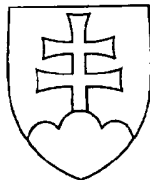


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285603

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. (2006):

C12N 15/09
C07K 14/435
C12N 1/21
C12N 15/19
C12N 15/70
C12N 15/72
C12P 21/02

- (21) Číslo prihlášky: **76-2000**
(22) Dátum podania prihlášky: **19. 1. 2000**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 4. 2007**
Vestník ÚPV SR č.: **4/2007**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **99100967.1**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **20. 1. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **14. 8. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **08/2000**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti:
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:

(73) Majiteľ: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, Leverkusen, DE;**

(72) Pôvodca: **Apeler Heiner, Wuppertal, DE;**
Wehlmann Hermann, Wuppertal, DE;

(74) Zástupca: **Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Vektor na výrobu IL-4 a muteínov IL-4 v kmeni *Escherichia coli*, vektor obsahujúci dna sekvenciu, *Escherichia coli* transformovaná jedným alebo viacerými vektormi a použitie vektora**

(57) Anotácia:
Vektor na výrobu IL-4 a muteínov IL-4 v kmeni *Escherichia coli*, pozostávajúci z operatívne spojených elementov v smere 5' k 3': regulovateľný promótor pozostávajúci z promótoru fágu T5 *Escherichia coli* a dvoch lac operátorových sekvencií, väzbového miesta pre ribozóm z bakteriofágu T7g10 *E.coli*, iniciačného translačného kodónu, štruktúrneho génu pre IL-4 alebo muteín IL-4 a transkripčného terminátora za štruktúrnym génom. Do rozsahu riešenia patrí tiež *Escherichia coli* transformovaná jedným alebo viacerými týmito vektormi a použitie tohto vektora v metóde prípravy IL-4 a muteínov IL-4.

SK 285603 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka vektora na výrobu IL-4 a muteínov IL-4 v kmeni *Escherichia coli*, vektora obsahujúceho DNA sekvenciu znázornenú ako Seq. ID. NO. 2 pozri ďalej, *Escherichia coli* transformovaného jedným alebo viacerými týmito vektormi a použitie tohto vektora v metóde prípravy IL-4 a muteínov IL-4. Konkrétne sa vynález týka konštrukcie a použitia expresných plazmidov vo výrobe rekombinantného interleukínu-4 (IL-4) a muteínov IL-4.

Doterajší stav techniky

Zrelý ľudský interleukín-4 (IL-4) je zložený zo 129 aminokyselín a je z 50 % homologný s myším IL-4. IL-4 je jediný známy cytokín, ktorý riadi diferenciáciu pomocných T buniek na fenotyp T_{H2} (Mosmann a Sad, Immunol. Today 17, 138 - 146, 1996). IL-4 odovzdáva signál lymfocytom a ďalším bunkám cez heterodimerický aggrekát dvoch receptorov cytokínu, IL-4R α a bežný γ -reťazec (γ c). V publikáciách podľa doterajšieho stavu techniky boli opísané antagonistické mutanty IL-4 (Kruse a kol., EMBO J., 11, 3237 - 3244, 1992). Tri aminokyseliny blízko C-konca (R121, Y124 a S125) sú dôležité pre väzbu k γ c-reťazcu. Zavedenie Asp (D) do týchto pozícií blokuje dimerizáciu receptora a prenos signálov cez membránu.

Dvojitý muteín interleukínu-4 (IL-4 DM) je variant IL-4 s dvoma zmenami aminokyselín v pozíciách 121 a 124, nazvaná IL-4 R121D Y124D. IL-4 DM je schopný blokať obe aktivity IL-4 a IL-3. Na rozdiel od všetkých bodových mutantov žiadne zvyškové agonistické aktivity neboli pre tento muteín nikdy zistené. Predpokladá sa, že tieto antagonistické vlastnosti IL-4 DM sú užitočné pri liečení ochorení, ktoré zahŕňujú vývoj T_{H2} a/alebo produkciu IgE (Ryan, J., Allergy Clin. Immunol. 99, 1 - 5, 1997).

Ako bolo opísané v rôznych publikáciách, na produkciu rekombinantného IL-4 a muteínov IL-4 sa môžu využiť prokaryotické organizmy. Bohužiaľ, opisované systémy majú rad nedostatkov (nízka hladina expresie, nízka stabilita expresného vektora), ktoré znemožňujú produkciu IL-4 a muteínov IL-4 vo veľkom meradle alebo sú ekonomicky nerealizovateľné.

Hlavné kritériá pre účinný a bezpečný expresný systém sú:

- vysoký výťažok produktu;
- regulovateľná stabilná expresia;
- stabilita expresného vektora.

Pre tieto uvedené kritéria sú dôležité niektoré znaky expresného plazmidu (pozri Hannig a kol., TIBTECH. 16, 54 - 60, 1998). Sú to:

- promótor,
- ribozomálne väzbové miesto (rbs);
- využitie kodónu príslušného génu;
- transkripčný terminátor;
- gén pre rezistenciu;
- regulácia expresie;
- počiatok replikácie (ori).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je vektor na výrobu IL-4 a muteínov IL-4 v kmeni *Escherichia coli*, pozostávajúci z operatívne spojených elementov v smere 5' k 3': regulovateľný promótor pozostávajúci z promótora fága T5 *Escherichia coli* a dvoch lac operátorových sekvencií, väzbo-

vého miesta pre ribozóm z bakteriofága T7g10 *Escherichia coli*, iniciačného translačného kodónu, štruktúrneho génu pre IL-4 alebo muteín IL-4 a transkripčného terminátora za štruktúrnym génom.

Do rozsahu tohto riešenia podľa vynálezu taktiež patrí vektor obsahujúci DNA sekvenciu znázornenú ako Seq. ID. NO. 2, pozri ďalej.

Do rozsahu riešenia podľa vynálezu taktiež patrí *Escherichia coli* transformovaná jedným alebo viacerými uvedenými vektormi podľa vynálezu.

Do rozsahu riešenia podľa vynálezu taktiež patrí použitie tohto vektora podľa vynálezu v metóde prípravy IL-4 a muteínov IL-4.

Podľa vynálezu boli vytvorené expresné plazmidy pre IL-4 a muteíny IL-4 s modifikáciami vo všetkých príslušných elementoch pre účinný a bezpečný expresný systém. Kvalita a vhodnosť príslušného expresného systému bola klasifikovaná hlavne podľa nasledujúcich kritérií:

- výťažok IL-4 a muteínov IL-4;
- stabilita plazmidu; a
- udržanie indukčnej schopnosti.

Cieľom predmetného vynálezu bolo preto vytvorenie metódy na konštrukciu na použitie expresného plazmidu na výrobu rekombinantného interleukínu-4 (IL-4) a muteínov interleukínu-4 vo veľkom meradle. Navyše by mal novo vytvorený systém hostiteľa/vektora byť vhodný na expresiu ďalších proteínov (cytokínov, rastových faktorov, rozpustných receptorov, protilátok atď.). Podľa predmetného vynálezu sa prekvapivo zistilo, že baktérie transformované plazmidom podľa tohto vynálezu poskytujú mnohonásobne väčšie rýchlosti expresie a stabilitu plazmidu a expresie, ako sa pozorovalo po transformácii rovnakého hostiteľa inými známymi plazmidmi z doterajšieho stavu techniky. Preto je použitie plazmidov podľa tohto vynálezu oveľa výhodnejšie na produkciu rekombinantného interleukínu-4 a muteínov interleukínu-4 v porovnaní so všetkými skôr známymi plazmidmi.

Novovyvinutý vektorový systém obsahuje nasledujúce prvky:

T5 promótor

Promótor bakteriofága T5 *E. coli* spoločne s dvoma lac operátorovými sekvenciami je odvodený z plazmidu pQE30 (Qiagen), patriaceho do skupiny plazmidov pDS (Bujard a kol., Methods Enzymol. 155, 416 - 433, 1987 a Stüber a kol., Immunological Methods, I. Lefkowitz a B. Pernis, eds., Academic Press, Inc. Vol. IV, 121 - 152, 1990).

T7 g10 ribozomálne väzbové miesto

Väzbové miesto ribozómu (rbs) je odvodené z oblasti pred génom 10 bakteriofága T7 (T7g10 vedúcej sekvencie). Gén 10 fága T7 kóduje plášťový proteín, ktorý je hlavným proteínom exprimovaným po infekcii fágom T7. T7 g10 rbs sa získal z vektora pET-9a (Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 - 89, 1990). T7 g10 vedúca sekvencia zahŕňa oblasť okolo 100 bp (Olins et al., Gene 227 - 235, 1988). Vo finálnom expresnom konštrukte je oblasť pred *Xba*I miestom odstránená. T7 g10 vedúca sekvencia teraz teda zahŕňa 42 bp a obsahuje zámenu jednej bázy z G na A v pozícii 3638 v tomto tu opisovanom plazmide.

Využitie kodónov prirodzenej sekvencie IL-4

Ako účinné meradlo využitia synonymných kodónov prirodzenej sekvencie môže byť index adaptácie kodónu (codon adaptation index - CAI) použitý na predpovedanie hladiny expresie daného génu (Sharp a kol., Nucleic Acids

Res. 15, 1281 - 1295, 1987 a Apeler a kol., Eur. J. Biochem. 247, 890 - 895, 1997). CAI sa počíta ako geometrický stred hodnôt relatívneho využitia kodónov (RSCU) zodpovedajúcich každému z kodónov použitých v géne, delené maximálnym možným CAI pre gén pre rovnaké aminokyselínové zloženie. RSCU hodnoty sú pre každý kodón počítané z veľmi vysoko exprimovaných génov určitého organizmu, napr. *E. coli* a reprezentujú pozorovanú frekvenciu kodónu delenú frekvenciou očakávanou za predpokladu rovnakého využitia synonymných kodónov pre aminokyselinu. Vysoko exprimované gény, napr. gény kódujúce ribozomálne proteíny, všeobecne majú vysoké hodnoty $CAI \geq 0,46$. Slabo exprimované gény ako *lacI* a *trpR* v *E. coli* majú nízke hodnoty $CAI \leq 0,3$.

Vypočítaná hodnota CAI v *E. coli* je pre prirodzenú sekvenciu IL4 0,733. To znamená, že prirodzený gén by mal byť vhodný pre vysokú hladinu expície v *E. coli*. Ale má syntetický gén s optimálnym využitím *E. coli* kodónov (hodnota CAI = 1) potenciál k ďalšiemu zvýšeniu hladiny expície. Preto boli navrhnuté a klonované syntetické gény pre IL-4 a muteíny IL-4.

Transkripčný terminátor

Fragment z T7 DNA obsahujúci transkripčný terminátor T ϕ je odvodený z vektora pET-9a (Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 - 89, 1990). Transkripčné terminátory určujú miesta, kde komplex mRNA-RNA polymeráza-DNA disociuje, a tým končí transkripcia. Prítomnosť transkripčného terminátora na konci vysoko exprimovaného génu má niekoľko výhod. Minimalizuje nedostupnosť RNA polymerázy, ktorá by bola zahnutá v nadbytočnej transkripcii, obmedzuje dĺžku mRNA na minimálnu potrebnú dĺžku, a tým obmedzuje výdaj energie. Vzhľadom na to, že silná transkripcia by mohla interferovať s počiatkom replikácie, zvyšuje terminátor transkripcie stabilitu plazmidu prostredníctvom udržania počtu kópií (Balbas a Bolivar, Methods Enzymol. 185, 14 - 37, 1990).

Gén kódujúci rezistenciu

Gén kanamycínovej rezistencie je odvodený z vektora pET-9a (Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 - 89, 1990). Pôvodne ide o *kan* gén Tn903 z vektora pUC4KISS (Barany, Gene 37, 111 - 123, 1985). V tu opisovanom plazmide je *kan* gén v opačnej orientácii ako gény pre IL-4 a muteín IL-4, takže nedochádza k zvýšeniu množstva produktu *kan* génu po indukcii v dôsledku prečítania terminátora transkripcie z T5 promótora. Kanamycín bol vybraný ako selekčný markér alebo je preferovaným antibiotikom pre GMP-účely. Navyše sú vektory založené na rezistencii ku kanamycínu stabilnejšie ako plazmidy s ampicilínovou (*bla*) rezistenciou. Selekcii na ampicilíne má tendenciu k stratám, lebo táto látka je degradovaná sekretovaným enzýmom: β -laktamázou. Spôsob bakteriálnej rezistencie ku kanamycínu závisí od aminoglykozidovej fosfotransferázy, ktorá inaktivuje antibiotikum.

Regulácia expície

Kontrolovaná génová expícia je absolútne nevyhnutná na nastavenie stabilného plazmidového systému, najmä ak je požadovaný proteín zhubný pre hostiteľské bunky. Výhodný plazmid podľa predmetného vynálezu využíva indukovateľný systém založený na *lac* systéme pozostávajúcom z génu pre *lac* represor (*lacI*) a dvoch syntetických sekvencií *lac* operátora predchádzajúcich vo fúzii promótoru bakteriofága T5 *E. coli*. Promótor *lacI*^q a štruktúrny gén *lacI* bol izolovaný z vektora pTrc99A (Amman et al., Gene 69, 301 - 315, 1988). I^q predstavuje promótorovú mutáciu vedúcu

k nadprodukcii *lacI* represora. *Lac* represor štandardného typu je tetramérna molekula pozostávajúca zo štyroch identických podjednotiek každá s 360 aminokyselinami. Tetramér *lac* represora je dimér dvoch funkčných dimérov. Štyri podjednotky sú držané spolu zväzkom štyroch helixov tvorených zvyškami 340 - 360. Pri izolácii *lacI* génu z vektora pTrc99A pomocou štepu *NarI* boli zvyšky za aminokyselinou 329 odstránené a pridalo sa 10 aminokyselín, ktoré nie sú normálne kódované *lacI* génom. Je známe, že mutácie alebo delécie prebiehajúce v C-terminálnej časti *lacI*, za aminokyselinou 329, poskytujú funkčné diméry, ktoré sa javia ako fenotypovo podobné štandardnému represoru (Pace a kol., TIS 22, 334 - 339, 1997).

Počiatok replikácie (ori)

Počiatok replikácie (ori) tu opisovaného plazmidu je odvodený z vektora pET-9a, ktorého ori pochádza z pBR322. Výhodný plazmid podľa predmetného vynálezu preto nesie pMB1 (ColEI) replikón. Plazmidy s týmto replikónom sú mnohokópiové plazmidy, ktoré sa replikujú „relaxovaným“ spôsobom. Za normálnych rastových podmienok sa v každej bakteriálnej bunke udržiava minimálne 15 - 20 kópií plazmidu. Bežný počet pre výhodný plazmid, opísaný v tomto texte, je v tomto rozmedzí. Replikácia ori ColEI-typu je iniciovaná 555-nukleotidovým transkriptom RNA, RNAI, ktorý tvorí stabilný hybrid so svojím DNA templátom blízko ori. Hybrid RNAI-DNA je potom štiepený RNázou H v ori za vzniku voľného 3'OH, ktorý slúži ako primér pre DNA polymerázu I. Táto iniciácia syntézy DNA je negatívne regulovaná RNA I, čo je 108-nukleotidová molekula RNA komplementárna k 5' koncu RNA II. Interakcia antisense RNA I s RNA II spôsobuje konformačnú zmenu RNA II, ktorá inhibuje väzbu RNA II k DNA templátu a následne bráni iniciácii syntézy plazmidovej DNA. Väzba medzi RNA I a II je zvýšená malým proteínom s veľkosťou 63 aminokyselín (Rop proteínom, Represor of primer), ktorý je kódovaný génom umiestneným 400 nukleotidov po smere transkripcie od začiatku replikácie (Sambrook a kol., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). Delícia *rop* génu vedie k zvýšeniu počtu kópií a prostredníctvom zvýšenia množstva génu k zvýšeniu hladiny expície heterológnych génov kódovaných plazmidom. Toto sa zistilo rovnako v prípade skúšaných expresných vektorov pre IL-4. Ale ukázalo sa, že *rop* plazmidy sú nestabilné a pri fermentácii za neselektívnych podmienok dochádza k ich strate. Preto obsahuje replikón tu opisovaného plazmidu *rop* gén kvôli zaisteniu vysokej stability plazmidu. V opise predmetného vynálezu opisovanému plazmidu chýba *mob* gén, ktorý je nutný na mobilizáciu, a preto nie je schopný riadiť svoj vlastný konjugáciu prenos z jednej baktérie do inej.

Vo výhodnom uskutočnení podľa predmetného vynálezu sú z plazmidu odstránené všetky prvky, ktoré nie sú nevyhnutné na jeho replikáciu, rezistenciu a reguláciu expície.

V rozsahu predmetného vynálezu nemusia byť na konštrukciu expresného plazmidu podľa predmetného vynálezu použité všetky uvedené znaky. Napríklad namiesto syntetického génu na optimalizované využitie kodónov v *E. coli* sa môže použiť gén pre prirodzený interleukín-4 alebo muteín interleukínu-4. Transkripčný terminátor je vo výhodnom vyhotovení T ϕ , ale rovnako možno použiť i ďalšie terminátory ako mB T2 alebo aspA. Podobne je možné použiť na konštrukciu výhodného plazmidu podľa predmetného vynálezu prvky z iných ako tu opísaných, komerčne dostupných vektorov.

Metódy použité počas vývoja expresného systému sú uvedené.

Materiály a metódy

Enzýmy

Reštrikčné endonukleázy, alkalická fosfatáza z telacieho čreva, T4 polynukleotid kináza a T4 DNA ligáza boli získané od firmy Boehringer Mannheim a GIBCO-BRL a boli použité podľa odporúčenia dodávateľa.

Metódy práce s rekombinantnou DNA

Štandardné klonovacie postupy boli opísané v Sambrook a kol., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). Transformácie boli vykonané podľa M. Scott (Seed and Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365 - 3369, 1987). Kmene *E. coli* DH5a (GIBCO BRL) a W3110 (ATCC 27325) boli použité primárne ako hostiteľské bunky. Genotyp W3110 je K12, F' [N(rmD-mnE)]lambda.

Na izoláciu vo veľkom meradle sa použili špičky „Qia-gen-tips” (Qiagen). Extrakcia fragmentov DNA z agarózových gélov bola vykonaná s použitím Jetsorb (Genomed) podľa odporúčenia dodávateľa.

Oligonukleotidy na riadenú mutagenézu, PCR reakcie a sekvenovanie pochádzali od MWG Biotech, Pharmacia Biotech alebo GIBCO BRL.

Pri experimentoch zameraných na mutagenézu bola použitá metóda Deng a Nickoloffa (Deng a Nickoloff, Anal. Biochem. 200, 81 - 88, 1992), používajúca systém „Mutagenéza s elimináciou unikátneho miesta” od Pharmacia Biotech. Primér používaný na znovuvytvorenie T7 g10 rbs má nasledujúcu sekvenciu:

5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACATCT-AGAAATAATTTTGTTTAAC TTTA AGAA3' (Sekv. 1).

Všetky konštrukty a sekvencie DNA boli potvrdené použitím sekvenovania terminačnou metódou s AmpliTaq DNA polymerázy, FS na ABI 373A sekvenátore (Applied Biosystems).

Vynález je detailnejšie vysvetlený nasledujúcimi príkladmi, obrázkami a informáciami o sekvenciách.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 až obr. 4 sú znázornené konštrukcie tu opísaného expresného plazmidu. (Skratky: IL-4 TM, trojitý muteín IL-4, IL-4 DM, dvojitý muteín IL-4).

Na obr. 5 je znázornená plazmidová stabilita expresných vektorov muteínu IL-4 pRO2.1.0 a pRO.2.1.0. Vektor pRO2.1.0 zostáva celkom stabilný cez 78 generácií bez selekcie antibiotikami. Na rozdiel od tohto je expresný vektor pRO2.1.0, ktorý je založený na komerčne dostupnom plazmide pET-30a (Novagen), stratený veľmi rýchlo. Iba 16 % kolónií obsahuje plazmid po 78 generáciách bez kanamycínovej selekcie.

Na obr. 6 je znázornené udržanie schopnosti indukcie a expresie tu opísaného expresného vektora IL-4 a muteínu IL-4.

Podľa tohto uskutočnenia bola vykonaná SDS-PAGE (15 %) analýza celkových extraktov z *E. coli*/pRO2.1.0 pestovaných rôznym počtom generácií bez selekcie antibiotikami 5 hodín po indukcii IPTG. 10 µl resuspendovaných bunkových peliet bolo aplikované do každej jamky. Elektrofóza prebehla za denaturačných podmienok a gél bol zafarbený pomocou Coomassie brilliant blue.

Vysvetlivky k obr. 6:

Dráha 1: Marker molekulových hmotností (Malý Rozsah, Life Technologies);

Dráha 2: IL-4 muteín (µg)

Dráha 3: *E. coli*/pRO2.1.0 (8 generácií) pred indukciou;
Dráha 4: *E. coli*/pRO2.1.0 (8 generácií) po indukcii;
Dráha 5: *E. coli*/pRO2.1.0 (18 generácií) po indukcii;
Dráha 6: *E. coli*/pRO2.1.0 (28 generácií) po indukcii;
Dráha 7: *E. coli*/pRO2.1.0 (38 generácií) po indukcii;
Dráha 8: *E. coli*/pRO2.1.0 (48 generácií) po indukcii;
Dráha 9: *E. coli*/pRO2.1.0 (58 generácií) po indukcii;
Dráha 10: *E. coli*/pRO2.1.0 (68 generácií) po indukcii;
Dráha 11: *E. coli*/pRO2.1.0 (78 generácií) pred indukciou;
Dráha 12: *E. coli*/pRO2.1.0 (18 generácií) po indukcii;
Dráha 13: Marker molekulových hmotností (Malý Rozsah, Life Technologies);
Dráha 14: Marker molekulových hmotností (Malý Rozsah, Life Technologies).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Test stability plazmidu

Testy stability plazmidu boli vždy štartované kultúrou zmrazenou v tekutom dusíku. Po roztavení kultúry bola stanovená OD₆₀₀ a kultúra bola zriedená na 10⁻⁴ PBS pufrum a potom bola rozotretá na misky s LB médiom stuženým agarom bez antibiotika.

Pri vykonávaní tohto testu bol 1 ml roztavenej kultúry inokulovaný do 100 ml peptónového média (30 g sójového peptónu, 20 g kvasničného extraktu, 5 g KH₂PO₄, 20 g glycerolu, 1 mg MgSO₄ x 7 H₂O na liter, pH 7,0) a inkubovaný pri 37 °C za trepania 280 rpm počas 24 hodín.

Stanovila sa OD₆₀₀ narastenej kultúry, kultúra bola zriedená až do koncentrácie 10⁻⁴ v PBS pufrí a potom bola rozotrená na misky s LB médiom stuženým agarom bez antibiotika, aby sa získali dobre oddelené kolónie.

100 µl narastenej kultúry bolo inokulované do 100 ml peptónového média a inkubované pri 37 °C za trepania 280 rpm počas 24 hodín. Tento postup bol opakovaný osemkrát.

100 dobre oddelených kolónií z LB misiek bolo očkované na LB misky s kanamycínom (25 µg/ml) a LB misky bez kanamycínu a inkubované pri 37 °C počas noci. Percentuálne zastúpenie rezistentných kolónií sa určovalo každý deň.

Počty generácií za deň sa vypočítali podľa nasledujúceho vzorca: $\log [OD_{600\text{ END}}/OD_{600\text{ BEG}}]/\log 2$.

Pre expresné štúdie bol 1 ml narastenej kultúry zriedený 100-krát LB médiom a nakladalo sa s ním podľa opisu (pozri príklad 2).

Príklad 2

Expresia

Na expresiu interleukínu-4 a muteínu interleukínu-4 v malom meradle boli bunky kultivované v LB médiu (10 g Bacto tryptónu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl na liter, pH 7,5), kým OD₆₀₀ nedosiahla 0,8 - 1,0. Expresia bola indukovaná prídavkom IPTG do finálnej koncentrácie 0,5 mM a inkubácia pokračovala počas 5 hodín. Bunky boli z média získané centrifugáciou.

Na SDS-PAGE analýzu sa bunkové pelety resuspendovali vo vzorkovom pufrí pre SDS-PAGE do koncentrácie 1 jednotka OD₆₀₀/100 µl.

Sekvencie

<110> Bayer AG
 <120> PLAZMIDY, ICH KONŠTRUKCIA A ICH
 POUŽITIE PRI VÝROBE INTERLEUKÍNU-4
 A MUTEÍNOV INTERLEUKÍNU-4

<130> Plazmidy pre muteíny IL-4

<160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> neznámy

<220>

<223> Opis neznámeho organizmu: primér

<400> 1

tcaattgtga gcggataaca atttcacaca tctagaaata attgttta actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNA

<213> Neznámy

<220>

<223> Opis neznámeho organizmu: Človek

<400> 2

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgsaa ctgcatttta ttcattctag gatttatcaat 60
 accatatttt tgaataagcc gttctgttaa tgaaggagaa aactccacga gccagtcca 120
 taggatggca agatccctgt atcgtcttgc gattccgact cgtccacacat caatcacacc 180
 tatcaatttc cctctgtcaa aataaaggtt atcaagttag aattccacat gactgacgac 240
 tgaatccggt gagaatggca aagcttatg catttctttc cagacttggt caacagggca 300
 gccattacgc tctgtatcaa aaccactcgc atcaaccacg cgttatctta ttctgtgatt 360
 cgcctcgagg agacgaata cgcgactcgt gtcaaaaaga caatttcaaa caggaaatca 420
 atgcaacagg cgcaggaaac ctgcagcggc atcaacataa ttttccctg aatcaggata 480
 tttctctaat accctggaat ctgttttccc ggggatcgca gttgtgagta accatggatc 540
 atcaggagta cggatcaaat gcttctgtgt cgaagaggc ataaatctcg tccagccagt 600
 tagctcgacc atccactct taaatcaatt cgaacgcta cttttgcaat gtttcagaaa 660
 caactctggc gcatcggggt tcccatacaa tcatagatt gtgcacctg attgcccagc 720
 attatcgaga gcccatlta acccatataa atcagcatcc atgctggaat ttaatccgag 780
 cctcgagcaa gacttttccc gtctaatatg gctcataaca ccccttgatc taccgtttat 840
 gtaagcagac agtttttatt tctatgacca aatcccttta acgtgagttt tctgtccact 900
 gaggccgaga ccccgtagaa aagatcaaa gatctcttct agatctttt ttctgtcgag 960
 taactctgct cttgcaaaaa aaaaaccacc cgtccacgac ggtgtgttgt ttgcccagtc 1020
 agagactacc aactcttttt cgaaggttaa ctggcttcag cagagccgag atacaaaata 1080
 ctgtctctct agtgcaggc tagtaggac accacttcaa gaaacttgta gccacggcct 1140
 caaccctcgc tctgttaatt ctgtatcagg tggcgtgag cagtggcgat aagctcgctc 1200
 ttaccggggt ggaacaaaga ctatagatag cgaataggc gtagcggtcg gctggaacgg 1260
 ggggtctgtg ccaacggccc agcttgagc gaacgacct caaccgaacg agatccatc 1320
 agpctgagc atgagaagc gccacgcttc cgaagggag aagcggagc aggtatccgg 1380
 taagccgagc ggtcgaaca ggaagcgcga cgaaggagct tcaaggcga aacgctcgt 1440

atctttatag tctgtcggg tttgcacac tctgacttga cgttctgatt ttgtgatgct 1500
 cgtcaggggg gcggagccta tgaataaac ccagcaacgc gcctttttta cgttctctg 1560
 ccttttctgt gcttttctgt cacatgttct tctctgctt atccctctgt tctgtggata 1620
 accgtattac cgcctttgag tgagctgata cgcctcgccg cagccgaacg accgagcgca 1680
 gcgagctcag gaggagga ggcgaagagc gcttgatgct gttcttctc cttaagatc 1740
 ttgtcgggtt ttccacacgc aatgtgtcac cgtgactggg tcatggtgct gccccgacac 1800
 gttaaagccg tacaacatgc gctatcgtta cgttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 1860
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 1920
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 1980
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2040
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2100
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2160
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2220
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2280
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2340
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2400
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2460
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2520
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2580
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2640
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2700
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2760
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2820
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2880
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 2940
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3000
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3060
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3120
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3180
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3240
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3300
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3360
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3420
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3480
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3540
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3600
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3660
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3720
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3780
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3840
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3900
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 3960
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4020
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4080
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4140
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4200
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4260
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4320
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4380
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4440
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4500
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4560
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4620
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4680
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4740
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4800
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4860
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4920
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 4980
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5040
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5100
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5160
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5220
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5280
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5340
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5400
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5460
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5520
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5580
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5640
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5700
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5760
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5820
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5880
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 5940
 cccgcacacg cgtctctcgc gactgacgag gcttctctgc tcccgccatc cgtttacaga 6000

PATENTOVÉ NÁROKY

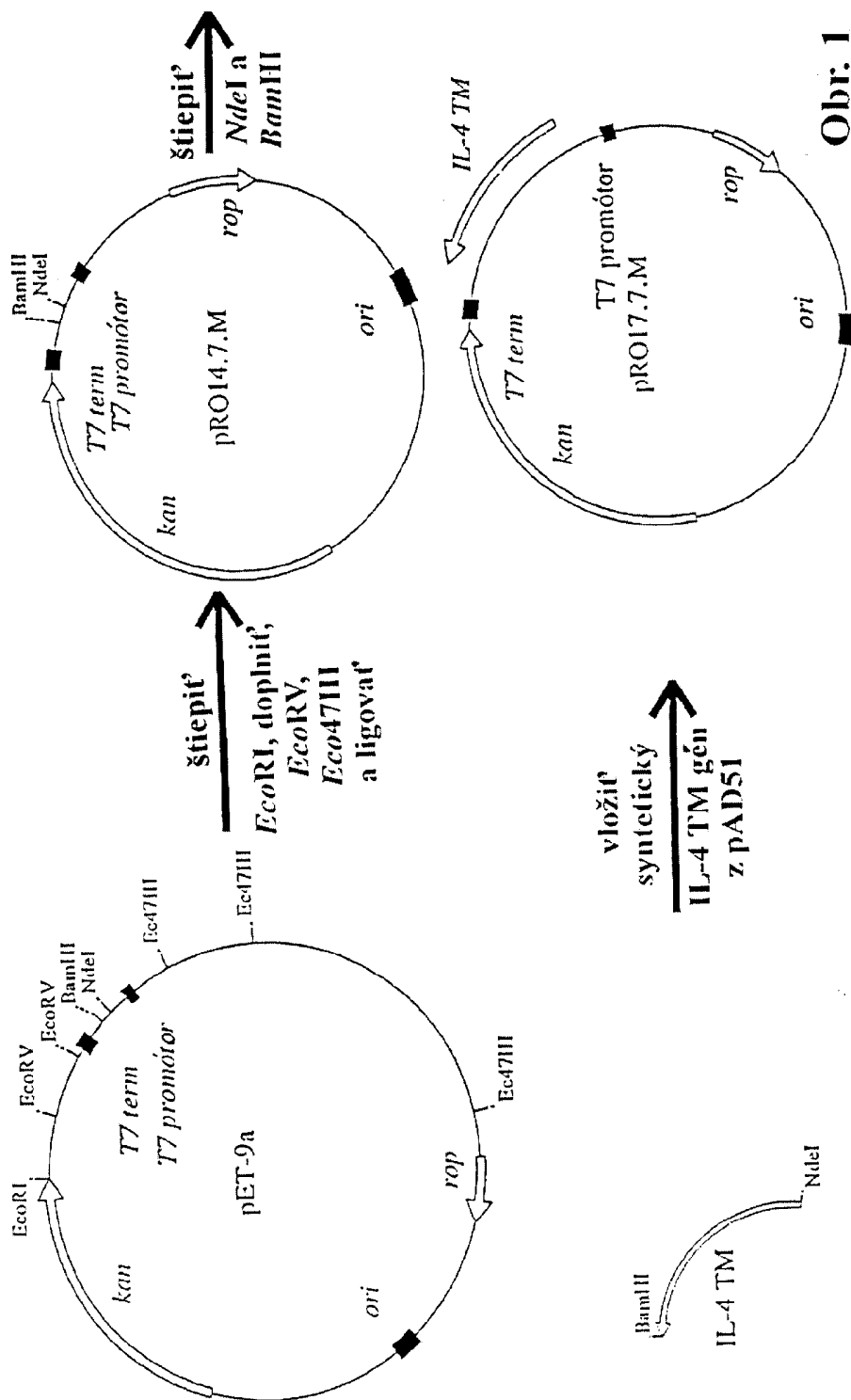
1. Vektor na výrobu IL-4 a muteínov IL-4 v kmeni *Escherichia coli*, pozostávajúci z operatívne spojených elementov v smere 5' k 3': regulovateľný promótor pozostávajúci z promótoru fágu T5 *E. coli* a dvoch lac operátorových sekvencií, väzbového miesta pre ribozóm z bakteriofágu T7g10 *E. coli*, iniciačného translačného kodónu, štruktúrneho génu pre IL-4 alebo muteín IL-4 a transkripčného terminátora za štruktúrnym génom.

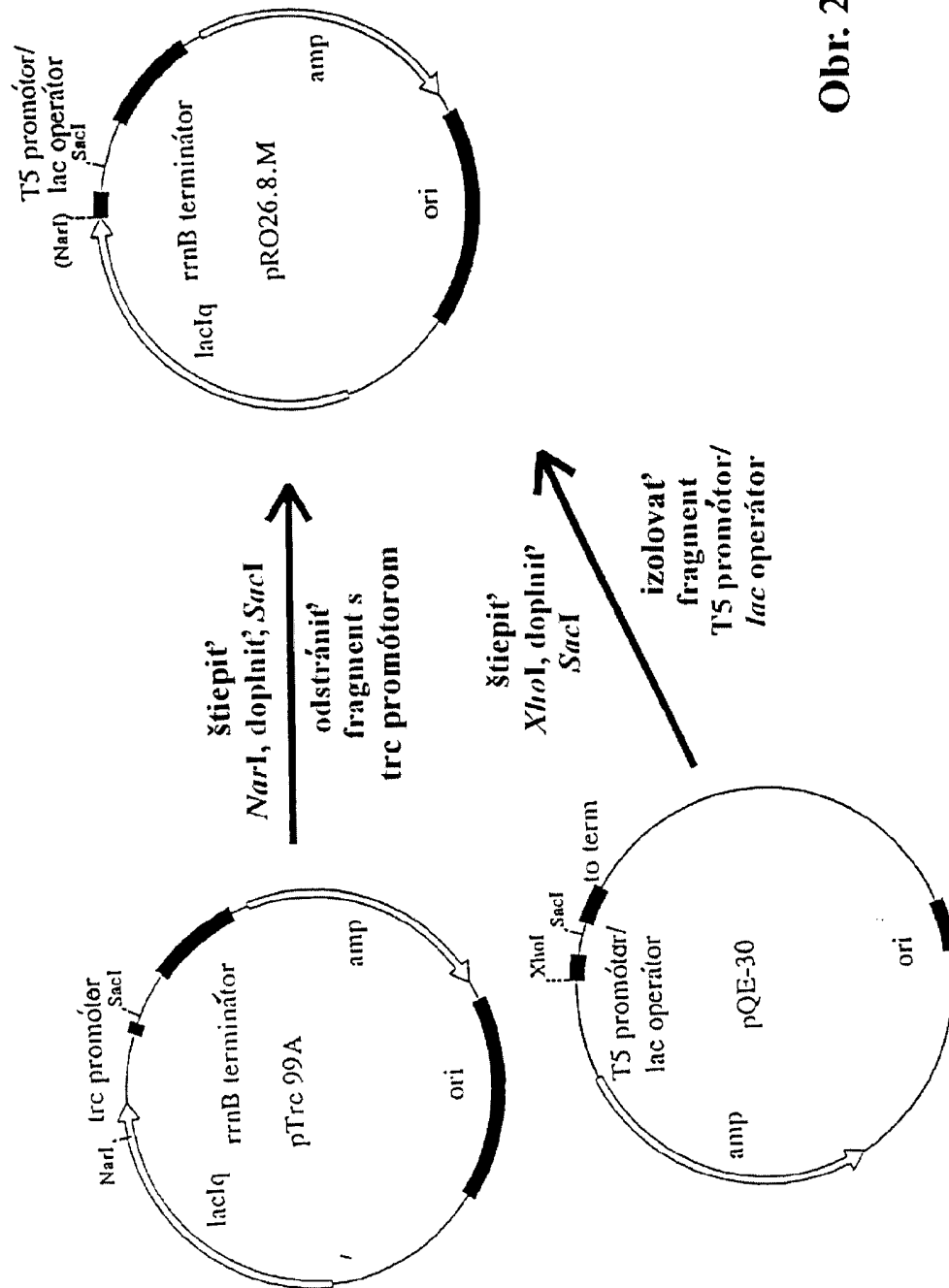
2. Vektor obsahujúci DNA sekvenciu znázornenú ako Seq. ID. NO.2.

3. *Escherichia coli* transformovaná jedným alebo viacerými vektormi podľa nároku 1 alebo 2.

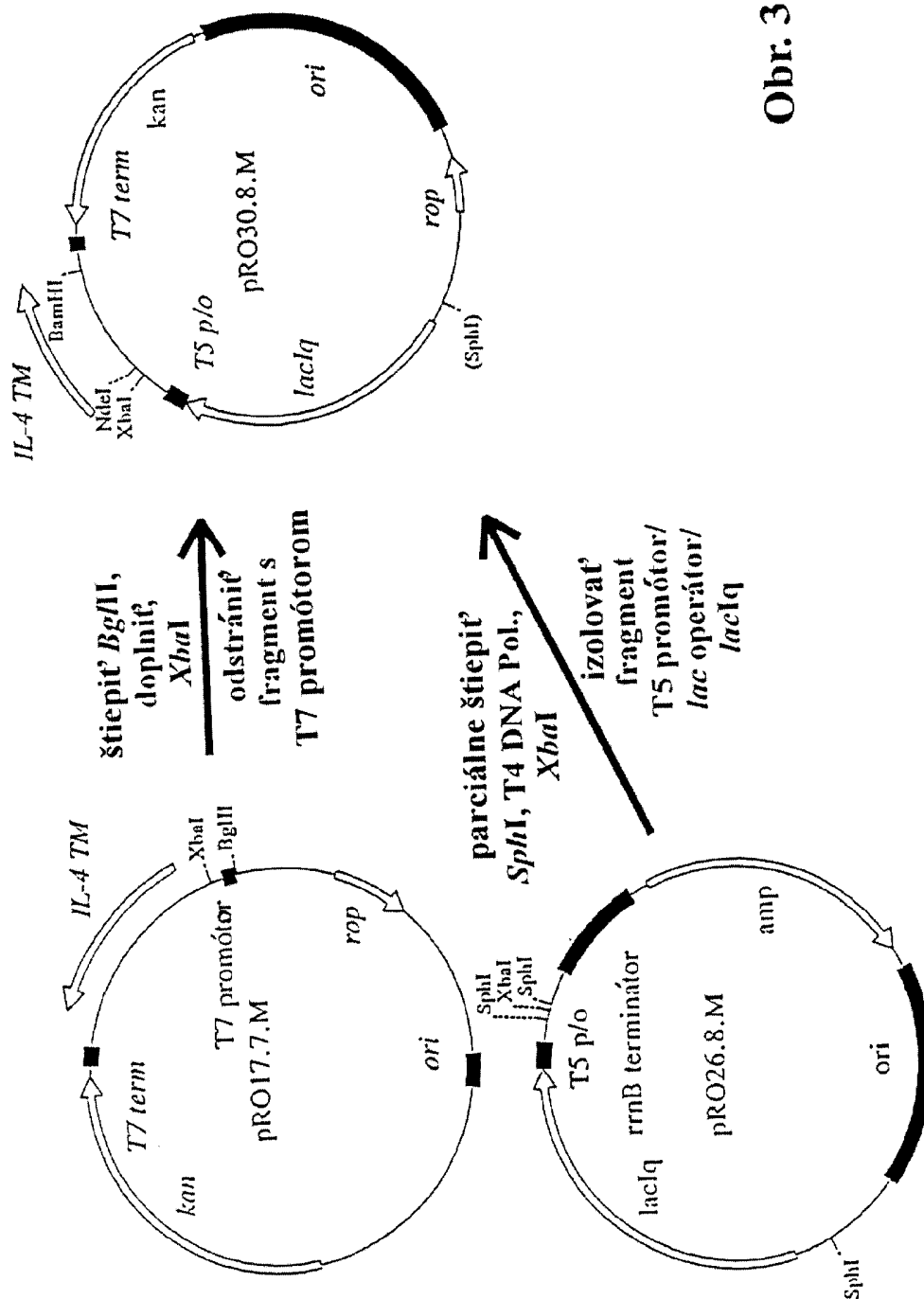
4. Použitie vektora podľa nároku 1 alebo 2 v metóde prípravy IL-4 a muteínov IL-4.

6 výkresov

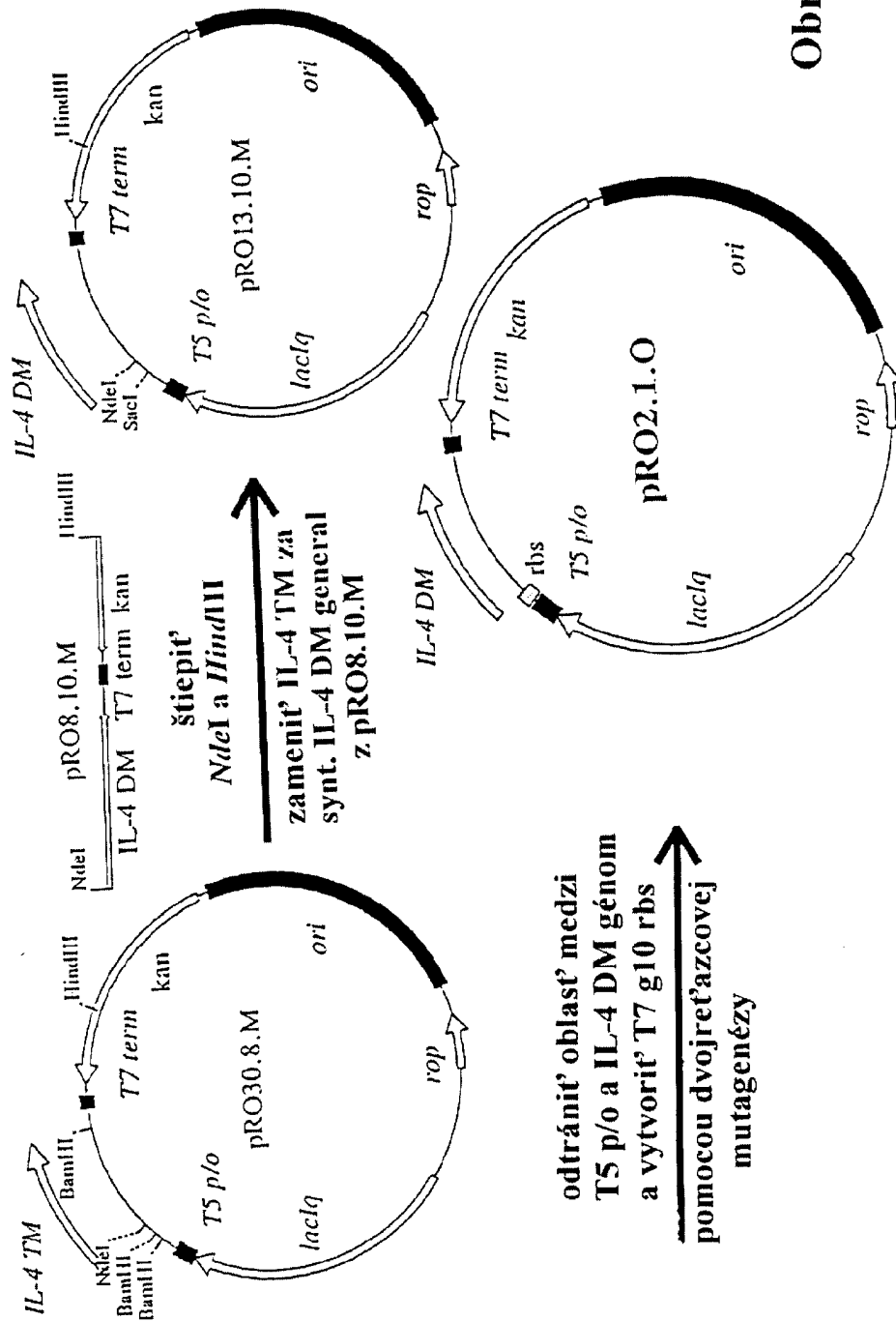




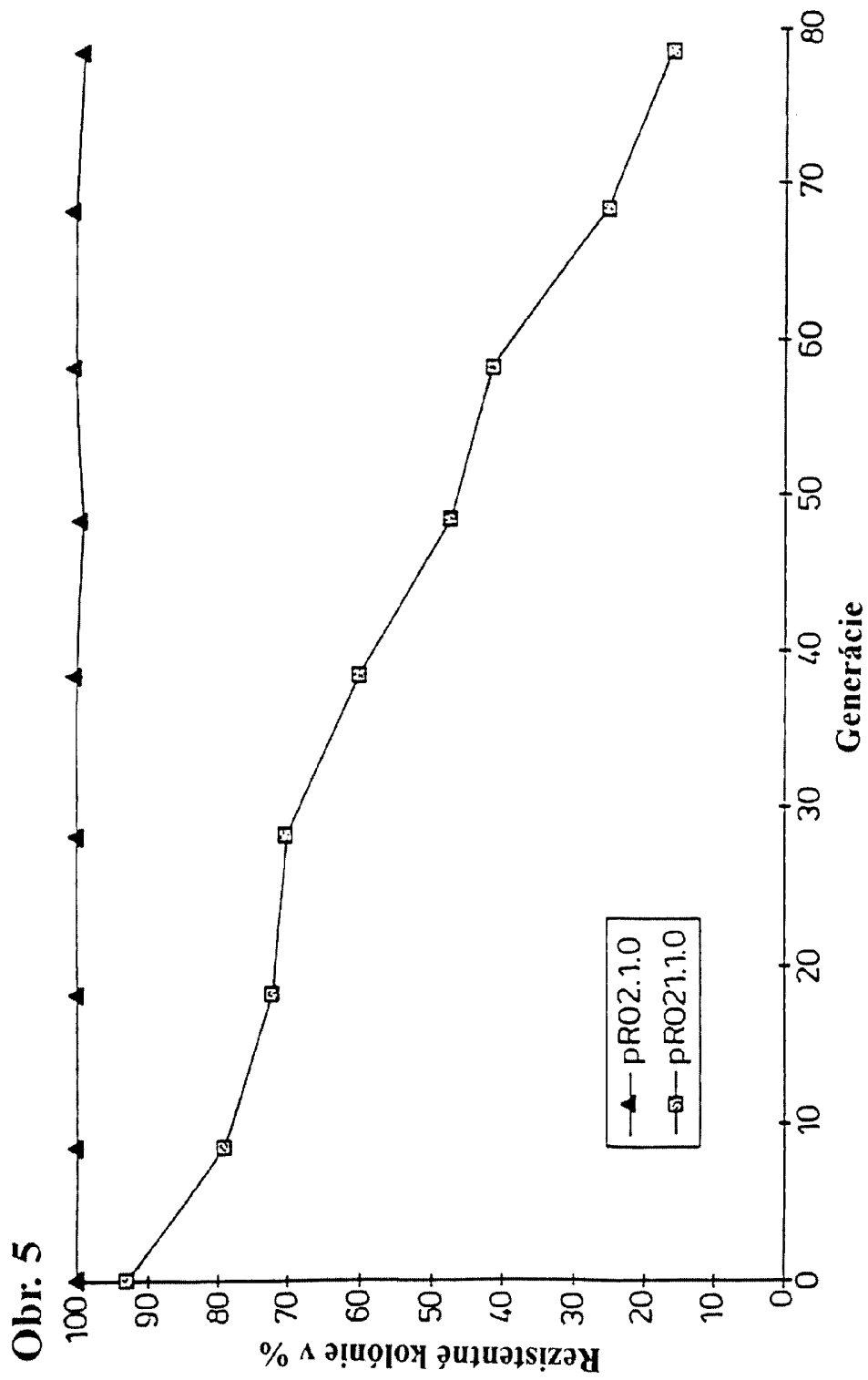
Obr. 2



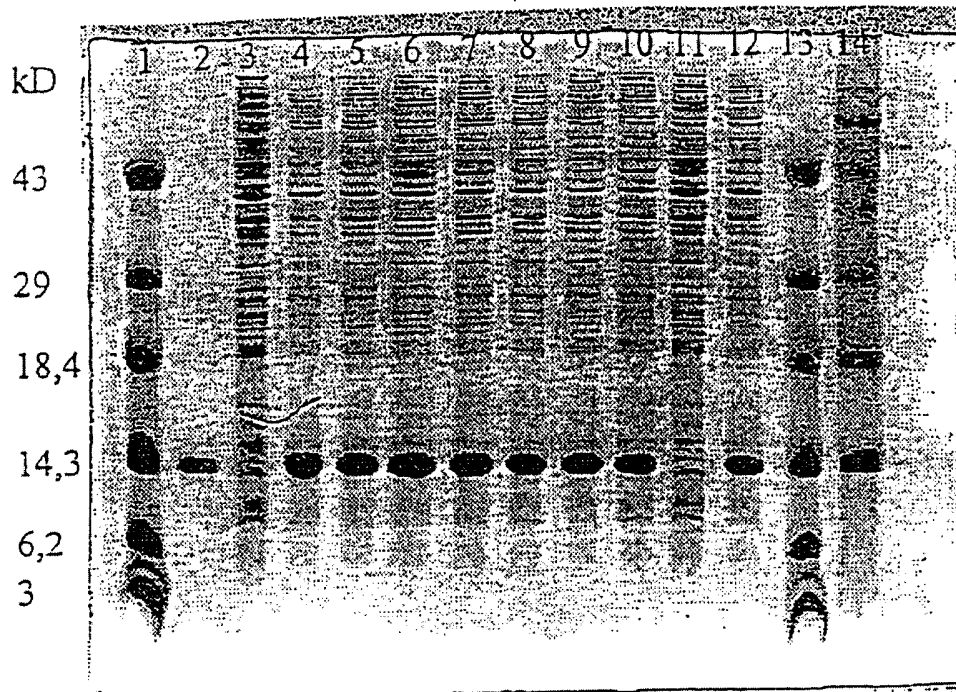
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 6



SDS-PAGE (15 %) analýza celkových extraktov z *E. coli* pRO2.1.0

Koniec dokumentu