukturou, uloženou za ním. Sledem, uloženým v poloze 5' může být sled z genů TDH3 nebo ARG3 z kvasinek. Fragment se sestrojí tak, že dojde k vynechání řetězců ze struktury genů TDH3 nebo ARG3, přičemž tyto řetězce se nahradí řetězci, které obsahují alternativní místa pro působení restrikčních enzymů, například pro restrikční enzymy NcoI nebo BamHI, takže je možno snadno zapojit tento řetězec do polohy 5' ve struktuře svrchu uvedeného genu.

Třetí složkou uvedené konstrukce je gen, jehož struktura je zkonstruována tak, že obsahuje současně signál ATG pro počátek translace a signál pro ukončení této translace.

Čtvrtou složkou svrchu uvedené konstrukce je řetězec DNA kvasinky, který obsahuje sled, uložený do polohy 3' genu kvasinky a obsahuje příslušné signály pro ukončení transkripce a pro polyadenylaci. Na příklad plasmidy, které řídí produkci proapo A-I lidského původu v kvasinkách mohou být konstruovány tak, že se fragmenty genu pro polypeptid proapo A-I lidského původu uloží do místa pro působení restrikčního enzymu BamHI plasmidu pRIT ~~pro-apoA-I~~ 10774 pro expresi, který byl popsán v evropském patentovém spisu č.151102.

Vynález bude dále popsán v souvislosti s přiloženými výkresy a také v souvislosti s popisem výhodných provedení způsobu podle vynálezu, zejména pokud jde o konstrukci vektorů a rekombinantní DNA.

Příklady provedení vynálezu

Na obr. 1A a 1B je znázorněn nukleotidový sled a řetězec aminokyselin pro lidský preproapo-A-I. Nukleotidový sled pro m-RNA lidského preproapo A-I byl zjištěn na základě analyzy sledů DNA a cDNA klonu pULB1609. Aminokyseliny jejichž přítomnost je předpokládána v signálním peptidu, propetidu a vlastním úplném polypeptidu apo A-I jsou uvedeny a označeny od prvního zbytku aminokyseliny bílkoviny apo A-I. Podtržena je oblast, která odpovídá syntetické sondě DNA, která byla užita pro izolaci uvedeného klonu.

Byly užity následující jednopísmenové zkratky pro označení aminokyselinových zbytků:
A-alanin, C-cystein, D-kyselina asparagová, E-kyselina glutamová, F-fenylalanin, G-glycin, H-histidin, I-isoleucin, K-lysin, L-leucin, M-methionin, N-asparagin, P-prolin, Q-glutamin, R-arginin, S-serin, T-threonin, V-valin, W-tryptofan a Y-tyrosin.

Na obr. 2 je znázorněno schema pro syntézu oligonukleotidového řetězce, který byl užit pro konstrukci fragmentu DNA, který je kódem pro 6 aminokyselin propeptidu a pro prvních 14 aminokyselin úplného polypeptidu apo A-I spolu s iniciačním kodonem

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.
14 VI 1

ATG. Jsou označeny oligonukleotidy, užité pro syntézu fragmentu NcoI-BalI s 65/61 páry bazí (pb).

Na obr. 3 je znázorněna konstrukce plasmidu pULB9291, který obsahuje řídící oblasti P_L lambda a nukleotidový sled pro proapo A-I.

Na obr. 4 je znázorněna konstrukce plasmidu pULB9296, který obsahuje promotor lac z E. coli a nukleotidový sled, který je kódem pro β-galaktosidázu, spojený se sledem pro proapo A-I.

Na obr. 5 je znázorněna konstrukce plasmidu pULB9299, který obsahuje řídící oblasti ARG3 kvasinek a mimoto nukleotidový sled pro proapo A-I.

Na obr. 6A, 6B a 6C je znázorněna konstrukce plasmidu pNIV1612, který obsahuje řídící oblasti lac a lpp, dále kódový sled pro signální peptid ompA a nukleotidový sled pro proapo A-I.

Na obr. 7 je znázorněna konstrukce plasmidu pNIV1613, který obsahuje řídící oblast polyhedrinového genu a nukleotidový sled, který je kódem pro proapo A-I.

Příprava RNA

Celková RNA z lidských jater se připraví způsobem s použitím guanidiniumchloridu, popsaným v publikaci Cox R.A., Methods Enzymol. XII, část B (1968), 120-129. Takto získaná RNA se pak nechá projít sloupcem s obsahem oligo(dT)-celulózy k získání celkové polyA$^+$RNA způsobem podle publikace Maniatis a další, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1982). Z 10 g lidských jater je tímto způsobem možno získat 200 /ug celkové polyA$^+$RNA.

Syntéza komplementární DNA (cDNA) in vitro

Reversní transkripce se při použití 0,1 až 5 /ug polyA$^+$RNA zahájí při použití přibližně 1 /ug oligo(dT)$_{12-18}$ (Boehringer). Získaná cDNA s jedním řetězcem se pak transformuje na cDNA s dvojitým řetězcem (cdbDNA) působením enzymu reversní transkriptázy. Vzorky této látky v množství přibližně 1 /ug se zpracovávají působením S1 nukleázy k získání vazných zakončení. Tento postup je v oboru dobře znám a byl podrobně popsán v publikaci T. Maniatis a další, tak jak byla svrchu uvedena. Pak se na tato volná zakončení

naváže oligo(dC) způsobem, popsaným v publikaci Villa-Komaroff a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978), 3727-3731. Obvykle se působí na 10 ng cdbDNA enzymem deoxynukleotidyltransferázou (terminální). Na 3-zakončení molekuly cdbDNA se naváže obvykle zbytek o délce 15 bazí.

Klonování cdbDNA s vaznými zakončeními v plasmidu pBR322

DNA plasmidu pBR322 se linearizuje působením enzymu PstI a zakončení se vyplní oligo(dG) způsobem podle publikaceLawn R.M. a další, Nucleic Acids Res. 9 (1981), 6103-6114. Pak se cdbDNA s vaznými zakončeními oligo(dC) smísí v ekvimolekulárním poměru s DNA z plasmidu pBR322 s vaznými zakončeními oligo(dG). Obvykle s k recirkularisaci plasmidu hybridizuje 50 /ug směsi. Podmínky této reakce jsou v oboru dobře známy a byly podrobně popsány v publikaci R.M. Lawna, tak jak byla svrchu uvedena. Hybridizační směs se pak užije k transformaci příslušných buněk kmene MM294 E. coli, například způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci R.M. Lawna a dalších. Selekcí pěstováním na prostředí s obsahem tetracyklinu je možno získat několik stovek transformantů, odolnost proti tomuto antibioti-

ku je vlastní ~~xx~~ plasmidu pBR322. Transformanty byly rovněž zkoušeny na svou citlivost proti ampicilinu. Ty, které byly citlivé, obsahují chimérní plasmid, takže včlenění cizorodé DNA do vektoru inaktivuje gen pro odolnost proti ampicilinu.

Třídění získané sestavy cDNA.

Transformanty E. coli byly tříděny při použití synthetických oligonukleotidů a označeny na svém 5´-zakončení pomocí ^{32}P, zakončení odpovídá fragmentu genu pro apo A-I. Sled nukleotidů peo apo A-I lidského původu je znám například ze svrchu uvedených publikací Cheunga a Chana a také J.J. Seilhamera a dalších a je tedy v důsledku toho možné jej chemicky synthetizovat způsobem, popsaným v publikaci N.Sinha a další, Nucleic Acids Res. 12 (1984), 4539 - 4557 ve formě nukleotidové sondy, která obsahuje 22 bazí, odpovídajících 5´-zakončení uvedeného genu. Vybraný řetězec má následující sled: 5´-GCTGCGGTGCTGACCTTGGCCG-3´. Před použitím k hybridizaci byl synthetický oligonukleotid fosforylován na svém 5´-zakončení působením T4-polynkuleotidkinázy (P-L Biochemicals) a (gamma^{32}P)ATP.

Podmínky pro značení a hybridizaci jsou v oboru známy a byly podrobně popsány ve svrchu uvedené publikaci T. Maniatise a dalších a v publikaci A. Bollen a další, DNA 2 (1983), 255-264.

Konstrukce plasmidů pro expresi

Způsoby výroby DNA, izolace fragmentů DNA, jakož i podmínky analyzy působením restrikčních enzymů a podmínky navázání fragmentů jsou v oboru známy a byly podrobně popsány v publikacích R.M.Lawna a dalších a T. Cabezona a dalších, tak jak byly svrchu uvedeny a je možno je v tomto případě použít.

Dále bude popsána syntéza fragmentů pro vazbu promotoru vektorů pro extresi na 5'-zakončení genu.

Syntéza fragmentu NcoI-BalI.

Na obr. 2 jsou podrobně popsány principy, které jsou podkladem pro oligonukleotidy s obsahem 35, 30, 18 a 43 bazí kterých se užívá při syntéze fragmentu NcoI-BalI s 65/61 pb. Synthetické fragmenty s

30 a 18 bazemi se na svých 5´-zakončeních fosforylují působením enzymu T4-polynukleotidkinázy (P-L Biochemicals). Pak se 1 /ug každého oligonukleotidu včetně oligonukleotidů a 35 a 43 bazemi, které nejsou fosforylovány hybridizuje 3 minuty při teplotě 95° C ve 300 mM octanu sodném o pH 7,0, načež se směs nechá pomalu zchladnout na teplotu 4° C. Pak se hybridizační směs užije jako taková v průběhu klonování pro konstrukci plasmidů pro expresi.

Zjištění sledu DNA

Analyza sledu DNA byla prováděna způsobem, popsaným v publikacích A.M. Maxam a W. Gilbert Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 560-564 a F. Sanger a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467.

Analyza bílkovin

Usazeniny buněk s hustotou 1 jednotky při 630 nm (1 OD_{630})se získají v různých stupních v průběhu fermentace kmenů, které obsahují plasmidy

pro expresi proapo A-I lidského původu, pULB9291, pULB9292, pULB9296 a pULB9299 (užité k transformaci kmenů AR58 a JM101 E. coli a kmene 10S44c kvasinek). Každý vzorek se znovu uvede do suspenze v pufru 50 mM tris-HCl o pH 6,8 s obsahem 2 % dodecylsíranu sodného (DSS), 6 M močoviny, 10 % glycerolu a 5 % 2-merkaptoethanolu, směs se zahřeje na 3 minuty na teplotu varu, načež se vzorky podrobí elektroforéze na polyakrylamidovém gelu podle publikace U.K Laemmli, Nature 227, (1970), 680 - 685. K detekci bílkovin se užije coomasiová modř a synthetizovaný proapo A-I lidského původu se identifikuje po elektroforetickém přenosu imunologicky (A. Bollen a další, svrchu).

Konstrukce rekombinantních vektorů pro expresi proapo A-I lidského původu v bakteriích, kvasinkách a v buňkách hmyzu, infikovaného bakulovirem.

1. Klon cDNA pro lidský preproapo A-I: pULB1609 (obr.1).

Několik stovek transformantů, získaných klonováním cdbDNA, odpovídající polyA$^+$RNA z lidských jater, v místě po štěpení enzymem PstI plasmidu pBR322 se třídí pomocí synthetického oligonukleotidu jako son-

dy s 22 nukleotidy pro apo A-I, tak jak byla svrchu popsána. U jednoho z klonů bylo možno pozorovat v průběhu sledování intensivní hybridizační signál. Tanto klon, který byl označen pULB1609 byl izolován a včleněná DNA, obsažená v tomto plasmidu byla charakterizována analyzou svého sledu. Délka tohoto včleněného sledu je 878 párů bazí (pb). Tato DNA je kódem pro úplný polypeptid preproapo A-I lidského původu. Jak je znázorněno na obr. 1, klonovaný fragment cDNA obsahuje nekódové oblasti na 3´ a 5´zakončení o 19 bp a 55 bp, dále sled o 54 pb, který je kódem pro prekursor (aminokyseliny -24 až -7, sled pro propeptid o 18 pb (aminokyseliny -6 až -1) a sled o 732 bp, který je kódem pro úplný apo A-I (aminokyseliny 1 až 243) spolu s terminačním kodonem pro ukončení translace. Řetězec bílkoviny, odvozené od tohoto sledu DNA přesně odpovídá sledu aminokyselin, které jsou obsaženy v preproapo A-I v nezávisle izolovaných klonech cDNA (W.C.Barker a další, Comp. Biochem- Physiol. 57B, (1977), 309-315, Japonská patentová přihláška č. 96998/86, P. Cheung a L. Chan, svrchu a J.J. Seilhamer a další, svrchu).

2. Konstrukce vektoru pro expresi v bakteriích s obsahem sledu cDNA proapo A-I lidského původu: pULB9291 (obr. 2 a 3).

Plasmid pULB9291, při jehož expresi vzniká proapo A-I lidského původu je možno zkonstruovat tak, že se uloží segment z klonu pULB1609 za řídící oblast promotoru P_L lambda, jak je znázorněno na obr. 3. Konstrukce tohoto plasmidu pro expresi vyžaduje syntézu fragmentů DNA, které obsahují místo působení restrikčního enzymu NcoI, iniciační kodon ATG pro počátek translace a sled nukleotidů, který je kódem pro aminokyseliny genu se strukturou pro proapo A-I lidského původu až do prvního místa působení restriční endonukleázy BalI, jak je znázorněno na obr. 2.

Pomocný řetězec se připraví synthetickým způsobem (N.D. Sinha a další, svrchu). Připraví se čtyři synthetické oligonukleotidy; po hybridizaci jsou kodem pro methionin, odpovídající iniciačnímu kodonu ATG pro počátek translace, pro 6 aminokyselin, odpovídajících propeptidu a pro 14 prvních aminokyselin úplného apo A-I lidského původu, jak je znázorněno na obr. 2. Pomocný řetězec byl synthetizován proto, aby

byla na nejnižší míru snížena tvorba sekundárních struktur na 5'-zakončení genu. K tomuto účelu byly vybrány kodony, které jsou kódem pro aminokyseliny -6, -1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 a 14 tak, že neodpovídají přírodním kodonům pro tyto aminokyseliny, které je možno nalézt v cDNA klonu pULB1609.

Svrchu uvedený pomocný řetězec se užije pro spojení fragmentu DNA o 744 pb z plasmidu pULB1609 s promotorem P_L lambda v plasmidu pro expresi pULB1221.

Konstrukce vektoru pro expresi pULB1221 je popsána v evropském patentovém spisu č. 186 643. Tato konstrukce sestává ze tří základních etap, vychází se z plasmidu pCQV2. Plasmid pCQV2 je popsán v publikaci C. Queen, J. Mol. ~~Xxxxx~~ Appl. Genet, 2 (1983), 1-10 a je volně dostupný.

Volba určitého vektoru není závazná. Je možno užít jakýkoliv jiný vektor, který obsahuje promotor a před ním příslušné místo pro působení restrikčního enzymu NcoI. Naváže se přibližně 0,1 /ug svrchu popsaných synthetických fragmentů působením DNA-ligázy T4 na přibližně 1 /ug fragmentu BalI-PstI o 744 pb z plasmidu pULB1609 a přibližně 1 /ug vektoru, kterým je plasmid pULB1221, rozštěpený NcoI a BalI.

Před uskutečněním vazby se fragment BalI-PstI o 744 pb zpracovává působením T4 DNA-polymerázy, že se zakončení změní na 3-vazná zakončení. Tento postup je v oboru znám a byl popsán v publikaci T. Maniatis a další, uvedené svrchu.

Po amplifikaci v příslušných hostitelských buňkách kmene AR58 E. coli byly rekonstruované plasmidy charakterizovány analyzou restrikčních míst a stanovením sledu DNA synthetických fragmentů a míst spojení. Jeden z rekombinantních plasmidů, pULB9291 splňoval všechna kriteria, protože obsahoval všechny fragmenty ve správném pořadí a směru, tento plasmid byl použit pro studie exprese.

3. Konstrukce vektoru pro expresi v bakteriích s obsahem složeného sledu pro beta-galaktosidázu a pro lidský proapo A-I: plasmid pULB9296 (obr. 4).

Při této konstrukci se sled DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I uloží před sled DNA, který je kódem pro beta-galaktosidázu ve správném pořadí a s tímto sledem se spojí. Gen pro beta-galaktosidázu se nachází v plasmidu pro expresi v E. coli

pUR288, který je volně dostupný, byl popsán v publikaci U. Ruther a B. Muller-Hill, EMBO J., 2 (1983), 1791-1794 a nese promotor lac v účinné formě a mimoto obsahuje příslušná restrikční místa pro sled beta- galaktosidázy. Příslušný rekombinantní plasmid se zkonstruuje tak, jak je znázorněno na obr. 4. Především se DNA plasmidu pUR288 rozštěpí působením enzymu BamHI, pak se zpracovává působením T4-DNA-polymerázy, načež se znovu rozštěpí enzymem SalI. Pak se postupně izoluje fragment o velikosti 805 pb z plasmidu pULB9291 štěpením působením restrikčního enzymu KpnI, působením T4-DNA-polymerázy a nakonec štěpením restrikčním enzymem Sal.I. Oba fragmenty se naváží v molárním poměru působením T4-DNA-ligázy a získaný plasmid se užije k transformaci hostitelských buněk kmene JM101 E. coli, což je volně dostupný kmen ATCC č. 33 876. Získané transformanty se ověří analyzou působením restrikčních enzymů k průkazu správné orientace sledu pro proapo A-I lidského původu vzhledem ke genu pro beta-galaktosidázu a na přítomnost místa pro působení restrikčního enzymu BamHI, které je rekonstruováno ve spojení obou uvedených sledů. To znamená, že sled, který je kódem pro proapo A-I lidského původu je zařazen před sled

pro beta-galaktosidázu ve správné fázi. Jeden z transformantů, obsahující plasmid pULB9296 splňoval všechna kriteria a byl pak použit při studiích na expresi.

4. Konstrukce plasmidu pro expresi u kvasinek pULB9299, který obsahuje sled DNA, který je kódem pro proapo-A-I lidského původu (obr. 5).

Při této konstrukci se sled cDNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu klonuje mezi signálem promotoru a terminačního kodonu v plasmidu pro expresi u kvasinek. K těmto pokusům byl vybrán bektor pro expresi u kvasinek pRIT10774. Konstrukce plasmidu pro expresi pRIT10774 je popsána v evropské patentové přihlášce č. 151 102. Tento vektor byl zkonstruován na jedné straně z plasmidu pRIT 10749, uloženého ve sbírce ATCC pod číslem 39133 podle Budapeštské úmluvy a nadruhé straně z vektoru YEp13 pro E- coli-Saccharomyces cerevisiae, který byl popsán v publikaci J.R. Broach a další, Gene, 8 (1979), 121-133, a který je dostupný ve sbírce ATCC pod číslem 37 115. Vektor pRIT 10774 je schopen replikace v E. coli i v kva-

sinkách a nese promotor e terminátor transkripce ornirhinkarbamoyltransferázy (ARG3), který je oddělený jediným místem pro působení restrikčního enzymu BamHI, vhodným pro včlenění cizorodé DNA spolus příslušným iniciačním kodonem ATG pro počátek translace. Mimoto obsahuje vektor sledy 2/u kvasinek, metabolické značení pro selekci v kvasinkách a značení AmpA pro selekci po transformaci E. coli tímto vektorem. Není tovšak jediný vektor, jehož by bylo možno užít pro dosažení exprese proapo A-I lidského původu v kvasinkách. Je zásadně možno užít jakýkoliv jiný vektor pro kvasinky, který obsahuje řídící signály a jeho použití pak povede k získání kvalitativně obdobných výsledků. Konstrukce, která je znázorněna na obr. 5 se provádí následujícím způsobem: DNA z plasmidu pRIT10744 se linearizuje působením restrikčního enzymu BamHI a pak se na ni působí T4 polymerázou DNA.

Dále byl izolován z plasmidu pULB9291 působením restrikčních endomukleáz Asp 718 a SalI fragment DNA o velikosti 810 pb a tento fragment byl pak podroben působení T4 polymerázy DNA. Tento fragment je kódem pro proapo A-I lidského půcovu a současně obsahuje i iniciační kodon ATG pro počátek tramslace. Oba fragmenty, získané svrchu uvedeným způsobem se

vzájemně naváží v ekvimolárních poměrech působením T4 DNA-ligázy a získaná směs se použije k transformaci příslušných buněk E. coli kmene MM 294. Transformanty se sledují pomocí restrikční analyzy, aby bylo možno ověřit správnou orientaci sledu DNA pro proapo lidského původu vzhledem ke sledu promotoru ARG3, Jeden z transformantů obsahoval rekombinantní plasmid pULB9299, který splňoval všechny požadavky. Tento plasmid pULB9299 byl schopen amplifikace v E. coli a pak byl použit k transformaci sferoplastů kvasinky Saccharomyces cerevisiae, kmen 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112) podle svrchu uvedené publikace T. Cabezona a dalších.

Použití kmene Ic 1679d (ATCC č. 20631) vedlo k získání kvalitativně obdobných výsledků. Transformaty kvasinek pak byly zkoumány na schopnost exprese proapo A-I lidského původu.

5. Konstrukce vektoru pro použití u bakterií s obsahem sledu DNA pro proapo A-I lidského původu: pNIV1612 (obr. 6A, 6B, 6C).

Při provádění této konstrukce se sled DNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu zařadí ve správné fázi za sled DNA signálního peptidu bílkoviny OmpA z E. coli. K tomuto sledování byl vybrán vektor pro sekreci pIN-III-ompA-2, popsaný v publikaci J. Ghrayeb a další, EMBO J. 3 (1984), 2437-2442. Tento vektor a tímto vektorem transformovaný kmen E. coli JA221 jsou dostupné na požádání v Department of Biochemistry of the State University of New Yourk (Stony Brook).

Tento vektor pro sekreci obsahuje velmi účinný promotor lpp (lipoprotein), frament promotoru-operátoru lac, sled lacI represoru lac a příslušná místa pro působení restrikčních endonukleáz, uložená bezrpostředně za sledem, který je kódem pro signální peptis genu ompA.Příslušný rekombinantní plasmid je možno zkonstruovat způsobem, který je znázorněn na obr. 6A, 6B a 6C. V první řadě se vektor pro sk sekreci pIN-III-ompA-2 linearizuje působením restrikčního enzymu EcoRI a pak se pdrobí působení T4-DNA-polymerázy. Pak se z plasmidu pULB9291 vyjme fragment o velikosti 805 pb tak, že se postupně působí restrikčními endo-

nukleázami KpnI a SalI, načež se na získanou směs působí T4-DNA-polymerázou. Uvedený fragment je kódem pro proapo A-I lidského původu a obsahuje iniciační kodon ATG pro počátek translace.Oba takto získané fragmenty se navzájem naváží v ekvimolárním poměru působením T4-DNA-ligázy a takto získaná směs se pak použije k transformaci příslušných buněk kmene JA221 E. coli, pěstovaných na živném prostředí M9, popsaném v publikaci J.H. Miller, " Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring HarborLaboratory, Cold Spring Harbor, New York 1972, str. 431. Prostředí obsahuje 20 mg/l $T_r$yptofanu, 20 mg/l leucinu, 2g/l laktózy a 50 mg/l ampicilinu. Získané transformanty se podrobí selekci podle své odolnosti proti ampicilinu a pak se třídí při použití oligonukleotidu s obsahem 18 bazí. Jde o syntetický oligonukleotid, který byl použit také při syntéze pomocného řetězce, jak je znázorněno na obr.2.

Transformanty, které byly získány selekcí se pak podrobí kontrole analyzou svého sledu působením restrikčních endonukleáz k ověření správné orientace sledu DNA pro proapo A-I lidského původu vzhledem ke sledu DNA, který je kódem pro signální peptid, obsažený ve vektoru pro sekreci (v místě spojení

obou sledů je rekonstituováno místo působení restrikčního enzymu EcoRI). Jeden z transformantů nese rekombinantní plasmid, který splňuje všechny požadavky. Řízenou mutagenezou se pak odstraní přebytečný sled, který pochází z konstrukce pomocného řetězce a který je v následujícím nukleotidovém sledu podtržen:

5'- GTA GCG GAG GCC GCT GAA TTC ATG AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Ala Glu Phe Met Arg His Phe Trp

aa_{-6}

K tomuto účelu se konstruuje následující oligonukleotid s obsahem 24 bazí

signální peptid---✱--------proapo A-I

5' GTA GCG GAG GCC AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Arg His Phe Trp

zbavený 12 přebytečných bazí a tento sled se pak užije k odstranění přebytečného sledu s obsahem 12 bazí z pomocného řetězce.

K provedení mutagenezy se užije Amershamova systému. Tento systém je založen na postupu, který byl uveden v publikaci F. Eckstein a další, Nucleic Acids Res. 13, (1985), 8765-8785. Tento postup poskytuje vysoké výtěžky a jeho celková účinnost je až 95 %.

V první řadě se ta oblast DNA, která má být podrobena mutagenezi klonuje ve vektoru M13. K tomuto účelu se včlení fragment DNA mezi místy působení restrikčních enzymů XbaI-BalI rekombinantního plasmidu pIN-III-ompA-2, který obsahuje gen pro proapo A-I do vektoru M13mp19, rozštěpeného působením restrikčních endonukleáz XbaI a HindII. Vektor M12mp19 se bežně dodává a je možno jej získat na objednávku (Amersham, Buckinghamshire, Velká Británie). Pak se oligonukleotid s obsahem 24 bazí, získaný mutagenezou hybridizuje s matricí s jedním řetězcem a prodlouží se při použití Klenowova fragmentu DNA-polymerázy za přítomnosti T4-DNA-ligázy za vzniku heteroduplexní mutanty.

Selektivní odstranění nemutovaného sledu je možno provést včleněním thionukleotidu do

mutovaného sledu v průběhu syntézy in vitro s následným štěpením řetězce, který neobsahuje fosfothionát působením restrikční endonukleázy NCiI. Tento řetězec obsahuje místo pro štěpení exonukleázou III, která nemutovaný řetězec rozštěpí. Mutovaný řetězec se tedy užívá jako matrice pro rekonstrukci cirkulární molekuly s dvěma řetězci, čímž dochází ke vzniku homoduplexní mutované molekuly. Průběh mutagenezy je možno ověřit analyzou sledu mezi signálním peptidem a počátkem genu, který je kódem pro proapo A-I. Rekombinantní plasmid pNIV1612 se rekonstruuje tak, že se naváže fragment vektoru pIN-III-ompA-2 po štěpení restrikčními enzymy XbaI a HindIII s fragmentem po štěpení enzymy XbaI-BalI, který byl zbaven 12 přebytečných bazí a s fragmentem genu pro proapo A-I po štěpení enzymy BalI a HindIII.

Všechny tři fragmenty se naváží působením T4-DNA-ligázy a získaná směs se užije k transformaci příslušných buněk E. coli kmene JA221, jak již bylo uvedeno svrchu. Získané transformanty se podrobí selekci na svou resistenci proti ampicilinu a pak se třídí pži použití oligonukleotidu s obsahem 18

bazí, jak již bylo svrchu uvedeno. Jeden ze získaných transformantů obsahuje plasmid pNIV1612 . Jde o rekombinantní plasmid, v jehož konstrukci je uložen sled, který je kódem pro signální peptid ompA před úplným sledem pro proapo A-I bez iniciačního kodonu ATG, jak je znázorněno na obr. 6A, 6B a 6C. Takto získané transformanty E. coli se pak sledují na svou schopnost exprese lidského proapo A-I.

6. Konstrukce vektoru pro přenos pro včlenění sledu cDNA pro lidský proapo A-I do bakuloviru: pNIV1613, obr. 7.

Plasmid pNIV1613, který obsahuje sled DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I je možno zkonstruovat tak, že se uloží řetězec z klonu pULB9291 před polyhedrinový gen bakuloviru, jak je znázorněno na obr. 7. Při těchto pokusech bylo užito vektoru pro přenos pAcRP6 bakuloviru, který byl popsán v publikaci Y. Matsuura a další, J. Gen Virol. 67, (1986), 1515-1529. Tento plasmid je možno získat z Department of

Microbiology and Immunology university v Ottawě. Plasmid obsahuje promotor polyhedrinového genu až do nukleotidu -7 ve svém signálním sledu na 5´-zakončení. Chybí mu kodon ATG polyhedrinového genu a prvních 170 nukleotidů sledu, který je polyhedrinovým genem. Příslušné místo pro štěpení restrikčním enzymem BamHI je uloženo před nukleotidem -7. Konstrukce, která je znázorněna na obr. 7 se realizuje následujícím způsobem: DNA plasmidu pAcRP6 se linearizuje působením enzymu BamHI. Pak se vyjme fragment DNA o velikosti 810 pb z plasmidu pULB9291 působením restrikčních enzymů Asp718 a SalI. Tento fragment je kódem pro proapo A-I lidského původu a obsahuje iniciační kodon ATG pro počátek translace. Oba fragmenty se v ekvimolárním poměru smísí a podrobí působení T4-DNA-polymerázy, naváží se působením T4-DNA-ligázy a pak se užijí pro transformaci příslušných buněk E. coli kmene AR58. Transformanty, které se tímto způsobem získají, se podrobí selekci na svou resistenci proti ampicilinu a pak se třídí při použití synthetického oligonukleotidu s obsahem 35 bazí, značeného ^{32}P, jak je znázorněno na obr. 2, který odpovídá části sledu DNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu, načež se provede

kontrola analyzou sledu DNA při použití restrikčních enzymů k ověření správné orientace sledu DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I vzhledem k promotoru polyhedrinového genu. Jeden z takto získaných transformantů obsahuje rekombinantní plasmid pNIV1613, který odpovídá těmto požadavkům. Tento plasmid se pak užije k pokusům na expresi.

7. Produkce proapo A-I lidského původu transformovanými mikroorganismy

20 ml kultury kmene AR58 nebo JM101 E. coli, transformované plasmidem pULB9291 nebo plasmidem pULB9296 se pěstuje na bohatém živném prostředí, doplněném 50 /ug/ml ampicilinu (živný bujon LB, podrobnosti jsou uvedeny ve svrchu zmíněné publikaci T. Maniatise a dalších). Buňky se pěstují až do optické hustoty 0,6 při 630 nm. V případě plasmidu pULB9291 se indukce promotorem P_L lambda uskuteční tím, že se kultura nejprve pěstuje při teplotě v rozmězí 30 až 42° C tak, aby došlo k inaktivaci represoru promotoru P_L lambda, tak jak je uvedeno v publikaci M.Rosenberg

a další, Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138. Indukce se provádí celkem 20 minut.

V případě plasmidu pULB9296 se provádí indukce promorotu lac tím způsobem, že se ke kultuře, inkubované při teplotě 37° C přidá chemický induktor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktosid) až do dosažení konečné koncentrace 1 mM (podle svrchu uvedené publikace R- Lorenzettiho a dalších). Indukce se v tomto případě provádí 60 minut.

20 ml kultury kvasinkových buněk kmene 10S44c, transformované plasmidem pULB9299 se pěstuje při teplotě 30° C v prostředí pro pěstování kvasinek (Difco) s obsahem dusíkatých bazí a 1 % glukózy tak dlouho, až je dosaženo optické hustoty 0.3 při 630 nm. V tomto případě není zapotřebí použít žádné indukce, protože v tomto zvláštním případě je exprese konstitutivní.

Pak se odeberou vzorky takto získaného materiálu o objemu 1 ml a tyto vzorky se odstředí 5 minut při 15 000 g. Pak se získaná usazenina rozruší působením vroucího dodecylsíranu sodného (DSS). Pak se usazenina znovu uvede do suspenze v 50 µl pufru

obsahujícího DSS (50 mM Tris-HCl o pH 6,8. 2 % DSS, 6 M močoviny, 5 % 2-merkaptoethanolu a 10 % glycerolu) a pak se směs zahřívá na teplotu varu 100°C celkem 3 minuty. Pak se extrakty odstředí při 15 000 g celkem 10 minut. Tím jsou vzorky připraveny k provádění analyzy elektroforézou na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 15 % nebo 7,5 % za přítomnosti DSS za denaturačních podmínek (svrchu uvedená publikace Laemmliho a dalších).

Po ukončení elektroforézy se polyakrylamidové gely promyjí 40 ml destilované vody a pak 40 ml pufru s fosforečnanem sodným o koncentraci 50 mM a o pH 7,5. Pak se bílkoviny elektrickým způsobem přenesou z gelů na listy nitrocelulózy v průběhu dvou hodin při použití napětí 60 V a proudu 1,5 A v tomtéž fosfátovém pufru (svrchu uvedená publikace T. Cabezona a dalších). Listy nitrocelulózy se pak nasytí 1% albuminem v 50 mM pufru s fosforečnanem sodným o pH 7,5, načež se inkubují při teplotě místnosti přes noc za přítomnosti králičího séra s obsahem protilátek proti apo A-I lidského původu v ředění 1/500 (a za přítomnosti monoklonálních protilátek proti beta-galaktosidáze myšího původu v pří-

padě plasmidu pULB9296), a to v tomtéž pufru, který byl zbaven albuminu.

Listy nitrocelulózy se pak pětkrát promyjí 40 ml téhož fosfátového pufru a pak se inkubují ve 40 ml fosfátového pufru, který obsahuje 10 /ug/ml kozí protilátky proti protilátce králíka (nebo proti protilátce myši), a označí se peroxidázou. Po čtyřech hodinách inkubace při teplotě místnosti se listy nitrocelulózy znovu pětkrát promyjí 40 ml fosfátového pufru a pak se vyvíjí přidáním 50 ml chromogenního substrátu (10 mg diaminobenzidinu, 100 /ul paroxidu močoviny o koncentraci 10 % a 100 mM tris-HCl o pH 7,6.(.

V případě plasmidů pULB 9291 a pULB9299 je možno nalézt jediný produkt, který reaguje s protilátkami proti apo A-I lidského původu. Tento produkt má molekulovou hmotnost, která odpovídá molekulové hmotnosti vzorku přírodního apo-A-I lidského původu. V případě plasmidu pULB9296 je možno prokázat složený polypeptid, jehož velikost odpovídá předpokládané velikosti polypeptidů beta-galaktosidázy a proapo A-I lidského původu (144 kjednotek), tento složený polypeptid reaguje se sérem s obsahem protilátek proti apo A-I lid-

ského původu a se sérem s obsahem protilátek proti beta-galaktosidáze. Rozměry uvedených látek byly stanoveny předběžně pomocí kalibračních křivek, založených na migraci různých vzorků s odlišnými molekulovými hmotnostmi při použití týchž gelů, které byly užity pro zpracování molekulárních extraktů.

V dalším pokusu bylo pěstováno 20 ml kultury kmene E. coli JA221, transformované plasmidem pNIV1612 v bohatém prostředí, doplněném 50 /ug/ml ampicilinu (živný bujon LB, svrchu uvedená publikace T. Maniatise a dalších) až do dosažení optické hustoty 0,6 při 630 nm. Indukce promotoru lac byla prováděna tak, že ke kultuře, inkubované při teplotě 37° C byl přidán chemický induktor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktosid) až do konečné koncentrace 2 mM. Indukce byla prováděna 60 minut. Pak byly odebrány vzorky těchto kultur o objemu 1 ml a tyto vzorky byly odstřeďovány při 15 000 g celkem 5 minut. Získaná usazenina byla podrobena osmotickému šoku, aby bylo možno oddělit periplasmatickou frakci, postup byl uveden v publikaci D. Koshland a D. Botstein, Cell 20, (1980), 749 - 760. Uvolněná frakce se znovu uvede do suspenze

ve svrchu uvedeném pufru s obsahem DSS, avšak bez močoviny, směs se uvede na teplotu varu, pak se odstředí a podrobí se elektroforéze na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 12,5 % za přítomnosti DSS, načež se po elektroforetickém přenosu provádí detekce imunologickým způsobem. Frakci proapo A-I, synthetizovaného tímto způsobem je možno prokázat v buňkách, avšak nikoliv v periplasmě. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že nedochází k sekreci proapo A-I. Je také možné, že nebyla zvolena optimální účinnost osmotického šoku. Hlavní frakci proapo A-I je možno volně prokázat v prostředí po provedení osmotického šoku, což znamená, že došlo k sekreci této bílkoviny buňkami.

8. Produkce proapo A-I lidského původu hmyzími buňkami, infikovanými bakulovirem

Rekombinantní plasmid pNIV1613 byl užit spolu s kmenem, který je reservoárem bakuloviru k společné infekci buněk Spodoptera frugiperda ve tkáňové kultuře. Tříděním rekombinant viru, zbavených polyhedrinu byly získány rekombinantní plaky. Rekombinantní virus, získaný čištěním z jednoho plaku, se pak

užije k infekci hmyzích buněk. Tento postup je v oboru dobře znám a byl podrobně popsán v publikaci M.D. Summers a G.E. Smith, "Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas University College Station, (1987). Rekombinantní virus byl zkoumán na svou schopnost prosukce proapo A-I imunologicky po elektroforetickém přenosu a/ elektroforézou na 12,5% polyakrylamidovém gelu za přítomnosti DSS, po rozrušení buněk působením pufru RIPA (0,05 M pufru Tris-HCl o pH 7,2 s obsahem 0,15 M NaCl, 1 % Tritonu X100, 0,1 % DSS, 0,1 % desoxycholátu sodného a 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (FPMS)) s následným působením vroucího DSS. Bylo možno prokázat jediný produkt, který reagoval s protilátkami proti apo A-I lidského původu. Tento produkt měl molekulovou hmotnost, která odpovídala molekulové hmotnosti standardního vzorku přírodního lidského apo A-I. Bílkovina, k jejíž expresi došlo, tvořila hlavní složku celkových bílkovin. Koncentrace proapo A-I v 1 litru kultury, měřeně jednoduchou radiální imunodifuzí způsobem podle publikace G. Mancini a další, Immunochem. 2, (1965), 235 - 254 byla přibližně 100 mg.

9. Cytoplasmatická produkce lidského proapo A-I v E. coli. Použití minimálního definovaného prostředí.

Plasmid pULB9292 byl užit pro cytoplasmatickou produkci proapo A-I lidského původu mikroorganismem E. coli v prostředí, označeném jako minimální, jehož složení bude dále uvedeno. Plasmid pULB9292 je možno zkonstruovat tak, že se vymění fragment po štěpení enzymy EcoRI a NcoI plasmidu pULB9291, který je kódem pro promotor P_L lambda za fragment, získaný z plasmidu pOTS rovněž štěpením pomocí enzymu EcoRI a NcoI podle publikace M. Rosenberg a další, Methods Enzymol. 101, (1983), 123 - 138. Fragment plasmidu pOTS, získaný štěpením pomocí enzymů EcoRI a NcoI a popsaný v publikaci G. Devare a další. Cell, 36, (1984), 43 - 49 obsahuje rovněž promotor P_L fágu lambda, který je účinný a řiditelný. Pak se pěstuje ma dále definovaném minimálním prostředí 20 ml kultury kmene AR58 mikroorganismu E. coli, transformovaného plasmidem pULB9292. Minimální prostředí obsahuje na 1 litr následující množství jednotlivých složek: 3 g Na_2HPO_4. 2 H_2O, 3 g KH_2PO_4, 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 1,37 mM $MgSO_4$. 7 H_2O, 29,5 /uM $FeCl_3$. 6 H_2O, 236 /uM $MnSO_4$. H_2O, 10 g glu-

kózy, 1 mg vitaminu B_1, 50 mg ampicilinu, živné prostředí LB 1/20 (objemový poměr). Buňky se pěstují ve svrchu uvedeném minimálním živném prostředí tak dlouho, až optická hustota dosáhne hodnoty 0,5 při 630 nm. Indukce promotoru P_L lambda se provádí tak, že se na počátku kultura pěstuje při teplotním rozmezí 30 °C až 42°C, čímž dojde k inaktivaci represoru promotoru P_L lambda, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci M. Rosenberga a dalších. Indukce se provádí celkem 60 minut. Pak se odeberou vzorky získané kultury s objemem 1 ml a tyto vzorky se nechají projít Frenchovým lisem nebo se odstředí celkem 5 minut při 15 000 g. Celkový získaný buněčný extrakt nebo získaná usazenina se pak zpracovávají působením vroucího DSS, tak jak bylo popsáno v odstavci 7). Po provedení elektroforézy a po elektroforetickém přenosu je možno prokázat jediný produkt, který reaguje s protilátkami proti apo A-I lidského původu. Tento produkt má molekulovou hmotnost, která je v souladu s molekulovou hmotnostní standardního vzorku přírodního lidského apo A-I. Podíl proapolipoproteinu A-I, který se po expresi dostal do svrchu definovaného minimálního živ-

ného prostředí je 13,5 % celkových bílkovin, stanovený obsah proapo A-I je přibližně 270 mg na litr kultury.

10. Izolace, čištění a charakterizace lidského proapo A-I, produkovaného transformovanými mikroorganismy

10.1 Izolace a čištění

Surové extrakty takto získaného surového rekombinantního proapo A-I se odstřeďují celkem 15 minut při 4 000 g a usazenina se odloží. Supernatant se pak odstřeďuje dvě hodiny při 100 000 g. Získaná usazenina se znovu uvede do suspenze v co nejmenším objemu pufru (TEN100), se složením 20 mM Tris-HCl o pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1,75 /ug/ml FPMS a 100 /ug/ml merthiolátu sodného (sodná sůl kyseliny ethylmerkurithiosalicylové), načež se odděleně upraví objem suspenze a supernatantu na původní objem extraktu přidáním téhož pufru. Pak se bílkovina vysráží z obou suspenzí přidáním zvyšující se koncentrace isopropylalkoholu. Pak se stanoví při použití radiální imu-

nodifuze, popsané ve svrchu uvedené publikaci G. manciniho a dalších frakce bílkoviny, vysrážená z každé suspenze, která obsahuje hlavní podíl imunologické reaktivity, odpovídající apo A-I lidského původu při použití běžně dodávaného autentického vzorku lidského apo A-I. Každá takto získaná frakce se s výhodou čistí chromatografií na sloupci pryskyřice Sephacryl S200, jako eluční činidlo se opět užije svrchu uvedený pufr. Odebírají se frakce s objemem 0,9 ml a pak se v každé z těchto frakcí stanoví pomocí radiální imunodifuze množství celkové bílkoviny, která má imunologickou reaktivitu, která odpovídá imunologické reaktivitě apo A-I lidského původu. Molekulová hmotnost bílkoviny ve frakcích, získaných vymýváním chromatografického sloupce se stanoví kalibrací sloupce pomocí sloučenin se známou molekulovou hmotností, jako jsou například aldoláza, sérový albumin skotu, vaječný albumin, chymotrypsinogen a Cytochrom C, kalibrace se provádí za stejných podmínek. Čistota lidského proapo A-I na 1 mg celkové bílkoviny v hlavních frakcích, které obsahují rekombinantní

proapo A-I lidského původu, vyjádřeno v mg bílkoviny se stejnou imunologickou reaktivitou, jakou má běžně dodávaný vzorek autentického lidského apo A-I byla stanovena jako 95 %.

10.2. Charakterizace

10.2.1. Fysikální vlastnosti rekombinantního proapo A-I

V případě, že se podrobí rekombinantní proapo A-I, čištěný a izolovaný ze supernatantu a z usazeniny po odstředění při 100 000 g isoelektrické fokusaci způsobem, popsaným v publikaci N.Catsimpoolas, Anal. Biochem 26 (1969), 54 - 62 při postupně se zvyšujícím pH v rozmezí 4 až 6, získá se jednotný pás, jehož isoelektrický bod leží při pH 4,95. Apo A-I z lidské plasmy je o něco kyselejší a jeho isoelektrický bod leží při pH 4,75. Celkový rozdíl mezi hodnotou isoelektrického bodu pro rekombinantní proapo A-I a pro proapo A-I, izolovaný z lidské plasmy činí pouze 0,2

jednotky pH, což je v dobré shodě s rozdílem, který je znám pro hodnoty isoelektrických bodů pro plasmatický apo A-I a plasmatický proapo A-I, který byl stanoven jako 0,17 jednotky pH podle publikace G.L. Millis a další, Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol. 14, (1984), 244-245.

Pokud jde o molekulovou hmotnost, sestává jak rekombinantní proapo A-I z usazeniny, tak proapo A-I ze supernatantu z jediného polypeptidového řetězce, který má v obou případech stejnou molekulovou hmotnost 29,9 ± 1,4 kjednotek. Apo A-I z lidské plasmy má o něco menší molekulu, jeho molekulová hmotnost je rovna 29,3 ± 1,3 kjednotek.

10.2.2. Zjištění peptidového sledu pro rekombinantní proapo A-I při použití BNPS-skatolu

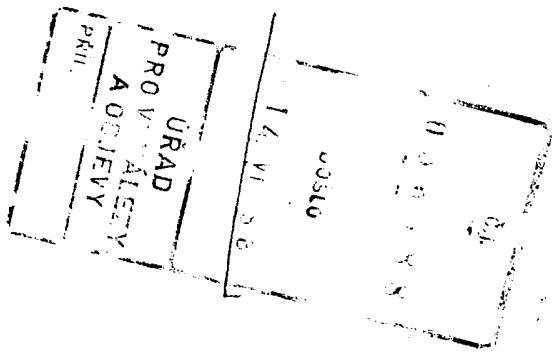
Štěpení chemickým způsobem bylo provedeno při použití 3-brom-3-methyl-2-/(2-nitrofenyl)thio/-3H-indolu, tj.

BNPS-skatolu způsobem, popsaným v publikaci A. Fontana, Methods Enzymol 25 (1972), 419-423. 5 až 10 /ug vzorku čištěné bílkoviny se rozpustí ve 100 /ul roztoku fenolu o koncentraci 15 % objemových ve vodném roztoku kyseliny octové o koncentrací 50 % objemových. Pak se přidá 50 /ul roztoku s obsahem 4,8 mg BNPS-skatolu na 1 ml ledové kyseliny octové a směs se inkbuje 72 hodin při teplotě 25° C. Pak se přidá 50 /ul 2-merkaptoethanolu a směs se podruhé inkubuje 5 hodin při teplotě 37° C. Vzorky se odpaří, znovu se rozpustí ve 100 /ul vody a roztok se extrahuje třikrát 200 /ul ethylacetátu. Organické fáze se odloží, vodné fáze se lyofilizují a analyzují elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s obsahem DSS.

V případě chemického štěpení působením BNPS-skatolu jsou počet a rozměry fragmentů apo A-I více nebo méně předem dány, protože za použitých experimentálních podmínek nastává působením BNPS-skatolu selektivní štěpení za tryptofanovým zbytkem.

Při předpokládané 100% účinnosti štěpení v každém štěpeném místě je největším fragmentem, jehož přítomnost je možno očekávat, C-terminální fragment o velikosti 15,4 kjednotek. Molekulová hmotnost zbývajících fragmentů se pohybuje v rozmezí 0,5 až 5,3 kjednotek, tyto fragmenty jsou tedy příliš malé pro detekci.

V případě neúplného štěpení může být fragment o velikosti 15,5 kjednotek "prodloužen" ve směru k N-terminálnímu zakončení, tvoří se fragmenty o velikosti 20,7 kjednotek, 23,1 kjednotek a 27,6 kjednotek. Tento jev je možno pozorovat jak v případě lidského apo A-I z krevní plasmy, tak pro různě čištěné vzorky rekombinantního proapo A-I.



1618-88
Tuk

JUDr. Ivan KOREČEK
Advokatní a patentová kancelář
160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6
Česká republika

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu v y z n a č u j í c í s e t í m, že se 1) pěstuje za příslušných podmínek buněčná kultura nebo mikroorganismus ze skupiny E. coli, Saccharomyces cerevisiae nebo buněk Spodoptera frugiperda, transformovaný vektorem pro expresi, který obsahuje řetězec rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský proapolipoprotein A-I, vázaný operativním způsobem na řídící sled DNA a zavzatý mezi signály pro iniciaci a pro ukončení translace, přičemž ve sledu řetězce rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský apolipoprotein A-I, je vypuštěn fragment přírodního kódového řetězce pro aminokyseliny -6 až +14 a je nahrazen fragmentem DNA

5´-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGAC-TTG-3´

který je kódem pro tytéž aminokyseliny, přičemž tento sled obsahuje navíc iniciační kodon ATG a modifikované kodony pro aminokyseliny v polohách -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 a +12, čímž dochází ke snížení nebo vyloučení tvorby struktur s dvojitým řetězcem a 2) takto získaný lidský apolipoprotein A-I se i z o l u j e.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vektor pro expresi obsahuje řídící sled DNA s obsahem oblasti promotoru P_L fágu lambda.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vektor pro expresi obsahuje řídící sled DNA pro proapolipoprotein A-I lidského původu, uložený před sledem DNA pro beta-galaktosidázu a řídící sled DNA obsahuje oblast lac promotoru.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vektor pro expresi obsahuje řídící sled DNA s oblastí promotoru a terminátoru transkripce ARG3 z kvasinek.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vektor pro expresi obsahuje řídící sled DNA s oblastí pro proapolipoprotein A-I lidského původu, prostý kodonu ATG, uložený před sledem DNA pro signální peptid bílkoviny OmpA E. coli, přičemž řídící sled DNA obsahuje oblasti promotoru lpp a promotoru-operátoru lac.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že vektor pro expresi obsahuje řídící sled DNA s oblastí promotoru polyhydrinového genu bakuloviru.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako vektor pro expresi se volí rekombinantní plasmid ze skupiny pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612, pNIV1613.

JUDr. Ivan KOREČEK
Advokátní a patentová kancelář
160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6
Česká republika

3638-88
Ti5/L

```
      10        20        30        40        50        60        70
TCCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGGCCGTGCTCTTCCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCA
                   M  K  A  A  V  L  T  L  A  V  L  F  L  T  G  S  Q  A  R  H
                              -20                           -10

80        90        100       110       120       130       140       150
TTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTC
  F  W  Q  Q  D  E  P  P  Q  S  P  W  D  R  V  K  D  L  A  T  V  Y  V  D  V  L
              1                          10                            20

160       170       180       190       200       210       220       230
AAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACA
K  D  S  G  R  D  Y  V  S  Q  F  E  G  S  A  L  G  K  Q  L  N  L  K  L  L  D
                     30                            40

240       250       260       270       280       290       300       310
ACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCT
N  W  D  S  V  T  S  T  F  S  K  L  R  E  Q  L  G  P  V  T  Q  E  F  W  D  N  L
50                            60                            70

320       330       340       350       360       370       380       390
GGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTG
 E  K  E  T  E  G  L  R  Q  E  M  S  K  D  L  E  E  V  K  A  K  V  Q  P  Y  L
       80                            90                            100

400       410       420       430       440       450       460       470
GACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAG
D  D  F  Q  K  K  W  Q  E  E  M  E  L  Y  R  Q  K  V  E  P  L  R  A  E  L  Q
                           110                           120
```

Obr. 1A

```
     480       490       500       510       520       530       540       550
AGGGCGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCGC
 E  G  A  R  Q  K  L  H  E  L  Q  E  K  L  S  P  L  G  E  E  M  R  D  R  A  R  A
   130                           140                           150

     560       570       580       590       600       610       620       630
CCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCT
  H  V  D  A  L  R  T  H  L  A  P  Y  S  D  E  L  R  Q  R  L  A  A  R  L  E  A
              160                           170                           180

     640       650       660       670       680       690       700       710
CTCAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGG
 L  K  E  N  G  G  A  R  L  A  E  Y  H  A  K  A  T  E  H  L  S  T  L  S  E  K
                           190                           200

     720       730       740       750       760       770       780
CCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCCTGAGCGCT
 A  K  P  A  L  E  D  L  R  Q  G  L  L  P  V  L  E  S  F  K  V  S  F  L  S  A
    210                           220                           230

790       800       810       820       830       840       850       860
CTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGCGCCCGCCGCCGCCCCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAAACGT
 L  E  E  Y  T  K  K  L  N  T  Q
                   240         Stop

870   878
TTCCAAAGTGGG
```

Obr. 1B

místo NcoI

místo BalI

5' ← 35-mère → 3' 5' ← 30-mère → 3'

CATG AGA CAT TTC TGG CAG CAG GAC GAA CCT CCA C AA TCT CCT TGG GAT AGA GTT AAG GAC TTG G

3' ← 18-mer → 5' 3' ← 43-mer → 5'

TCT GTA AAG ACC GTC GTC CTG CTT GGA GGT G TT AGA GGA ACC CTA TCT CAA TTC CTG AAC C

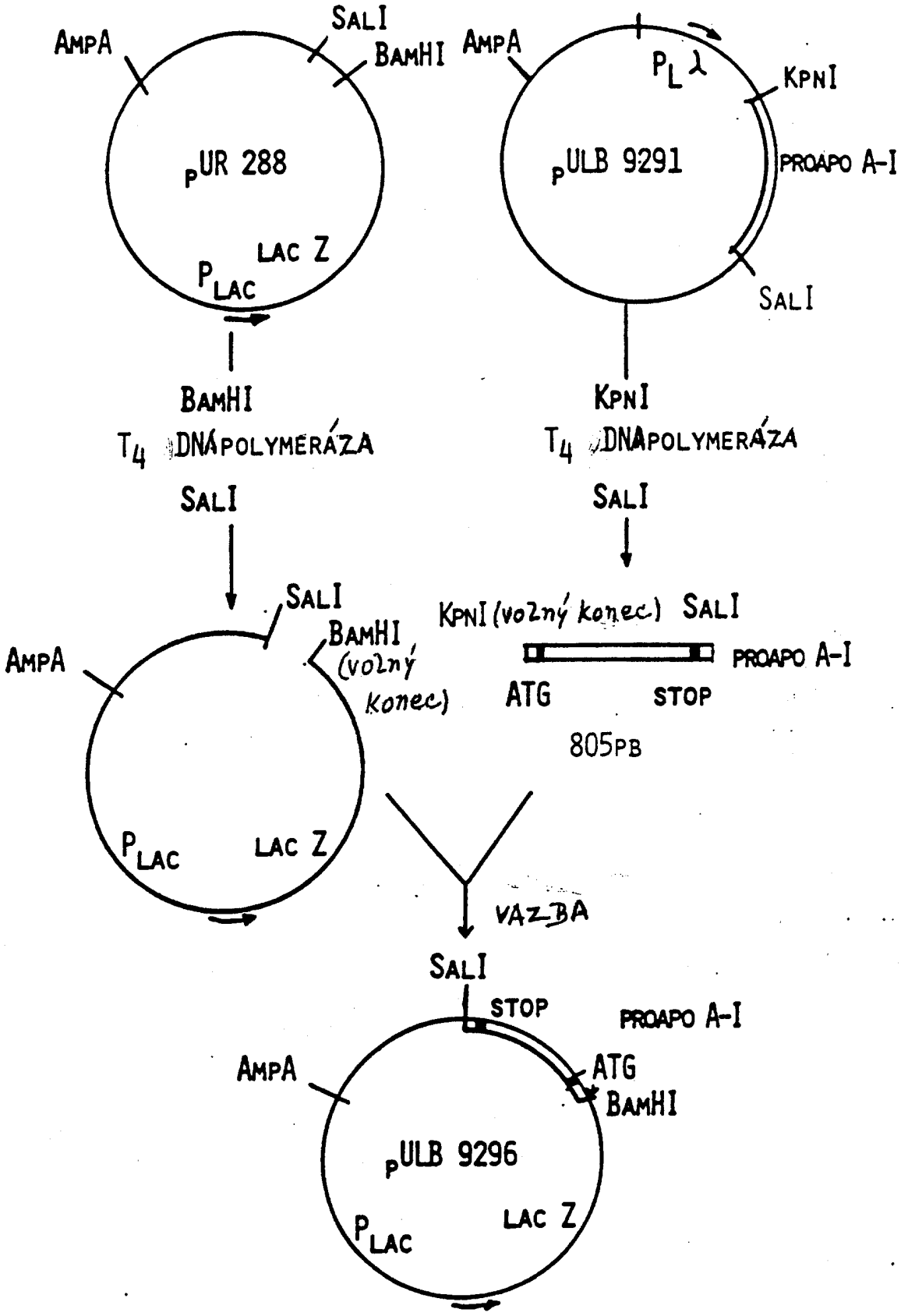
Met	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	A(la)
	-6			-3		-1	+1		+3			+6			+9			+12		+14	

methionin NH_2-terminální — propeptid (aa_{-6} - aa_{-1}) — apo A-I (aa_1 - aa_{14}) zralý

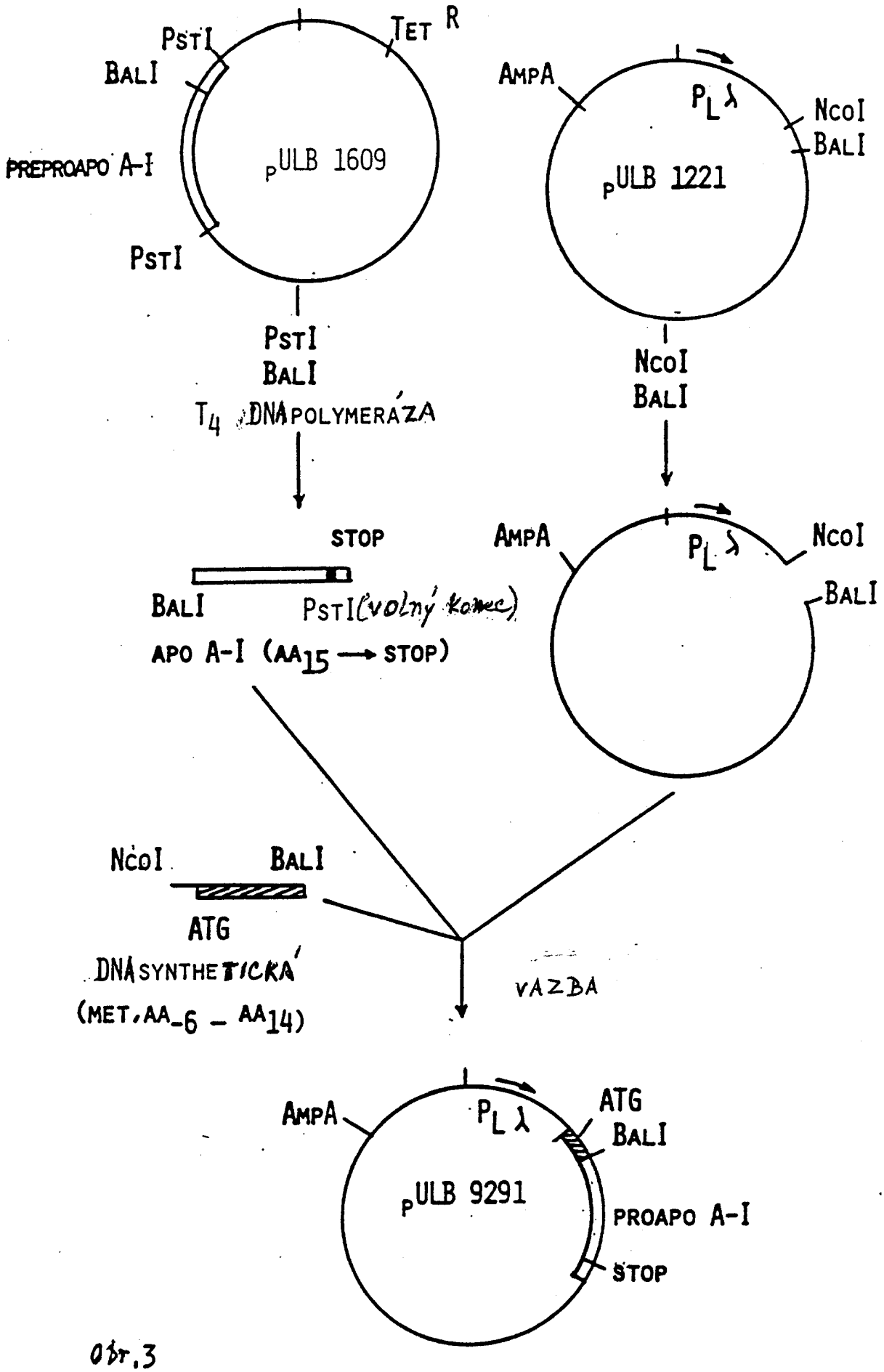
místo štěpení apo A-I propeptidasy

Obr. 2

3638-88
TISIC

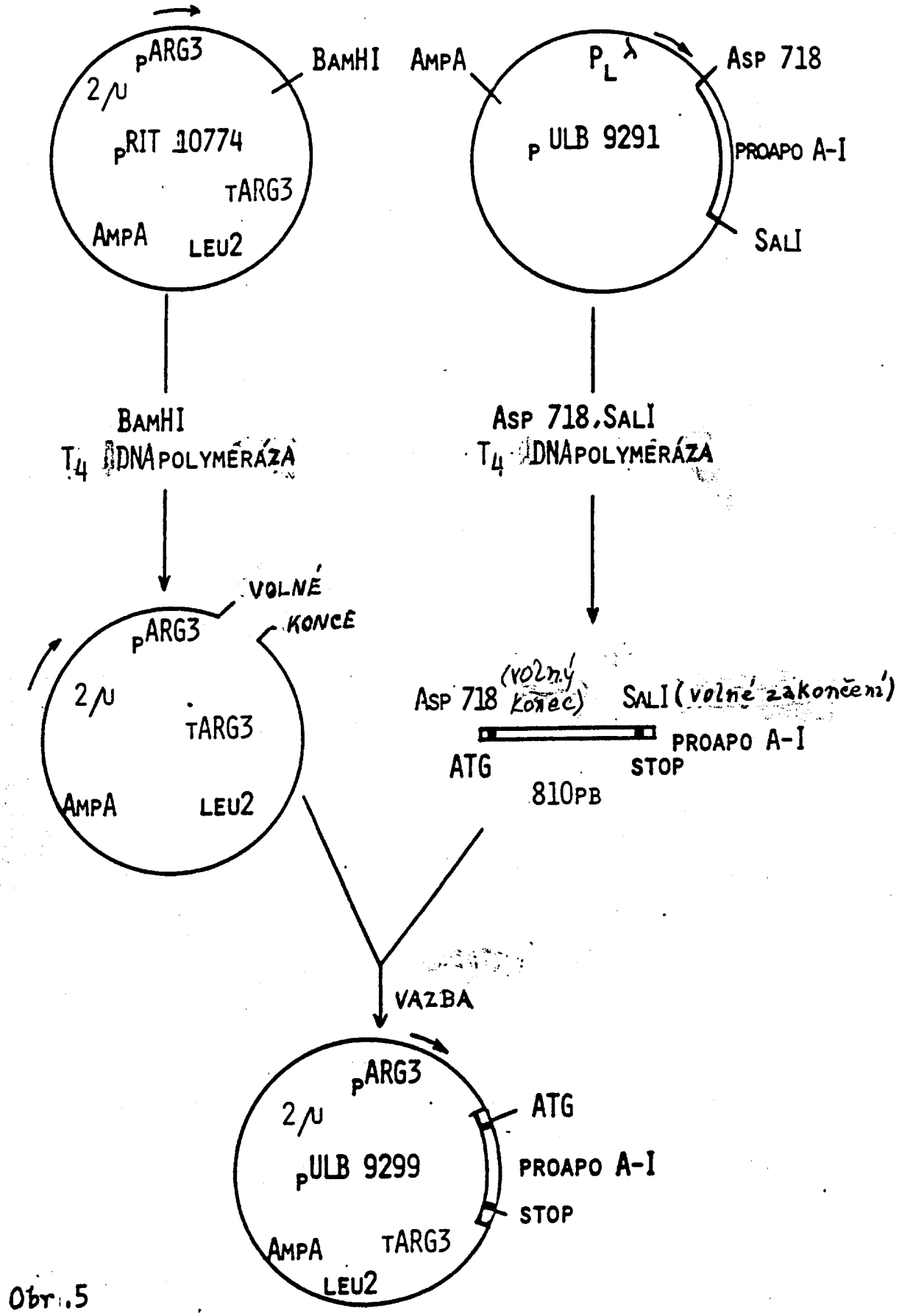


Obr.4

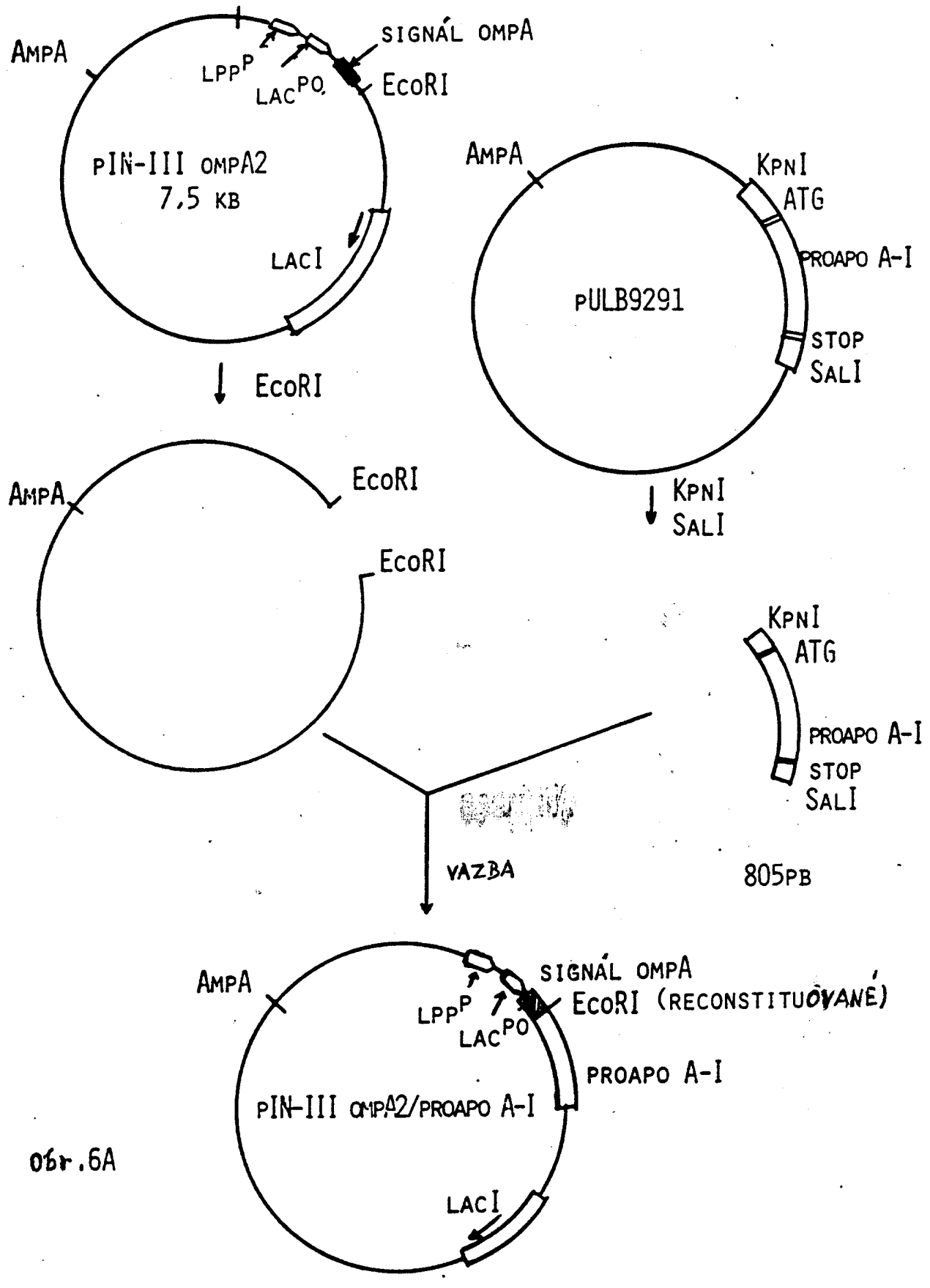

PstI
BalI
Tet R
PREPROAPO A-I
pULB 1609
PstI
PstI
BalI
T4 DNA POLYMERÁZA
AmpA
PL λ
NcoI
BalI
pULB 1221
NcoI
BalI
STOP
BalI
PstI (volný konec)
APO A-I (AA15 → STOP)
AmpA
PL λ
NcoI
BalI
NcoI
BalI
ATG
DNA SYNTHETICKÁ
(MET, AA-6 – AA14)
VAZBA
AmpA
PL λ
ATG
BalI
pULB 9291
PROAPO A-I
STOP

Obr. 3

36 28 -88
Tisk

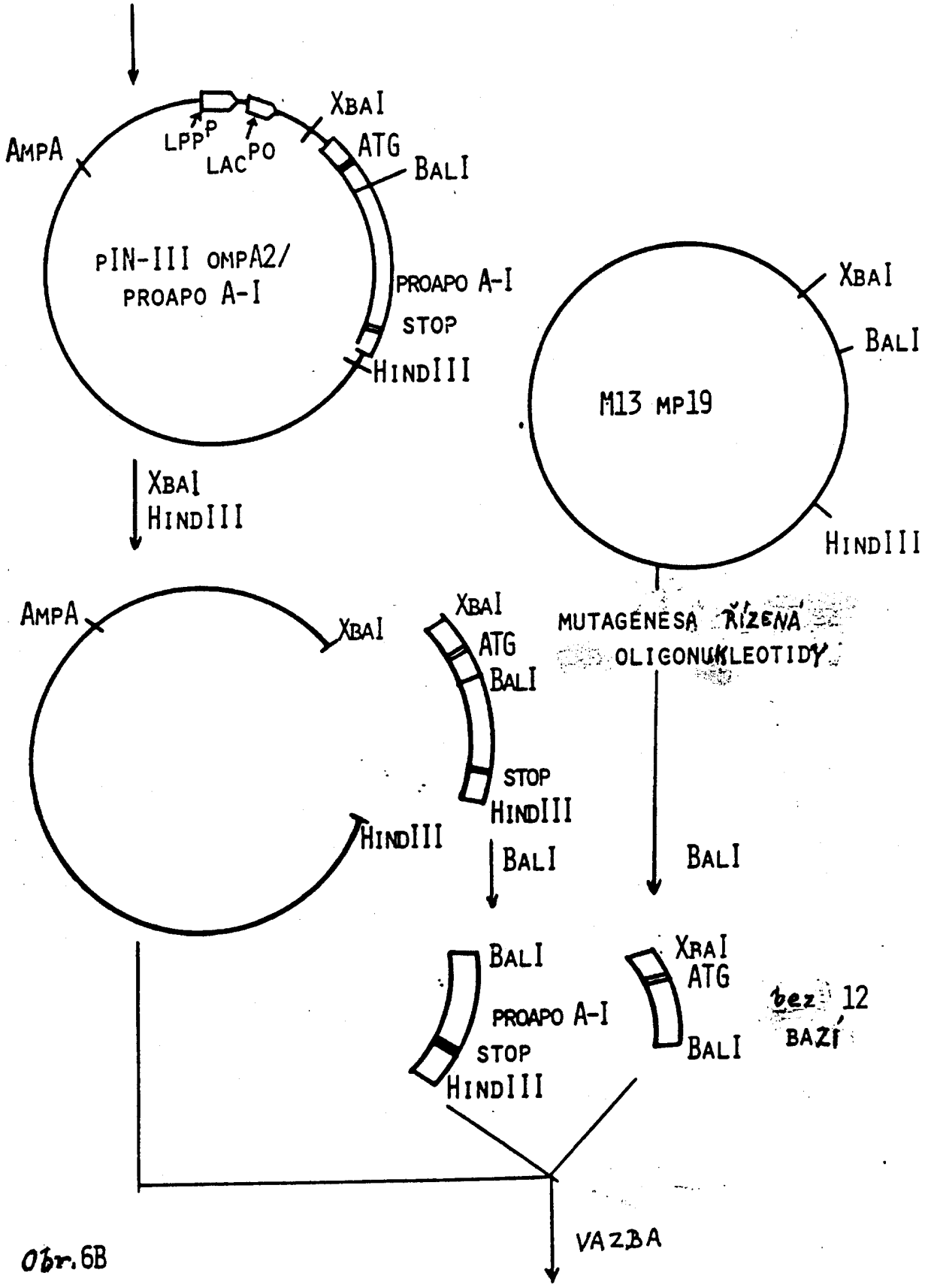


Obr. 5


AMPA
LPP^P
LAC^PO
SIGNÁL OMPA
ECORI
PIN-III OMPA2
7,5 KB
LACI
ECORI
AMPA
KPNI
ATG
PROAPO A-I
PULB9291
STOP
SALI
KPNI
SALI
AMPA
ECORI
ECORI
KPNI
ATG
PROAPO A-I
STOP
SALI
VAZBA
805PB
AMPA
SIGNÁL OMPA
LPP^P
LAC^PO
ECORI (RECONSTITUOVANÉ)
PROAPO A-I
PIN-III OMPA2/PROAPO A-I
LACI

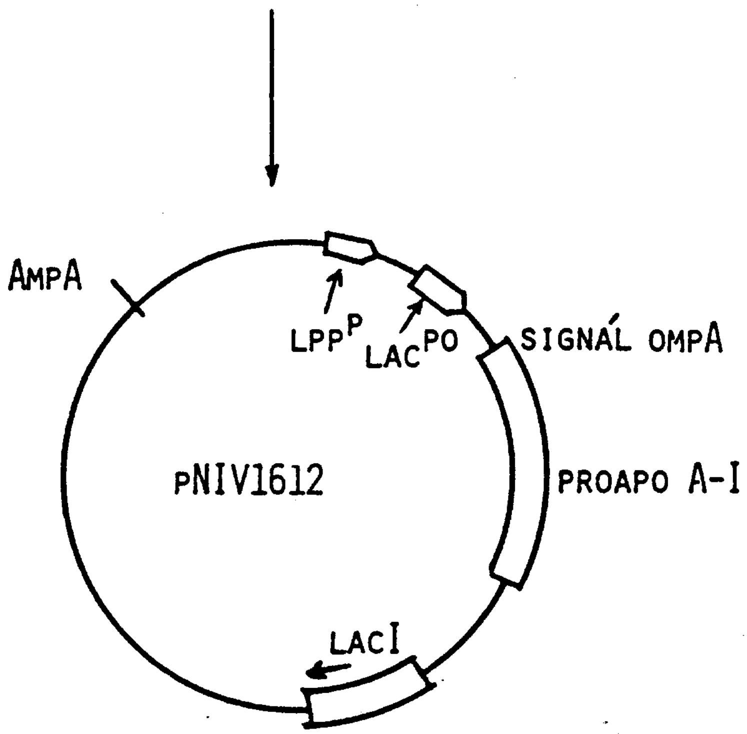
Obr.6A

1638-88
TISK



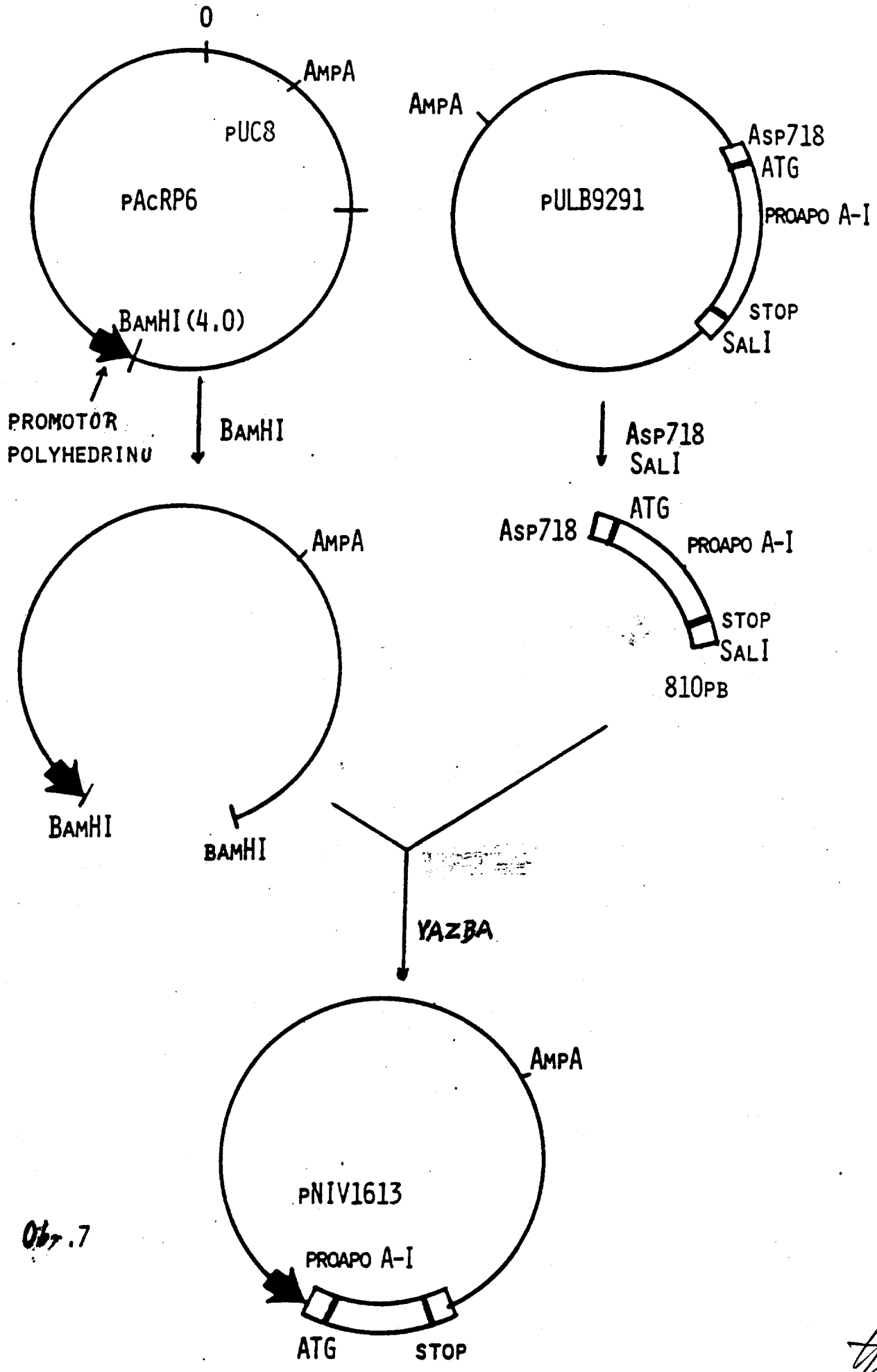
Obr. 6B

3638-88
Tisk



Obr.6C

3638-88
Tisk



Obr. 7