SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 19.01.2000

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 99100967.1

(32) Dátum priority: 20.01.1999

(33) Krajina priority: EP

(40) Dátum zverejnenia: 14.08.2000

(86) Číslo PCT:

(21) Číslo dokumentu:

76-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

C 12N 15/24

(71) Prihlasovateľ: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, Leverkusen, DE;

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

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

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Plazmidy, ich konštrukcia a ich využitie vo výrobe interleukínu-4 a muteínov interleukínu-4**

(57) Anotácia:
Je opísaná konštrukcia a využitie expresných plazmidov vo výrobe rekombinantného interleu-kínu-4 (IL-4) a muteínov interleukínu-4.

PLAZMIDY, ICH KONŠTRUKCIA A ICH VYUŽITIE VO VÝROBE INTERLEUKÍNU-4 A MUTEÍNOV INTERLEUKÍNU-4

Oblasť techniky

Vynález sa týka konštrukcie a použitia expresných plazmidov vo výrobe rekombinantného interleukínu-4 (IL-4) a muteínov interleukínu-4.

Doterajší stav techniky

Zrelý ľudský interleukín-4 (IL-4) je zložený zo 129 aminokyselín a je z 50 % homológny 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 aggkomplex dvoch receptorov cytokínu, IL-4Ralfa a τ-reťazca (τc). Boli popísaní antagonistickí mutanti 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 τc-reťazcu. Zavedenie Asp (D) do týchto pozícií blokuje dimerizáciu receptoru 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 blokovať 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 na liečenie ochorení, ktoré zahrňujú vývoj T_{H2} a/alebo produkciu IgE (Ryan, J., Allergy Clin. Immunol. 99, 1 – 5, 1997).

Ako bolo popísané v rôznych publikáciách, na produkciu rekombinantného IL-4 a muteínov IL-4 sa môžu využiť prokaryotické organizmy. Bohužiaľ, popisované systémy majú rad nedostatkov (nízka hladina expresie,

nízka stabilita expresného vektoru), 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 vektoru.

Niekoľko aspektov expresného plazmidu je dôležitých pre vyššie uvedené kritériá (Hannig a kol., TIBTECH. 16, 54 – 60, 1998). Sú to:

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

Podstata vynálezu

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
- udržanie indukčnej schopnosti.

Predmetom tohto vynálezu je preto vytvorenie metódy pre 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/vektoru byť vhodný na expresiu ďalších proteínov (cytokínov, rastových faktorov, rozpustných receptorov, protilátok, atď.). S prekvapením sa 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. Preto je použitie plazmidov podľa tohto vynálezu oveľa výhodnejšie na produkciu rekombinantného interleukínu-4 a muteínov interleukínu-4 v porovnaní so všetkými prv známymi plazmidmi.

Novo vyvinutý 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. Lefkowits a B. Pernis, eds., Academic Press, Inc. Vol. IV, 121 – 152, 1990).

T7 g10 ribozomálne väzobné miesto

Väzobné 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 vektoru pET-9a (Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 – 89, 1990). T7 g10 vedúca sekvencia zahrňuje oblasť okolo 100 bp (Olins et al., Gene 227 – 235, 1988). Vo finálnom expresnom konštrukte je oblasť pred XbaI miestom odstránená. T7 g10 vedúca sekvencia teraz teda zahrňuje 42 bp a obsahuje zámenu jednej bázy z G na A v pozícii 3638 v tomto tu popisovanom 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, deleno maximálnym možným CAI pre gén pre rovnaké aminokyselinové 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 ribosomálne proteíny, všeobecne majú vysoké hodnoty CAI ≥ 0,46. Slabo exprimované gény ako lacI a trpR v E. coli majú nízke hodnoty CAI ≤ 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 expresie v *E. coli*. Avšak má syntetický gén s optimálnym využitím *E. coli* kodónov (hodnota CAI = 1) potenciál k ďalšiemu zvýšeniu hladiny expresie. Preto boli navrhnuté a klonované syntetické gény pre IL-4 a muteíny IL-4.

Transkripčný terminátor

Fragment z T7 DNA obsahujúci transkripčný terminátor TØ je odvodený z vektoru 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 zahrnutá v nadbytočnej transkripcii, obmedzujú dĺžku mRNA na minimálnu potrebnú dĺžku, a tým obmedzuje výdaj energie. Vzhľadom k tomu, 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 vektoru pET-9a (Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 – 89, 1990). Pôvodne sa jedná o kan gén Tn903 z vektoru pUC4KISS (Barany, Gene 37, 111 – 123, 1985). V tu popisovanom 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. Selekcia na ampicilíne má tendenciu k stratám, lebo táto látka je degradovaná sekretovaným enzýmom: beta-laktamázou. Spôsob bakteriálnej rezistencie ku kanamycínu závisí od aminoglykozidovej fosfotransferázy, ktorá inaktivuje antibiotikum.

Regulácia expresie

Kontrolovaná génová expresia 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 promótor bakteriofága T5 *E. coli*. Promótor $lacI^q$ a štruktúrny gén lacI bol izolovaný z vektoru 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 s 360 aminokyselinami, každá. Tetramér lac represoru je dimér dvoch funkčných dimérov. Štyri podjednotky sú držané spolu zväzkom štyroch helixov tvorených zvyškami 340 – 360. Pri izolácii lacI génu z vektoru 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 popisovaného plazmidu je odvodený z vektoru 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. Minimálne 15 – 20 kópií plazmidu sa udržiava v každej bakteriálnej bunke za normálnych rastových podmienok. Bežný počet tu popisovaného plazmidu je v tomto rozmedzí. Replikácia počiatku replikácie ColE1 – typu je iniciovaná 555 – nukleotidovým transkriptom RNA, RNAII, ktorý tvorí stabilný hydrid so svojím DNA templátom blízko ori. Hybrid RNAII - 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). Delécia rop génu vedie k zvýšeniu počtu kópií a prostredníctvom zvýšenia množstva génu k zvýšeniu hladiny expresie 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 popisovaného plazmidu rep gén kvôli zaisteniu vysokej stability plazmidu. V popise predmetného vynálezu popisovanému plazmidu chýba mob gén, ktorý je nutný na mobilizáciu, a preto nie je schopný riadiť svoj vlastný konjugačný prenos z jednej baktérie do inej.

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

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

Metódy použité počas vývoja expresného systému sú uvedené nižšie.

Materiály a metódy

Enzýmy

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

Metódy práce s rekombinantnou DNA

Štandardné klonovacie postupy boli popísané 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 DH5alfa (GIBCO BRL) a W3110 (ATCC 27325) boli použité primárne ako hostiteľské bunky. Genotyp W3110 je K12, F´ [N(rrnD-rnnE)lambda⁻.

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

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

Experimenty zamerané na mutagenézu použili metódu Denga a Nickoloffa (Deng a Nickoloff, Anal. Biochem. 200, 81 – 88, 1992), používajúcu systém „Mutagenéza s elimináciou unikátneho miesta„ od Pharmacia Biotech. Primer používaný na znovuvytvorenie T7 g10 rbs má nasledujúcu sekvenciu:

5´TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACATCTAGAAATAATTTTGTTTAA C TTTAAGAA3´ (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

Obr. 1 až obr. 4

Konštrukcia tu popisovaného expresného plazmidu. (Skratky: IL-4 TM, trojitý muteín IL-4, IL-4 DM, dvojitý muteín IL-4).

Obr. 5

Plazmidová stabilita expresných vektorov muteínu IL-4 pRO21.1.0 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 pRO21.1.0, ktorý je založený na komerčne dostupnom plazmide pET-30a (Novagen), stratený veľmi rýchlo. Iba 16 % kolónií obsahuje plazmid po 78 generáciách bez kanamycínovej selekcie.

Obr. 6

Udržanie schopnosti indukcie a expresie tu popisovaného expresného vektoru IL-4 a muteínu IL-4.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Test stability plazmidu

Testy stability plazmidu boli vždy štartované kultúrou zmrazenou v tekutom dusíku. Po roztavení kultúry bola stanovená OD_{600} a kultúra bola zriedená na 10^{-4} PBS pufrom 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 KH_2PO_4, 20 g glycerolu, 1 mg $MgSO_4$ x 7 H_2O na liter, pH 7,0) a inkubovaný pri 37 °C za trepania 280 rpm po dobu 24 hodín.

Stanovila sa OD_{600} narastenej kultúry, kultúra bola zriedená až do koncentrácie 10^{-4} v PBS pufre 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 po dobu cez noc. Percentuálne zastúpenie rezistentných kolónií sa určovalo každý deň.

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

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

Príklad 2

Expresia

Pre 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 OD_{600} 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.

Pre SDS-PAGE analýzu sa bunečné pelety resuspendovali vo vzorkovom pufre pre SDS-PAGE do koncentrácie 1 jednotka OD_{600}/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> Popis neznámeho organizmu: primér

<400> 1

tcaattgtga gcggataaca atttcacaca tctagaaata atttgttta actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNA

<213> Neznámy

<220>

<223> Popis neznámeho organizmu: Človek

<400> 2

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 240
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca 300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480
ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc gggcgatcgca gtggtgagta accatgcatc 540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 720
attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg 780
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat 840
gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 900
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 960
taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1020
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata 1080
ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 1140
catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1200
ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 1260
ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 1320
agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 1380
taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccagggggа aacgcctggt 1440

atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 1500
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttttа cggttcctgg 1560
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata 1620
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca 1680
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 1740
tgtgcggtat ttcacaccgc aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 1800
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 1860
ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 1920
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 1980
cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc acagatgtct 2040
gcctgttcat ccgcgtccag ctcgttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 2100
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcactgatgc ctccgtgtaa 2160
gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata 2220
cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta ctggaacgtt gtgagggtaa acaactggcg 2280
gtatggatgc ggcgcgacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg ctcatgagcc 2340
cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg 2400
cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatccatt 2460
tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggta tggcatgata gcgcccggaa 2520
gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat 2580
gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg 2640
aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg 2700
gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc 2760
ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgtcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc 2820
agcgtggtgg tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac 2880
aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat 2940
gccattgctg tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac 3000
cagacaccca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag 3060
catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt aagttctgtc 3120
tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg 3180
atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaaac catgcaaatg 3240
ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc 3300
gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtgggg 3360
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt taaccaccat caaacaggat 3420
tttcgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg 3480
gtgaagggca atcagctgtt gcccgtctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcttga 3540
gaaatcataa aaaatttatt tgctttgtga gcggataaca attataatag attcaattgt 3600
gagcggataa caatttcaca catctagaaa taatttttatt taacctttaag aaggagatat 3660
acatatgcac aaatgcgata tcaccctgca ggaaatcatc aaaaccctga attctctgac 3720
cgaacagaaa acccctgtgca ccgaactgac cgttaccgac atcttcggctg cttcgaaaaa 3780
caccaccgaa aaagaaacct tctgccgtgc tgctaccgtt ctgcgtcagt tctactctca 3840
ccacgaaaaa gacacccgtt gcctgggtgc taccgcttcag cagttccacc gtcacaaaca 3900
gctgatccgt ttcctgaaac gtctggaccg taaccgtgtgg ggttctggctg gtctgaacag 3960
ctgcccggtt aaagaagcta accagttcac cctggaaaac ttcctggaac gtctgaaaac 4020
catcatggac gaaaaagact ctaaatgctc ttcttaataa ggatccggct gctaacaaag 4080
cccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taaccccttg 4140
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggataat 4200
tc 4202

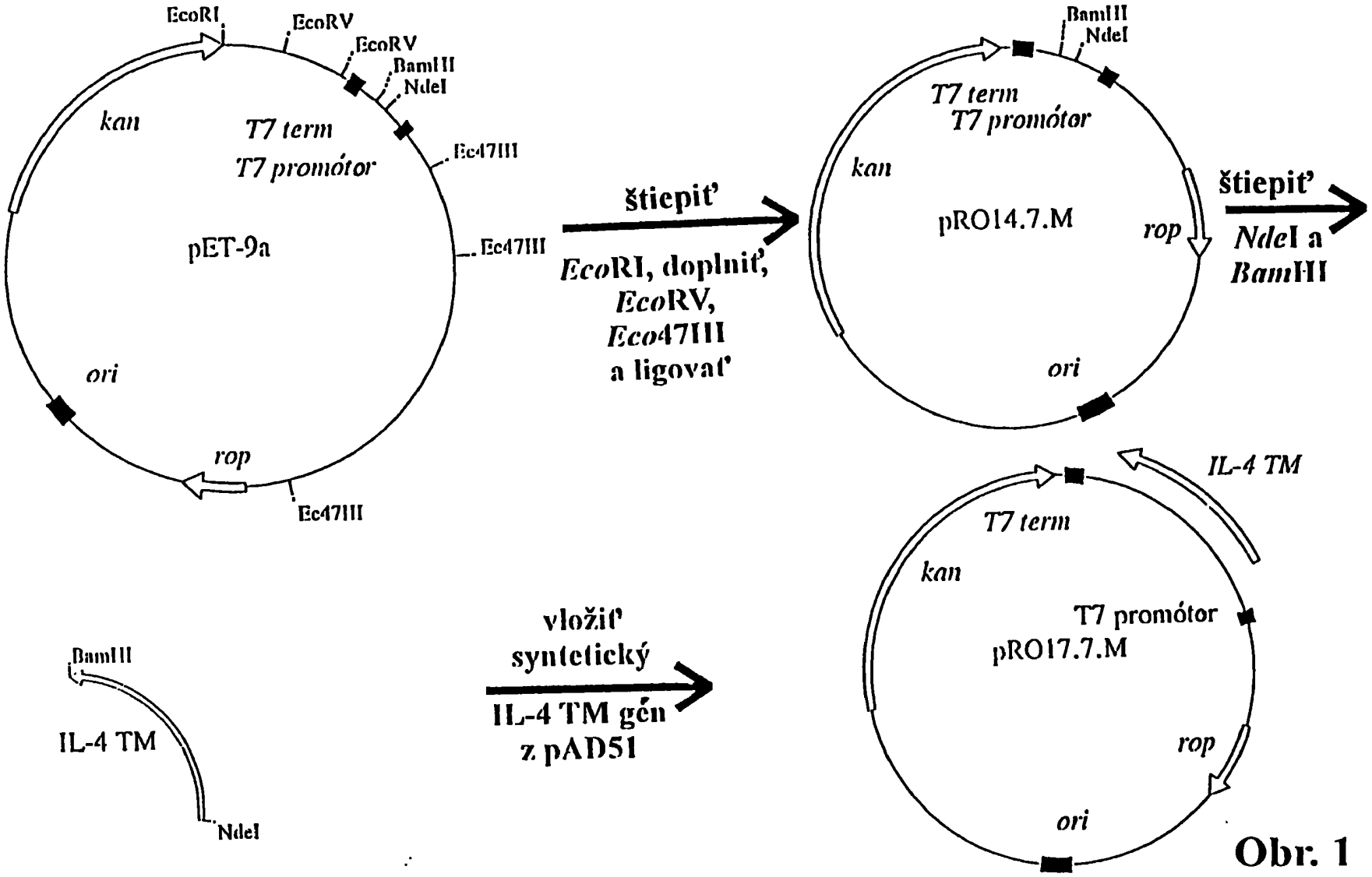
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Operón 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 *E. coli* a dvoch lac operátorových sekvencií, väzobného miesta pre ribozóm z bakteriofága T7g10 *E. coli,* iniciačného translačného kodónu, štruktúrneho génu pre IL-4 a muteín IL-4 a transkripčného terminátora za štruktúrnym génom.

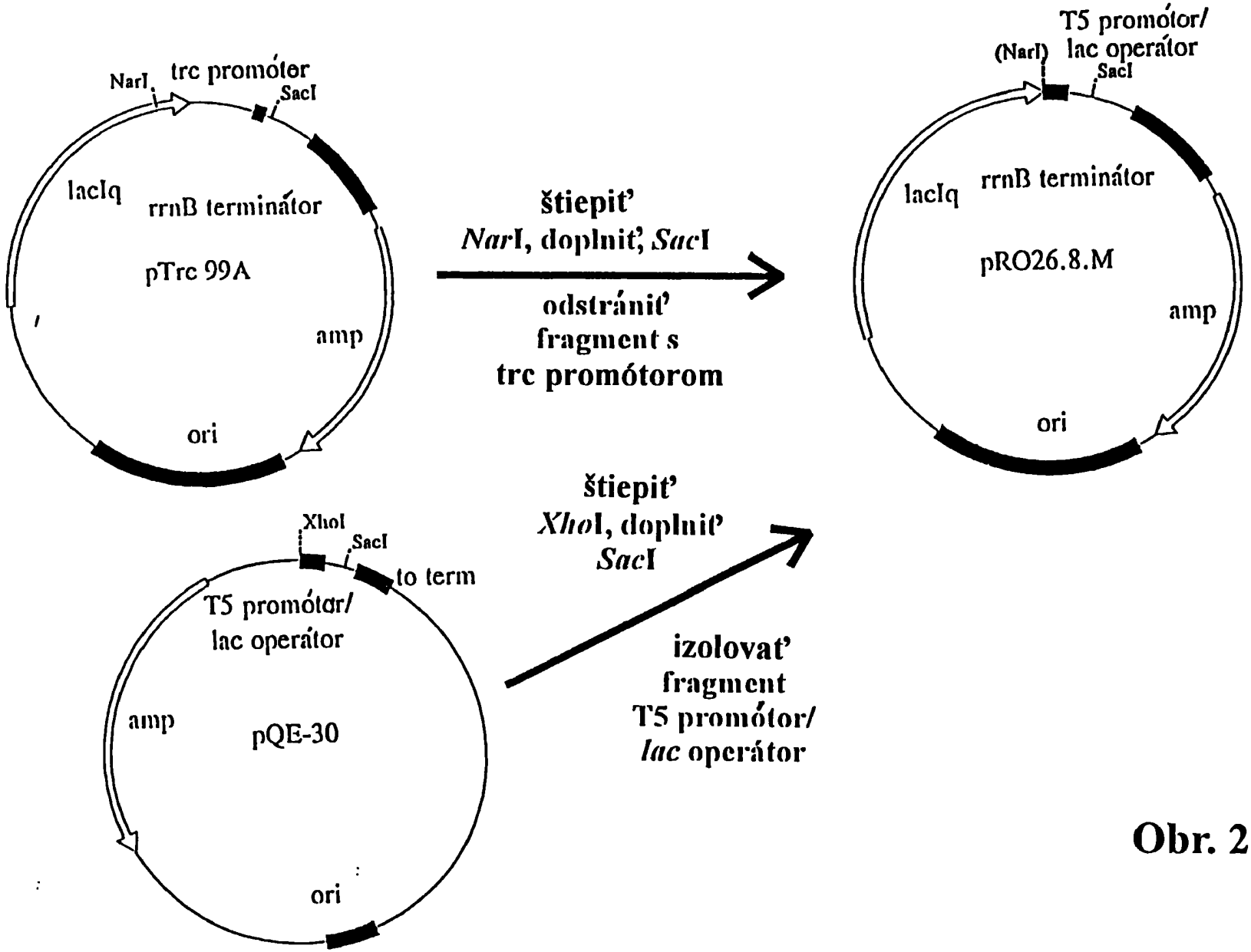
2. *E. coli* / pRO2.1.0.

3. *Escherichia coli* transformovaná jedným alebo viacerými plazmidmi nárokov 1 alebo 2.

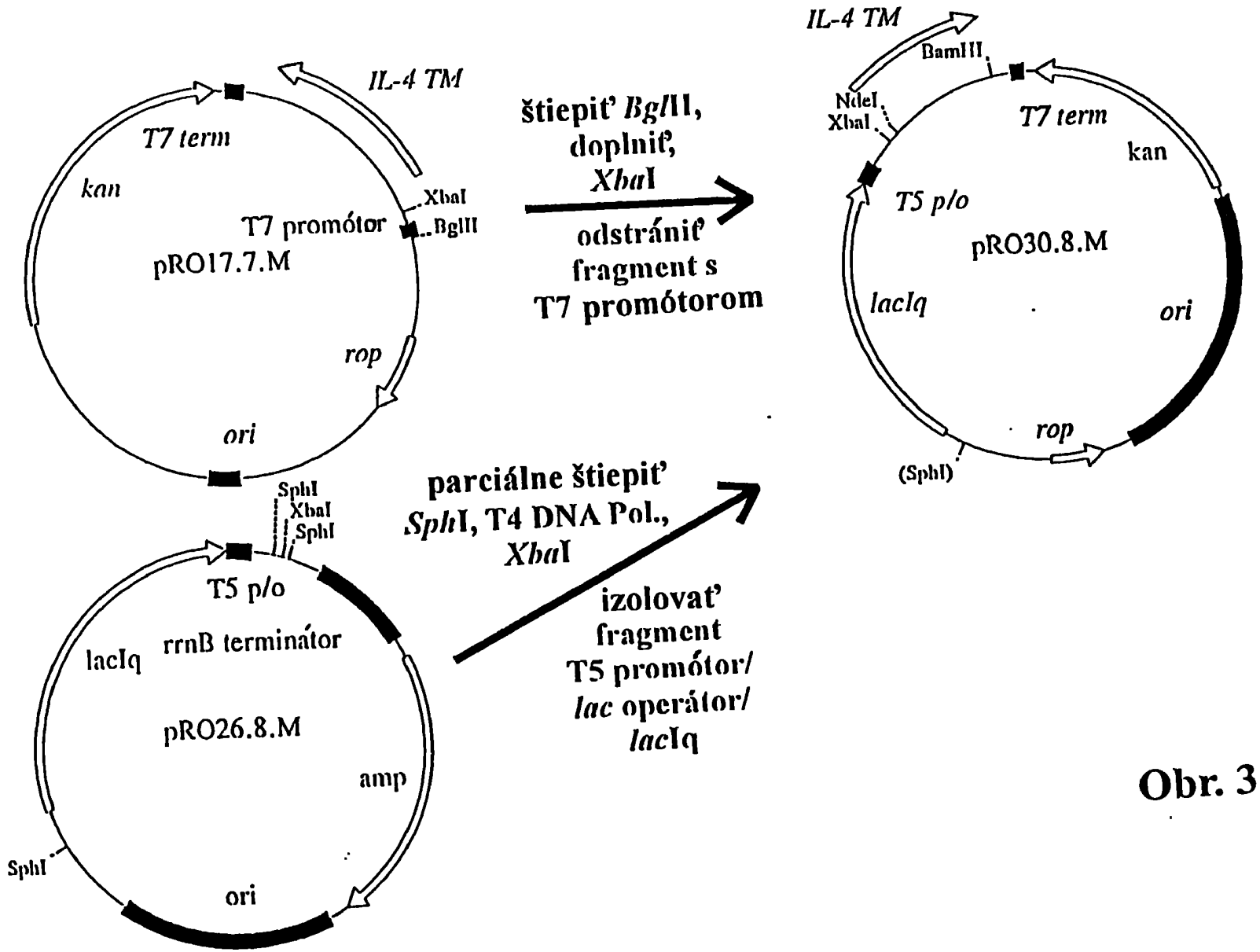
4. Použitie plazmidov podľa nárokov 1 alebo 2 v metóde prípravy IL-4 a muteínov IL-4.


EcoRI
EcoRV
EcoRV
BamHI
NdeI
Ec47III
Ec47III
kan
T7 term
T7 promótor
pET-9a
ori
rop
Ec47III
štiepiť
EcoRI, doplniť,
EcoRV,
Eco47III
a ligovať
BamHI
NdeI
T7 term
T7 promótor
kan
pRO14.7.M
rop
ori
štiepiť
NdeI a
BamHI
IL-4 TM
T7 term
kan
T7 promótor
pRO17.7.M
rop
ori
vložiť
syntetický
IL-4 TM gén
z pAD51
BamHI
IL-4 TM
NdeI

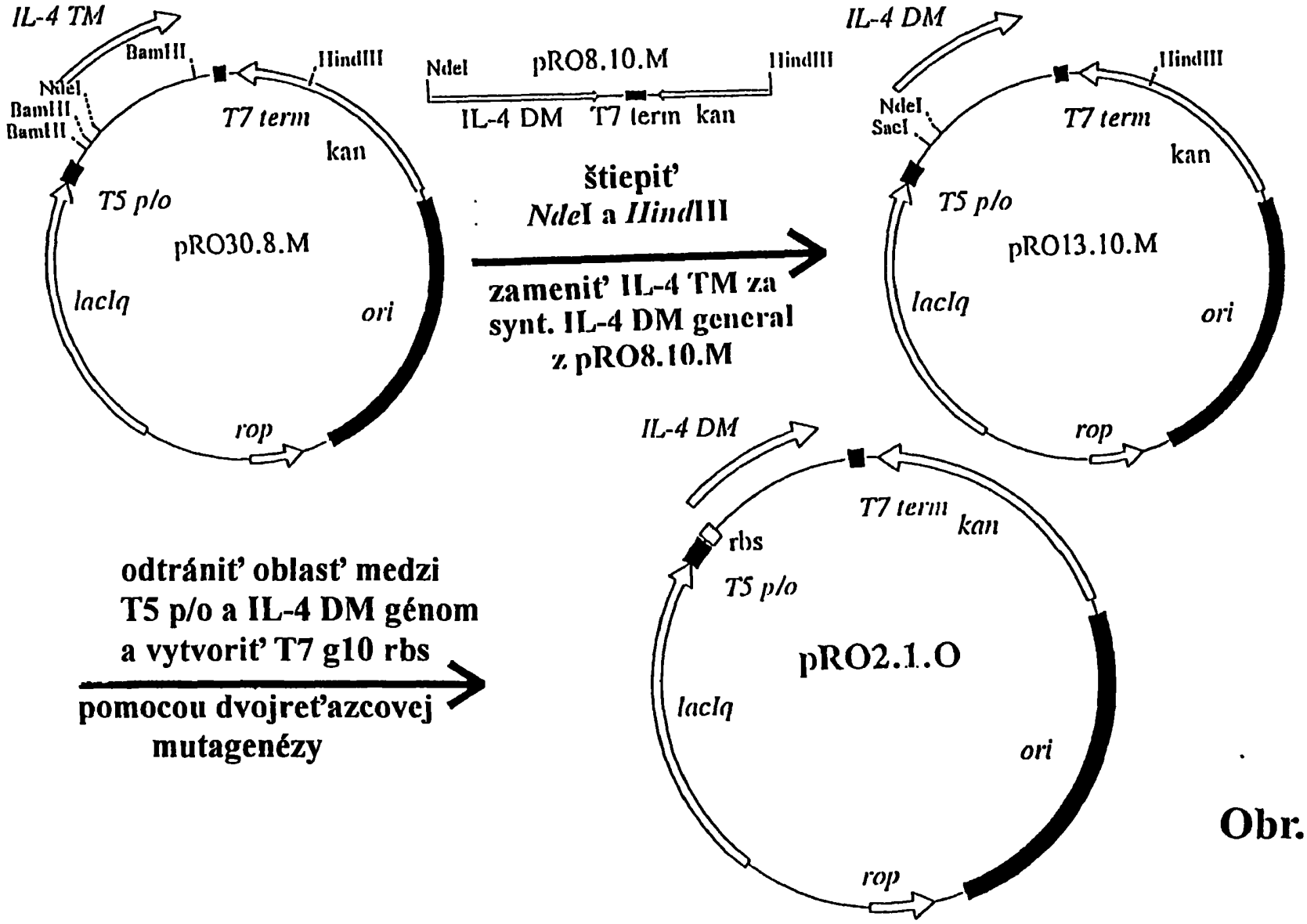
Obr. 1


NarI
trc promótor
SacI
lacIq
rrnB terminátor
pTrc 99A
amp
ori
štiepiť
NarI, doplniť, SacI
odstrániť
fragment s
trc promótorom
T5 promótor/
lac operátor
(NarI)
SacI
lacIq
rrnB terminátor
pRO26.8.M
amp
ori
štiepiť
XhoI, doplniť
SacI
XhoI
SacI
to term
T5 promótor/
lac operátor
amp
pQE-30
ori
izolovať
fragment
T5 promótor/
lac operátor

Obr. 2


IL-4 TM
T7 term
kan
XbaI
BglII
T7 promótor
pRO17.7.M
rop
ori
štiepiť BglII,
doplniť,
XbaI
odstrániť
fragment s
T7 promótorom
IL-4 TM
BamHI
NdeI
XbaI
T7 term
kan
T5 p/o
pRO30.8.M
lacIq
ori
rop
(SphI)
SphI
XbaI
SphI
T5 p/o
lacIq
rrnB terminátor
pRO26.8.M
amp
SphI
ori
parciálne štiepiť
SphI, T4 DNA Pol.,
XbaI
izolovať
fragment
T5 promótor/
lac operátor/
lacIq

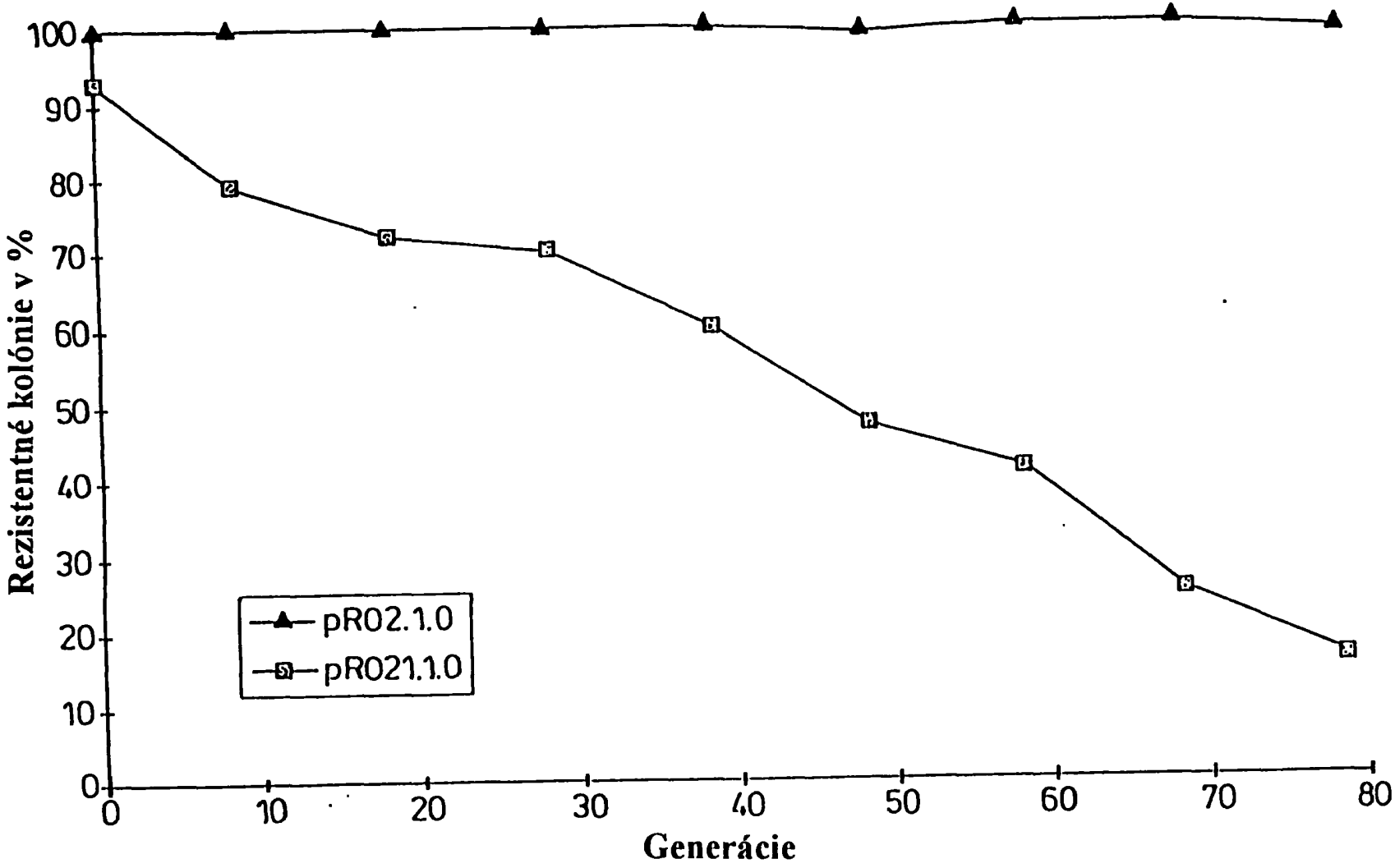
Obr. 3



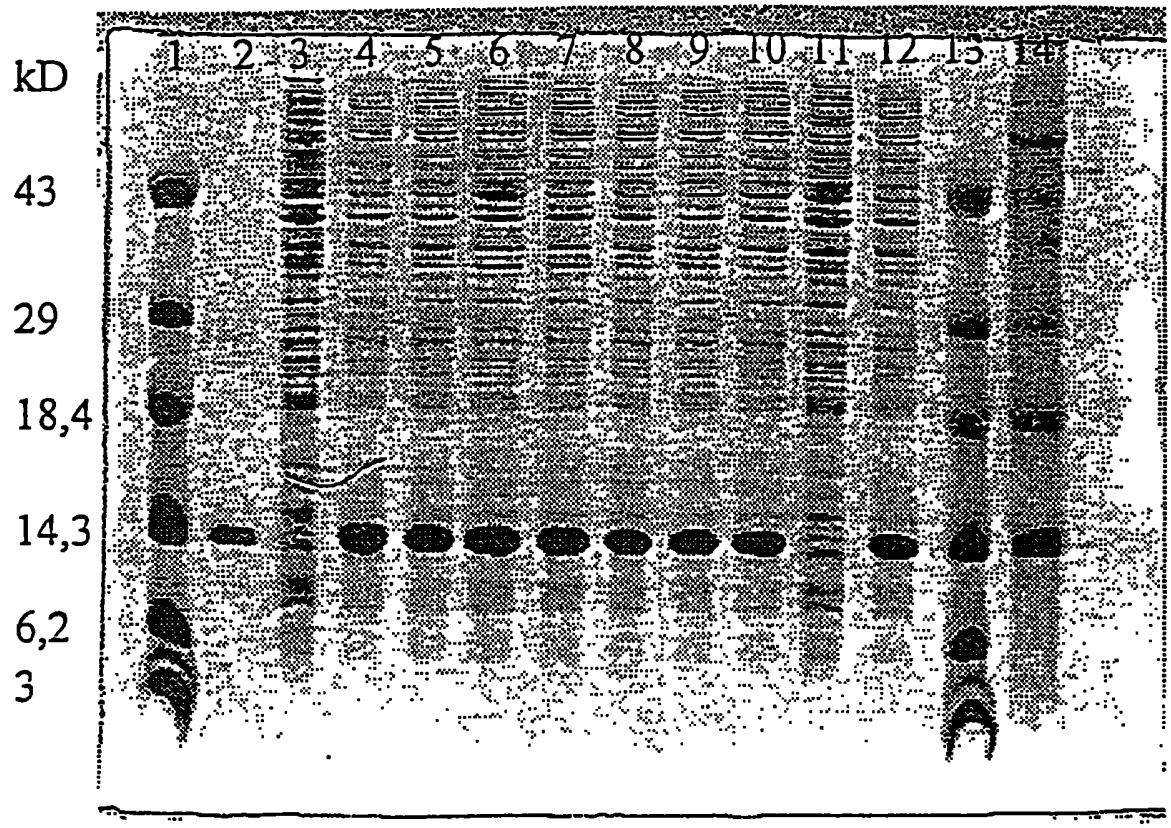
Obr. 4

0034-2202

Obr. 5


Rezistentné kolónie v %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Generácie
pRO2.1.0
pRO21.1.0

Obr. 6



SDS-PAGE (15 %) analýza celkových extraktov z *E. coli*/pRO2.1.0 pestovaných rôzny počet generácií bez selekcie antibiotikami 5 hodín po indukcii IPTG. 10 µl resuspendovaných bunečných peliet sa aplikovalo do každej jamky. Elektroforéza prebehla za denaturačných podmienok a gél bol farbený pomocou Coomassie brilliant blue.

Dráha 1: Markér molekulových hmotností (malý rozsah, Life Technologies)

Dráha 2: IL-4 mutein (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 (78 generácií) po indukcii

Dráha 13: Markér molekulových hmotností (malý rozsah, Life Technologies)

Dráha 14: Markér molekulových hmotností (vysoký rozsah, Life Technologies)