

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 745

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. :⁷

C 12 N 15/53 G 01 N 33/573

C 12 N 1/21

C 12 N 5/12

C 12 N 9/02

C 07 K 16/40

A 61 K 38/44

A 61 P 7/12

A 61 P 9/10

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-4056**

(22) Přihlášeno: **13.07.1995**

(30) Právo přednosti: **13.07.1994 JP 1994/161053**

13.09.1994 JP 1994/218392

07.12.1994 JP 1994/303809

(40) Zveřejněno: **14.02.1996**

(Věstník č. 02/1996)

(47) Uděleno: **17.05.04**

(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.07.2004**

(Věstník č. 7/2004)

(73) Majitel patentu:

SANKYO COMPANY LIMITED, Tokyo, JP

(72) Původce:

Takahashi Tohru, Tokyo, JP

Koishi Ryuta, Tokyo, JP

Kawashima Ichiro, Tokyo, JP

Serizawa Nobufusa, Tokyo, JP

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Polynukleotidová sekvence, DNA, polypeptid,
farmaceutický prostředek, vektor, hostitel,
expresivní systém, protilátka, způsob čištění
proteinu a hybridom**

(57) Anotace:

Polynukleotidová sekvence kódující polypeptid, který obsahuje sekvenci aminokyselin od čísla 1 do čísla 526 sekvence č. ID: 12 nebo která kóduje mutaci či variantu řečeného polypeptidu s předpokladem, že polypeptid, kódovaný touto polynukleotidovou sekvencí je schopen redukovat dichloroindofenol a oxidovaný glutathion. Řešení se rovněž týká DNA s obsahem uvedené polynukleotidové sekvence, polypeptidu, který je touto sekvencí kódován, příslušných vektorů, hostitelů, expresivních systémů a protilátek a farmaceutického prostředku, který uvedený polypeptid obsahuje spolu s farmaceutickým nosičem. Mimo to se řešení týká také způsobu čištění účinných polypeptidů a hybridomu, který exprimuje příslušné protilátky.

CZ 293745 B6

Polynukleotidová sekvence, DNA, polypeptid, farmaceutický prostředek, vektor, hostitel, expresivní systém, protilátka, způsob čištění proteinu a hybridom

5 Oblast techniky

Tento vynález se vztahuje na nový polypeptid mající schopnost redukovat dichloroindofenol a oxidovaný glutathion, na DNA kódující tento nový polypeptid, na vektory obsahující takovou DNA, na hostitele transformované takové vektory a na farmaceutické prostředky obsahující tento polypeptid. Tento vynález dále pojednává o monoklonálních protilátkách proti tomuto polypeptidu a způsobu izolace a čištění tohoto polypeptidu s použitím těchto protilátek.

Dosavadní stav techniky

15 Tvorba exogenních proteinů expresivními systémy může být s použitím technik známých pracovníkům v tomto oboru jednoduchou záležitostí. Nicméně existuje mnoho polypeptidů, které v exogenních systémech nelze snadno exprimovat. Problém může být v tom, že takový polypeptid nemůže být exprimován ve velkém množství, což nelze upravit pouhým umístěním regulačního genu ve směru proti směru exprese. Dále to může být způsobeno možností, že post-transkripční úpravy potřebné pro získání zralé formy se neuskutečňují nebo se uskutečňují nesprávně.

25 Například u mnoha eukaryotických polypeptidů se translace zpočátku uskuteční s methioninem na N-konci, který je následně deletován a vzniká tak zralá forma polypeptidu. Toto zpracování se nemůže u prokaryot odehrát, proto se musí hledat alternativní prostředky pro získání potřebné exprese. Jedna z takových technik zahrnuje sloučení požadovaného exogenního proteinu s proteinem vážícím maltózu nebo s glutathion-S-transferázo například pročištěním exprimovaného fúzního proteinu a následným štěpením proteázou, jako je faktor Xa, enterokinázou nebo thrombinem. Hlavní nevýhodou této nepohodlné metody je skutečnost, že vyžaduje dva čisticí kroky, které vedou k výrazným ztrátám konečného produktu.

35 Kyslík pro metabolickou energii je v buněčném prostředí obecně poskytován ve formě využíván, je většinou volný radikál, jako je superoxid (O_2^-), peroxid (H_2O_2) nebo hydroxylové radikály ($OH^\cdot$), které jsou všechny redukovány, aby po reakci vytvořily vodu (H_2O). Plynný kyslík sám je silně oxidační, ale termín „aktivovaný kyslík“ je zde používán ve vztahu ke kyslíku a molekulám obsahujícím kyslík, které mají vyšší oxidační potenciál než atmosférický kyslík. Nejsilnější formou aktivovaného kyslíku je jeho volný radikál, což je molekula nebo atom mající jeden nebo více nepárových elektronů.

40 Volné radikály jsou nestabilní, a pokud nejsou pod řádnou kontrolou, mohou denaturovat lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Z toho vyplývá, že ačkoli je aktivovaný kyslík, životně důležitým prvkem, je zároveň potenciálně zdraví škodlivý a musí být pod přísnou kontrolou. Dokonce i malá množství aktivovaného kyslíku mohou vyvolat vzhledem ke své vysoké reaktivitě poruchy. Z toho důvodu nejsou organismy schopny přežít, pokud nejsou vybaveny obrannými mechanismy zaměřenými proti aktivovanému kyslíku.

50 V buněčném prostředí musí být umístění, množství a čas tvorby aktivovaného kyslíku přísně vyváženo schopností buněk neutralizovat nebezpečí představované aktivovaným kyslíkem. Tuto schopnost typicky zabezpečují obranné mechanismy, které využívají vlastní antioxidanty nebo antioxidační enzymy. V kontextu tohoto vynálezu je termín „antioxidant“ obecně používán pro přirozeně se vyskytující látky, které mají schopnost zabránit nebo potlačit autooxidaci například lipidů. Termín „antioxidační enzym“ je obecně používán pro enzym katalyzující reakci, která eliminuje aktivovaný kyslík. Termín „antioxidační působení“ je sestaven na základě těchto termínů.

V řadě abnormálních situací dochází ke tvorbě nadbytečného množství aktivovaného kyslíku. Takovými případy jsou pro člověka například stresové situace, používání drog, kouření, chirurgické zákroky, transplantace orgánů, ischemické choroby z důvodu mozkové mrtvice nebo infarktu myokardu. Tato vysoká množství aktivovaného kyslíku jsou větší, než jaká mohou dané kontrolní systémy zpracovat, takže přebytečný aktivovaný kyslík může způsobit další poškození organismu vážným narušením normálních buněk. Výsledný tzv. oxidační stres je odpovědný za velké množství dalších zdravotních potíží.

Jako příklad lze uvést arteriosklerózu. Za jednu z příčin tohoto onemocnění je považován výskyt lipoproteinů s nízkou hustotou, které byly oxidovány aktivovaným kyslíkem [Steinbeerg, D. (1983), Arteriosclerosis 3, 283–301]. Rovněž se předpokládá, že oxidační stres se přímo podílí na příčinách a důsledcích mechanismů spojených s výskytem metabolických poruch a vaskulárních komplikací při diabetu [Kondo, M. vyd., „Approaches from Modern Medicine (4) Free Radicals“, Medical view Pub., str. 138–146].

Aktivovaný kyslík se rovněž účastní vzniku dalších patologických stavů a okolností, jako jsou ischemické poruchy (poruchy provázející reperfúzi, ischemická srdeční onemocnění, cerebroischemie, ischemická enteritida, apod.), edémy, vaskulární hyperpermeabilita, záněty, poruchy žaludeční sliznice, akutní pankreatitida, Crohnova nemoc, vředová kolitida, poruchy jater, Paraquatova nemoc, rozedma plic, chemokarcinogeneze, karcinogenní metastázy, syndrom nedostatečnosti dýchacího ústrojí u dospělých, disseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), šedý zákal, předčasná retinopatie, autoimunitní onemocnění, porfyrémie, hemolytická onemocnění, středomořská anemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, epilepsie, poruchy z ultrafialového záření, poruchy z ozáření, omrzliny a popáleniny.

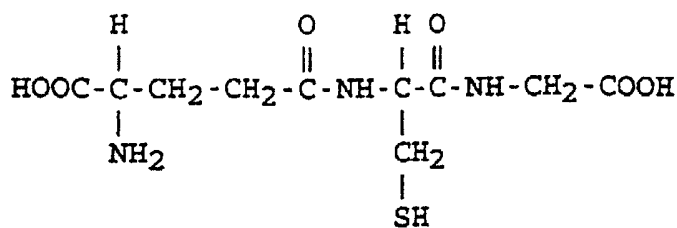
Jak na povrchu, tak uvnitř buňky existuje několik obranných mechanismů sloužících výhradně účelům zneškodnění aktivovaného kyslíku vytvořeného fyziologickými cestami.

Níže uvedené antioxidanty a antioxidační enzymy z vnitřního prostředí buňky jsou známy pro své schopnosti zpracovat a eliminovat aktivovaný kyslík. Například v peroxisomech se vyskytuje kataláza, která redukuje a odstraňuje peroxid vodíku. Tluthionperoxidáza se vyskytuje v cytoplazmě mitochondrií. Tento enzym redukuje a detoxikuje peroxid vodíku a peroxidy lipidů v přítomnosti redukováného glutathionu. Například transferin, feritin a laktoferin potlačují tvorbu aktivovaného kyslíku tím, že stabilizují ionty železa, zatímco cerolplazmin působí podobně při použití iontů mědi. Superoxiddismutáza, která je rovněž přítomna v cytoplazmě mitochondrií, katalyzuje redukci superoxidů za vzniku peroxidu vodíku, který je dále eliminován například katalázou. Dále vitamíny C a E, redukováný glutathion a některé další látky s nízkou molekulovou hmotností mají rovněž schopnost redukovat a eliminovat aktivovaný kyslík.

Na druhé straně takové látky, jako je extracelulární superoxiddismutáza, extracelulární glutathionperoxidáza a redukováný glutathion existují v extracelulárním prostředí a mají podobné mechanismy působení jako jejich protějšky vyskytující se uvnitř buněk. Avšak ve srovnání se situací uvnitř buňky je počet antioxidantů a antioxidačních enzymů vně buňky podstatně nižší a pouze několik z nich vykazuje antioxidační účinky v extracelulárním prostředí.

Redukovaný glutathion má významnou funkci při udržování redukováného stavu jak vně, tak uvnitř buňky. Jeho vzorec je uveden níže. Glutathion byl poprvé objeven jako látka vyskytující se v kvasinkách v roce 1888 de-Ray-Pailhadem a byl po izolaci v roce 1921 pojmenován Hopkinsem jako glutathion.

Vzorec glutathionu:



Glutathion se skládá ze tří aminokyselin: kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Thiolové skupiny dvou molekul glutathionu mohou být oxidovány za vzniku disulfidové vazby v přítomnosti aktivovaného kyslíku, čímž tento aktivovaný kyslík redukuje.

Glutathion vzniká především v játrech a v těle cirkuluje prostřednictvím plazmy. V normálním organismu se glutathion vyskytuje téměř výhradně v redukované formě. Pakliže se zvýší hladina jeho oxidované formy, znovu se vytvoří redukovaná forma působením glutathionreduktázy v přítomnosti NADPH (nikotinadenindinukleotidfosfát). Tak ochraňuje redukovaný glutathion buněčné membrány, před oxidačními poruchami prostřednictvím své redukční funkce, která redukuje aktivovaný kyslík na volné radikály. Další výsledkem této antioxidační vlastnosti redukovaného glutathionu je obrana proti účinkům radioaktivity a jeho využitelnost jako léčebného přípravku při šedém zákalu. V posledních letech bylo rovněž publikováno, že u pacientů s AIDS jsou značně sníženy systémové hladiny redukovaného glutathionu, čímž se dokazuje, že redukovaný glutathion má pro organismus zásadní důležitost. Při nenormálních podmínkách může být však množství aktivovaného kyslíku tak vysoké, že doslova veškerý glutathion je v oxodovaném stavu, takže aktivovaný kyslík není odstraňován tím nejrychlejším možným způsobem.

Dalším příkladem je lidský thioredoxim. Je to látka, která využívá svou redukční účinnost k několika fyziologickým procesům, které zprostředkovává jak na povrchu, tak uvnitř buňky. Lidský thioredoxin (rovněž známý jako Adult T Cell Leukemie Derived Factor, ADF) byl klonován jako faktor, který má schopnost indukovat receptory interleukinu 2 (IL-2R) u dospělých T buněk leukemických buněčných linií. Je to reduktáza závislá na thiolu, obsahující ve svých aktivních místech dva cysteinové zbytky a mající schopnost redukovat aktivovaný kyslík a volné radikály.

Kromě indukce receptorů IL-2 může lidský thioredoxin rovněž: podporovat buněčný růst u B buněk kmene 3B6, které byly infikovány Epstein-Barr virem (EBV), chránit před faktorem nádorové nekrózy (TNF) odvozeného od monocytů linie U937 a chránit proti poškození vaskulárních endoteliálních buněk neutrofily. Dále působí lidský thioredoxin v intracelulárním prostředí na transkripční faktor NFkB, JUN a FOS prostřednictvím své redukční účinnosti, čímž podporuje vazebnou aktivitu DNA a umožňuje tak zvýšení transkripční činnosti. V současné době se vyvíjí lidský thioredoxin jako léčebný přípravek pro poruchy z ozáření a při poruchách provázejících reperfúzi, revmatické artritidě a zánětech. Všem těmto poruchám lze zabránit schopností jeho redukční účinnosti vedoucí k ochraně buněk před poškozením.

Jak bylo již dříve zmíněno, z fyziologického hlediska je nesmírně důležité udržovat nitrobuněčné i mimobuněčné prostředí v redukovaném stavu eliminací aktivovaného kyslíku a volných radikálů. Předpokládá se, že existuje mnoho dosud nepopsaných antioxidantů a antioxidačních enzymů jak uvnitř, tak vně buňky, které hrají důležitou roli při odstraňování aktivovaného kyslíku a volných radikálů. Bylo by tedy nadmíru užitečné nalézt redukující látky, které by měly schopnost opětovně vytvářet například redukovaný glutathion. Takový látka by mohla pomoci při takových abnormálních stavech, jaké byly popsány výše v tomto textu.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří polynukleotidová sekvence kódující polypeptid, který obsahuje sekvenci aminokyselin od čísla 1 do čísla 526 sekvence č. ID: 12 nebo která kóduje mutaci či variantu řečeného polypeptidu s předpokladem, že polypeptid, kódovaný touto polynukleotidovou sekvencí je schopen redukovat dichloroindofenol a oxidovaný glutathion.

Součástí podstaty vynálezu tvoří zejména sekvence, která má 55% nebo vyšší sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. 1 až 526 sekvence č. ID: 12, sekvence, která sdílí více než 70% sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. 1 až 526 sekvence č. ID: 12 a zvláště sekvence, která sdílí více než 80% sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. až 526 sekvence č. 12.

Výhodným provedením je sekvence, jejíž kódující sekvence obsahuje nukleotidovou sekvenci 70 až 1647 vyznačenou v sekvenci č. ID: 11 a sekvence, která kóduje polypeptid mající sekvenci – 23 až 526 ze sekvence č. ID: 12 nebo její mutaci či variantu.

Podstatu vynálezu tvoří také DNA, která hybridizuje s uvedenou polynukleotidovou sekvencí a ve které řetězec s odpovídajícím smyslem kóduje polypeptid mající redukující účinek, zejména DNA, při jejímž hybridizačních podmínkách se používá 6x SSC při 60 až 70 °C.

Součástí řešení tvoří také polypeptid, který je kódován uvedenou polynukleotidovou sekvencí a který je určen pro využití v profylaxi nebo léčbě stavů způsobených nebo souvisejících s oxidačním stresem nebo s kterýmkoliv onemocněním způsobeným aktivovaným kyslíkem, zvláště pro využití v profylaxi nebo léčbě arteriosklerózy, diabetu nebo ischemických poruch. Polypeptid je specificky určen pro využití v profylaxi nebo léčbě arteriosklerózy, diabetu, ischemických poruch, edemů, vaskulární hypermeability, zánětů, poruch žaludeční sliznice, akutní pankreatitidy, Crohnovy nemoci, vředové kolitidy, poruch jater, Paraquatovy nemoci, rozedmy plic, chemokarcinogeneze, karcinogenních metastáz, syndromu nedostatečnosti dýchacího ústrojí u dospělých, disseminované intravaskulární koagulace (DIC), šedého zákalu, předčasné retinopatie, autoimunitních onemocnění, porfyrémie, hemolytického onemocnění, středomořské anemie, Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy nemoci, epilepsie, poruch z ultrafialového záření, poruch z ozáření, omrzlin a popálenin.

Podstatu vynálezu tvoří rovněž použití tohoto polypeptidu pro výrobu farmaceutického prostředku a farmaceutický prostředek pro léčbu a profylaxi stavů způsobených nebo majících souvislost s oxidačním stresem nebo jakoukoli nemocí způsobenou aktivovaným kyslíkem, a zároveň léčebné přípravky obsahující takový polynukleotid.

Vynález se dále týká vektorů, obsahujících svrchu uvedenou polynukleotidovou sekvenci.

Podstatu vynálezu tvoří také protilátky, obzvláště monoklonální protilátky, a jejich ekvivalenty proti polypeptidu. Tento vynález dále popisuje způsob výroby takových protilátek, hybridomy pro jejich produkci a způsoby čištění takového polypeptidu s využitím těchto protilátek.

Přehled obrázků na výkresech

Tento vynález bude ilustrován následujícími obrázky, ve kterých:

Obr. 1 je konstrukční diagram plazmidu pSR α 31–7.

Obr. 2 je diagram začlenění sekvence kódující histidinový hexamer do pUCKM31–7.

Obr. 3 je konstrukční diagram pMAL31–7.

Obr. 4 je graf hodnocení redukční účinnosti dichlorfenol–indofenolu.

Obr. 5 uvádí stanovení redukční účinnosti oxidovaného glutathionu.

Přirozeně se vyskytující redukující polypeptid má sekvenci uvedenou pod číslem ID: 12 a skládá se z 526 aminokyselin s valinem na svém N-konci.

- 5 Přirozeně se vyskytující DNA kódující tento polypeptid má sekvenci nukleotidů 70 až 1647 vyznačenou jako sekvence ID: 11.

Polypeptid podle vynálezu má schopnost redukovat oxidovaný glutathion a dichloroindofenol. Takovýto popis tohoto peptidu je sice přísný, avšak poněkud těžkopádný, takže polypeptid podle 10 vynálezu bude označován jako polypeptid nebo protein KM31-7.

Protein KM31-7 má původ v organismu nebo je mutací či variantou takového proteinu, takže přináší minimální problémy s jeho toxicitou a/nebo antigenitou.

- 15 V druhém provedení tohoto vynálezu je za prekursor proteinu TM31-7 pokládán polypeptid o sekvenci -23 až 526 se sekvenčním číslem ID: 12. Jako takový zahrnuje tento vynález rovněž tento prekursor a jeho mutace či varianty zároveň se sekvencí polynukleotidů kódující takový prekursor.

- 20 Dále budou uvedeny základní postupy pro získání exprimovaného specifického polypeptidu z živočišných buněk technikami genetických rekombinací.

mRNA kódující peptid KM31-7 může být tvořen známými metodami a reverzní transkripcí převedena na ds-DNA. Jak zdroj původní mRNA mohou být použity jakékoli vhodné živočišné 25 buňky, buněčné linie nebo tkáně, dává se však přednost buňkám buněčné linie KM-102 odvozeným od lidských buněk kostní dřeně [Haryguaya, K. a Handa, H. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3447-3480].

Pro extrakci mRNA za savčích buněk mohou být použity různé metody. Ve většině případů se 30 používají metody používající guanidinthiokyanát a horký fenol nebo metoda guanidinthiokyanát-kyseliny chlorovodíkové, ale obecně je nejvíce používána metoda používající guanidinthiokyanát a chlorid cesný.

Vzhledem k tomu, že většina mRNA přítomné v cytoplazmě eukaryotických buněk má 3'-konci 35 sekvenci polyA, může být purifikace savčí mRNA provedena adsorpcí na kolonu celulózy obsahující oligo(dt), čímž se využije tato vlastnost mRNA. Eluovaná mRNA může být dále frakcionována takovými metodami, jako je centrifugace v sacharosovém hustotním gradientu.

Kontrola, zda taková mRNA skutečně kóduje požadovaný peptid, může být provedena translací 40 této mRNA ve vhodném systému, jakým je například oocyt *Xenopus laevis*, králičí retikulocyty nebo pšeničné klíčky.

Měření redukující aktivitu exprimovaného produktu může být provedeno následujícím způsobem.

- 45 i) Stanovení účinnosti redukující dichlorindofenol

Metodika tohoto stanovení byla popsána Beinertem, H. v „Methods in Enzymology“ (1962), 5, 546.

50 Přípravek 50 μ M dichlorindofenolu (Sigma) je naředěn 20mM fosfátovým pufrém a 0,5 M NaCl (pH 7,8). Do kyvety (SARSTEDT, 10 x 4 x 45 mm) se napipetuje 1 ml tohoto roztoku a přidá se vzorek na měření. Do kyvety se při teplotě místnosti přidá 15 μ l 1 mM NADPH (Boeringer-Mannheim) ředěný stejným pufrém pro započítí reakce. Účinnost reduktázy pak může být stanovena absorpcí oxidovaného dichloroindofenolu při 600 nm nebo stanovením poklesu 55 absorpce NADPH při 340 nm.

ii) Stanovení účinnosti redukující oxidovaný glutathion

Metodika tohoto stanovení byla popsána Nakajimou, T. a kol. v „New Basic Experimental
5 Methods in Biochemistry (6) – Assay Methods Using Biological Activity“, 3–34.

10 10 mM oxidovaný glutathion (Boehringer–Mannheim) se připraví s 20 mM fosfatovým pufrům a 0,5 M NaCl do pH 7,8. Vzorek reduktázy se napipetuje do kyvety (10 x 4 x 4 mm), kam se dále převede 15 µl tohoto roztoku. Pro spuštění reakce se do kyvety dále při teplotě místnosti přidá
15 15 µl 1 mM NADPH připraveného ve stejném pufru. Redukční účinnost reduktázy pak může být stanoveny následným poklesem absorpce při 340 nm.

Pro odvození ds–DNA od mRNA mohou být použity různé výše uvedené metody. Mezi tyto metody patří metoda používající nukleázu S1, Landova metoda a metoda O. Joon Yooa, dává se
15 však v tomto případě přednost metodě Okayama–Berga [Okayama, H. a Berg. P. (1982), Mol Cell. Bio. 2, 161–170].

Takto získaná ds–cDNA pak může být zavedena do klonovacího vektoru a výsledný rekombinantní plazmid pak může být vnesen do Escherichia coli.

20 Kmen obsahující požadovanou DNA kódující daný peptid podle vynálezu může být selektován různými způsoby. Například, je-li pro přípravu nukleotidové sondy použita PCR, pak vhodnou templátovou DNA je cDNA, nebo genomová DNA.

25 Je možné použít primární screening, aby se snížil počet transformovaných kmenů, které se budou muset testovat. Primární screening, je možný z toho důvodu, že peptid podle vynálezu je příbuzný s cytokiny, takže jeho mRNA obsahuje AUUUA motiv společný pro mRNA cytokinů [Shaw, G. a Kamen, R. (1986), Cell 46: 659–667]. Proto může být pro primární screening použita
30 syntetická oligonukleotidová sonda, která je komplementární k motivu AUUUA. Potom může být proveden test na produkci exogenního proteinu v savčích buňkách.

DNA kódující daný peptid může být potom z vektoru vyštěpena a sekvenována. Fragment DNA může být pak opět zaveden do vhodného vektoru a použit pro transformaci prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk podle potřeby.

35 Protein KM31–7 může být použit buď samostatně, nebo v kombinaci s jedním nebo více léčebnými přípravky jako prevence léčby stavů způsobených nebo majících souvislosti s oxidativním stresem či jakoukoliv další nemocí způsobenou aktivovaným kyslíkem. Takové stavy zahrnují, avšak nejsou omezeny pouze na arteriosklerózu, diabetes ischemické poruchy (jako
40 poruchy při reperfuzi, ischemická choroba srdeční, cerebroischemie a ischemická enteritis), edémy, vaskulární hyperpermeability, záněty, poruchy žaludeční mukózy, akutní pankreatitidu, Crohnova nemoc, vředovou kolitidu, poruchy jater, Paraquatovu nemoc, rozdmu plic, chemo-karcinogenezi, karcinogenní metastázy, DIC, šedý zákal, předčasnou retinopatii autoimunitní onemocnění, porfyremii, hemolytická onemocnění, středozevní anemii, Parkinsonovu nemoc,
45 Alzheimerovu nemoc, epilepsii, poruchy způsobené ultrafialovým zářením, poruchy způsobené radioaktivitou, omrzliny a popáleniny.

Farmaceutický prostředek podle vynálezu obsahuje farmakologicky aktivní množství peptidu KM31–7 a jeho přijatelný nosič.

50 Prostředek může být aplikován v různé formě. Orální aplikace může být provedena ve formě tablet, kapslí, granulí, prášku nebo sirupu. Parenterální aplikace zahrnuje injekce, infuze a čípky. Odborníkům budou jistě známy další vhodné způsoby aplikace.

V případě, že polypeptid podle vynálezu má být aplikován injekcí nebo infuzí, pak je potřeba připravit apyrogenní přípravek polypeptidu v lékařsky přijatelném vodném roztoku polypeptidu tak, aby vyhovoval požadavkům na pH, izotonicitu a stabilitu, bude předmětem technické expertizy odborníků v tomto oboru.

5

Dávkování a forma aplikace může být odborníky snadno stanovena s přihlédnutím na stav pacienta, tělesnou hmotnost, pohlaví, věk, dietu, závažnost dalších infekcí, čas podání a další klinicky důležité faktory. Normální orální dávka pro dospělé se bude pohybovat v rozmezí od 0,001 mg do 1000 mg denně. Toto množství může být podáno v jediné dávce nebo jako několik dávek v rozmezí 24 hodin. Při parenterálním podání tohoto polypeptidu může být podáno v jedné podkožní, nitrosvaleové nebo nitrožilní injekci 0,01 mg až 100 mg.

10

Pro celkovou charakterizaci proteinu KM31-7 bylo důležité získat specifické protilátky proti tomuto proteinu. Takové protilátky jsou užitečné při stanovení funkcí proteinu KM31-7, jeho množství, čistoty a distribuce v tkáních.

15

Proto byly získány hybridomy produkující protilátky proti KM31-7 technikou očkování laboratorních zvířat polypeptidem vyprodukovaným *E. coli* transformovanými pMAL31-7, přípravou hybridomů produkujících protilátky společně s myelomovými buňkami, screeningem a klonováním takových hybridomů. Protilátky produkované výslednými hybridomy měly schopnost rozpoznat polypeptid získaný z bezsérového supernatantu kultury COS-1 buněk transformovaných pSR α 31-7.

20

Tak tento vynález rovněž popisuje protilátky, především monoklonální, nebo jejich ekvivalenty, které specificky rozpoznávají protein KM31-7 nebo jeho mutaci či variantu.

25

Protilátky popsané v tomto vynálezu jsou zaměřeny proti proteinu KM31-7, jeho mutaci nebo variantě. Je vhodné, aby tyto protilátky byly polyklonální nebo monoklonální, přičemž výhodnější jsou monoklonální protilátky, protože polyklonální protilátky jsou většinou spojeny s nespecifičností. Pro jednotnost výsledků ať již při terapii, nebo při čištění proteinu KM31-7 jsou vhodnější monoklonální protilátky.

30

Protilátky pro účely tohoto vynálezu mohou být připraveny z kteréhokoli živočicha. U protilátek vytvořených u jiných organismů než lidských však mohou nastat problémy s antigenitou. Proto je lépe vytvořit protilátky, které co nejvíce připomínají lidské protilátky, čehož může být dosaženo buď chemickými, nebo genetickými úpravami odborníků dostatečně známými.

35

Tento vynález rovněž předpokládá anti-idiotypové protilátky, tj. protilátky jejichž rozpoznávací místo rozpoznává vazebná místa výše uvedených protilátek. Takovéto protilátky lze získat aplikací působením protilátek vhodným zvířatům. Je pochopitelné, že tento proces může účinně pokračovat nepřetržitě, přičemž každá odpovídající generace protilátek bude buď původní, nebo anti-idiotypová. Avšak pokud s nebude provádět selekce protilátek na správné rozpoznávací místo po každé generaci, může se specifičnost takových protilátek postupně vytratit. Anti-idiotypové protilátky mohou být užitečné na příklad při testu volných protilátek proti KM31-7.

45

Tento vynález zároveň předpokládá tvorbu fragmentů protilátek podle vynálezu, které mají schopnost rozpoznávat protein KM31-7, a molekul nesoucích vazebná místa pro takové protilátky. Takové fragmenty a molekuly jsou v tomto textu označovány jako „ekvivalenty“ protilátek podle vynálezu.

50

Pro transformaci *E. coli* byl použit plazmid pMAL31-7. Produkt exprese byl čištěn a použit k imunizaci laboratorních zvířat. Slezinné buňky očkováných zvířat byly použity pro přípravu hybridomů fúzí s myelomovými buňkami, byly získány klony produkující anti-KM31-7 monoklonální protilátky ve vysokém množství a o dobré stabilitě (tento klon byl pojmenován MKM150-2 a uložen v Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and

55

Technology, Japonsko, pod registračním číslem FERM BP-5086). Kultura tohoto klonu poskytuje ze svého supernatantu monoklonální protilátky proti KM31-7.

- 5 Výsledné monoklonální protilátky proti KM31-7 reagují imunochemicky s fúzním proteinem získaným zavedením expresivního vektoru pMAL31-7 do E. coli. Tyto protilátky zároveň imunochemicky reagují s proteinem KM31-7 získaným ze supernatantu kultury savčích buněk transformovaných cDNA kódující KM31-7.

10 Při přípravě monoklonálních protilátek je nutné dodržovat dále uvedené postupy, které se skládají z:

- (a) čištění biopolymeru, který má být použit jako antigen,
- (b) imunizace myši injekcemi antigenu a ve vhodné chvíli přípravy buněk produkujících protilátky ze sleziny pomocí krevních vzorků a jejich testů,
- (c) přípravy myelomových buněk,
- 15 (d) fúze sleziných a myelomových buněk,
- (e) selekce skupin hybridomů produkujících požadované protilátky,
- (f) přípravy jednotlivých klonů,
- (g) velkoobjemové kultivace hybridomů pro přípravu monoklonálních protilátek nebo podle potřeby pěstování myši infikovaných hybridomy,
- 20 (h) testování fyziologické aktivity nebo vlastností výsledné monoklonální protilátky označením reaktantu.

25 Dále bude popsána příprava monoklonálních protilátek anti-KM31-7 s odkazem na výše uvedené metody. Je zřejmé, že není nutné přesně dodržovat následující popisy a že je možné použít jakoukoli vhodnou metodu. Pro přípravu protilátek je například možné použít jiné buňky než sleziné a myelomové stejně tak, jako je možné použít sleziné nebo myelomové buňky jiných živočichů. Následující postup představuje v současné době nejpoužívanější metodu přípravy monoklonálních protilátek proti KM31-7.

30 (a) Purifikace antigenu

Fúzní protein získaný expresí pMAL31-7 v E. coli a jeho purifikací je účinným antigenem. Kultura E. coli TB-1 transformovaná pMAL31-7 byla indukována izopropyl- β -d-thiogalaktopyronosidem (IPTG). Exprimovaný fúzní protein byl čištěn afinitní chromatografií s použitím kolony s amylosou (New England BioLabs). Protein KM31-7 čištěný z bezsérového supernatantu kultury COS-1 buněk transformovaných pSR α 31-7 je rovněž účinným antigenem.

(b) Příprava buněk produkujících protilátky

40 Čištěný fúzní protein získaný podle bodu (a) se smísí s kompletním nebo nekompletním Freundovým adjuvans nebo s látkou jakou je potaš a výslednou vakcínou jsou imunizována laboratorní zvířata. Nejpoužívanějšími laboratorními zvířaty jsou myši BALB/c, protože většina použitelných myelomů získaných z myši byla odvozena právě od kmene BALB/c a navíc byl tento kmen myši dopodrobna prostudován. Další výhodou případu, kdy jsou myelomy i buňky produkující

45 protilátky získány z BALB/c myši, je, že takto získané hybridomy mohou být pěstovány v břišní dutině myši BALB/c. Tím poskytuje použití myši kmene BALB/c výhody představované snadným získáním monoklonálních protilátek z ascitu bez nutnosti využívat složité postupy. Tento vynález se nicméně neomezuje pouze na použití myši BALB/c.

50 Antigen může být aplikován v jakékoli vhodné formě jakou je třeba podkožní injekce, intraperitoneální injekce, nitrožilní, nitrosvalové injekce nebo nitrokožní injekce. Přednost se dává podkožním nebo intraperitoneálním injekcím.

Imunizace může být provedena jednou nebo při více příležitostech ve vhodných intervalech. Nejvhodnějším režimem je očkování a následné přeočkování jednou nebo vícekrát v intervalech od 1 do 5 týdnů. Účinnost tohoto postupu může být zvýšena, je-li pravidelně testován titr použitého antigenu v séru imunizovaných zvířat a zvířata s dostatečně vysokým titrem protilátek jsou pak použita pro získání buněk produkující protilátky. Buňky produkující protilátky pro následnou fúzi jsou ze zvířat izolovány převážně 3 až 5 dnů po očkování.

Způsoby testování titru protilátek zahrnují například různé známé techniky, jako je RIA (radioizotopová imunologická zkouška), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), techniky fluorescenčních protilátek a pasivní hemaglutinace, ale nejvýhodnějšími technikami pro svoji citlivost, rychlost, přesnost a možnost automatizace jsou RIA a ELISA.

Dále bude uveden popis vhodného ELISA testu. Antigen se adsorbuje na pevnou fázi. Povrch pevné fáze je pak vysycen proteinem nepřibuzným s daným antigenem, jako je například hovězí sérumalbumin (BSA), aby se blokovaly veškeré povrchové oblasti, na kterých není adsorbován antigen. Pevná fáze je pak omyta a vystavena postupně ředěnému vzorku primární protilátky (např. myšimu séru). Veškeré protilátky proti KM31-7 ve vzorku se vážou s antigenem. Po omytí jsou přidány anti-myší protilátky ve vazbě s enzymem, aby se mohly navázat na vázané myší protilátky. Po omytí je přidán substrát enzymu a titr protilátek pak může být spočítán měřením takových parametrů, jako je změna barvy způsobená rozkladem substrátu.

(c) Příprava myelomových buněk

Jako zdroj myelomových buněk jsou především používány zavedené linie myších buněk. Vhodnými příklady takovýchto linií jsou třeba myelomové buněčné linie P3-X63 Ag8-U1 (P3-U1) odvozené původně od myši BABL/c rezistentních proti 8-azaguaninu [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], P3-NSI/1-Ag4.1 (NS-1) [European J. Immunology, 6: 511-519 (1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276: 269-279 (1978)], PS-X63-AG8.653 (653) [J. Immunology, 123: 1548-1550 (1979)] a PS-X63-AG8 (X63) [Nature 256, 495-497 (1975)]. Tyto buněčné linie mohou být kultivovány ve vhodném médiu, jakým je například 8-azeguaninové médium (médium RPMI-1640 obsahující 8-azeguanin, 1,5 mM glutamin, 5×10^{-5} M 2-merkptoethanol, 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin a 10 % fetální telecí sérum), médium IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) nebo médiu DMEM (Dulbecco's Modified Engle's Medium). Počet buněk se ke dni fúze zvýší na nejméně 2×10^7 předkultivací v běžném médiu známém jako kompletní GIT [5,5 ml MEM roztoku neesenciálních aminokyselin (NEAA, Gibco), 27,5 ml NCTC109 (Gibco), 6 ml roztoku penicilin-Streptomycin (Sigma) a 11 ml 200 mM roztoku glutaminu (Sigma) v 500 ml média GIT (Wako Pure Chemical Industry)] 3 až 4 dny před fúzí buněk.

(d) Fúze buněk

Buňky produkující protilátky jsou plazmatické buňky a jejich prekurzory jsou lymfocyty. Mohou být získány z vhodných míst jednotlivých zvířat, jako je slezina, lymfatické uzliny, periferní krev nebo z jakékoli vhodné kombinace těchto orgánů. Nejpoužívanějšími jsou však slezinové buňky.

Buňky produkující protilátky jsou sklizeny 3 až 5 dnů po poslední imunizaci od myši, které mají alespoň zde popsany titr. Výsledné buňky produkující protilátky jsou pak fúzovány s myelomovými buňkami získanými podle c). V současnosti je nejvíce používán postup fúze slezinových buněk s myelomovými buňkami při použití ethylenglykolu vzhledem k nízké hladině buněčné toxicity a snadné manipulaci s těmito složkami. Tento postup se provádí následujícím způsobem:

Slezinné buňky a myelomové buňky se důkladně promyjí médiem nebo fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrům (PBS) a smíchají tak, aby se poměr mezi slezinovými buňkami a myelomovými buňkami pohyboval přibližně mezi 5 až 10:1. Pak se tato směs centrifuguje. Odstraní se

supernatant a usazenina buněk se rozruší a za stálého míchání se přidá roztok polyethylenglykolu (PEG, molekulová hmotnost od 1000 do 4000). Po několika minutách se buňky opět centrifugují. Supernatant se opět odstraní a usazené buňky jsou resuspendovány ve vhodném množství kompletního GIT obsahujícího 5 až 10 ng/ml myšího IL-6, 10^{-6} až 10^{-3} M hypoxantin, 10^{-8} až 10^{-7} M aminopterin a 10^{-6} až 10^{-4} M thymidin).

(e) Selektce skupin hybridomů

Kultivační plotna je inkubována v inkubátoru s CO₂ atmosférou při 30 až 40 °C po dobu 10 až 14 dnů. Během této doby se přidává každý 1. až 3. den čerstvé HAT médium v množství odpovídajícím polovině původního objemu.

Myelomové buňky procházejí z buněčné linie rezistentní proti 8-azaguaninu a jako myelomové buňky, tak hybridomy složené pouze z myelomových buněk nemohou přežít v médiu HAT. Avšak hybridomy obsahující část buněk produkujících protilátky a hybridomy složené z myelomových buněk a buněk produkujících protilátky mohou v tomto médiu přežít. Hybridomy složené pouze z buněk produkujících protilátek nejsou schopny života, takže potřebné hybridomy obsahující buňky produkující protilátky a myelomové buňky mohou být tímto způsobem snadno selektovány.

HAT médium je nahrazeno HT médiem (ve kterém je vynechán aminopterin) v těchto komůrkách, ve kterých byl pozorován růst kolonií. Část supernatantu z kultury je odebrána a testována na přítomnost protilátek proti KM31-7 například pomocí ELISA testů.

Výše uvedený postup používá buňky z buněčné linie rezistentní proti 8-azaguaninu, avšak mohou být použity i jiné buněčné linie za předpokladu, že umožňují selekci hybridomů. Složení média se v těchto případech samozřejmě rovněž změní.

(f) Klonování

Hybridomy podle (e), u kterých byla stanovena produkce specifických protilátek proti KM31-7, jsou přeneseny na novou kultivační plotnu. Mohou být použity různé klonovací metody, jako je očkování, (kde jsou hybridomy podrobeny analýze omezeného ředění, tak aby každá komůrka obsahovala pouze jeden hybridom), metoda měkkého agaru, (kde jsou naočkovány kolonie přeneseny do měkkého agarového média), očkovací metoda, (kde jsou jednotlivé buňky přemístěny pomocí mikromanipulátoru), a třídící klonovací metoda, (ve které jsou jednotlivé buňky oddělovány buněčným tříděčem). Analýza omezeného ředění se vzhledem ke své jednoduchosti používá nejčastěji.

Klonování pomocí omezeného ředění se opakuje 2x až 4x u těch komůrek, ve kterých je opakovaně pozorován titr protilátek. Klon soustavně vykazují tvorbu protilátek proti KM31-7 je pak vybrán jako hybridom volby.

(g) Příprava monoklonálních protilátek kulturou hybridomů

Hybridom vybraný podle (f) je pak kultivován v běžném médiu. Velkoobjemová kultivace se pak provádí za rotace kultury buď ve velkoobjemových lahvích, nebo v míchačce. Monoklonální protilátky proti KM31-7 se mohou získat ze supernatantu z kultury filtrací na gelu a pak odebráním a čištěním frakce IgG. Hybridomy mohou být navíc pěstovány v břišní dutině stejného kmene myši (např. výše uvedené myši BALB/c) nebo například myši Nu/Nu. Jednoduchou metodou přípravy monoklonálních protilátek je použití soupravy na přípravu monoklonálních protilátek (např. MAbTrap GII z Pharmacia).

(h) Identifikace monoklonální protilátky

Identifikace izotypu a podtřídy monoklonální protilátky získané podle (g) může být provedeno následujícím způsobem. Příklady identifikace monoklonálních protilátek zahrnují Ouchterlonyho metodu, ELISA test a RIA test. Ačkoli je Ouchterlonyho metoda velice jednoduchá, má jednu nevýhodu, a tou je nutnost zahuštění monoklonální protilátky v případě její příliš nízké koncentrace.

At' už je použit test ELISA nebo RIA, může být v oboru případech suspenzátant přímo vystaven pevné fázi, na kterou byl adsorbován antigen. Při určování typu podtřídy protilátky mohou být použity sekundární protilátky specifické pro každý typ podtřídy IgG. Může se rovněž použít souprava izotypů (například izotypová souprava myších monoklonálních protilátek od firmy Amersham). Množství proteinu může být stanoveno metodou Flin-Lowryho nebo měření absorbance při 280 nm [$1,4 (OD_{280}) = 1 \text{ mg/ml}$ imunoglobulinu].

V následujících příkladech byla monoklonální protilátka získaná z hybridomů označených MKM150-2 definována jako izotyp třídy IgG jako příslušník podtřídy IgG1.

Monoklonální protilátka získaná podle vynálezu má vysokou specifickou pro protein KM31-7. Tuto monoklonální protilátku lze navíc získávat dlouhodobě a ve vhodném množství pomocí kultivace výše zmíněných hybridomů. Tato monoklonální protilátka může být použita pro izolaci a čištění proteinu KM31-7 a tato izolace a purifikace proteinu KM31-7 uvedenou monoklonální protilátkou pomocí imunoprecipitace s použitím antigen-protilátka tvoří součást tohoto vynálezu.

Tento vynález bude dále doplněn následujícími příklady. Veškeré roztoky jsou vhodné, připravené z deionizované vody a tam, kde jsou uvedena množství v %, jedná se o objemová procenta, pokud není uvedeno jinak. Pokud nejsou metody určeny jinak, jedná se o metody, které lze nalézt v „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“ [druhé vydání, Sambrook, J., Fritsch, E. F., a Maniatis, T. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Metody přípravy roztoků a ostatních médií, které nejsou specifikovány přímo u jednotlivých příkladů, jsou uvedeny v další části tohoto testu pod hlavičkou „Použité chemikálie a roztoky“.

Příklady provedení vynálezu

35

Příklad 1

Extrakce poly(A) +/- RNA z buněk KM-102

40

Buňky KM-102 byly pěstovány v 36 plastických kultivačních miskách o průměru 15 cm v upraveném Iscovo minimálním základní médiu (Boehringer Mannheim) obsahujícím 10 % fetálního hovězího séra. Po nárůstu buněk do zákalu byl přidán forbolmyristylacetát (PMA) a ionofor vápníku A23187 (Sigma) do konečné koncentrace 10 ng/ml a 0,2 μM . Kultivace pokračovala při 37 °C. Po 3, 6 a 14 hodinách bylo sklizeno 12 misek, obsah každé misky byl odděleně rozpuštěn v roztoku guanidinthiokyanátu a byla odebrána kapalná fáze.

Izolace poly(A) ⁺RNA byla provedena v podstatě podle postupu z „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“ [Maniatis, T., a kol. (1982): 196–198]. Následuje podrobný popis tohoto postupu.

50

Každá odebraná kapalná fáze byla zpracována následujícím způsobem. Tekutina byla opakovaně natažena a vypuštěna z 10 ml injekční stříkačky s jehlou 21G. Byly přidány 3 ml roztoku 5,7 M CsCl – 0,1 M EDTA (pH 7,5). Směs byla centrifugována v kyvetách Polyaromar v centrifuze

RPS 40-T (Hitachi Koki). Přípravek buněk byl poté navrstven na roztok v kyvetách až do jejich úplného naplnění.

Po centrifugaci při 30 000 ot/min. po dobu 18 h při teplotě 20 °C byla vzniklá usazenina resuspendována v 400 µl destilované vody a vysrážena etanolem. Výsledná peleta byla rozpuštěna ve 400 µl destilované vody a za stálého míchání bylo přidáno stejné množství směsi chloroform/1-butanol (4:1 v/v). Vodná vrstva byla oddělena centrifugací. Poté bylo opět provedeno srážení etanolem a peleta byla rozpuštěna v 600 µl destilované vody, čímž byla získána celá RNA. Z každého vzorku odebraného po 3, 6 a 14 hodinách a stimulovaného PMA/A 23187 bylo získáno kolem 4,5 mg celkové RNA.

Dále bylo odebráno 600 µg od každého ze 3 typů celkové RNA získaných výše uvedených postupem a poly(A)⁺RNA byla čištěna chromatografií na sloupci oligo(dT) celulózy.

Celková RNA byla rozpuštěna v adsorpčním pufru a inkubována při 65 °C po dobu 5 minut. Výsledný roztok byl aplikován na sloupec oligo(dT) celulózy (Pharmacia, typ 7) v adsorpčním pufru a eluován elučním roztokem. Tímto postupem bylo získáno 100 µg poly(A)⁺RNA.

20 Příklad 2

Příprava cDNA knihovny

25 cDNA knihovna byla připravena metodou Okayama-Berga.

Pro reakci bylo použito 5 µg poly(A)⁺RNA a 24 jednotek reverzní transkriptázy (Seikagaku Corp.). Reakce probíhala při 42 °C po dobu 1 hodiny ve 20 µl reakčních roztoku reverzní transkriptázy.

30 Reakce byla zastavena přidáním 2 µl 0,25 M EDTA a 1 µl 10% SDS. Roztok byl poté deproteionizován 20 µl směsi fenol/chloroform (1:1 v/v). Proteinová frakce byla odstraněna centrifugací a k supernatantu bylo přidáno 20 µl 4 M octanu amonného a 80 µl ethanolu. Směs byla ponechána v teplotě -70 °C po dobu 15 minut. Po této době byla sraženina oddělena centrifugací, promyta 70% alkoholem a vysušena za sníženého tlaku.

40 Vysušená sraženina byla rozpuštěna v 15 µl reakčního roztoku terminální transferázy a zahřívána na 37 °C po dobu 3 minut. Pak bylo k reakční směsi přidáno 18 jednotek terminální deoxynukleotidyltransferázy (Pharmacia). Reakce probíhala 5 minut. Poté byla ukončena přidávkem 1 µl 0,25 EDTA a 0,5 ml 10% SDS a roztok byl deproteinizován fenol/chloroformem (podle postupu uvedeného výše). Proteinová frakce byla odstraněna centrifugací. Supernatant byl odebrán a důkladně promíchán s 15 µl 4 M octanu amonného a 60 µl ethanolu. Směs byla chlazená v -70 °C po dobu 15 minut a sraženina byla oddělena centrifugací.

45 Výsledná usazenina byla rozpuštěna v 10 µl pufru pro restrikční enzym a k roztoku byly přidány 2,5 jednotek restrikčního enzymu HindIII. Účinného štěpení bylo dosaženo inkubací směsi v 37 °C po dobu 1 hodiny.

50 Reakční roztok byl poté deproteinizován fenol/chloroformem a srážení etanolem. Supernatant byl ponechán v teplotě -70 °C po dobu 15 minut. Výsledná sraženina byla oddělena centrifugací a rozpuštěna v 10 µl TE pufru [10 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 1 mM EDTA]. 1 µl výsledné směsi byl doplněn do objemu 10 µl reakčním roztokem obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl a 10 ng spojovací DNA zakončenou oligo(dG) [spojovník 3'-oligo(dG) pL-1 HindIII, Pharmacia]. Směs byla inkubována po dobu 5 minut v 65 °C a poté 30 minut ve

42 °C. Reakční směs byla zchlazena směsí vody a ledu. Poté bylo přidáno 10 µl 10x ligačního pufru, 78 µl destilované vody a 8 jednotek T4 DNA ligázy. Reakční roztok byl ponechán přes noc v teplotě 12 °C.

- 5 Následující den bylo k reakční směsi přidáno 10 µl 1 M KCl, 1 jednotka ribonukleázy H a 33 jednotek DNA polymerázy I, 4 jednotky T4 DNA ligázy, 0,5 µl roztoku dNTP (20 mM dATP, 20 mM dCTP, 20 mM dGTP) a 0,1 µl 50 µl/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a výsledná směs byla zahřívána při teplotě 12 °C 1 hodinu a další hodinu při teplotě 25 °C. Po této době byl reakční roztok 5x zředěn destilovanou vodou a okamžitě použit pro transformaci *E. coli* HD5α s použitím Hanahanovy metody [Hanahan, D. (1983), *J. Mol. Biol.* 166: 557–580], čímž byla
10 připravena cDNA knihovna buněk KM-102.

Příklad 3

15

Příprava oligonukleotidové sondy

- Na základě sekvence AUUUA na nepřenašené 3' oblasti mRNA cytokinů byl chemicky syntetizován oligonukleotid 5'–TAAATAAATAAATAA–3' (sekvenční č. ID:13) skládající se z
20 15 bází a označený ATT–3. Syntéza byla provedena s použitím automatického syntetizátoru 380 B (Perkin–Elmer Japan Applied Biosystem) podle návodu dodavatele. Použitou metodou byla metoda fosfoamiditová podle Carutherse a kol. 103, 3185–3191]. Po syntéze 15–mer byly nukleotidy odděleny od nosiče a byly odstraněny ochranné skupiny. Výsledný roztok oligonukleotidů byl lyofilizován, byl vytvořen prášek, který byl pak rozpuštěn v destilované vodě a
25 skladován při teplotě –20 °C až do chvíle použití.

Příklad 4

30

Screening cDNA knihovna

- 6500 kolonií vytvořených z cDNA knihovny připravené v příkladu 2 bylo fixováno na nitrocelulózový film podle metody popsané Grunsteinem a Hognessem [Grunstein, M. a Hogness, D. S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3961–3965]. Sonda ATT–3 připravená podle příkladu 3
35 byl na 5'–konci označena ³²P standardním postupem (viz „Molecular Cloning – A laboratory“), a označená sonda byla použita pro hybridizaci kolonií.

- Předběžná hybridizace byla provedena při 37 °C po dobu 3 hodin v následujícím prostředí: 6x SSC, 1x Denhardtův roztok, 0,25% SDS, 0,5% pyrofosfát sodný a 100 µg/ml denaturované DNA lososího spermatu. Hybridizace probíhala přes noc při 31 °C v následujícím prostředí: 6x SSC, 1x Denhardtův roztok, 17 mg/ml tRNA kvasinek a 0,05% pyrofosfát sodným obsahující ATTT–3 sondu značenou ³²P.

- 45 Následující den byl nitrocelulózový filtr 2 hodiny omýván roztokem 6x SSC obsahujícím 0,05% pyrofosfát sodný při laboratorní teplotě.

- Plazmidová DNA byla extrahována z pozitivních klonů následujícím způsobem. Náhodně bylo vybráno několik klonů a dideoxy metodou byly určeny dílčí sekvence cDNA. Tyto dílčí sekvence byly testovány na homologii nukleotidových sekvencí se sekvencemi registrovanými v EMBL nebo GenBank databázi přes počítač a bylo stanoveno, že některé z těchto dílčích sekvencí klonů
50 detekovaných pomocí ATT–3 mělo homologní části s částmi Alu repetice [Schmid, C. W. a Jelínek, W. R. (1982) *Science* 216, 1065–1070].

Fragmenty DNA obsahující sekvenci Slu repetice byly připraveny z lidské genomové DNA a označené ^{32}P standardním postupem. Tato značená DNA byla použita jako sonda v hybridizaci kolonií s použitím 33 klonů definovaných výše a ukázalo se, že 12 z těchto klonů obsahovalo tuto Alu repetici. Byla stanovena délka inzertu cDNA každého ze zbývajících klonů. Tato délka byla

5 různá a pohybovala se v rozsahu 50 až 3 600 bází.

Na inzertech cDNA ze zbývajících 21 klonů bylo provedeno mapování restrikcními enzymy a byly stanoveny dílčí nukleotidové sekvence stejným způsobem jako bylo uvedeno výše. Tyto dílčí sekvence pak byly testovány ohledně homologních oblastí s nukleotidovými sekvencemi registrovanými v EMBL nebo GenBank databázi pomocí počítače a byly vybrány klony obsahující nové sekvence.

Příklad 5

15

Nothern hybridizace klonu č. 31

Jeden z klonů, klon č. 31 (označený pcD-31) měl cDNA inzert kolem 560 bp. Z tohoto cDNA inzertu z pcD-31 byl získán fragment (292 bp) a byl označen ^{32}P pro použití v Northern blotu jako sonda s použitím poly(A)⁺RNA připravené z buněk KM-102 podle postupu jako v příkladu 1. Tato hybridizace byla použita pro stanovení délky přirozeně se vyskytující mRNA, která odpovídá inzertu pcD-31.

Postup při Northern hybridizaci byl následující. Z KM-102 buněk bylo připraveno 5,5 mg poly(A)⁺RNA a inkubováno při 50 °C 1 hodinu ve směsi 1 mg glyoxalu, 50% dimetylsufoxidu (DMAO) a 0,01 M hydrogenfosfátu sodného (pH 7,0). Na konci této doby byly k inkubační směsi přidány 4 µl elektroforetického barviva a směs byla pak rozdělena elektroforézou na 1% agarózovém gelu v 1x TAE:

Po elektroforéze byla RNA z agarózového gelu přes noc převedena na mylonovou membránu (BiRad, Zeta-Probe) při použití 20x SSC pomocí metody kapilárního přenosu (viz „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“). Po přenosu byl filtr opatrně omyt 2x SSC, usušen vzduchem a pak dodatečně sušen při 80 °C 2 hodiny, aby se fixovala mRNA.

Fragment PstI-AaTI z pcD-31 byl značen ^{32}P s použitím DNA značícího systému Multiprime (Amersham).

Předběžná hybridizace byla prováděna na filtru po dobu 3 hodin při 37 °C v roztoku obsahujícím 5x SSCP, 2,5x Denhardtův roztok, 50% formamid, 10 mM hydrogenfosfát sodný (pH 7,0), 0,5% SDS a 100 µg/ml denaturované DNA lososího spermatu. Následující den byl filtr nejdříve omýván 1 hodinu při 37 °C roztokem obsahujícím 50% formamid, 5x SSC a 0,1% SDS, a pak 2 hodiny omýván při téže teplotě roztokem obsahujícím 40% formamid, 5x SSC a 0,1 % SDS. Nakonec byl filtr omýván při laboratorní teplotě po dobu 15 minut roztokem 2x SSC. Následná autoradiografie ukázala, že inzert cDNA klonu pcD-31 zde není v celé délce a že kompletní délka odpovídající mRNA je 3,9 kb (stanovena z kalibrační křivky založené na molekulové hmotnosti markerů).

Příklad 6

50

Příprava čerstvé knihovny pro screening cDNA klonu pcD-31

Čerstvá knihovna byla připravena s použitím systémů cDNA Synthesis Systém Plus a cDNA Cloning Systém (λ gt10, adapterová metoda, dodávané Amershamem).

55

Do reakce bylo vloženo 5 μg poly(A)⁺RNA extrahované z buněk KM-102 (podle postupu jako v příkladu 1) a 100 jednotek reverzní transkriptázy. Reakce probíhala při teplotě 42 °C 40 minut v 50 μl reakčního roztoku reverzní transkriptázy. Po této době bylo k reakčnímu roztoku přidáno 20 μCi [α -32P]dCTP, 93,5 μl pufru druhého řetězce, 4 jednotky ribonukleázy H a 115 jednotek DNA polymerázy I (všechny roztoky dodávány v soupravě). Směs pak byla inkubována při 22 °C 1 hodinu a nakonec zahřívána na 70 °C po dobu 10 minut. Po této tepelné reakci bylo k reakční směsi přidáno 10 jednotek T4 DNA polymerázy (dodávané v soupravě) a reakce dále probíhala dalších 10 minut při 37 °C.

Reakční směs pak byla zbavena proteinů fenol–chloroformovou deproteinizací. Reakční roztok byl centrifugován, odebrán supernatant a smíchán s 250 μl 4 M octanu sodného a 1 ml ethanolu. Směs byla ponechána přes noc v teplotě –20 °C, sraženina byla oddělena centrifugací. Výsledná usazenina byla rozpuštěna v 30 μl sterilní vody. Z výsledného roztoku bylo odebráno 10 μl a přidáno ke směsi 2 μl pufru pro ligázu/kinázu, 250 pM EcoRI adaptéru a 5 jednotek T4 DNA ligázy (vše dodáváno v soupravě) a výsledná směs byla inkubována přes noc při 15 °C.

Celý reakční roztok byl pak aplikován na frakcionační kolonu, aby byl odstraněn EcoRI adapter. Reakční roztok byl pak rozdělen na alikvotní objemy po 120 μl a každý podíl byl smíchán s 200 μl 0,25x TE pufru. Byly shromážděny frakce od č. 10. do 17., koncentrovaný butanolem na celkový objem 120 μl .

Celý koncentrovaný přípravek pak byl smíchán s 55 μl sterilní vody, 20 μl pufru ligáza/kináza a 40 jednotek T4 polynukleotidkinázy (vše dodáváno v soupravě) a výsledná směs byla inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byla reakční směs třikrát deproteinizována fenolchloroformovou metodou, sražená ethanolem a ponechána přes noc při teplotě –20 °C. Výsledná sraženina byla oddělena centrifugací a rozpuštěna v 10 μl sterilní vody, čímž vznikl vzorek cDNA.

Ke každému vzorku cDNA o objemu 2 μl byl přidán 1 μg EcoRI ramene $\lambda\text{gt}10$, 1 ml ligáza/kináza pufru a 2,5 jednotek T4 DNA ligázy (vše poskytováno v soupravě) a pak následovala inkubace přes noc při 15 °C. Vzorek obsahující 4 μl cDNA byl připraven stejným způsobem. Každý vzorek byl pak dále zpracován následovně. Veškerý vzniklý reakční roztok byl nejdříve přidán k 10 ml extraktu A (poskytovaného v soupravě) a takto vzniklá směs pak byla přidána k 15 μl extraktu B (poskytovaného v soupravě). Výsledná směs byla 20 minut inkubována v 20 °C, aby mohla proběhnout reakce balení in vitro.

Po této době bylo k reakčnímu roztoku přidáno 470 μl SM pufru a pak byla směs uskladněna při 4 °C. Kmen E. coli NM514 byl po reakci s 10 mM MgSO_4 infikován skladovaným roztokem čímž vznikla $\lambda\text{gt}10$ knihovna cDNA KM-102.

Příklad 7

Screening cDNA knihovny

Z kombinovaných cDNA knihoven připravených podle příkladu 6 bylo získáno 2×10^5 plaků, které byly následně fixovány na nylonové filtry (Hybond N, Amersham) následujícím způsobem.

Infikované E. coli připravené podle příkladu 6 byly kultivovány na 9 cm miskách obsahujících pevné LB médium tak, aby se na každé misce vytvořilo mezi 1 a 2×10^4 plaky.

50

Příklad 8

Příprava nukleotidové sondy a hybridizace

Sondy značené ^{32}P byly vytvořeny z pcD-31 (získaného podle příkladu 4) označením fragmentů PstI-AatI a EcoT221-AatI (223 bp) z pcD-31 pomocí systému Multiprime DNA labeling systém. Byla provedena hybridizace plaků na filtrech získaných podle příkladu 7 při použití uvedených sond.

Prehybridizace byla provedena umístěním těchto filtrů do reakčního roztoku obsahujícího sondy značené ^{32}P a připravované podle výše uvedeného postupu, 50% formamid, 5x SSC, 1x Danhardtův roztok, 0,01 M hydrogenfosfátu sodného (pH 7,0), 0,1% SDS a 100 $\mu\text{g/ml}$ denaturované DNA z lososího spermatu. Inkubace probíhala přes noc při 37 °C.

Následující den byl filtr nejdříve omýván 3 hodiny při laboratorní teplotě roztokem obsahujícím 50 % formamid, 5x SSC a 0,1% SDS, a pak 5 minut promýván při laboratorní teplotě 2x SSC. Autoradiografie ukázala 80 pozitivních klonů získaných tímto prvním screeningem.

S použitím klonů, které byly opakovaně identifikovány jako pozitivní, byly opakovány postupy příkladu 7 a 8 ještě třikrát (čtvrtý screening) a na konci bylo určeno celkem 17 pozitivních klonů. Z každého z těchto 17 klonů byla izolována cDNA a pomocí EcoRI byly vyštěpeny inzerty. Délka každého cDNA inzertu byla ověřena elektroforézou na agarosovém gelu a byl izolován klon 31-7, který měl cDNA inzert o délce 3,9 kbp odpovídající celkové délce původní mRNA.

Příklad 9

Restrikční mapování klonu č. 31-7

Klon č. 31-7 byl štěpen EcoRI, aby byl izolován a čištěn fragment o 3,9 kb obsahující cDNA inzert. Tento fragment byl pak vložen do pUC18 pomocí T4 DNA ligázy. E. coli DH5 α byly transformovány tímto novým plazmidem. Transformované buňky byly podrobeny selekcí podle rezistence a ampicilin a klon pUCKM31-7 obsahující inzert 3,9 kb cDNA byl určen štěpením DNA EcoRI a následnou elektroforézou v agarózovém gelu.

pUCKM31-7 byl štěpen každým z těchto restrikčních enzymů: HindIII, SacI, XbaI, SmaI, BglII, EcoT221 a AatI nebo jejich dvojice. Výsledné fragmenty byly analyzovány elektroforézou na gelu a délka každého fragmentu byla změřena použitím markeru $\phi\text{X174HaeIII}$ jako indikátoru. Výsledná restrikční mapa je uvedena na obr. 7.

Příklad 10

Stanovení sekvence klonu č. 31-7

Celková nukleotidová sekvence inzertu cDNA v pUCKM31-7 byla určena dideoxymetodou využívající fág M13. Část této sekvence byla analyzována sekvenátorem 373A DNA Sequencer (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems). Výsledná sekvence nukleotidů má sekvenční číslo ID: 11 a je uvedena v přiloženém přehledu sekvencí.

Inzert cDNA z pUCKM31-7 je dlouhý 3815 báze a má otevřený čtecí rámec složený z 549 aminokyselin počínaje methioninem. Zjevně chybí poly(A) konec. Srovnání sekvencí bází na 3'-konci inzertu pcD-31 se sekvencí klonu pUCKM31-7 ukazuje, že inzert z pUCKM31-7 postrádá pouze konec poly(A) a nic víc.

Porovnání sekvencí bází a aminokyselin bylo provedeno pomocí databází nukleotidů EMBL, GenBank, NBRF a SWISS-PROT. Nejtěsnější souhlasnost, která byla nalezena, činila 35,3 %

homologii peptidové sekvence s lidskou glutathionreduktázou. Z tohoto bylo vyvozeno, že ORF inzertu cDNA z pUCKM31-7 jasně kóduje nový polypeptid. Tento nový polypeptid je uveden pod sekvenční číslem ID: 12 v příloženém seznamu sekvencí.

5

Příklad 11

Expres a purifikace nového polypeptidu

10 Konstrukce vysoce expresivního vektoru a exprese v COS-1 buňkách

pUCKM31-7 byl štěpen HindIII a fragment 3003 bp obsahující cDNA inzert byl izolován a čištěn standardními technikami. Konce výsledného fragmentu byly zatupeny s použitím soupravy DNA blunting kit (Takara Shuzo).

15

Mezitím byl vysoce expresivní vektor pcDL-SR α 296 [Takabe, Y. a kol. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472] štěpen PstI a KpnI a konce byly zatupeny pomocí uvedené soupravy. Zatupený inzert byl pak ligován do zatupeného plazmidu pomocí reakce T4 DNA ligázy. E. coli pak byly pomocí metody chloridu vápenatého transformovány výslednou DNA. Vzniklé transformanty Amp^R byly podrobeny selekci a byl analyzován plazmid DNA zachycený v buňkách.

20

Štěpením plazmidu enzymu HindIII a GblII, po kterém následovala elektroforéza na agarózovém gelu pro detekci 800bp fragmentu, byl vybrán kmen, ve kterém byl směr transkripce cDNA totožný s SR α promotorem. Vybraný plazmid byl označen pSR α 31-7 (obr. 9). SR α promotor obsahuje počáteční promotor SV40 a sekvenci R-U5 LTR z HTLV-1 a aktivita jeho promotoru je desetkrát až stokrát silnější než samotného počátečního promotoru SV40.

25

Dále byly COS-1 buňky podrobeny transfekci výsledným plazmidem pSR α 31-7. Transfekce COS-1 buněk byla provedena elektroporací pomocí zařízení pro zavádění genů GTE-1 (Shimadzu).

30

COS-1 buňky byly pěstovány v sedmi lahvích o objemu 150 cm³, z nichž každá obsahovala 25 ml DMEM (s 10% fetálním hovězím sérem) až do částečného základu na dně lahví. Kultury pak byly sklizeny, ke každé z nich byly přidány 3 ml roztoku trypsin-EDTA (10x koncentrovaný roztok dodávaný Sigmou) a byly ponechány při laboratorní teplotě dokud se neoddělili buňky. Pak byl přidán 1 ml inaktivovaného fetálního hovězího séra a 9 ml čerstvého roztoku trypsin-EDTA. Buňky pak byly odděleny centrifugací. Takto oddělené buňky byly dvakrát promyty PBS(-) pufrem a resuspendovány v pufru PBS(-) do hustoty 6×10^7 buněk/ml.

35

40 Mezitím byl metodou s chloridem cesným připraven plazmid DNA a doplněn do 200 μ g/ml pufrem PBS(-).

Z obou výše uvedených PBS(-) přípravků buněk a plazmidu bylo odebráno 20 μ l a jejich směs byla umístěna do komory obsahující elektrody v rozestupu 2 mm. Na směs pak byly aplikovány dva pulsy v intervalu 1 sekundy o síle 600 V a trvání 30 μ sec.

45

Elektrodová komora byla chlazena 5 minut na 4 °C a pak byla směs buňky-DNA uvnitř smíchána s 10 ml DMEM obsahujícího 10 % fetálního bovinního séra. Tato směs byla přenesena na Petriho misku a kultivována přes noc při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Následující den byl z kultury odebrán supernatant, buňky byly omyty bezsérovým DMEM médiem a pak resuspendovány v 10 ml DMEM a kultivovány při 37 °C další 3 dny. Po této době byl odebrán supernatant.

50

Supernatant byl rovněž odebrán z negativní kontroly. Jako negativní kontrola byl použit plazmid pCDL-SR α 296 neobsahující žádný inzert cDNA, který však byl jinak připraven podobným způsobem jako testovaná kultura.

- 5 Jeden ml supernatantu z každé testované kultury a z negativní kontroly byl zpracován následujícím způsobem. K supernatantu byla pro vysrážení proteinů nejdříve přidána kyselina trichloroctová (TCA) a sraženina byla oddělena centrifugací. Tato sraženina byla promyta eldovým acetonem, vysušena vzduchem a poté rozpuštěna ve vzorkovém pufru pro elektroforézu v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) obsahujícím 2-merkapt ethanol. Pak byl proveden SDS-PAGE na 12,5% gelu za redukčních podmínek.

Po elektroforéze byly pruhy obarveny stříbrem s použitím stříbrného barviva „Daiichi“ (Daiichi Chemical Detection). Tímto způsobem bylo obarveno několik specifických pruhů z testovaného vzorku (molekulová hmotnost kolem 60 000).

- 15 Protože molekulová hmotnost polypeptidu kódovaného v pSR α 31-7 je kolem 60 000 a protože bylo vydedukováno, že je nepravděpodobná přítomnost aminosekvence, která by způsobovala posttranslační modifikace přidáváním postranních sacharidových řetězců, bylo stanoveno těchto několik specifických pruhů odpovídá danému polypeptidu kódovanému cDNA z pSR α 31-7.

20

Příklad 12

Příprava vysoce expresivního plazmidu pro buňky COS-1

25

- Dalším krokem bylo ověření, zda těchto několik specifických 60 kDa pruhů určených v příkladu 11 je stejných jako jsou polypeptidy kódované inzertem z pSR α 31-7. Dalším záměrem bylo stanovení N-konce sekvence aminokyselin tohoto polypeptidu. Proto byl vytvořen klon s dalšími šesti histidinovými zbytky přímo před terminačním kodonem kódovanými pro C-konec polypeptidu kódovaného inzertem pSR α 31-7. Histidinové zbytky mají vysokou afinitu pro Ni²⁺ a cílem bylo exprimovat polypeptid mající histidinový hexamer (6x His), který by mohl být čištěn pomocí afinitní chromatografie na koloně s nábojem Ni²⁺.

30

Nejdříve byl syntetizován oligonukleotid se 66 bázemi: 5'-

35

CTAGCGCTCTGGGGCAAGCATCCTCCAGGCTGGCTGGCTGCCACCACCACCACCACC
ACTGATCTAGACT-3' (sekvenční č. ID:14) a komplementární řetězec o 66 bázích a tyto látky byly čištěny s použitím automatického syntetizátoru DNA Automated DNA Synthesizer 394 (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems). Oba přípravky oligonukleotidů byly smíchány a inkubovány 3 minuty v 70 °C a dodatečně zahřívány 30 minut při 37 °C, aby proběhla teplotní hybridizace. Následně byly fosforylovány konce pomocí T4 polynukleotidkinázy.

40

Výsledný dvouřetězový (ds) fragment byl pomocí T4 DNA ligázy ligován do pUCKM31-7, který byl předem štěpen Eco47III. Tento konstrukt byl uveden na obr. 10. E. coli DH5 byly transformovány DNA metodou využívající chlorid vápenatý a výsledné transformované kmeny byly podrobeny selekci a testovány, aby byl získán pUCKM31-7His.

45

Analýzou části relevantní sekvence bází tohoto pUCKM31-7 bylo potvrzeno, že v části pUCKM31-7His nejsou žádné abnormality.

50

Vysoce expresivní plazmid pro COS-1 buňky byl připraven subklonováním inzertu z pUCKM31-7 His do pCDL-SR α 296.

pUCKM31-7His byl rozštěpen XbaI a HindIII, fragmenty byly čištěny a konce fragmentů byly zatupeny použitím jedné jednotky Klenowova fragmentu za přítomnosti 2 mM dATP, 2 mM

dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 0,1mM dithiothreitolu a 50 µg/ml BSA.

- 5 Mezitím byl vysoce expresivní vektor pcDL-SRα296 rozštěpen PstI a KpnI a konce byly zatupeny soupravou DNA blunting kit. Zatupený fragment byl pak ligován do zatupeného plazmidu pomocí T4 DNA ligázy. Výsledný plazmid byl pak použit pro transformaci E.coli DH5α. Transformanty byly selektovány a testovány. Kmen, ve kterém byl směr transkripce cDNA totožný se směrem promotoru SRα, byl vybrán a plazmid tohoto kmene byl označen pSRα31-7His. Buňky COS-1 byly podrobeny transfekci výsledným plazmidem pSRα31-7 a bezsérový
10 supernatant byl získán postupem stejným jako v příkladu 7.

Příklad 13

- 15 Čištění a analýza aminokyselinové sekvence na N-konci

600 ml supernatantu získaného podle příkladu 12 bylo dialyzováno proti 17 objemům dialyzačního pufru po dobu 15 hodin při teplotě 4 °C. Pufr byl nahrazen dalšími 17 objemy dialyzačního pufru a dialýza pokračovala při 4 °C další 4 hodiny.

- 20 Dialyzovaný přípravek pak byl podroben afinitní chromatografii používající FPLC (Fast Protein Polynukleotide Liquid Chromatography – Pharmacia) v následujících podmínkách.

Kolona: 20 ml ProBond^(tm) Resin (Invitrogen) naplněná XK16/20 (φ2,0 x 20 cm, Pharmacia)

- 25 Eluční pufr:

A) 20 mM fosfátového pufru (pH 7,8) obsahující imidazol, 0,5 M NaCl
B) 20 mM fosfátový pufr (pH 7,8) obsahující 300 mM imidazol, 0,5 M NaCl.

- 30 Průtok: 1 ml/min
Frakční roztok: 5 mg/zkumavka

- 35 Eluční podmínky: po odebrání 4 frakcí elučním pufrem A) bylo odebráno 16 frakcí elučním pufrem B) a frakce byly očíslovány v pořadí od 1 do 20.

- 40 300 µl každého vzorku z výsledných frakcí byl vysráženo TCA a vzniklá sraženina byla připravena pomocí SDS-PAGE využívající 12,5% gel v redukčních podmínkách jako svrchu. Barvením stříbrem byly detekovány pruhy, z nichž tři byly poblíž frakce č. 10. Přítomnost těchto tří pruhů ukázala, že inzert pSRα31-7His kóduje polypeptid mající tři různé délky s různými sekvencemi na N-konci.

- 45 Zbytek frakcí 7 až 14 byl koncentrován TCA srážením a sraženina byla použita v SDS-PAGE s 10% gelem v redukčních podmínkách. Proteinové pruhy pak byly z polyakrylamidového gelu přeneseny na polyvinylidendifluoridový film (PVDF) (proBlot^(tm), Applied Biosystems) pomocí přenosového zařízení a gelové membrány (Merisol, KS-8441) při 9 V a v přítomnosti transferovaného pufru [0,02 % SDS, 20% methanol, 25 mM Tris-kyselina boritá (pH 9,5)] při 4 °C po dobu 2,5 hodiny.

- 50 Po této době byla membrána obarvena 0,2% naftolovou modročerní (Sigma) a tři pruhy odpovídající těm, které byly dříve určeny, byly z membrány vystřiženy. Byla stanovena sekvence každého pruhu k šesté aminokyselině od N-konce pomocí plynného sekvenátoru protienů (Shimadzu, PPSQ-10). Sekvence N-konce pruhu s druhou zjevně největší molekulovou hmotností (molekulová hmotnost kolem 60 000) byla následující:

Val-Val-Phe-Val-Lys-Gln (aminokyseliny 1 až 6 sekvence č. ID: 12).

Těchto šest aminokyselin odpovídá prvním šesti aminokyselinám ORF z klonu 31-7 a také odpovídá sekvenci šesti aminokyselin počínaje 24. aminokyselinou (Val) z N-konce prekurzorového polypeptidu kódovaného inzertem cDNA z pSR α 31-7His. Proto by měla delece aminokyselin 1 až 23 z N-konce tohoto prekurzoru polypeptidu vést k sekreci zralé formy proteinu začínající valinovým zbytkem.

10 Příklad 14

Stanovení redukční účinnosti

i) Konstrukce expresivního vektoru

15 Polypeptid čištěný v předchozím příkladu byl získatelný v extrémně malých množstvích, jak byl exprimován z COS-1 buněk. Nebylo tudíž možné použít tento polypeptid k dalším účelům, jako jsou testy účinnosti. Bylo tedy nezbytné najít způsob, jak exprimovat tento polypeptid kódovaný cDNA inzertem v pSR α 31-7 v alternativním hostiteli, který by umožňoval produkci množství vhodných pro čištění a testy. Následující postupy byly použity pro dosažení tohoto záměru.

20 pUCKM31-7 byl rozštěpen HindIII, fragment 3003 bp obsahující cDNA inzert byl izolován a čištěn a konce byly zatupeny pomocí DNA soupravy pro tento účel. Tento fragment byl dále rozštěpen XbaI.

25 Expresivní vektor pMAL-c [Guan, C. a kol. (1987) Gene 67, 21-30] byl rozštěpen XbaI a StuI. Pomocí XbaI upravený fragment HindIII byl poté ligován do tohoto rozštěpeného plazmidu pomocí T4 DNA ligázy. Výsledný konstrukt je uveden na obr. 11. Tento konstrukt byl pak použit pro transformaci E. coli TB-1 a byli vybráni a testováni transformanty Amp^R. Kmen, ve kterém byl směr transkripce cDNA totožný s transkripční promotorem byl vybrán a takto získaný plazmid byl označen pMAL31-7.

ii) Exprese a čištění fúzního proteinu

35 Naočkovaná kultura E. coli nesoucí pMAL31-7 byla připravena kultivací při třepání přes noc při 37 °C v 3 ml LB média obsahujícího 50 μ g/ml ampicilinu. Následující den byl přidán 1 ml počáteční kultury do 100 ml čerstvého kultivačního LB média obsahujícího 50 μ l/ml ampicilinu a kultivace pokračovala za stálého třepání a teplotě 37 °C, dokud nebylo dosaženo zákalu 0,5 při OD₆₀₀ nm. V té chvíli bylo ke kultuře přidáno IPTG do konečné koncentrace 0,1 mM a kultivační bujón byl kultivován dále za třepání při 37 °C.

40 Následující den byly bakteriální buňky odděleny z kultury centrifugací při 6500 ot/min po dobu 20 minut při 4 °C. Usazenina pak byla resuspendována v 10 ml kolonového pufru a buňky byly ve výsledné suspenzi rozrušeny pomocí ultrazvukového desintegrátoru. Celé buňky a buněčné fragmenty pak byly získány centrifugací v 8800 ot/min po dobu 30 min při 0 °C a frakce rozpuštěného proteinu byla odebrána v podobě supernatantu. Jeden ml této rozpustné frakce pak byl aplikován na chromatografickou kolonu s amylózou (New England Biolabs).

50 Eluční pufr pro chromatografii byl připraven přidáním maltózy k 10 ml kolonového pufru do konečné koncentrace 10 mM.

Negativní kontrolní vzorky byly rovněž testovány chromatografií. Negativní kontrola byla připravena podobným způsobem kromě toho, že byl použit vektor pMAL-c bez cDNA inzertu. Pak byla testována redukční účinnost proteinu v chromatografických vzorcích.

iii) Stanovení redukční účinnosti

Stanovení redukční účinnosti bylo provedeno v kyvetě (SARSTEDT, 10 x 4 x 45 mm) s použitím dichlorfenolindofenolu (DCIP) a oxidovaného glutathionu.

5

a) Stanovení redukční účinnosti pomocí DCIP

Z každého chromatografického vzorku získaného v ii) bylo podle návodu v soupravě Protein Assay Kit (Bio-Rad) odebráno 90,4 µg a každý byl odděleně smíchán s 1 ml 50 µM DCIP (Sigma). Pak bylo ke každému vzorku přidáno 15 µl 1 mM NADPH (Boehringer-Mannheim) a pokaždé byly měřeny hodnoty absorbance při OD₆₀₀ nm a OD₃₄₀ nm. Výsledný pokles absorbance při obou vlnových délkách je uveden na obr. 12. Z obrázku je zřejmé, že pouze vzorek pMAL31-7 obsahuje faktor, který redukuje DCIP.

15

b) Stanovení redukční účinnosti pomocí oxidovaného glutathionu

K 90,4 µg každého chromatograficky získaného vzorku podle ii) a naneseného do samostatné kyvety byly přidány 15 ml 10 mM oxidovaného glutathionu. Do každé kyvety bylo přidáno 15 µl 1 mM NADPH a pokaždé byla změřena absorbance při OD₃₄₀ mM. Výsledky jsou uvedeny na obr. 13 a je z nich zřejmé, že pouze vzorek pMAL31-7 obsahuje protein, který je schopen redukovat oxidovaný glutathion. Bylo rovněž pozorováno, že nedochází k žádné spotřebě NADPH, pokud není přítomen žádný oxidovaný glutathion, takže z tohoto bylo vyvozeno, že protein ze vzorku pMAL31-7 může redukovat oxidovaný glutathion pouze v přítomnosti NADPH.

25

Příklad 15

Čištění a analýza sekvence aminokyselin na N-konci.

30

Z příkladu 13 bylo vyvozeno, že COS-1 buňky po transfekci pSR 31-7His exprimovaly polypeptid mající tři typy N-konců.

35

V odděleném experimentu byli imunizováni králci fúzním proteinem získaným v E. coli transformovaných pMAL31-7. Záměrem tohoto experimentu byla připravena polyklonální protilátky proti proteinu KM31-7. Byl proveden Western blot s použitím této polyklonální protilátky a ukázalo se, že tři typy pruhů jsou rovněž zjištělné v supernatantu bezsérové kultury získaného z COS-1 buněk po transfekci pSRα31-7. Tento výsledek je podobný výsledku získanému v příkladu 13.

40

COS-1 buňky byly proto podrobeny transfekci pSRα31-7 s cílem získat větší množství bezsérového supernatantu, které by umožnilo purifikaci a analýzu N-konce sekvence proteinu KM31-7.

45

COS-1 buňky byly podrobeny transfekci pSRα31-7 s cílem získat větší množství bezsérového supernatantu, které by umožnilo purifikaci a analýzu N-konce sekvence proteinu KM31-7.

50

COS-1 buňky byly podrobeny transfekci pSRα31-7 a byly pěstovány 3 dny v Petriho miskách o průměru 15 cm, přičemž každá obsahovala 30 ml DMEM. Supernatant této kultury byl po těchto třech dnech odebrán a do každé misky bylo přidáno čerstvé medium v objemu 30 ml. Kultivace pokračovala další tři dny. Opět byl sklizen supernatant z kultury. Ostatní aspekty transfekce a kultury byly podle popisu v příkladu 11, avšak bylo pěstováno 199 misek.

Sklizené supernatanty byly slity dohromady. Po centrifugaci bylo získáno 10 litrů bezsérového supernatantu, které byly dialyzovány přes noc proti 10 mM Tris-HCl (pH 9,0). Chromatografie na iontoměniči byla na dialyzovaném přípravku provedena osmkrát v následujících podmínkách a s použitím FPLC (Pharmacia):

5

Kolona: 20 ml DEAE Sepharosy Fast Flow (Pharmacia) plněné do XK16/20 ϕ 2,0 x 20 cm, Pharmacia)

Eluční pufry:

10

A) 10 mM Tris-HCl (pH 9,0)

B) 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) – 0,5 M NaCl

Průtok: 1 ml/mi

15

Frakční roztok: 3 ml/zkumavka

Eluční podmínky: eluční pufr A s přechodem na eluční pufr B v lineárním koncentračním gradientu během 60 minut.

20

Frakce eluované pro každou koncentraci NaCl od 0,1 M do 0,4 M byly odebrány a shromážděny. Poté byly dialyzovány přes noc proti dialyzačnímu pufru obsahujícímu 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6) a 1 mM 2-Merkaptoethanol. Dialyzovaný přípravek byl pak nanesen na afinitní chromatografickou kolonu plněnou 2', 5'-ADP Sepharose 4B (Pharmacia) při následujících podmínkách:

25

Kolona: 20 ml 2',5'-ADP Sepharose 4B plněná do XK16/20 (ϕ 2,0 x 20 cm, Pharmacia)

Eluční pufry:

A) 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6) 1 mM 2-merkaptethanol

30

B) 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,6) 1 mM 2-merkaptethanol

Průtok: 0,5/min

Frakční roztok: 2 ml/zkumavka

35

Eluční podmínky: eluční pufr A postupně změněný na eluční pufr B v lineárním koncentračním gradientu během 120 minut.

40

100 μ l podíly z každé výsledné frakce byly vysráženy TCA a sraženiny byly nanесeny na SDS-PAGE při použití 12,5% gelu při redukčních podmínkách.

Po elektroforéze byl gel barven stříbrem pro detekci proteinových pruhů. Počínaje frakcí č. 11 byly získány tři poruchy.

45

Všechny zbylé frakce od č. 11 do č. 14 pak byly koncentrovány srážením TCA a sraženina byla analyzována na SDS-PAGE v 12,5% gelu v redukčních podmínkách. Protein byl pak převeden z gelu na PloBlot PVDF membránu (Applied Biosystems) ihned po elektroforéze. Po přenosu proteinu na membránu byla membrána odebrána 0,2% amidočerní a byly vystřiženy tři proteinové pruhy. Analýza N-koncové sekvence byla provedena pomocí sekvenátoru proteinů v plynné fázi.

50

N-konec daného pruhu mající zjevně nejmenší molekulovou hmotnost ze všech tří typů byl stanoven na Lys-Leu-Leu-Lys-Met. Těchto pět aminokyselin odpovídá pěti aminokyselinám počínaje 49. aminokyselinou na N-konci polypeptidu kódovaného cDNA inzertem pSR α 31-7.

Proto bylo vyvozeno, že rozštěpení tohoto peptidu v místě 48. zbytku vede k jedné zralé formě tohoto proteinu začínající lysinem na N-konci.

5 Příklad 16

Příprava monoklonální protilátky proti proteinu KM31-7

(a) Příprava antigenního proteinu

10

Naočkovaná kultura *E. coli* nesoucí pMAL31-7 byla připravena kultivační bakteriologické smyčky buněk třepáním přes noc při 37 °C v 3 ml LB média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu. 1 ml narostlé kultury byl naočován do 100 ml čerstvého LB média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu a tato kultura byla pěstována za stálého třepání při 37 °C do dosažení zákalu 0,5 při 15 OD₆₀₀ nm. V tomto stadiu bylo do kultivačního bujónu přidáno IPTG do konečné koncentrace 0,1 mM a kultivace pokračovala při třepání v 37 °C přes noc.

Z takto vypěstované kultury byly buňky získány centrifugací při 6500 ot/min, 20 minut při 4 °C a usazenina byla resuspendována v 10 ml kolonového pufru. Buňky ve výhodné suspenzi byly 20 rozrušeny ultrazvukovým dezintegrátorem a vzniklá tekutina byla centrifugována při 8000 ot/min při teplotě 0 °C po dobu 30 minut. Výsledný supernatant obsahoval frakci rozpuštěného proteinu. Frakce rozpustného proteinu pak byla aplikována na chromatografickou amylozovou kolonu o objemu 1 ml. Eluce byla provedena 10 ml kolonového pufru obsahujícího 10 mM maltózu. Fúzní protein získaný chromatografickou cestou byl uložen a později použit jako antigen.

25

(b) Příprava slezinných buněk z imunizovaných myší

Ke 2 ml antigenu (odpovídajícím 200 µg) čištěnému podle a) byly přidány 2 ml Freundova kompletního adjuvans, aby vznikla emulze. Tato emulze byla nabrána do 5ml stříkačky se skleněnou spojkou a emulze byla použita k imunizaci osmitýdenních savců myší BALB/c podkožními 30 injekcemi.

Počínaje druhým kolem imunizace byla jako adjuvans použito Freundovo nekompletní adjuvans, ostatní postup byl jinak zachován. Imunizace byla provedena dohromady čtyřikrát zhruba každé 35 dva týdny.

Od druhého očkovaní byly odebírány krevní vzorky z retroorbitální žilní pleteně okamžitě po očkovaní a v séru byl měřen titr protilátek proti KM31-7 pomocí ELISA testů na pevné fázi.

40 Elisa anti-KM31-7 na pevné fázi

Do každé komůrky 96komůrkové plotny (Costar) bylo jako antigen naneseno mezi 150 a 200 µl (což odpovídá kolem 200 ng fúzního proteinu) bezsérového supernatantu získaného z kultury COS-1 buněk po transfekci pSRα31-7. Plotna pak byla ponechána přes noc v 4 °C, aby se 45 protáhly dna komůrek. Následující den byla miska třikrát omyta 0,1% Tweenem 20/fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (0,1% Tween 20/PBS) a pak byly komůrky naplněny 100 µ BSA připravené na 10 µg/ml s PBS a plotna byla ponechána jednu hodinu při laboratorní teplotě.

Po této době byla plotna opět třikrát omyta 0,1% Tweenem 20/PBS. Do každé komůrky bylo 50 naneseno 30–100 µl primárních protilátek ve formě seriově ředěných vzorků (na příklad myší sérum, supernatant hybridomové kultury nebo monoklonální protilátka) a plotna byla ponechána při laboratorní teplotě 1 hodinu.

Po této době byla plotna opět třikrát omyta 0,1% Tweenem 20/PBS) a pak byla do každé komůrky přidána sekundární protilátka v množství 100 μ l. Sekundární protilátka byla připravena 3000násobným ředěním roztoku koziho anti-mýšního IgG-peroxidázového komplexu (Amershamu nebo 3000násobným ředěním koziho anti-mýšního IgG komplexu alkalické fosfatázy (BIO-RAD). Pak byla plotna ponechána 1 až 2 hodiny při laboratorní teplotě.

Po této době byla plotna opět omyta třikrát 0,1% Tweenem 20/PBS a pak bylo do každé komůrky přidáno 100 μ l buď roztoku substrátu peroxidázy (BIO-RAD, Peroxidase Substrate Kit ABTS), nebo 10% diethanolaminu obsahujícího 0,001% roztok para-nitrofenylfosfátu. Plotna pak byla ponechána 15 až 30 minut při laboratorní teplotě. Titr protilátek byl počítán měřením absorbance při 415 nm nebo 405 nm pomocí odečítacího zařízení (BIO-RAD).

(c) Příprava myších myelomových buněk

Myší myelomové buňky P3-X63-Ag8.653 (653) (ATCC č. CRL-1580) rezistentní na 8-azaguanin byly kultivovány normálním médiu (kompletní GIT) za účelem získat minimální 2×10^7 buněk.

(d) Příprava hybridomů

$1,4 \times 10^8$ slezinných buněk imunizovaných myší získaných po imunizačním režimu v b) bylo důkladně omyto DMEM (Nissui Pharmaceutical). Omyté buňky pak byly smíchány s $1,5 \times 10^7$ myších slezinných buněk P3-X63-Ag8.653 (653) připravených podle c) a výsledná směs byla 6 minut centrifugována při 800 ot/min.

Skupina buněk obsahující směs slezinných buněk P3-X63-Ag8.653 (653) byla odebrána jako usazenina a byla rozrušena. Předem byl připraven 50% roztok polyethylenglykolu 4000 s DMEM a tento roztok byl nakapán rychlostí 2 ml/min na rozrušené buňky v průběhu 1 minuty za míchání. Pak bylo k buněčnému přípravku přidáno DMEM rychlostí 2 ml/min podobným způsobem po dobu 1 minuty. Tento postup byl ještě jednou opakován u obou roztoků, tj. polyethylenglykolu a DMEM. Nakonec bylo přidáno 16 ml DMEM postupně v průběhu 3 minut. Výsledný buněčný přípravek pak byl centrifugován 6 minut při 800 ot/min. Výsledný supernatant byl odebrán, buňky resuspendovány v 35 ml kompletního GIT obsahujícího 5 až 10 ng/ml myšího IL-6.

(e) Screening hybridomů

Do každé komůrky 96komůrkové plotny (Sumitomo Bakelite) bylo nanášeno 100 μ l suspenze připravené podle d). Pak byla plotna inkubována při 37 °C v inkubátoru s 7,5% CO₂. Po 7 dnech inkubace bylo do každé komůrky přidáno 50 μ l HAT média. Po dalších 4 dnech inkubace bylo do každé komůrky přidáno dalších 50 μ l HAT média. Poté následovaly další 3 dny inkubace. Po této době byl z každé komůrky, u které byl pozorován růst kolonií fúzovaných buněk, odebrán vzorek supernatantu a byl testován titr protilátek proti KM31-7 ELISA testem na pevné fázi popsaném v b). Médium odebrané na vzorky bylo ihned nahrazeno HT médiem.

(f) Klonování

Klonování buněk z komůrek, které byl označeny jako pozitivní bylo opakováno třikrát analýzou omezeného ředění. Tyto klony, u kterých byl pozorován stálý titr protilátek, byly vybrány pro použití jako hybridomové linie buněk produkujících monoklonální protilátky proti KM31-7. V tomto stadiu byl proveden test ELISA nejen, jak bylo popsáno v b), ale rovněž jako kontrolní ELISA, přičemž byl použit bezsérový supernatant z kultury získaný z COS-1 buněk po transfekci pcDL-pSR α 296 pro přípravu pevné fáze. Proto byly pro klonování vybrány ty buněčné linie, které reagovaly v dřívějším ELISA testu, ale nereagovaly v pozdějším kontrolním ELISA testu.

(g) Čištění monoklonální protilátky

5 Z kultury hybridomové buněčné linie produkující monoklonální protilátky proti KM31-7 byl odebrán supernatant, sterilizován filtrem 0,22 μ m (Millipore), a pak byla protilátka čištěna pomocí MAbTrap GI (Pharmacia).

(h) Analýza monoklonální protilátky

10 1) Antigenní specifčnost monoklonální protilátky

Imunologickým srážecím testem s použitím bezsérového supernatantu odebraného z kultury COS-1 buněk po transfekci pSR α 31-7 bylo potvrzeno, že monoklonální protilátka je specifická pro KM31-7 protein.

15

2) Klasifikace monoklonální protilátky

Tento test byl proveden s použitím soupravy izotypů monoklonálních protilátek (Amersham). Bylo stanoveno, že protilátka patří do podtřídy IgG1.

20

Příklad 17

25 Izolace a čištění proteinu KM31-7 s použitím reakce antigen-protilátka

Byl použit postup uvedený v příkladu 15 h) 1). Stejný test byl opakován s použitím supernatantu s protilátkou a bezsérového supernatantu získaného z COS-1 buněk po transfekci pcDL-pSR α 296.

30 1,4 μ g monoklonální protilátky bylo přidáno k 1,7 ml každého bezsérového supernatantu a reakce probíhala při teplotě místnosti 1 hodin při centrifugování v 20 ot/min v mikrozkušavkách 2,2 ml. Kontrola byla provedena s použitím bezsérového supernatantu získaného z COS-1 buněk po transfekci pSR α 31-7, avšak bez přidání monoklonální protilátky.

35 Do každé zkumavky bylo pro adsorpci protilátky přidáno 30 μ l Proteinu G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia), který byl předem promyt 0,1 Tweenem 20/PBS, a centrifugace pokračovala dalších 30 minut při laboratorní teplotě a rychlosti 20 ot/min.

40 Po této době byla každá směs centrifugována několik sekund při 10 000 ot/min v mikrocentrifuze a supernatant byl opatrně odstraněn, aby nedošlo k žádným ztrátám sedimentu. Usazeniny pak byly jednotlivě promyty 0,1% Tweenem 20/PBS, centrifugovány v mikrocentrifuze a opět promyty, to vše celkem pětkrát.

45 Výsledný sediment byl resuspendován ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE obsahujícím 10 μ l 2-merkaptóethanolu. Každá suspenze byla 2 minuty ohřívána na 90 °C a pak byla provedena SDS-PAGE v 12,5% gelu v redukčních podmínkách. Po elektroforéze byl produkt převeden z polyakrylamidového gelu na nitrocelulókový film (BIO-RAD). Western blot byl proveden s použitím polyklonální protilátky proti KM31-7 popsané v příkladu 1 část (a). Bylo stanoveno, že monoklonální protilátka proti KM31-7 specificky sráží protein KM31-7 z bezsérového supernatantu z kultury COS-1/pSR α 31-7.

50

Příklad 18

Příprava fúzního proteinu CYVV-NIa/KM31-7

- 5 Aby mohl být protein KM31-7 exprimován technikou CYVV-NIa proteázy, je nutné spojit 3'-konec genu pro NIa ve stejném ORF jako je DNA pro protein KM31-7. Proto byly provedeny následující dvoustupňové postupy.

i) Zavedení 3'-postranního řetězce (SmaI-XbaI, 1006 bp) KM31-7 cDNA do pKSUN9

10

Plazmid pSR α 31-7 byl rozštěpen restričními enzymy SmaI a XbaI, aby byl získán SmaI-XbaI fragment o 1 006 bp obsahující 3'-konec KM31-7 cDNA. Výsledný fragment byl odebrán a purifikován v 0,8% agarózovém gelu při použití GENECLAN II (Funakoshi Japan).

15

Mezitím bylo podobným způsobem rozštěpeno SmaI a XbaI 5 mg plazmidové DNA pKSUN9 a vzniklé fragmenty byly defosforylovány hovězí alkalickou fosfatázou (Alkaline Phosphatase E. coli C75, Takara Shuzo, Japan). Výsledná defosforylovaná linearizovaná DNA byla ligována s fragmentem SmaI-XbaI KM31-7 pomocí ligační soupravy (Takara Shuzo) a takto připravený konstrukt byl použit k transformaci kmene E. coli JM109. Transformanty byly podrobeny selekci a testovány, aby byl nalezen klon pNIa31-7SX obsahující fragment SmaI-XbaI.

20

ii) Spojení proteázy NIa a KM31-7

25

Aby mohl být C-konec sekvence NIa spojen s N-koncem sekvence KM31-7, subtypy majícího valin na N-konci ve stejném čtecím rámci, byl připraveny čtyři typy primerů pro PCR využívající Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems Model 392 DNA Synthesizer. Primery jsou následující: 5' GGT CAG CAC AAA TTT CCA 3' sekv. č. ID: 14 (1)

5' AAA CAC AAC TTG GAA TGA ACA ATT 3' sekv. č. ID: 16 (2)

5' TCA TTC CAA GTT GTG TTT GTG AAA 3' sekv. č. ID 17 (3)

30

5' CAT AGG ATG CTC CAA CAA 3' sekv. č. ID: 18 (4)

35

První kolo PCR bylo provedeno s použitím 1 μ g plazmidové DNA pKSUN9 jako templátu. Do reakce bylo vloženo 100 pmol každého primeru (1) a (2) a 1/10 objemu desetinasobné koncentrace roztoku reakčního pufru Taq polymerázy a nakonec 5 jednotek Taq polymerázy (Takara Shuzo) v uvedeném pořadí. PCR reakce byla nejdříve provedena 3 minuty při 72 °C. Pak následovalo 30 cyklů: 1 minuta při 94 °C, 2 minuty při 55 °C a 3 minuty 72 °C, zakončeno reakcí 10 minut při 72 °C. Po PCR reakci byl znásobený DNA produkt podroben elektroforéze v 8% polyakrylamidovém gelu. Proužky gelu obsahující DNA byly určeny barvením ethidiumbromidem a byly vystřiženy. K rozlámání proužků bylo přidáno 300 μ l elučního pufru (0,5 octan amonný, 1 mM EDTA, pH 8,0) a pak následovala inkubace přes noc při 37 °C. Centrifugací se získal supernatant, který obsahoval čistou a amplifikovanou DNA.

40

Opět byla provedena PCR podobným způsobem při použití 1 μ g pUCKM31-7 plazmidové DNA jako templátu a primerů (3) a (4). Výsledná DNA byla čištěna jako předtím.

45

Amplifikovaný fragment z první PCR obsahoval sekvenci kódující zbytky z N-konce proteinu KM31-7 počínaje Val-Val-Phe přes 31 bp proti směru exprese od místa XhoI v NIa. Amplifikovaný fragment z druhé PCR obsahoval sekvenci kódující Asn-Cys-Ser-Phe-Gln z C-konce NIa přes 32 bp po směru exprese od místa SmaI v cDNA KM31-7.

50

Při PCR provedené s použitím obou fragmentů cDNA vzniklých z uvedených dvou PCR reakcí spolu s primery (1) a (4) je výsledkem reakce hybridizovaný řetězec sestávající z 9 bp 3'-konce NIa a 15 pg sekvence kódující požadovaný N-konec KM31-7. Tak je možné vytvořit sekvenci fúzované DNA s touto částí jako spojovníkem.

Na základě této logiky bylo provedeno druhé kolo PCR stejným způsobem a znásobený fragment byl pak získán z gelu.

5 iii) Zavádění Nla/KM31-7 DNA do pNla31-7SX

5 µg plazmidové DNA z pNla31-7SX získané podle i) bylo rozštěpeno XhoI a SmaI a výsledná DNA byla defosforylována reakcí s hovězí alkalickou fosfatázou. Produkt PCR připravený podle ii) byl rovněž rozštěpen XhoI a SmaI výsledný fragment byl ligován s rozštěpeným defosforylovaným pNla31-7SX pomocí ligační soupravy. Výsledný konstrukt byl použit k transformaci *E. coli* kmene JM109.

Transformandy amp^R byly selektovány a testovány. Screening byl proveden rozštěpením XhoI a následnou elektroforézou. Byly vybrány klony mající pouze jeden pruh o 8,0 kbp. Plazmidy vybraných klonů byly pak rozštěpeny HindIII a opět elektroforeticky rozděleny. Vybraný plazmid měl pruh 330 bp odpovídající části inzertu Nla cDNA. Tento plazmid byl označen pNla31-7V a obsahoval XhoI a SmaI PCR produkt.

Byla určena sekvence bází klonu pNla31-7 a bylo potvrzeno, že sekvence kódující Nla a KM31-7 byly spojeny ve stejném otevřeném čtecím rámci a s nezbytnou štěpnou sekvencí Gln-Val umístěnou mezi Nla proteinem KM31-7.

iv) Produkce proteinu KM31-7

25 Western blotem bylo potvrzeno, že pNla31-7V byl v *E. coli* funkční a že protein KM31-7 byl exprimován zkonstruovaným rekombinantním genem.

Počáteční kultura *E. coli* nesoucí plazmid pNla31-7V byla pěstována přes noc za třepání v 3 ml LB média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu. Jeden ml této počáteční kultury byl přidán ke 100 ml čerstvého média obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu a kultivace pokračovala třepáním při 37 °C až do dosažení zákalu 1,0 při OD₆₀₀ nm. V tomto stadiu bylo přidáno ke kultivačnímu bujónu IPTG do konečné koncentrace 1 mM a kultura pak byla inkubována v 28 °C přes další dvě noci za stálého třepání.

35 Po této době byl 1 ml kultury přenesen do mikrocentrifugační zkumavky a byl centrifugován 5 minut při 15 000 ot/min. Supernatant byl odstraněn a usazenina byla smíchána s 300 µl sterilované vody a 300 µl roztoku vzorkového pufru pro SDS-PAGE obsahujícího 2-merkaptethanol, aby se rozrušily usazené buňky. Vzniklá suspenze byla zahřívána 2 minuty v 95 °C a pak bylo 10 µl této suspenze použito pro SDS-PAGE v 8% gelu při redukčních podmínkách.

40 Po elektroforéze byl protein přenesen z gelu na nitrocelulózovou membránu prostřednictvím kontaktu gelu s touto membránou a inkubací v přítomnosti roztoku transkripčního pufru (25 mM Tris-HCl, 1,4% glycin a 20% methanol) při 4 °C po dobu 2,5 hodin v 19 V a s použitím zařízení na transkripci gel-membrána (Marisol Japan).

45 Nitrocelulózová membrána pak byla omyta 20 ml PBS-T médiem a blokování bylo prováděno 1 hod v 20 ml PBS-T obsahujícího 5% odstředěné mléko (Snow Brand Co., Ltd.). Po této době byla membrána omyta dvěma dávkami 20 ml PBS-T a pak ponechána po 90 minut v reakci v 20 ml PBS-T obsahujícího 1 µl 100x ředěného králíčího séra proti KM31-7 (primární protilátka) 50 sterilní vodou. Nitrocelulózový film pak byl omýván dvakrát 15 minut a opět dvakrát po pěti minutách 20 ml PBS-T.

Omytá membrána pak byla umístěna do lázně s 3000x ředěnou korozí protilátkou anti-králíčí IgG značenou peroxidázou (BIO-RAD) v PBS-T (použité jako sekundární protilátka výše) a

ponechána v lázni 1 hodinu. Pak byla membrána omyta 20 ml PBS-T a přenesena do lázně detekční látky ECL (Amersham). Pruhy, které reagovaly s protilátkou proti KM31-7, byly určeny autoradiograficky.

- 5 Byl proveden Western blot a byly označeny pruhy mající molekulovou hmotnost přibližně 60 000. Tento pruh vykazoval stejnou mobilitu jako protein mající druhou nejvyšší molekulovou hmotnost ze tří proteinů KM31-7 detekovaných z bezsérového supernatantu získaného transfekcí buněk COS-1 pomocí pSR α 31-7 použitého jako kontroly.

10 Použité chemikálie a roztoky

x M fosfátový pufr

x M roztok Na₂HPO₄ upravený na požadované pH pomocí x M roztoku NaH₂PO₄.

15 Inokulační pufr

0,1 M Tris-HCl pufr, pH 7,0, 0,05 M EDTA, 1% 2-merkapt ethanol

Extrakční pufr

0,1 M Tris-HCl pufr, 0,05 M EDTA, 1% 2-merkapt ethanol, pH 7,0

20

Degradační roztok

200 mM uhličitán amonný, 2% SDS, 2 mM EDTA,
400 mg/ml bentonit a 20 mg/ml proteáza K (pH 9,0)

25 1 x SSC

0,15 M NaCl, 0,015 M citrát sodný, pH 7,0.

Tekuté LB médium

- 30 10 g Bacto Tryptonu (Difco), 5 g kvasničného extraktu Bacto yeast (Difco) a 5 g chloridu sodného, vše doplněno do 1 litru destilovanou vodou.

Pufr Tris-Kalcium

10 mM Tris, 50 mM chlorid vápenatý, pH upraveno na 7,4 kyselinou chlorovodíkovou.

35 Lyzační pufr

0,17 g sacharózy, 250 μ l 1 M pufru Tris-HCl (pH 8,0), 200 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0), vše doplněno 20 ml destilovanou vodou

Roztok alkalického SDS

- 40 0,2 M hydroxie sodný, 1% SDS

Roztok TBE

100 mM Tris, 100 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA

45 Denaturační roztok

1,5 M chlorid sodný, 0,5 M hydroxid sodný.

Neutralizační roztok

0,5 M Tris, 3 M chlorid sodný (pH 7,4)

50

50x Denhardtův roztok

1% polyvinyl pyrrolidon, 1% hovězí sérumalbumin,
1% Ficoll 400. Tento roztok je pak naředěn destilovanou vodou tak, aby se dosáhla požadovaná koncentrace.

55

5x denaturační pufr

125 μ l 1 M glycinu (pH 9,0), 25 μ l 1 M chloridu hořečnatého, 850 μ l redestilované vody.

5x značkovací pufr

5 25 μ l 1 M Tris-HCl pufru (pH 7,9), 5 μ l 1 M chloridu hořečnatého, 2,5 μ l 1 M dithiotreitolu, 9,2 μ l redestilované vody.

Solný roztok 10 x M9

10 0,145 M hydrogenfosfát sodný, 0,172 M dihydrogenfosfát draselný, 0,187 M chlorid amonný, 0,137 M chlorid sodný, pH 7,0.

M9 minimální agarové médium

15 10 M 10x M9 solného roztoku, 100 μ l 1M síranu hořečnatého, 1 ml 20% glukózy, 50 μ l 1% thiamin hydrochloridu, 1 ml 0,01 M chloridu vápenatého a 13 ml redestilované vody. Vše smíchané, sterilizováno filtrací a pak nalito na misky ihned po přidání 50 ml 3% bactoagaru.

Tekuté SOB médium

20 10 g baktotryptonu, 2,5 g kvasničného extraktu (bactoyeast), 100 μ l 5 M chloridu sodného a 125 μ l 1M chloridu draselného, vše smíchano dohromady a doplněno do 500 ml destilovanou vodou. Po autoklávování bylo přidáno 5 ml 1M chloridu hořečnatého a 5 ml síranu hořečnatého.

Pufr TFB1

25 5 ml 1 M 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES – upravená na pH 6,2 pomocí 1 N HCl, 6,045 g chloridu rubidného, 0,735 g bihydrátu chloridu vápenatého smíchano s 4,94 g tetrahydrátu chloridu vápenatého, pH upraveno ledovou kyselinou octovou na 5,8 a doplněno do 500 ml redestilovanou vodou. Sterilováno filtrací.

Pufr TFB2

30 1 ml 1 M 2-(N-morfolino)propansulfonové kyseliny (MOPS), 1,102 g bihydrátu chloridu vápenatého, 0,12 g chloridu rubidného a 15 ml glycerolu, smíchano, pH upraveno na 6,5 ledovou kyselinou octovou, do 100 ml doplněno redestilovanou vodou a sterilizovanou filtrací.

Tekuté SOC médium

35 5 ml tekutého SOB média, 90 μ l 20% glukózy.

Médium 2x YT

16 g byktoptryptonu, 5 g kvasničného extraktu (bactoyest) a 5 g chloridu sodného, smíchano a doplněno do 1 litru redestilovanou vodou.

40 Médium PBS-Tw

80 mM hydrogenfosfát sodný, 20 mM dihydrogenfosfát sodný, 100 mM chlorid sodný, 0,1% Tween 20.

Médium PBS-T

45 4 g chloridu sodného, 0,1 g dihydrogenfosfátu draselného 1,45 g dodekahydrátu hydrogenfosfátu sodného, 0,1 g chloridu draselného a 0,1 g azidu sodného, vše smíchano a doplněno do 1 litru redestilovanou vodou, pH 7,4.

Roztok substrátu alkalické fosfatázy

50 0,01 % p-nitrofenylfosfátu rozpuštěného v 10% vodném roztoku diethanolaminu, který byl upraven na pH 9,8 kyselinou chlorovodíkovou.

Médium A

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, obsahující 4,5 g/l glukózy), 10% inaktivované fetální hovězí sérum (Hyclone) a 10 mM HEPES (pH 7,2).

5 Médium B

DMEM (obsahující 4,5 g/l glukózy) 10 mM HEPES (pH 7,2), 3% inaktivované hovězí fetální sérum, 5 µg/ml hovězího inzulinu (výroba Sigma), 8 µg/ml d-biotinu (výroba Sigma), 4 mg/ml kyseliny panthotenové (výroba Sigma), 1,0 mM dexamethason (Sigma) a 0,5 mM izobutylmethoxanthin (Aldrich).

10

Médium C

DMEM (obsahující 4,5 g/l glukózy), 5% inaktivovaného hovězího fetálního séra, 10 mM HEPES (pH 7,2), 100 ng/ml hovězího inzulinu a 10 U/ml heparinu sodného (výroba Novo Industry Co.).

15

Roztok substrátu LPL

13 mM glycerol tri-[9,10(n)-³H]oleát (51,8 kBq/µmol, výroba Amersham), 1,3 mg/ml L- α -fosfatidylcholin distearoyl (výroba Sigma Co.), 20 mg/ml hovězího serumalbumin (výroba Sigma, co.), 135 mM Tris hydrochlorid [Tris-HCl(pH 8,1), výroba Sigma Co.], 16,5% (v/v) glycerol a 16,5% (v/v) inaktivované hovězí fetální sérum.

20

Roztok guanidin thyikyanátu

4 M guanidin thiokyanát, 1% sarkosyl, 20 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), 25 mM citrát sodný (pH 7,0), 100 mM 2-merkptoethanol a 0,1% antifoam A (Sigma).

25

Adsorpční pufr

0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA a 0,1% SDS.

Eluční roztok

30

10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA a 0,05% SDS.

Reakční roztok reverzní transkriptázy vzorku 2

50 ml Tris-HCl (pH 8,3), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 0,3 mM dithiothreitol, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 10 µCi[α -³²P]dCTP a 1,4 µg vektoru primerové-DNA (3'-oligo(dT)-koncový pcDV-1, Pharmacia).

35

Reakční roztok terminální transferázy

140 mM kakodylát draselný, 30 mM Tris-Cl (pH 6,8), 1 mM CoCl₂, 0,5 mM dithiothreitol, 0,2 µg polyA a 100 mM dCTP.

40

Pufr pro restrikční enzym

50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂ a 1 mM dithiotreitol.

10 objemů ligačního pufru

45

10 mM ATP, 60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 66 mM MgCl₂ a 100 mM dithiotreitol.

Elektroforetický pigment

50% glycerol, 0,01 M hydrogenfosfát sodný (pH 7,0) a bromfenolová modř.

50

1 x TAE

0,04 M Tris-acetát, 0,01 M EDTA.

1 x SSCP

120 mM NaCl, 15 mM citrát sodný, 13 mM dihydrogenfosfát draselný a 1 mM EDTA.

5 Reakční roztok pro reverzní transkriptázu vzorku 6

1x pufr syntézy prvního vlákna, 5% pyrofosfát sodný, 100 jednotek inhibitoru ribonukleázy, 1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 0,5 mM dCTP a 3,75 µg primeru oligo (dT), vše poskytováno v cDNA Cloning Systém (Amersham).

10 SM pufr

100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 0,01% želatina.

Dialyzační pufr

20 mM fosfátový pufr (pH 7,8) a 0,5 M NaCl.

15

Kolonový pufr

10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl a 1 mM EDTA.

Roztok reakčního pufru pro Taq polymerázu

20 Taq obsahující 500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP a 2 mg/ml želatiny.

Přehled sekvencí:

25	Sekvenční č. ID:	11
	Délka sekvence:	1650
	Typ sekvence:	nukleová kyselina
	Počet řetězců	dvouřetězcová
	Topologie:	lineární
30	Typ molekuly:	cDNA na mRNA
	Původní zdrojový organismus:	Homo sapiens
	Vlastnosti:	
	Charakteristika exprese symbolu:	CDS
	Umístění:	1..647
35	Metoda pro stanovení charakteristiky:	E
	Charakteristika exprese symbolu:	mat-peptid
	Umístění:	70..1647
	Metoda pro stanovení charakteristiky:	E
	Charakteristika exprese symbolu:	mat-peptid
40	Umístění:	70..1647
	Metoda pro stanovení charakteristiky:	sig peptid
	Umístění:	1..69
	Metoda pro stanovení charakteristiky:	E
	Sekvence:	

45

ATG TCA TGT GAG GAC GGT CGG GCC CTG GAA GGA ACG CTC TCG GAA TTG 48
 Met Ser Cys Glu Asp Gly Arg Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ser Glu Leu
 -23 -20 -15 -10

GCC GCG GAA ACC GAT CTG CCC GTT GTG TTT GTG AAA CAG AGA AAG ATA 96
 Ala Ala Glu Thr Asp Leu Pro Val Val Phe Val Lys Gln Arg Lys Ile
 -5 1 5

GGC GGC CAT GGT CCA ACC TTG AAG GCT TAT CAG GAG GGC AGA CTT CAA 144
 Gly Gly His Gly Pro Thr Leu Lys Ala Tyr Gln Glu Gly Arg Leu Gln
 10 15 20 25

AAG CTA CTA AAA ATG AAC GGC CCT GAA GAT CTT CCC AAG TCC TAT GAC 192
 Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro Lys Ser Tyr Asp
 30 35 40

TAT GAC CTT ATC ATC ATT GGA GGT GGC TCA GGA GGT CTG GCA GCT GCT 240
 Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Ala Ala
 45 50 55

AAG GAG GCA GCC CAA TAT GGC AAG AAG GTG ATG GTC CTG GAC TTT GTC 288
 Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val Leu Asp Phe Val
 60 65 70

ACT CCC ACC CCT CTT GGA ACT AGA TGG GGT CTT GGA GGA ACA TGT GTG 336
 Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val
 75 80 85

AAT GTG GGT TGC ATA CCT AAA AAA CTG ATG CAT CAA GCA GCT TTG TTA 384
 Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu
 90 95 100 105

GGA CAA GCC CTG CAA GAC TCT CGA AAT TAT GGA TGG AAA GTC GAG GAG 432
 Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp Lys Val Glu Glu
 110 115 120

ACA GTT AAG CAT GAT TGG GAC AGA ATG ATA GAA GCT GTA CAG AAT CAC 480
 Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala Val Gln Asn His
 125 130 135

ATT GGC TCT TTG AAT TGG GGC TAC CGA GTA GCT CTG CGG GAG AAA AAA 528
 Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu Arg Glu Lys Lys
 140 145 150

GTC GTC TAT GAG AAT GCT TAT GGG CAA TTT ATT GGT CCT CAC AGG ATT 576
 Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly Pro His Arg Ile
 155 160 165

AAG GCA ACA AAT AAT AAA GGC AAA GAA AAA ATT TAT TCA GCA GAG AGA 624
 Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr Ser Ala Glu Arg
 170 175 180 185

TTT CTC ATT GCC ACT GGT GAA AGA CCA CGT TAC TTG GGC ATC CCT GGT 672
 Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Gly
 190 195 200

GAC AAA GAA TAC TGC ATC AGC AGT GAT GAT CTT TTC TCC TTG CCT TAC 720
 Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe Ser Leu Pro Tyr
 205 210 215

TGC CCG GGT AAG ACC CTG GTT GTT GGA GCA TCC TAT GTC GCT TTG GAG 768
 Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu
 220 225 230

TGC GCT GGA TTT CTT GCT GGT ATT GGT TTA GAC GTC ACT GTT ATG GTT 816
 Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val Thr Val Met Val
 235 240 245

AGG TCC ATT CTT CTT AGA GGA TTT GAC CAG GAC ATG GCC AAC AAA ATT 864
 Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met Ala Asn Lys Ile
 250 255 260 265

GGT GAA CAC ATG GAA GAA CAT GGC ATC AAG TTT ATA AGA CAG TTC GTA 912
 Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile Arg Gln Phe Val
 270 275 280

CCA ATT AAA GTT GAA CAA ATT GAA GCA GGG ACA CCA GGC CGA CTC AGA 960
 Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro Gly Arg Leu Arg
 285 290 295

GTA GTA GCT CAG TCC ACC AAT AGT GAG GAA ATC ATT GAA GGA GAA TAT 1008
 Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile Glu Gly Glu Tyr
 300 305 310

AAT ACG GTG ATG CTG GCA ATA GGA AGA GAT GCT TGC ACA AGA AAA ATT 1056
 Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys Thr Arg Lys Ile
 315 320 325

GGC TTA GAA ACC GTA GGG GTG AAG ATA AAT GAA AAG ACT GGA AAA ATA 1104
 Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys Thr Gly Lys Ile
 330 335 340 345

CCT GTC ACA GAT GAA GAA CAG ACC AAT GTG CCT TAC ATC TAT GCC ATT 1152
 Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr Ile Tyr Ala Ile
 350 355 360

GGC GAT ATA TTG GAG GAT AAG GTG GAG CTC ACC CCA GTT GCA ATC CAG 1200
 Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro Val Ala Ile Gln
 365 370 375

GCA GGA AGA TTG CTG GCT CAG AGG CTC TAT GCA GGT TCC ACT GTC AAG 1248
 Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Lys
 380 385 390

TGT GAC TAT GAA AAT GTT CCA ACC ACT GTA TTT ACT CCT TTG GAA TAT 1296
 Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr
 395 400 405

GGT GCT TGT GGC CTT TCT GAG GAG AAA GCT GTG GAG AAG TTT GGG GAA 1344
 Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu Lys Phe Gly Glu
 410 415 420 425

GAA AAT ATT GAG GTT TAC CAT AGT TAC TTT TGG CCA TTG GAA TGG ACG 1392
 Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro Leu Glu Trp Thr
 430 435 440

ATT CCG TCA AGA GAT AAC AAC AAA TGT TAT GCA AAA ATA ATC TGT AAT 1440
 Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys Ile Ile Cys Asn
 445 450 455

ACT AAA GAC AAT GAA CGT GTT GTG GGC TTT CAC GTA CTG GGT CCA AAT 1488
 Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val Leu Gly Pro Asn
 460 465 470

GCT GGA GAA GTT ACA CAA GGC TTT GCA GCT GCG CTC AAA TGT GGA CTG 1536
 Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu Lys Cys Gly Leu
 475 480 485

ACC AAA AAG CAG CTG GAC AGC ACA ATT GGA ATC CAC CCT GTC TGT GCA 1584
 Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His Pro Val Cys Ala
 490 495 500 505

GAG GTA TTC ACA ACA TTG TCT GTG ACC AAG CGC TCT GGG GCA AGC ATC 1632
 Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser Gly Ala Ser Ile
 510 515 520

CTC CAG GCT GGC TGC TGA 1650
 Leu Gln Ala Gly Cys
 525

Sekvenční č. ID: 12
 5 Délka sekvence: 526
 Typ sekvence: aminokyseliny
 Počet řetězců: jednořetězcové
 Topologie: lineární
 Typ molekuly: peptid
 10 Popis sekvence:

Met Ser Cys Glu Asp Gly Arg Ala Leu Glu Gly Thr Leu Ser Glu Leu
 -23 -20 -15 -10
 Ala Ala Glu Thr Asp Leu Pro Val Val Phe Val Lys Gln Arg Lys Ile
 -5 1 5
 Gly Gly His Gly Pro Thr Leu Lys Ala Tyr Gln Glu Gly Arg Leu Gln
 10 15 20 25
 Lys Leu Leu Lys Met Asn Gly Pro Glu Asp Leu Pro Lys Ser Tyr Asp
 30 35 40
 Tyr Asp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Ala Ala
 45 50 55
 Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Gly Lys Lys Val Met Val Leu Asp Phe Val
 60 65 70
 Thr Pro Thr Pro Leu Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val
 75 80 85
 Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu
 90 95 100 105
 Gly Gln Ala Leu Gln Asp Ser Arg Asn Tyr Gly Trp Lys Val Glu Glu
 110 115 120
 Thr Val Lys His Asp Trp Asp Arg Met Ile Glu Ala Val Gln Asn His
 125 130 135
 Ile Gly Ser Leu Asn Trp Gly Tyr Arg Val Ala Leu Arg Glu Lys Lys
 140 145 150
 Val Val Tyr Glu Asn Ala Tyr Gly Gln Phe Ile Gly Pro His Arg Ile
 155 160 165

Lys Ala Thr Asn Asn Lys Gly Lys Glu Lys Ile Tyr Ser Ala Glu Arg
 170 175 180 185
 Phe Leu Ile Ala Thr Gly Glu Arg Pro Arg Tyr Leu Gly Ile Pro Gly
 190 195 200
 Asp Lys Glu Tyr Cys Ile Ser Ser Asp Asp Leu Phe Ser Leu Pro Tyr
 205 210 215
 Cys Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu
 220 225 230
 Cys Ala Gly Phe Leu Ala Gly Ile Gly Leu Asp Val Thr Val Met Val
 235 240 245
 Arg Ser Ile Leu Leu Arg Gly Phe Asp Gln Asp Met Ala Asn Lys Ile
 250 255 260 265
 Gly Glu His Met Glu Glu His Gly Ile Lys Phe Ile Arg Gln Phe Val
 270 275 280
 Pro Ile Lys Val Glu Gln Ile Glu Ala Gly Thr Pro Gly Arg Leu Arg
 285 290 295
 Val Val Ala Gln Ser Thr Asn Ser Glu Glu Ile Ile Glu Gly Glu Tyr
 300 305 310
 Asn Thr Val Met Leu Ala Ile Gly Arg Asp Ala Cys Thr Arg Lys Ile
 315 320 325
 Gly Leu Glu Thr Val Gly Val Lys Ile Asn Glu Lys Thr Gly Lys Ile
 330 335 340 345
 Pro Val Thr Asp Glu Glu Gln Thr Asn Val Pro Tyr Ile Tyr Ala Ile
 350 355 360
 Gly Asp Ile Leu Glu Asp Lys Val Glu Leu Thr Pro Val Ala Ile Gln
 365 370 375
 Ala Gly Arg Leu Leu Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Lys
 380 385 390
 Cys Asp Tyr Glu Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr
 395 400 405
 Gly Ala Cys Gly Leu Ser Glu Glu Lys Ala Val Glu Lys Phe Gly Glu
 410 415 420 425
 Glu Asn Ile Glu Val Tyr His Ser Tyr Phe Trp Pro Leu Glu Trp Thr
 430 435 440
 Ile Pro Ser Arg Asp Asn Asn Lys Cys Tyr Ala Lys Ile Ile Cys Asn
 445 450 455
 Thr Lys Asp Asn Glu Arg Val Val Gly Phe His Val Leu Gly Pro Asn
 460 465 470
 Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Ala Ala Leu Lys Cys Gly Leu
 475 480 485

Thr Lys Lys Gln Leu Asp Ser Thr Ile Gly Ile His Pro Val Cys Ala
 490 495 500 505
 Glu Val Phe Thr Thr Leu Ser Val Thr Lys Arg Ser Gly Ala Ser Ile
 510 515 520
 Leu Gln Ala Gly Cys
 525

5 Sekvenční č. ID: 13
 Délka sekvence: 15
 Typ sekvence: nukleová kyselina
 Počet řetězců: dvouřetězcová
 Topologie: lineární
 Typ molekuly: další typy DNA, syntetická DNA
 10 Popis sekvence:
 TAAATAAATA AATAA

15 Sekvenční č. ID: 14
 Délka sekvence: 66
 Typ sekvence: nukleová kyselina
 Počet řetězců: dvouřetězcová
 Topologie: lineární
 Typ molekuly: další typ DNA, syntetická DNA
 20 Popis sekvence:
 CTAGCGCTCT GGGGCAAGCA TCCTCCAGGC
 TGGCTGCCAC CACCACCACC ACCACTGATC TAGACT 66

25 Sekvenční č. ID: 16
 Délka sekvence: 18
 Typ sekvence: nukleová kyselina
 Topologie: lineární
 Typ molekuly: další typ DNA, syntetická DNA
 Popis sekvence:
 GGTCAGCACA AATTCCA 18

30 Sekvenční č. ID: 16
 Délka sekvence: 24
 Typ sekvence: nukleová kyselina
 Topologie: lineární
 35 Typ molekuly: další typ DNA, syntetická DNA
 Popis sekvence:
 AAACACAAC TGAATGAAC AATT 24

40 Sekvenční č. ID: 17
 Délka sekvence: 24
 Typ sekvence: nukleová kyselina
 Topologie: lineární
 Typ molekuly: další typ DNA, syntetická DNA
 Popis sekvence:
 45 TCATTCCAAG TTGTGTTTGT GAAA 24

Sekvenční č. ID: 18
 Délka sekvence: 18

Typ sekvence:	nukleová kyselina
Topologie:	lineární
Typ molekuly:	další typ DNA, syntetická DNA
Popis sekvence:	
5 CATAGGATGC TCCAACAA	18

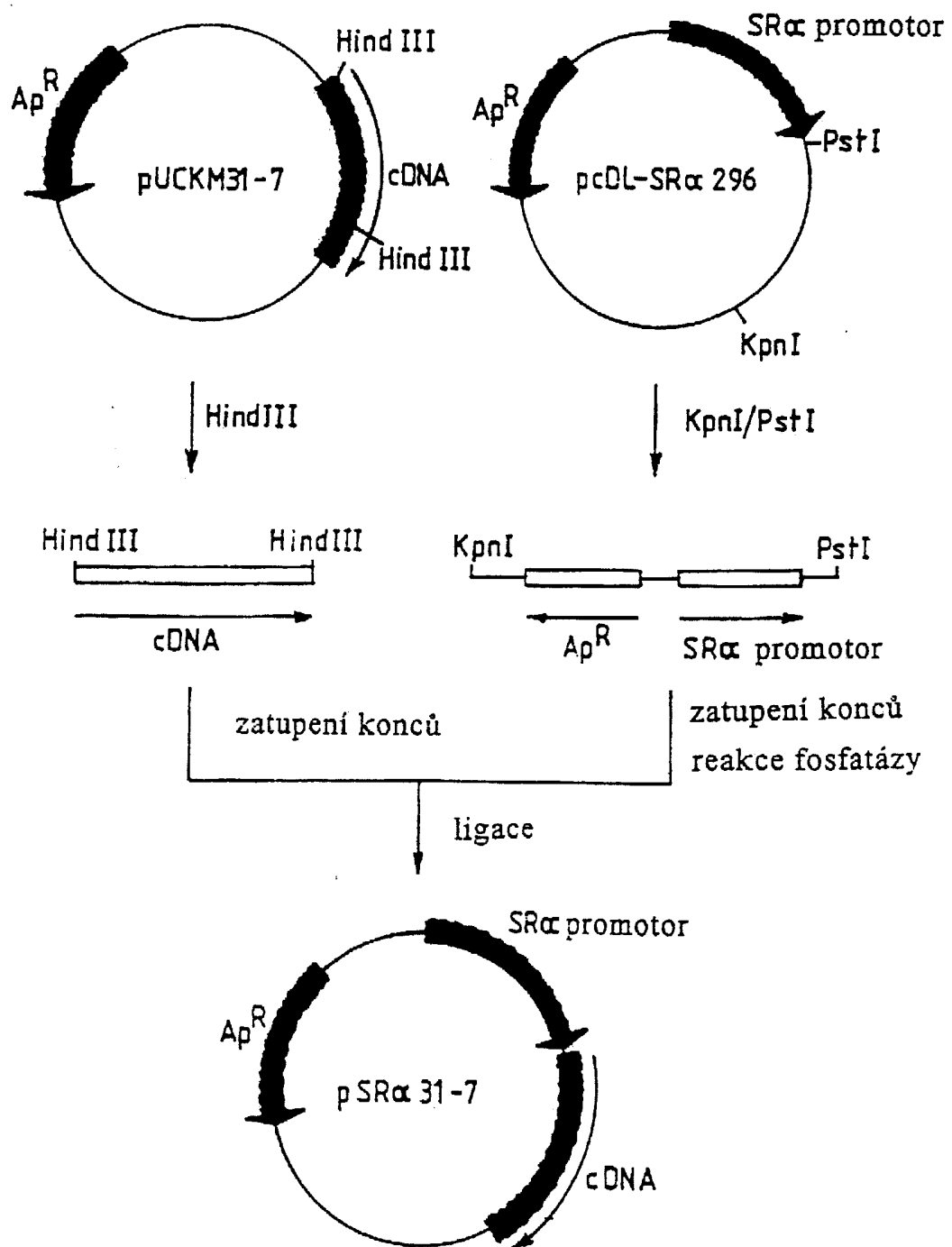
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polynukleotidová sekvence kódující polypeptid, který obsahuje sekvenci aminokyselin od čísla 1 do čísla 526 sekvence č. ID: 12 nebo která kóduje mutaci či variantu řečeného polypeptidu s předpokladem, že polypeptid, kódovaný touto polynukleotidovou sekvencí je schopen redukovat dichloroindofenol a oxidovaný glutathion.
2. Polynukleotidová sekvence podle nároku 1, která má 55% nebo vyšší sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. 1 až 526 sekvence č. ID: 12.
3. Polynukleotidová sekvence podle nároku 1, která sdílí více než 70% sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. 1 až 526 sekvence č. ID: 12.
4. Polynukleotidová sekvence podle nároku 1, která sdílí více než 80% sekvenční homologii se sekvencí aminokyselin č. 1 až 526 sekvence č. ID: 12.
5. Polynukleotidová sekvence podle kteréhokoli z nároků od 1 až do 4, jejíž kódující sekvence obsahuje nukleotidovou sekvenci 70 až 1647 vyznačenou v sekvenci č. ID: 11.
6. Polynukleotidová sekvence podle nároku 1, která kóduje polypeptid mající sekvenci -23 až 526 ze sekvence č. ID: 12 nebo její mutaci či variantu.
7. DNA, která hybridizuje s polynukleotidovou sekvencí podle kteréhokoli z nároků 1 až 6 za hybridizačních podmínek s použitím 6x SSC při teplotě 60 až 70 °C a ve které pozitivní kódující řetězec DNA kóduje polypeptid mající redukující účinek.
8. Polypeptid, který je kódován polynukleotidovou sekvencí podle kteréhokoli nároku 1 až 7.
9. Polypeptid podle nároku 8, který je určen pro využití v profylaxi nebo léčbě stavů způsobených nebo souvisejících s oxidativním stresem nebo s kterýmkoliv onemocněním způsobeným aktivovaným kyslíkem.
10. Polypeptid podle nároku 8 určený pro využití v profylaxi nebo léčbě arteriosklerózy, diabetu nebo ischemických poruch.
11. Polypeptid podle nároku 8, který je určen pro využití v profylaxi nebo léčbě arteriosklerózy, diabetu, ischemických poruch, edemů, vaskulární hypermeability, zánětů, poruch žaludeční sliznice, akutní pankreatitidy, Crohnovy nemoci, vředové kolitidy, poruch jater, Paraquatovy nemoci, rozedmy plic, chemokarcinogeneze, karcinogenních metastáz, syndromu nedostatečnosti dýchacího ústrojí u dospělých, disseminované intravaskulární koagulace (DIC), šedého zákalu, předčasné retinopatie, autoimunitních onemocnění, porfyrémie, hemolytického onemocnění, středomořské anemie, Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy nemoci, epilepsie, poruch z ultrafialového záření, poruch z ozáření, omrzlin a popálenin.

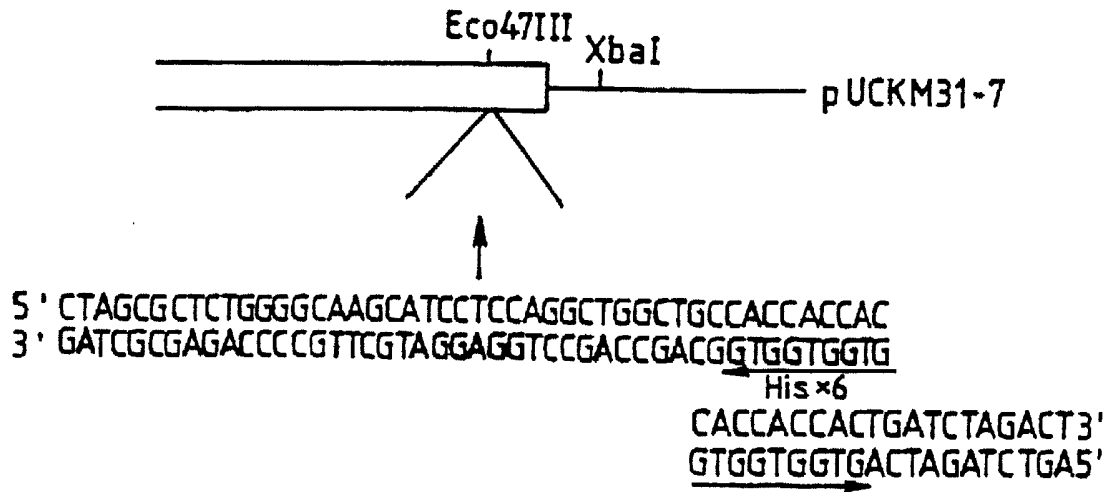
12. Použití polypeptidu podle nároku 8 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu nebo profylaxi kteréhokoli stavu specifikovaného v některém z nároků 10 až 12.
- 5 13. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje farmakologicky účinné množství peptidu podle nároku 8 spolu s farmakologicky přijatelným nosičem tohoto peptidu.
14. Vektor, který obsahuje polynukleotidovou sekvenci podle kteréhokoli z nároků 1 až 7.
- 10 15. Vektor podle nároku 14, který je expresivní vektor.
16. Hostitel, transformovaný vektorem podle kteréhokoli z nároku 14 nebo 15 s výjimkou lidských buněk.
- 15 17. Expresivní systém v němž je hostitel s výjimkou lidských buněk transformovaný vektorem podle nároku 15.
18. Expresivní systém podle nároku 17 v němž je hostitelem *E. coli*.
- 20 19. Protilátka nebo její ekvivalent specificky rozpoznávající polypeptid kódovaný polynukleotidovou sekvencí podle nároku 1 nebo specificky rozpoznávající mutaci či variantu tohoto proteinu.
20. Protilátka podle nároku 19, která je monoklonální protilátkou.
- 25 21. Protilátka podle nároku 19 nebo 20, která antigenně napodobuje lidskou protilátku.
22. Anti-idiotypová protilátka, která rozpoznává rozpoznávací místo protilátky podle kteréhokoli z nároků 19 až 21.
- 30 23. Protilátka, která je produkována hybridomem označeným MKM150-2 a uloženým pod evidenčním číslem FERM BP-5086.
24. Použití protilátky podle kteréhokoli z nároků 19 až 23, pro izolaci a purifikaci proteinu kódovaného polynukleotidovou sekvencí podle nároku 1.
- 35 25. Hybridom, který v kultuře exprimuje protilátky podle kteréhokoli z nároků 19 až 22.
26. Hybridom označený MKM150-2 a uložený pod evidenčním číslem FERM BP-5086.
- 40

5 výkresů

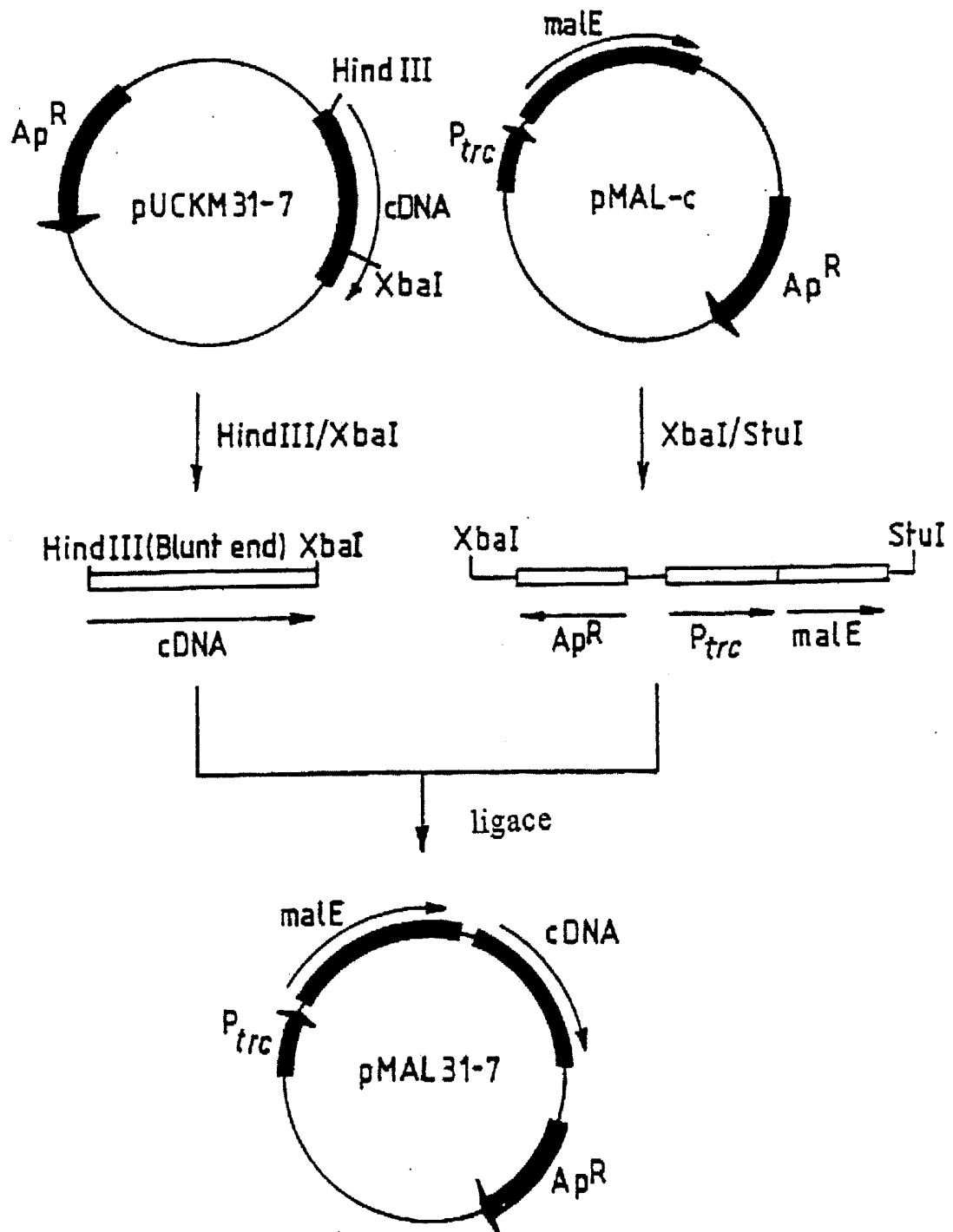
45



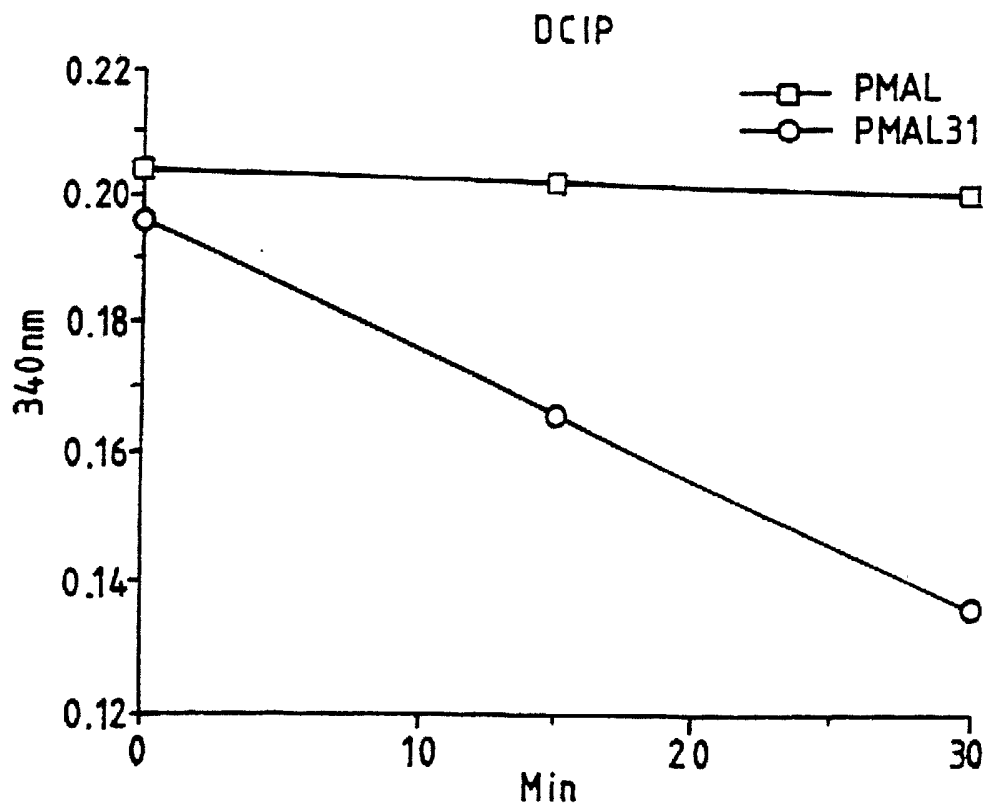
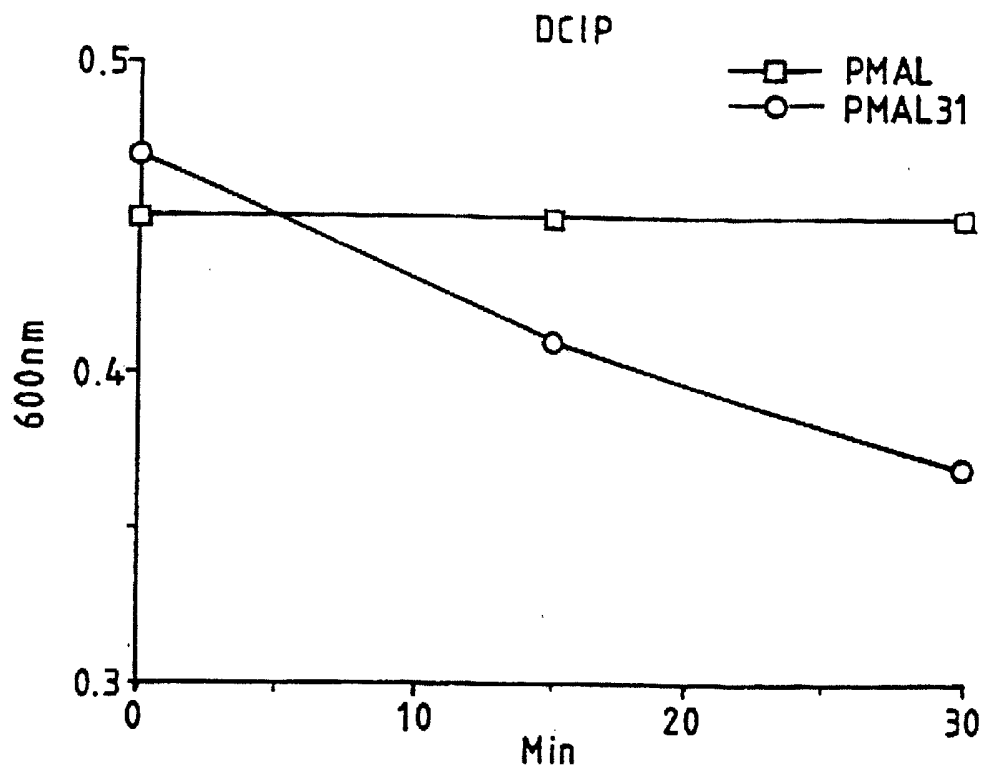
Obr. 1



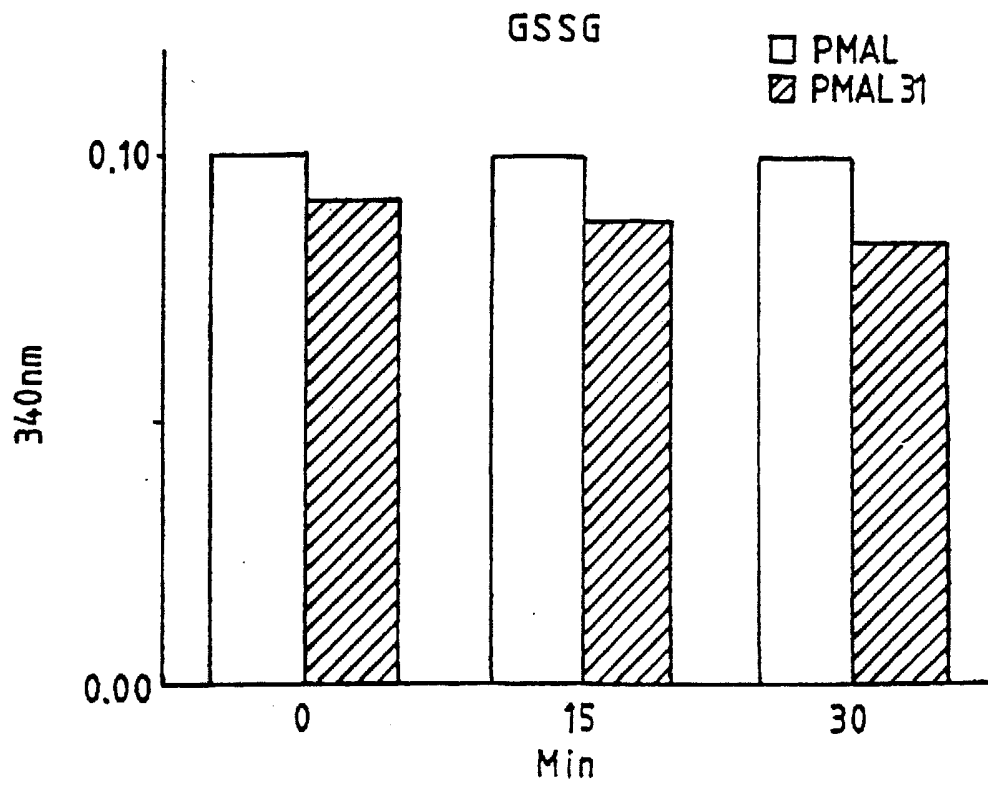
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

**Obr. 5**

Konec dokumentu
