

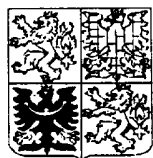
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 648

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3638-88**

(22) Přihlášeno: **27. 05. 88**

(30) Právo přednosti:
28. 05. 87 GB 87/8712540

(40) Zveřejněno: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(47) Uděleno: **30. 03. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 4/12

C 12 N 15/00

C 12 P 21/00

(73) Majitel patentu:

UCB S. A., Brusel, BE;

(72) Původce vynálezu:

Bollen Alex dr., Itterbeek, BE;

Gobert Jean dr., Brusel, BE;

Wulfert Ernst dr., Brusel, BE;

(74) Zástupce:

Koreček Ivan JUDr., Na baště sv. Jiří 9,
Praha 6, 16000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob výroby proapolipoproteinu A-I
lidského původu**

(57) Anotace:

Pěstuje se za příslušných podmínek buněčná kultura nebo mikroorganismus, transformovaný vektorem, obsahujícím řetězec, který je kódem pro lidský proapolipoprotein, v němž byla část přírodního kódového řetězce nahražena fragmentem DNA, který je kódem pro tytéž aminokyseliny, avšak na základě jiného nukleotidového sledu, a takto produkováný lidský proapolipoprotein A-I se izoluje.

CZ 283 648 B6

Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu

Oblast techniky

5

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

10

Dosavadní stav techniky

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

20 Proapo A-I obsahuje navíc šest aminokyselin (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln), které jsou vázány na aminoterminální zakončení apo A-I. Jakmile se tato látka dostane do krve, dochází k jejímu rozštěpení in vivo specifickým proteolytickým enzymem apo A-I-propetidázou za vzniku apo A-I.

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

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

Apo A-I a LHD jsou hlavními složkami, které se v krevní plazmě účastní transportu cholesterolu do periferních tkání, zejména do arterií směrem k játrům, což bývá také nazýváno inverzním
40 transportem cholesterolu, pro jeho vylučování z organismu. Vzhledem k tomu, že nahromadění cholesterolu v cévní tkáni arterií je charakteristickým mechanismem vzniku arteriosklerózy, mělo by být možné stimulací inverzního transportu cholesterolu působením apo A-I zpomalit nebo léčit arteriosklerotický proces a tím také snížit výskyt srdečních krizí.

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

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

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

10 V japonské patentové přihlášce č. 96 998/86, uvedeného svrchu, se popisuje exprese bílkoviny, která je podobná apolipoproteinu A-I lidského původu. K expresi došlo v *E. coli*, která byla transformována při použití plazmidu pHAIE-I, obsahujícího gen se strukturou genu pro apo A-I pod řízením promotoru tac. Struktura uvedeného genu však nebyla úplná, gen sestával z kodonů pro aminokyseliny +4 až +243, tyto kodony předcházeli kodon ATG pro počátek translace. V důsledku toho obsahoval získaný produkt exprese N-terminální methionin (odpovídající kodonu ATG), který může vyvolat vznik sekundárních účinků v případě, že by tato látka byla použita k léčbě.

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

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

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

Vynález se rovněž týká konstrukce vektorů pro klonování a pro expresi, které obsahují sled DNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu tak, že získaná konstrukce umožňuje
45 amplifikaci a v důsledku toho také expresi zralého lidského proteinu proapo A-I, jakož i met-proapo A-I, přičemž takto získané látky mohou být konjugovány fúzí, nebo mohou být konjugovány s N-terminálním signálem. Vynález rovněž využívá životaschopných tkáňových kultur, různých buněk nebo mikroorganismů, které byly geneticky pozměněny včleněním svrchu uvedených vektorů a jsou proto schopny produkovat lidský polypeptid proapo A-I. Mimo to by
50 mělo být způsobem podle vynálezu možno získat uvedenou látku v poměrně čistém stavu bez dalších bílkovin, jako je tomu při izolaci z přírodního prostředí. Vzhledem ke specifickému způsobu přípravy je tedy možno získat lidský proapo A-I, který je v podstatě prostý obvyklých endogenních bílkovin a jiných materiálů, obvykle obsažených při jiných způsobech výroby.

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

5

Podstata vynálezu

Způsob výroby proapolipoproteinu A-I lidského původu spočívá podle vynálezu v tom, že se 1) pěstuje za příslušných podmínek buněčná kultura nebo mikroorganismus ze skupiny *E. coli*,
 10 *Saccharomyces cerevisiae* nebo buněk *Spodoptera frugiperda*, transformovaný vektorem pro expresi, který obsahuje řetězec rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský proapolipoprotein A-I, vázaný operativním způsobem na řídicí sled DNA a včleněný mezi signály pro iniciaci a pro ukončení translace, přičemž ve sledu řetězce rekombinantní DNA, který je kódem pro lidský apolipoprotein A-I, je vypuštěn fragment přírodního kódového řetězce pro aminokyseliny -6 až
 15 +14 a je nahrazen fragmentem DNA.

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTA-
 AGGACTTG-3'

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

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

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

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

5 Způsobem podle vynálezu je tedy možno získat proapo A-I lidského původu jako produkt buněčné kultury nebo geneticky modifikovaného mikroorganismu. Tento proapo A-I lidského
původu může být získán jako zralý proapo A-I, ve formě proapo A-I, před nímž je uložen zbytek
methioninu, ve formě složené bílkoviny, kterou může být například beta-galaktosidáza-proapo
10 A-I a ve formě sloučeniny preproapo A-I. Takto získaný produkt je v podstatě prostý obvyklých
endogenních bílkovin a dalších látek, které se obvykle vyskytují v materiálech, získaných
z přírodních zdrojů, jako je krevní plazma v případě svrchu získávané bílkoviny. Tkáňové
kultury pro toto použití nebo mikroorganismy, využívané k produkci uvedených látek, nejsou
omezeny na použité buněčné linie nebo na specifické organismy. K uvedenému účelu je možno
15 použít jak buňky eukaryotických, tak buňky prokaryotických organismů, což znamená i možnost
použití živočišných a lidských buněčných linií. Pouze jako příklad je možno uvést možnost
expresí v mikroorganismu *Escherichia coli* (jako představitel prokaryotických buněk), dále
kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a také hmyzí buňky, infikované bakulovirem, jako
reprezentanty eukaryotických buněk.

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

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

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

40 5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTT-
AAGGACTTG-3',

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

45 Vynález se rovněž vztahuje k získání vektorů pro klonování s obsahem uvedené rekombinantní
DNA a vektorů pro expresi, které obsahují svrchu uvedený sled, který je kódem pro lidský
proapo A-I. Vynález se zvláště týká způsobu získání rekombinantních plazmidů pULB9291,
pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 a pNIV1613, jejichž konstrukce bude dále
popsána. První z uvedených plazmidů, pULB9291 a pULB9292, obsahují gen s modifikovanou
50 strukturou genu pro proapo A-I, před nímž se nachází kodon ATG pod řízením promotoru P_L
z fágu lambda. Tyto plazmidy jsou vektory pro expresi, které je možno použít v případě *E. coli* a
které řídí syntézu lidského proapo A-I, který může být štěpen propeptidázou za vzniku zralého
lidského apo A-I v autentické formě. V případě, že se tento plazmid včlení do *E. coli*, řídí
plazmid pULB9296 expresi bílkoviny, která je vázána na beta-galaktosidázu pod řízením oblasti

lac promotoru z *E. coli*. Vzhledem k tomu, že takto získaný produkt, obsahující lidský proapo A-I a beta-galaktosidázu, obsahuje také řetězec, v němž dochází ke štěpení působením propeptidázy, je možno jej rozštěpit za vzniku zralého autentického lidského apo A-I.

- 5 Plazmid pULB9299 je vektor pro expresi, který je vhodný pro použití u kvasinek a obsahuje oblasti promotoru a terminátoru transkripce pro zajištění účinné exprese u kvasinek. Takto získaný lidský proapo A-I je opět možno rozštěpit působením propeptidázy a získat tak zralý autentický lidský apo A-I.
- 10 Jako terminátoru transkripce se v případě kvasinek s výhodou užije ARG3 k zajištění účinné exprese.

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

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

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

40 Účelu, který si vynález klade za úkol, je zásadně možno dosáhnout také při použití různých kmenů mikroorganismů, například kmene MM 294 mikroorganismu *E. coli* K12 (endoA^{thi}, hsdR, supE); tento kmen byl uložen ve veřejné sbírce kultur American Type Culture Collection (ATCC č. 33 625), kde je k dispozici bez omezení, pokud jde o jeho dostupnost. Je však možno využít ještě další mikrobiální kmeny, například některé známé kmeny *E. coli*, jako *E. coli* B, *E. coli* z 1776 (ARCC č. 31537, kmen uložen 3. července 1979, dostupný bez omezení), dále *E. coli* AR58, který je odvozený od kmene N99 (A-ICC č. 33956) s cIII⁻, cI 857, bio⁻ funkce delta H-zbavený lambda (dodává PL-Pharmacia), mikroorganismus byl popsán v publikaci J.E. Mott a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 88-92, G. Devare a další, Cell 36, (1984), 43-49, dále je možno užít kmen *E. coli* JM101 (ATCC č. 33876), popsáný v publikaci Messing a další, Nucleic Acids Res. 9 (1981), 309-321 nebo *E. coli* JA221 (lpp⁻, hdsM⁺, trpE5, leuB6, lacY, recA-I/F⁺, lacI⁻, lac⁺, pro⁻), tento kmen byl popsán v publikaci J. Ghayeb a další, EMBO J. 3 (1984), 2437-2442 nebo ještě další mikrobiální kmeny, jichž byla řada uložena do sbírek a jsou dostupné v různých veřejných sbírkách mikroorganismů, jako například sbírka American Type Culture Collection (ATCC), která vydává katalogy mikroorganismů, které v ní jsou uloženy.

Z dalších mikroorganismů by bylo možno uvést například některé Bacilli, například *Bacillus subtilis* a další *Enterobacteriaceae*, z nichž je možno uvést například *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescens*, u nichž je možno dosáhnout replikace a exprese řetězců heterologních genů.

5

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

První složkou je fragment, který dovoluje transformaci jak *E. coli*, tak kvasinek a který proto musí obsahovat gen pro selekci, původem z každého z těchto organismů. Může to být gen pro odolnost proti ampicillinu z *E. coli* („AmpA“) a gen leu2 z kvasinek. Pak vyžaduje uvedená konstrukce ještě počátek replikace, původem z každého z uvedených organismů, který je možno zachovat jako plazmidovou DNA v obou uvedených organismech. Může jít o počátek z *E. coli* z plazmidu pBR322 a o počátek ars1 z chromozomu III kvasinek, nebo o počátek pro replikaci cirkulárního typu DNA 2 μ.

45

50

Druhou složkou plazmidu je sled, uložený v poloze 5' kvasinkového genu, u něhož dochází k silné expresi za uskutečnění transkripce genu se strukturou, uloženou za ním. Sledem,

uloženým v poloze 5', může být sled z genů TDH3 nebo ARG3 z kvasinek. Fragment se sestojí tak, že dojde k vynechání řetězců ze struktury genů TDH3 nebo ARG3, přičemž tyto řetězce se nahradí řetězci, které obsahují alternativní místa pro působení restrikčních enzymů, například pro restrikční enzymy NcoI nebo BamHI, takže je možno snadno zapojit tento řetězec do polohy 5' ve struktuře svrchu uvedeného genu.

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

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

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

Příklady provedení vynálezu

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

Byly užity následující jednopísmenové zkratky pro označení aminokyselinových zbytků:

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

Na obr. 2 je znázorněno schéma po syntézu oligonukleotidového řetězce, který byl užit pro konstrukci fragmentu DNA, který je kódem pro 6 aminokyselin propeptidu a pro prvních 14 aminokyselin úplného polypeptidu apo A-I spolu s iniciačním kodonem ATG. Jsou označeny oligonukleotidy, užité pro syntézu fragmentu NcoI-BalI s 65/61 páry bází (pb).

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

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

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

Na obr. 6A, 6B a 6C je znázorněna konstrukce plazmidu pNIV612, který obsahuje řídicí oblasti lac a lpp, dále kódový sled pro signální peptid ompA a nukleotidový sled pro proapo A-I.

Na obr. 7 je znázorněna konstrukce plazmidu pNIV1613, který obsahuje řídicí oblast polyhderinového genu a nukleotidový sled, který je kódem pro proapo A-I.

Příprava RNA

5

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

10

Syntéza komplementární DNA (cDNA) in vitro

Reverzní transkripce se při použití 0,1 až 5 µg polyA⁺RNA zahájí při použití přibližně 1 µg oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Boehringer). Získaná cDNA s jedním řetězcem se pak transformuje na cDNA s dvojitým řetězcem (cdbDNA) působením enzymu reverzní transkriptázy. Vzorky této látky v množství přibližně 1 µg se zpracovávají působením S1 nukleázy k získání vazných zakončení. Tento postup je v oboru dobře znám a byl podrobně popsán v publikaci T. Maniatis a další, tak jak byla svrchu uvedena. Pak se na tato volná zakončení naváže oligo(dC) způsobem, popsáným v publikaci Villa-Komaroff a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978), 3727-3731. Obvykle se působí na 10 ng cdbDNA enzymem deoxynukleotidyltransferázou (terminální). Na 3'-zakončení molekuly cdbDNA se naváže obvykle zbytek o délce 15 bází.

20

Klonování cdbDNA s vaznými zakončeními v plazmidu pBR322

25

DNA plazmidu pBR322 se linearizuje působením enzymu PstI a zakončení se vyplní oligo(dg) způsobem podle publikace Lawn R.M. a další, Nucleic Acids Res. 9 (1981), 6103-6114. Pak se cdbDNA s vaznými zakončeními oligo(dC) smísí v ekvimolekulárním poměru s DNA z plazmidu pBR322 s vaznými zakončeními oligo(dG). Obvykle se k recirkularizaci plazmidu hybridizuje 50 µg směsí. Podmínky této reakce jsou v oboru dobře známy a byly podrobně popsány v publikaci R.M. Lawna, tak jak bylo svrchu uvedeno. Hybridizační směs se pak užije k transformaci příslušných buněk kmene MM294 E. coli, například způsobem, popsáným ve svrchu uvedené publikaci R.M. Lawna a dalších. Selekcí pěstováním na prostředí s obsahem tetracyklinu je možno získat několik stovek transformantů, odolnost proti tomuto antibiotiku je vlastní plazmidu pBR322. Transformanty byly rovněž zkoušeny na svou citlivost proti ampicilinu. Ty, které byly citlivé, obsahující chimérní plazmid, takže včlenění cizorodé DNA do vektoru inaktivuje gen pro odolnost proti ampicilinu.

30

35

Třídění získané sestavy cDNA

40

Transformanty E. coli byly tříděny pro použití syntetických oligonukleotidů a označeny na svém 5'-zakončeními pomocí ³²P, zakončení odpovídá fragmentu genu pro apo A-I. Sled nukleotidů pro apo A-I lidského původu je znám například ze svrchu uvedených publikací Cheunga a Chana a také J.J. Seilhamera a dalších a je tedy v důsledku toho možné jej chemicky syntetizovat způsobem, popsáným v publikaci N. Sinha a další, Nucleic Acids Res. 123 (1984), 4539-4557, ve formě nukleotidové sondy, která obsahuje 22 bází, odpovídajících 5'-zakončení uvedeného genu. Vybraný řetězec má následující sled: 5'-GCTGCGGTGCTGACCTTGCCG-3'. Před použitím k hybridizaci byl syntetický oligonukleotid fosforylován na svém 5'-zakončení působením T4-polynukleotidkinázy (P-L Biochemicals) a (gamma³²P)ATP. Podmínky pro značení a hybridizaci jsou v oboru známy a byly podrobně popsány ve svrchu uvedené publikaci T. Maniatis a dalších a v publikaci A. Bollen a další, DNA 2 (1983), 255-264.

50

Konstrukce plazmidů pro expresi

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

Dále bude popsána syntéza fragmentů pro vazbu promotoru vektor pro expresi na 5'-zakončení genu.

Syntéza fragmentu NcoI-Ball

Na obr. 2 jsou podrobně popsány principy, které jsou podkladem pro oligonukleotidy s obsahem 35, 30, 18 a 43 bází, kterých se užívá při syntéze fragmentu NcoI-Ball s 65/61 pb. Syntetické fragmenty s 30 a 18 bázemi se na svých 5'-zakončeních fosforylují působením enzymu T4-poly-nukleotidkinázy (P-L Biochemicals). Pak se 1 µg každého oligonukleotidu včetně oligonukleotidů a 35 a 43 bázemi, které nejsou fosforylovány, hybridizuje 3 minuty při teplotě 95 °C ve 300 mM octanu sodném o pH 7,0, načež se směs nechá pomalu zchladnout na teplotu 4 °C. Pak se hybridizační směs užije jako taková v průběhu klonování pro konstrukci plazmidů pro expresi.

Zjištění sledu DNA

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

Analýza bílkovin

Usazeniny buněk s hustotou 1 jednotky při 630 nm (1 OD₆₃₀ se získají v různých stupních v průběhu fermentace kmenů, které obsahují plazmidy pro expresi proapo A-I lidského původu, pULB9291, pULB9292, pULB9296 a pULB9299 (užité k transformaci kmenů AR58 a JM101 E. coli a kmene 10S44c kvasinek). Každý vzorek se znovu uvede do suspenze v pufru 50 mM tris-HCl o pH 6,8 s obsahem 2 % dodecylsírany sodného (DSS), 6 M močoviny, 10 % glycerolu a 5 % 2-merkaptioethanolu, směs se zahřeje na 3 minuty na teplotu varu, načež se vzorky podrobí elektroforéze na polyakrylamidovém gelu podle publikace U.K. Laemmli, Nature 227, (1970), 680-685. K detekci bílkovin se užije coomasiová modř a syntetizovaný proapo A-I lidského původu se identifikuje po elektroforetickém přenosu imunologicky (A. Bollen a další, svrchu).

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

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

Několik stovek transformantů, získaných klonováním cdbDNA, odpovídající polyA⁺RNA z lidských jater v místě po štěpení enzymem PstI plazmidu pBR322 se třídí pomocí syntetického oligopeptidu jako sondy s 2 nukleotidy pro apo A-I, tak jak byla svrchu popsána. U jednoho z klonů bylo možné pozorovat v průběhu sledování intenzivní hybridizační signál. Tento klon, který byl označen pULB1609, byl izolován a včleněná DNA, obsažená v tomto plazmidu, byla charakterizována analýzou svého sledu. Délka tohoto včleněného sledu je 878 párů bází (pb). Tato DNA je kódem pro úplný polypeptid preproapo A-I lidského původu. Jak je znázorněno na obr. 1, klonovaný fragment cDNA obsahuje nekódové oblasti na 3'- a 5'-zakončení o 19 bp a 55 bp, dále sled o 54 bp, který je kódem pro prekurzor (aminokyseliny -24 až -7, sled pro propeptid o 18 pb (aminokyseliny -6 až -1) a sled o 732 bp, který je kódem pro úplný apo A-I

(aminokyseliny 1 až 243) spolu s terminačním kodonem pro ukončení translace. Řetězec bílkoviny, odvozené od tohoto sledu DNA, přesně odpovídá sledu aminokyselin, které jsou obsaženy v preproapo A-I v nezávisle izolovaných klonech cDNA (W.C. Barker a další, Comp. Biochem.-Physiol. 57B, (1977), 309-315, Japonská patentová přihláška č. 96998/86, P. Cheung a L. Chan, svrchu a J.J. Seilhamer a další, svrchu).

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

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

- Pomocný řetězec se připraví syntetickým způsobem (N.D. Sinha a další, svrchu). Připraví se čtyři syntetické oligopeptidy; po hybridizaci jsou kódem pro methionin, odpovídající iniciačnímu kodonu ATG pro počátek translace, pro 6 aminokyselin, odpovídajících propeptidu a pro 14 prvních aminokyselin úplného apo A-I lidského původu, jak je znázorněno na obr. 2. Pomocný řetězec byl syntetizován proto, aby byla na nejnižší míru snížena tvorba sekundárních struktur na 5'-zakočení genu. K tomuto účelu byly vybrány kodony, které jsou kódem pro aminokyseliny -6, -1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 a 14 tak, že neodpovídají přírodním kodonům pro tyto aminokyseliny, které je možno nalézt v cDNA klonu pULB1609.

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

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

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

Před uskutečněním vazby se fragment Ball-PstI o 744 pb zpracovává působením T4 DNA-polymerázy, že se zakončení změní na 3'-vazná zakončení. Tento postup je v oboru znám a byl popsán v publikaci T. Maniatis a další, uvedené svrchu vrchu.

- Po amplifikaci v příslušných hostitelských buňkách kmene AR58 E. coli byly rekonstruované plazmidy charakterizovány analýzou restrikčních míst a stanovením sledu DNA syntetických fragmentů a míst spojení. Jeden z rekombinantních plazmidů, pULB9291, splňoval všechna kritéria, protože obsahoval všechny fragmenty ve správném pořadí a směru, tento plazmid byl použit pro studie exprese.

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

Při této konstrukci se sled DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I, uloží před sled DNA, který je kódem pro beta-galaktosidázu ve správném pořadí a s tímto sledem se spojí. Gen pro beta-galaktosidázu se nachází v plazmidu pro expresi v *E. coli* pUR288, který je volně dostupný, byl popsán v publikaci U. Ruther a B. Muller-Hill, EMBO J., 2 (1983), 1791-1794 a nese promotor lac v účinné formě a mimoto obsahuje příslušná restrikční místa pro sled beta-galaktosidázy. Příslušný rekombinantní plazmid se zkonstruuje tak, jak je znázorněno na obr. 4. Především se DNA plazmidu pUR288 rozštěpí působením enzymu BamHI, pak se zpracovává působením T4-DNA-polymerázy, načež se znovu rozštěpí enzymem SalI. Pak se postupně izoluje fragment o velikosti 805 pb z plazmidu pULB9291 štěpením působením restrikčního enzymu KpnI, působením T4-DNA-polymerázy a nakonec štěpením restrikčním enzymem SalI. Oba fragmenty se naváží v molárním poměru působením T4-DNA-ligázy a získaný plazmid se užije k transformaci hostitelských buněk kmene JM101 *E. coli*, což je volně dostupný kmen ATCC č. 33 876. Získané transformanty se ověří analýzou působením restrikčních enzymů k průkazu správné orientace sledu pro proapo A-I lidského původu vzhledem ke genu pro beta-galaktosidázu a na přítomnost místa pro působení restrikčního enzymu BamHI, které je rekonstruováno ve spojení obou uvedených sledů. To znamená, že sled, který je kódem pro proapo A-I lidského původu, je zařazen před sled pro beta-galaktosidázu ve správné fázi. Jeden z transformantů, obsahujících plazmid pULB9296, splňoval všechna kritéria a byl pak použit při studiích na expresi.

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

Při této konstrukci se sled cDNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu, klonuje mezi signálem promotoru a terminačního kodonu v plazmidu pro expresi u kvasinek. K těmto pokusům byl vybrán vektor pro expresi u kvasinek pRIT10774. Konstrukce plazmidu pro expresi pRIT10774 je popsána v evropské patentové přihlášce č. 151 102. Tento vektor byl zkonstruován na jedné straně z plazmidu pRIT 10749, uloženého ve sbírce ATCC pod číslem 39133 podle Budapešťské úmluvy, a na druhé straně z vektoru YEpl3 pro *E. coli* - *Saccharomyces cerevisiae*, který byl popsán v publikaci J.R. Broach a další, Gene, 8 (1979), 121-133, a který je dostupný ve sbírce ATCC pod číslem 36 115. Vektor pRIT 10774 je schopen replikace v *E. coli* i v kvasinkách a nese promotor a terminátor transkripce ornirhinkarbamoyltransferázy (ARG3), který je oddělený jediným místem pro působení restrikčního enzymu BamHI, vhodným pro včlenění cizorodé DNA spolu s příslušným iniciačním kodonem ATG pro počátek translace. Mimoto obsahuje vektor sledy 2/ μ kvasinek, metabolické značení pro selekci v kvasinkách a značení AmpA pro selekci po transformaci *E. coli* tímto vektorem. Není to však jediný vektor, jehož by bylo možno užít pro dosažení exprese proapo A-I lidského původu v kvasinkách. Je zásadně možno užít jakýkoliv jiný vektor pro kvasinky, který obsahuje řídicí signály a jeho použití pak povede k získání kvalitativně obdobných výsledků. Konstrukce, která je znázorněna na obr. 5, se provádí následujícím způsobem: DNA z plazmidu pRIT10744 se linearizuje působením restrikčního enzymu BamHI a pak se na ni působí R4 polymerázou DNA.

Dále byl izolován z plazmidu pULB9291 působením restrikčních endonukleáz Asp 718 a SalI fragment DNA o velikosti 810 pb a tento fragment byl pak podroben působení T4 polymerázy DNA. Tento fragment je kódem pro proapo A-I lidského původu a současně obsahuje i iniciační kodon ATG pro počátek translace. Oba fragmenty, získané svrchu uvedeným způsobem, se vzájemně naváží v ekvimolárních poměrech působením R4 DNA-ligázy a získaná směs se použije k transformaci příslušných buněk *E. coli* kmene MM 294. Transformace se sledují pomocí restrikční analýzy, aby bylo možno ověřit správnou orientaci sledu DNA pro proapo lidského původu vzhledem ke sledu promotoru ARG3. Jeden z transformantů obsahoval

rekombinantní plazmid pULB9299, který splňoval všechny požadavky. Tento plazmid pULB9299 byl schopen amplifikace v *E. coli* a pak byl použit k transformaci sferoplastů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kmen 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112) podle svrchu uvedené publikace T. Cabezona a dalších.

5

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

10

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

15

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

20

25

30

35

Tento vektor pro sekreci obsahuje velmi účinný promotor lpp (lipoprotein), fragment promotoru-operátoru lac, sled lacI represoru lac a příslušná místa pro působení restrikčních endonukleáz, uložená bezprostředně za sledem, který je kódem pro signální peptid genu ompA. Příslušný rekombinantní plazmid je možno zkonstruovat způsobem, který je znázorněn na obr. 6A, 6B a 6C. V první řadě se vektor pro sekreci pIN-III-ompA-2 linearizuje působením restrikčního enzymu EcoRI a pak se podrobí působení T4-DNA-polymerázy. Pak se z plazmidu pULB9291 vyjme fragment o velikosti 805 pb tak, že se postupně působí restrikčními endonukleázami KpnI a SalI, načež se na získanou směs působí T4-DNA-polymerázou. Uvedený fragment je kódem pro proapo A-I lidského původu a obsahuje iniciační kodon ATG pro počátek translace. Oba takto získané fragmenty se navzájem naváží v ekvimolárním poměru působením T4-DNA-ligázy a takto získaná směs se pak použije k transformaci příslušných buněk kmene JA221 *E. coli*, pěstovaných na živném prostředí M9, popsáném v publikaci J.H. Miller, „Experiments in Molecular Genetics“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1972, str. 431. Prostředí obsahuje 20 mg/l Tryptofanu, 20 mg/l leucinu, 2 g/l laktózy a 50 mg/l ampicilinu. Získané transformanty se podrobí selekci podle své odolnosti proti ampicilinu a pak se třídí při použití oligopeptidu s obsahem 18 bází. Jde o syntetický oligopeptid, který byl použit také při syntéze pomocného řetězce, jak je znázorněno na obr. 2.

40

Transformanty, které byly získány selekcí, se pak podrobí kontrole analýzou svého sledu působením restrikčních endonukleáz k ověření správné orientace sledu DNA pro proapo A-I lidského původu vzhledem ke sledu DNA, který je kódem pro signální peptid, obsažený ve vektoru pro sekreci (v místě spojení obou sledů je rekonstituováno místo působení restrikčního enzymu EcoRI). Jeden z transformantů nese rekombinantní plazmid, který splňuje všechny požadavky. Řízenou mutagenezí se pak odstraní přebytečný sled, který pochází z konstrukce pomocného řetězce a který je v následujícím nukleotidovém sledu potvrzen:

45

5'- GTA GCC GAG GCC GCT GAA TTC ATG AGA CAT TTC TGG 3'
Val Ala Gln Ala Ala Glu Phe Met Arg His Phe Trp
aa₆

50

K tomuto účelu se konstruuje následující oligopeptid s obsahem 24 bází

signální peptid--->I<-----proapo A-I

5' GTA GCG GAG GCC AGA CAT TTC TGG 3'
Val Ala Gln Ala Arg His Phe Trp

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

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

10 V první řadě se ta oblast DNA, která má být podrobena mutagenesi klonuje ve vektoru M13. K tomuto účelu se včlení fragment DNA mezi místy působení restričních enzymů XbA-I-BallI rekombinantního plazmidu pIN-III-ompA-2, který obsahuje gen pro proapo A-I, do vektoru M13mp19, rozštěpeného působením restričních endonukleáz XbA-I a HindII. Vektor M12mp19 se běžně dodává a je možno jej získat na objednávku (Amersham, Buckinghamshire, Velká Británie). Pak se oligopeptid s obsahem 24 bází, získaný mutagenézí, hybridizuje s matricí s jedním řetězcem a prodlouží se při použití Klenowova fragmentu DNA-polymerázy za
15 přítomnosti T4-DNA-ligázy za vzniku heteroduplexního mutantu.

20 Selektivní odstranění nemutovaného sledu je možno provést včleněním thionukleotidu do mutovaného sledu v průběhu syntézy in vitro s následným štěpením řetězce, který neobsahuje fosfotionát, působením restriční endonukleázy NCII. Tento řetězec obsahuje místo pro štěpení exonukleázou III, která nemutovaný řetězec rozštěpí. Mutovaný řetězec se tedy užívá jako matrice pro rekonstrukci cirkulární molekuly s dvěma řetězci, čímž dochází ke vzniku homoduplexní mutované molekuly. Průběh mutagenese je možno ověřit analýzou sledu mezi signálním peptidem a počátkem genu, který je kódem pro proapo A-I. Rekombinantní plazmid pNIV1612 se rekonstruuje tak, že se naváže fragment vektoru pIN-III-ompA-2 po štěpení
25 restričními enzymy XbA-I a HindIII s fragmentem po štěpení enzymy XbA-I-BallI, který byl zbaven 12 přebytečných bází, a s fragmentem genu pro proapo A-I po štěpení enzymy BallI a HindIII.

30 Všechny tři fragmenty se naváží působením T4-DNA-ligázy a získaná směs se užije k transformaci příslušných buněk *E. coli* kmene JA221, jak již bylo uvedeno svrchu. Získané transformanty se podrobí selekci na svou rezistenci proti ampicilinu a pak se třídí při použití oligopeptidu s obsahem 18 bází, jak již bylo svrchu uvedeno. Jeden ze získaných transformantů obsahuje plazmid pNIV1612. Jde o rekombinantní plazmid, v jehož konstrukci je uložen sled, který je kódem pro signální peptid ompA, před úplným sledem pro proapo A-I bez iniciačního
35 kodonu ATG, jak je znázorněno na obr. 6A, 6B a 6C. Takto získané transformanty *E. coli* se pak sledují na svou schopnost exprese lidského proapo A-I.

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

40

Plazmid pNIV1613, který obsahuje sled DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I, je možno zkonstruovat tak, že se uloží řetězec z klonu pULB9291 před polyhedrinový gen bakuloviru, jak je znázorněno na obr. 7. Při těchto pokusech bylo užito vektoru pro přenos pAcRP6 bakuloviru, který byl popsán v publikaci Y. Matsuura a další, *J. Gen Virol.* 67 (1986), 1515-1529. Tento
45 plazmid je možno získat z Department of Microbiology and Immunology univerzity v Ottawě. Plazmid obsahuje promotor polyhedrinového genu až do nukleotidu -7 ve svém signálním sledu na 5'-zakončení. Chybí mu kodon ATG polyhedrinového genu a prvních 170 nukleotidů sledu, který je polyhedrinovým genem. Příslušné místo pro štěpení restričním enzymem BamHI je uloženo před nukleotidem -7. Konstrukce, která je znázorněna na obr. 7, se realizuje
50 následujícím způsobem: DNA plazmidu pAcRP6 se linearizuje působením enzymu BamHI. Pak se vyjme fragment DNA o velikosti 810 pb z plazmidu pULB9291 působením restričních enzymů Asp718 a Sall. Tento fragment je kódem pro proapo A-I lidského původu a obsahuje iniciační kodon ATG pro počátek translace. Oba fragmenty se v ekvimolárním poměru smísí a podrobí působení R4-DNA-polymerázy, naváží se působením T4-DNA-ligázy a pak se užijí pro

transformaci příslušných buněk *E. coli* kmene AR58. Transformanty, které se tímto způsobem získají, se podrobí selekci na svou rezistenci proti ampicilinu a pak se třídí při použití syntetického oligopeptidu s obsahem 35 bází, značeného ^{32}P , jak je znázorněno na obr. 2, který odpovídá části sledu DNA, který je kódem pro proapo A-I lidského původu, načež se provede kontrola analýzou sledu DNA při použití restričních enzymů k ověření správné orientace sledu DNA, který je kódem pro lidský proapo A-I vzhledem k promotoru polyhedrinového genu. Jeden z takto získaných transformantů obsahuje rekombinantní plazmid pNIV1613, který odpovídá těmto požadavkům. Tento plazmid se pak užije k pokusům na expresi.

10 7. Produkce proapo A-I lidského původu transformovanými mikroorganismy

20 ml kultury kmene AR58 nebo JM101 *E. coli*, transformované plazmidem pULB9291 nebo plazmidem pULB9296, se pěstuje na bohatém živném prostředí, doplněném 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu (živný bujon LB, podrobnosti jsou uvedeny ve svrhu zmíněné publikaci T. Maniatis a dalších). Buňky se pěstují až do optické hustoty 0,6 při 630 nm. V případě plazmidu pULB9291 se indukce promotorem P_L lambda uskuteční tím, že se kultura nejprve pěstuje při teplotě v rozmezí 30 až 42 °C tak, aby došlo k inaktivaci represoru promotoru P_L lambda, tak jak je uvedeno v publikaci M. Rosenberg a další, *Methods Enzymol.* 101, (1983), 123-138. Indukce se provádí celkem 20 minut.

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

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

Pak se odeberou vzorky takto získaného materiálu o objemu 1 ml a tyto vzorky se odstředí 5 minut při 15 000 g. Pak se získaná usazenina rozruší působením vroucího dodecylsiranu sodného (DSS). Pak se usazenina znovu uvede do suspenze v 50 μg pufru, obsahujícího DSS (50 mM Tris-HCl o pH 6,8, 2 % DSS, 6 M močoviny, 5 % 2-merkapt ethanolu a 10 % glycerolu) a pak se směs zahřívá na teplotu varu 100 °C celkem 3 minuty. Pak se extrakty odstředí při 15 000 g celkem 10 minut. Tím jsou vzorky připraveny k provádění analýzy elektroforézou na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 15 % nebo 7,5 % za přítomnosti DSS za denaturačních podmínek (svrhu uvedená publikace Laemmliho a dalších).

Po ukončení elektroforézy se polyakrylamidové gely promyjí 40 ml destilované vody a pak 40 ml pufru s fosforečnanem sodným o koncentraci 50 mM a o pH 7,5. Pak se bílkoviny elektrickým způsobem přenesou z gelů na listy nitrocelulózy v průběhu dvou hodin při použití napětí 60 V a proudu 1,5 A v tomtéž fosfátovém pufru (svrhu uvedená publikace T. Cabezona a dalších). Listy nitrocelulózy se pak nasatí 1% albuminem v 50 mM pufru s fosforečnanem sodným o pH 7,5, načež se inkubují při teplotě místnosti přes noc za přítomnosti králíčího séra s obsahem protilátek proti apo A-I lidského původu v ředění 1/500 (a za přítomnosti monoklonálních protilátek proti beta-galaktosidáze myšího původu v případě plazmidu pULB9296), a to v tomtéž pufru, který byl zbaven albuminu.

Listy nitrocelulózy se pak pětikrát promyjí 40 ml téhož fosfátového pufru a pak se inkubují ve 40 ml fosfátového pufru, který obsahuje 10 $\mu\text{g/ml}$ kozí protilátky proti protilátce králíka (nebo proti protilátce myši), a označí se peroxidázou. Po čtyřech hodinách inkubace při teplotě místnosti se listy nitrocelulózy znovu pětikrát promyjí 40 ml fosfátového pufru a pak se vyvíjí

přidáním 50 ml chromogenního substrátu (10 mg diaminobenzidinu, 100 µl peroxidu močoviny o koncentraci 10 % a 100 mM tris-HCl o pH 7,6).

V případě plazmidů pULB9291 a pULB9299 je možno nalézt jediný produkt, který reaguje s protilátkami proti apo A-I lidského původu. Tento produkt má molekulovou hmotnost, která odpovídá molekulové hmotnosti vzorku přírodního apo-A-I lidského původu. V případě plazmidu pULB9296 je možno prokázat složený polypeptid, jehož velikost odpovídá předpokládané velikosti polypeptidů beta-galaktosidázy a proapo A-I lidského původu (144 kjednotek), tento složený polypeptid reaguje se sérem s obsahem protilátek proti apo A-I lidského původu a se sérem s obsahem protilátek proti beta-galaktosidáze. Rozměry uvedených látek byly stanoveny předběžné pomocí kalibračních křivek, založených na migraci různých vzorků s odlišnými molekulovými hmotnostmi při použití týchž gelů, které byly užity pro zpracování molekulárních extraktů.

V dalším pokusu bylo pěstováno 20 ml kultury kmene E. coli JA221, transformované plazmidem pNIV1612, v bohatém prostředí, doplněném 50 µg/ml ampicilinu (živný bujon LB, svrchu uvedená publikace T. Maniatis a dalších) až do dosažení optické hustoty 0,6 při 630 nm. Indukce promotoru lac byla prováděna tak, že ke kultuře, inkubované při teplotě 37 °C, byl přidán chemický induktor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalaktosid) až do konečné koncentrace 2 mM. Indukce byla prováděna 60 minut. Pak byly odebrány vzorky těchto kultur o objemu 1 ml a tyto vzorky byly odstředovány při 15 000 g celkem 5 minut. Získaná usazenina byla podrobena osmotickému šoku, aby bylo možno oddělit periplazmatickou frakci, postup byl uveden v publikaci D. Koshland a D. Botstein, Cell 20, (1980), 749-760. Uvolněná frakce se znovu uvede do suspenze ve svrchu uvedeném pufru s obsahem DSS, avšak bez močoviny, směs se uvede na teplotu varu, pak se odstředí a podrobí se elektroforéze na polyakrylamidovém gelu o koncentraci 12,5 % za přítomnosti DSS, načež se po elektroforetickém přenosu provádí detekce imunologickým způsobem. Frakci proapo A-I, syntetizovaného tímto způsobem, je možno prokázat v buňkách, avšak nikoliv v periplasmě. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že nedochází k sekreci proapo A-I. Je také možné, že nebyla zvolena optimální účinnost osmotického šoku. Hlavní frakci proapo A-I je možno volně prokázat v prostředí po provedení osmotického šoku, což znamená, že došlo k sekreci této bílkoviny buňkami.

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

Rekombinantní plazmid pNIV1613 byl užit spolu s kmenem, který je rezervoárem bakuloviru, k společné infekci buněk Spodoptera frugiperda ve tkáňové kultuře. Tříděním rekombinant viru, zbavených polyhedrinu, byly získány rekombinantní plaky. Rekombinantní virus, získaný čištěním z jednoho plaku, se pak užije k infekci hmyzích buněk. Tento postup je v oboru dobře znám a byl podrobně popsán v publikaci M.D. Summers a G.E. Smith, „Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures“, Texas University College Station, (1987). Rekombinantní virus byl zkoumán na svou schopnost produkce proapo A-I imunologicky po elektroforetickém přenosu a elektroforézou na 12,5% polyakrylamidovém gelu za přítomnosti DSS, po rozrušení buněk působením pufru RIPA (0,05 M pufru Tris-HCl o pH 7,2 s obsahem 0,15 M NaCl, 1 % Tritonu X100, 0,1 % DSS, 0,1 % desoxycholátu sodného a 1 mM fenyl-methylsulfonylfluoridu (FPMS)) s následným působením vroucího DSS. Bylo možno prokázat jediný produkt, který reagoval s protilátkami proti apo A-I lidského původu. Tento produkt měl molekulovou hmotnost, která odpovídala molekulové hmotnosti standardního vzorku přírodního lidského apo A-I. Bílkovina, k jejíž expresi došlo, tvořila hlavní složku celkových bílkovin. Koncentrace proapo A-I v 1 litru kultury, měřená jednoduchou radiální imunodifúzí způsobem podle publikace G. Mancini a další, Immunochem. 2, (1965), 235-254, byla přibližně 100 mg.

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

Plazmid pULB9292 byl užít pro cytoplazmatickou produkci proapo A-I lidského původu mikroorganismem E. coli v prostředí, označeném jako minimální, jehož složení bude dále uvedeno. Plazmid pULB9292 je možno zkonstruovat tak, že se vymění fragment po štěpení enzymy EcoRI a NcoI plazmidu pULB9291, který je kódem pro promotor P_L lambda za fragment, získaný z plazmidu pOTS rovněž štěpením pomocí enzymu EcoRI a NcoI podle publikace M. Rosenberg a další. Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138. Fragment plazmidu pOTS, získaný štěpením pomocí enzymů EcoRI a NcoI a popsáný v publikaci G. Devare a další, Cel, 36, (1984), 43-49, obsahuje rovněž promotor P_L fágu lambda, který je účinný a řiditelný. Pak se pěstuje na dále definovaném minimálním prostředí 20 ml kultury kmene AR58 mikroorganismu E. coli, transformovaného plazmidem pULB9292. Minimální prostředí obsahuje na 1 litr následující množství jednotlivých složek: 3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, 1 g NH_4Cl , 1,37 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 29,5 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 236 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 g glukózy, 1 mg vitaminu B₁, 50 mg ampicilinu, živné prostředí LB 1/20 (objemový poměr). Buňky se pěstují ve svrhu uvedeném minimálním živném prostředí tak dlouho, až optická hustota dosáhne hodnoty 0,5 při 630 nm. Indukce promotoru P_L lambda se provádí tak, že se na počátku kultura pěstuje při teplotním rozmezí 30 °C až 42 °C, čímž dojde k inaktivaci represoru promotoru P_L lambda, jak bylo popsáno ve svrhu uvedené publikaci M. Rosenberga a dalších. Indukce se provádí celkem 60 minut. Pak se odeberou vzorky získané kultury s objemem 1 ml a tyto vzorky se nechají projít Frenchovým lisem, nebo se odstředí celkem 5 minut při 15 000 g. Celkový získaný buněčný extrakt nebo získaný buněčný extrakt nebo získaná usazenina se pak zpracovávají působením vroucího DSS, tak jak bylo popsáno v odstavci 7). Po provedení elektroforézy a po elektroforetickém přenosu je možno prokázat jediný produkt, který reaguje s protilátkami proti A-I lidského původu. Tento produkt má molekulovou hmotnost, která je v souladu s molekulovou hmotností standardního vzorku přírodního lidského apo A-I. Podíl proapolipoproteinu A-I, který se po expresi dostal do svrhu definovaného minimálního živného prostředí, je 13,5 % celkových bílkovin, stanovený obsah proapo A-I je přibližně 270 mg na litr kultury.

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

10.1 Izolace a čištění

Surové extrakty takto získaného surového rekombinantního proapo A-I se odstředí celkem 15 minut při 600 g a usazenina se odloží. Supernatant se pak odstředí dvě hodiny při 100 000 g. Získaná usazenina se znovu uvede do suspenze v co nejmenším objemu pufru (TEN100), se složením 20 mM Tris-HCl o pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1,75 $\mu\text{g/ml}$ FPMS a 100 $\mu\text{g/ml}$ methiolátu sodného (sodná sůl kyseliny ethylmerkurithiosalicylové), načež se odděleně upraví objem suspenze a supernatantu na původní objem extraktu přidáním téhož pufru. Pak se bílkovina vysráží z obou suspenzí přidáním zvyšující se koncentrace isopropylalkoholu. Pak se stanoví při použití radiální imunodifuze, popsané ve svrhu uvedené publikaci G. Manciniho a dalších, frakce bílkoviny, vysrážená z každé suspenze, která obsahuje hlavní podíl imunologické reaktivity, odpovídající apo A-I lidského původu při použití běžně dodávaného autentického vzorku lidského apo A-I. Každá takto získaná frakce se s výhodou čistí chromatografií na sloupci pryskyřice Sephacryl S2000, jako eluční činidlo se opět užije svrhu uvedený pufr. Odebírají se frakce s objemem 0,9 ml a pak se v každé z těchto frakcí stanoví pomocí radiální imunodifuze množství celkové bílkoviny, která odpovídá imunologické reaktivitě apo A-I lidského původu. Molekulová hmotnost bílkoviny ve frakcích, získaných vymýváním chromatografického sloupce, se stanoví kalibrací sloupce pomocí sloučenin se známou molekulovou hmotností, jako jsou například aldoláza, sérový albumin skotu, vaječný

albumin, chymotrypsinogen a Cytochrom C, kalibrace se provádí za stejných podmínek. Čistota lidského proapo A-I na 1 mg celkové bílkoviny v hlavních frakcích, které obsahují rekombinantní proapo A-I lidského původu, vyjádřeno v mg bílkoviny se stejnou imunologickou reaktivitou, jakou má běžně dodávaný vzorek autentického lidského apo A-I, byla stanovena jako 95 %.

10.2. Charakterizace

10.2.1. Fyzikální vlastnosti rekombinantního proapo A-I

V případě, že se podrobí rekombinantní A-I, čištěný a izolovaný za supernatantu a z usazeniny po odstředění při 100 000 g neelektrické fokusací způsobem v publikaci N. Catsimpoilas, Anal. Biochem. 26 (1969), 54-62, při postupně se zvyšujícím pH v rozmezí 4 až 6, získá se jednotný pás, jehož izoelektrický bod leží při pH 4,95. Apo A-I z lidské plazmy je o něco kyslejší a jeho izoelektrický bod leží při pH 4,75. Celkový rozdíl mezi hodnotou izoelektrického bodu pro rekombinantní proapo A-I a pro proapo A-I, izolovaný z lidské plazmy, činí pouze 0,2 jednotky pH, což je v dobré shodě s rozdílem, který je znám pro hodnoty izoelektrických bodů pro plazmatický apo A-I a plazmatický proapo A-I, který byl stanoven jako 0,17 jednotky pH podle publikace G.L. Millis a další, Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol. 14, (1984), 244-245.

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

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

Štěpení chemickým způsobem bylo provedeno při použití 3-brom-3-methyl-2-((2-nitrofenyl)-thio)-3H-indolu, tj. BNPS-skatolu způsobem, popsáným v publikaci A. Fontana, Methods Enzymol 25 (1972), 419-423. 5 až 10 µg vzorku čištěné bílkoviny se rozpustí ve 100 µl roztoku fenolu o koncentraci 15 % objemových ve vodném roztoku kyseliny octové o koncentraci 50 % objemových. Pak se přidá 50 µl roztoku s obsahem 4,8 mg BNPS-skatolu na 1 ml ledové kyseliny octové a směs se inkubuje 72 hodin při teplotě 25 °C. Pak se přidá 50 µl 2-merkapt ethanolu a směs se podruhé inkubuje 5 hodin při teplotě 37 °C. Vzorky se odpaří, znovu se rozpustí ve 100 µl vody a roztok se extrahuje třikrát 200 µl ethylacetátu. Organické fáze se odloží, vodné fáze se lyofilizují a analyzují elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s obsahem DSS.

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

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

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

PATENTOVÉ NÁROKY

5

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

15 5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTT-AAGGACTTG-3'

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

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vektor pro expresi obsahuje řídicí sled DNA s obsahem oblasti promotoru P_L fagu lambda.

25

3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vektor pro expresi obsahuje řídicí sled DNA pro proapolipoprotein A-I lidského původu, uložený před sledem DNA pro beta-galaktosidázu a řídicí sled DNA obsahuje oblast lac promotoru.

30 4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vektor pro expresi obsahuje řídicí sled DNA s oblastí promotoru a terminátoru transkripce ARG3 z kvasinek.

5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vektor pro expresi obsahuje řídicí sled DNA s oblastí pro proapolipoprotein A-I lidského původu, prostý kodonu ATG, uložený před sledem DNA pro signální peptid bílkoviny OmpA E. coli, přičemž řídicí sled DNA obsahuje oblasti promotoru lpp a promotoru-operátoru lac.

35

6. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vektor pro expresi obsahuje řídicí sled DNA z oblasti promotoru polyhydrinového genu bakuloviru.

40

7. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že jako vektor pro expresi se volí rekombinantní plazmid ze skupiny pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612, pNIV1613.

45

10 výkresů

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

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

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

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

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

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

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

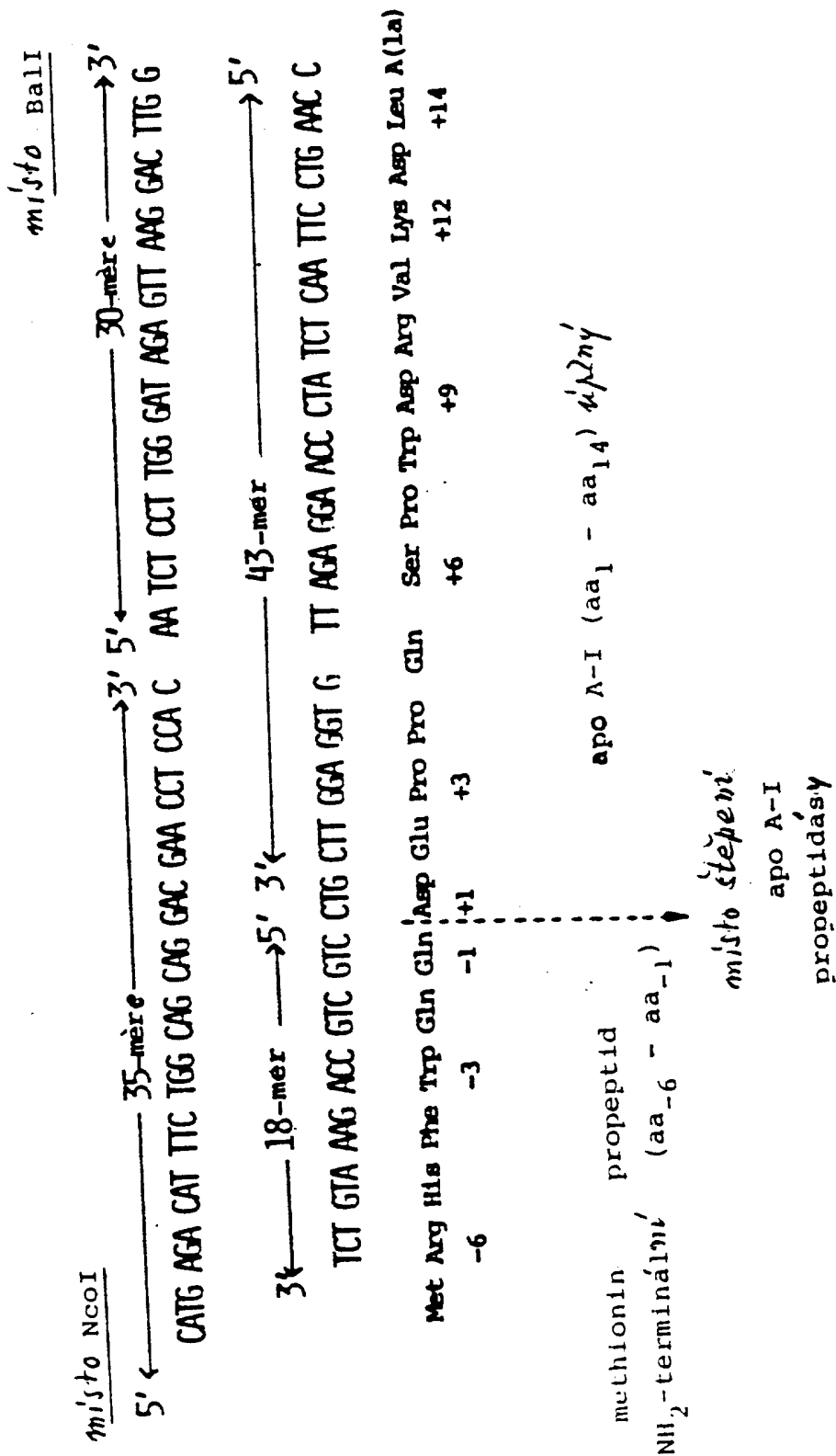
560 570 580 590 600 610 620 630
 CCATGTGGAGGGCTGGCAGGCATCTGGCCCCCTACAGGAGAGCTGGGACAGGCTTGGGGGGGGCTTGGAGGCT
 H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A
 160 170 180

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

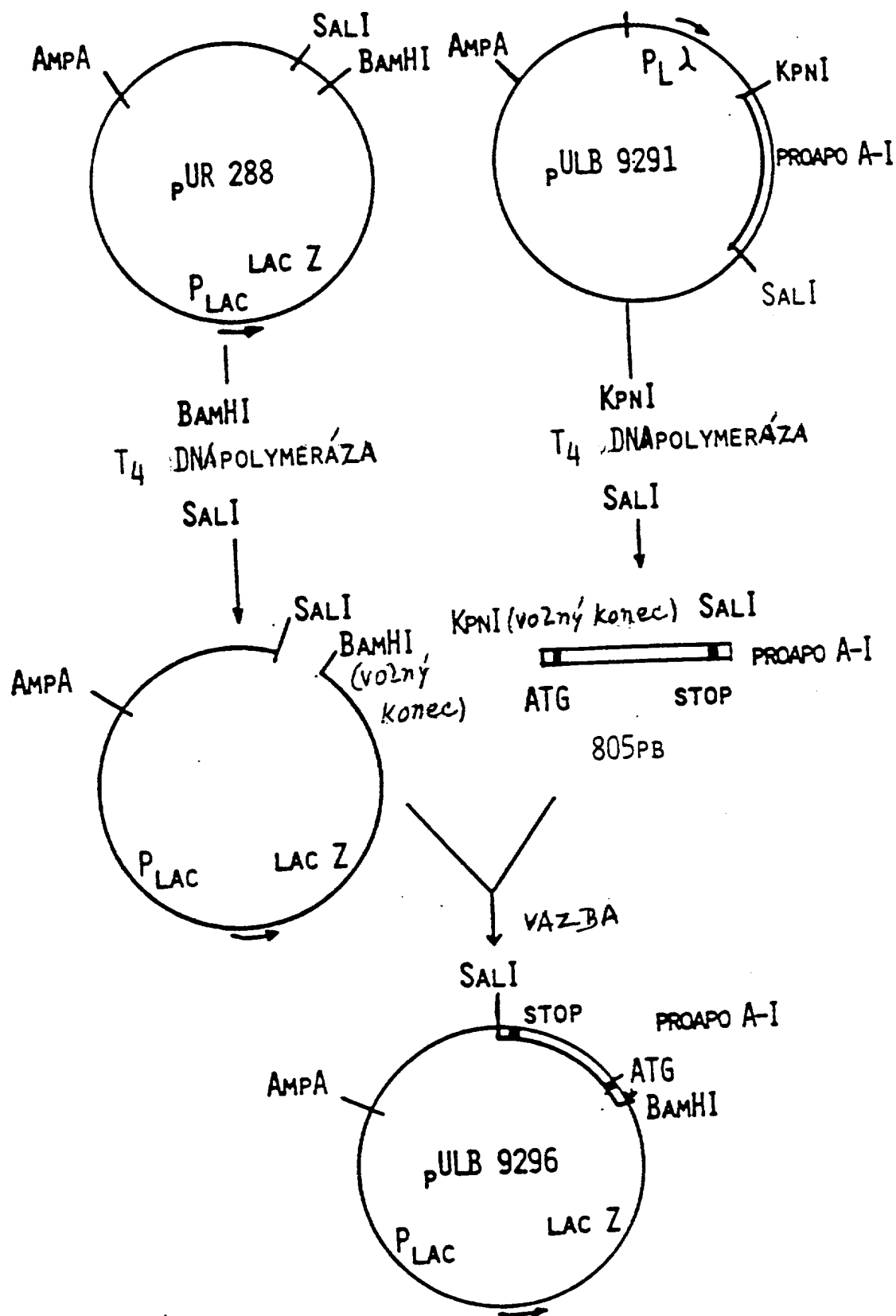
720 730 740 750 760 770 780
 CCAAGCGGGGGCTGAGGAGCTCGGCCAAGGCTGCTGCCGGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGGGCT
 A K P A L E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S A
 210 220 230

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

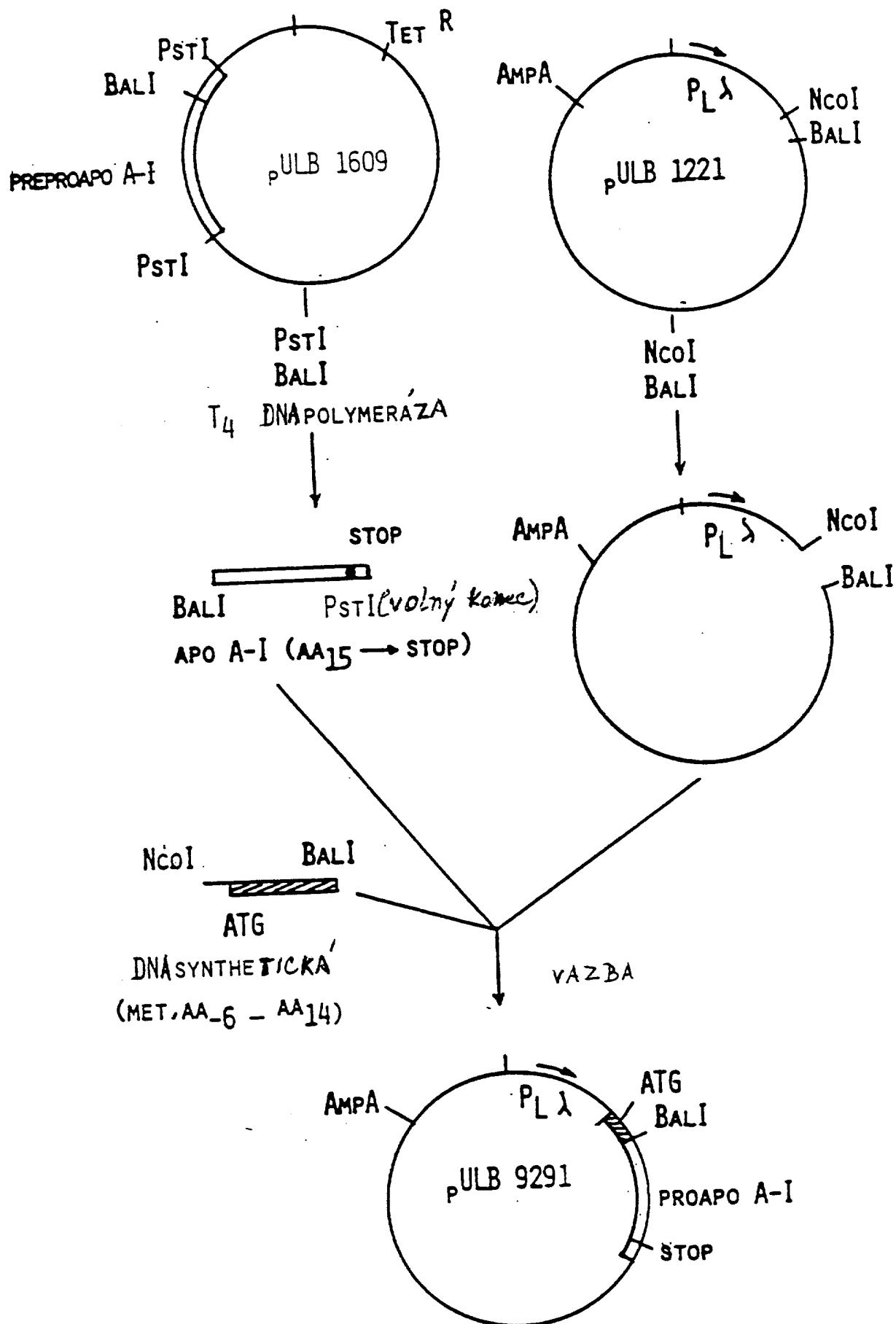
870 878
 TTCCAAAGTGGG



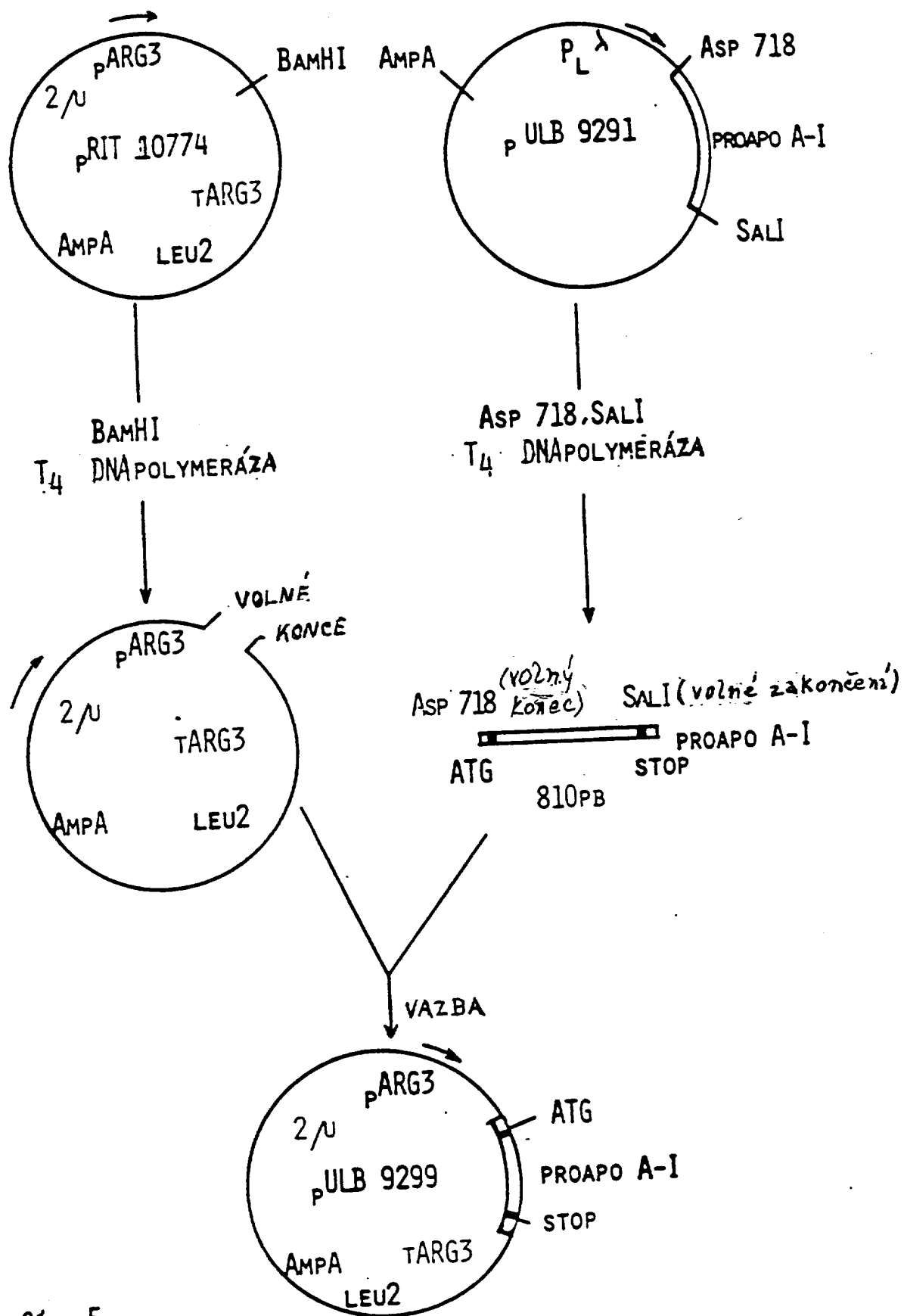
obr. 2



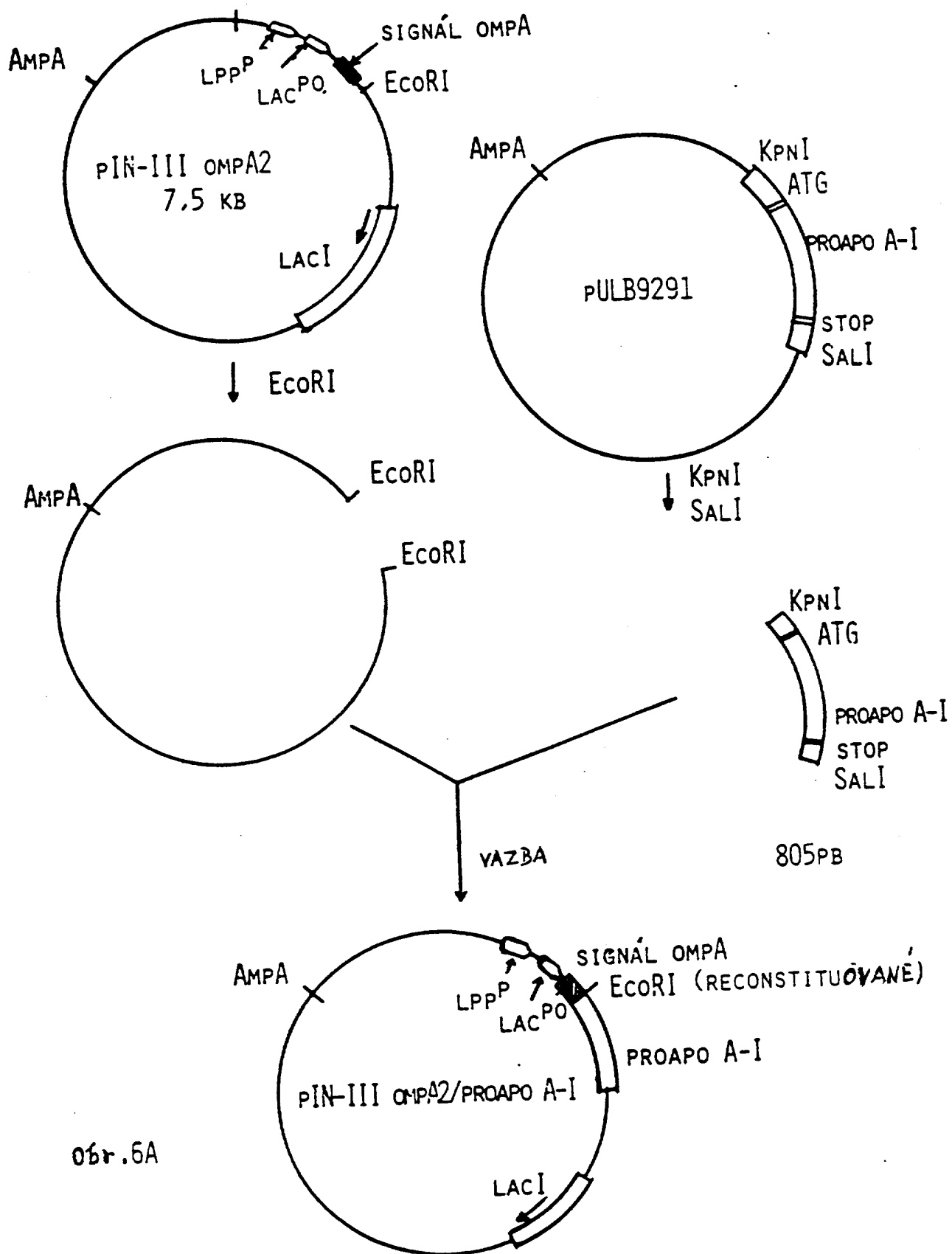
Obr. 4



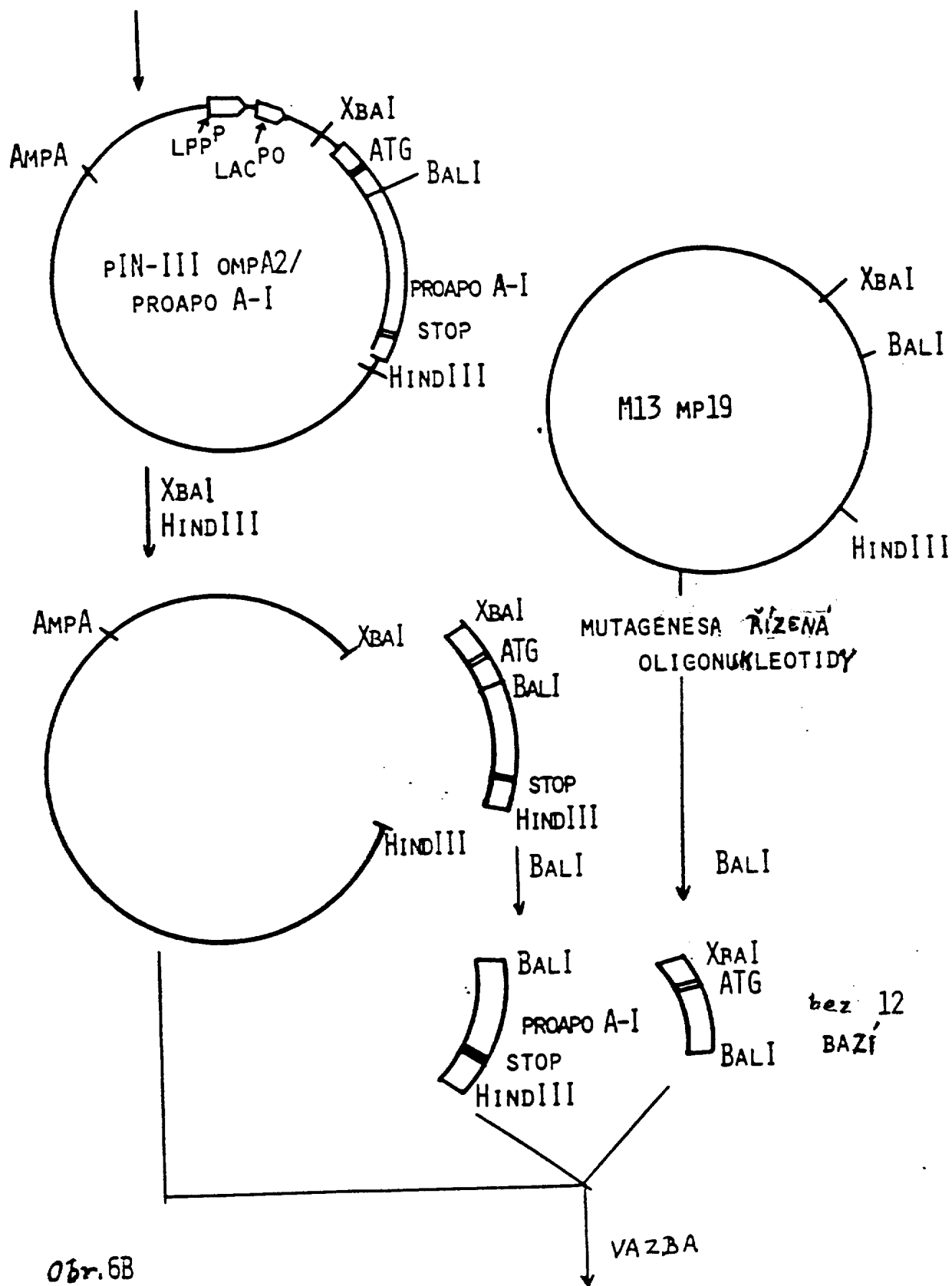
obr. 3



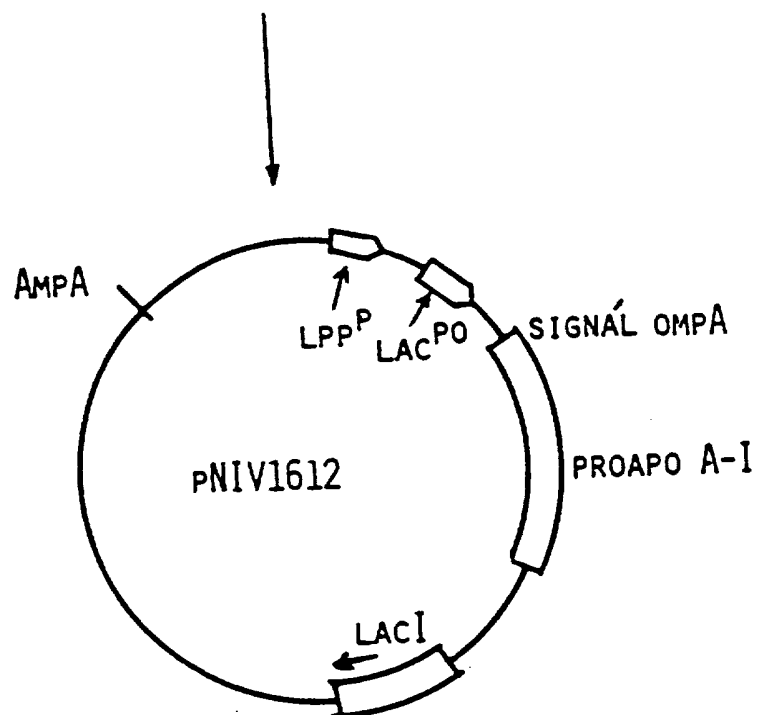
Obr. 5



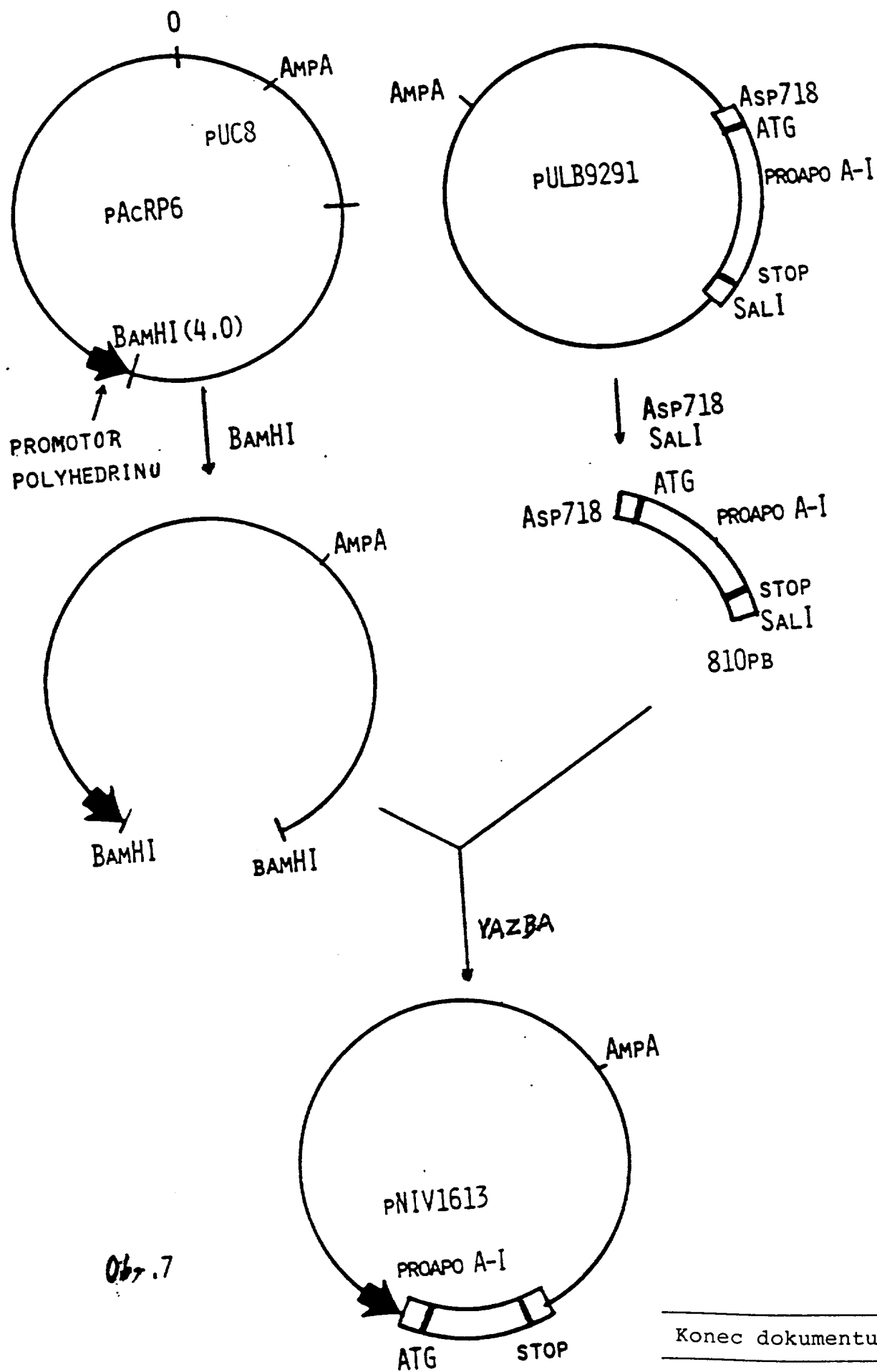
obr. 6A



Obr. 6B



obr. 6C



Obz. 7

Konec dokumentu