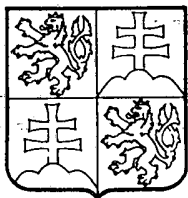


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00189-91.V

(13) A3

(22) 28.01.91

(32) 29.01.90

(31) 90/4002521

(33) DE

(40) 15.09.91

5(51) C 12 N 15/66
C 12 N 15/86
C 12 N 7/01
C 12 N 7/04
C 12 N 5/10
C 07 K 15/04

(71) IMMUNO Aktiengesellschaft, Wien, AT

(72) Bodemer Walter dr., Wien, AT
Scheifflinger Friedrich ing., Wien, AT

(54) Rekombinantní plasmid

(57) Rekombinantní plasmid, který obsahuje alespoň jeden replikon (ori), alespoň jeden selekční znak (sml), alespoň jeden promotor (prl) a DNA sekvence z pox viru ohraničující tento promotor, multi-funkční kazetu DNA sekvencí umístěnou po směru tohoto promotoru (prl). Tato multi-funkční kazeta DNA sekvencí obsahuje sekvence, které jsou komplementární s komerčně dostupnými primery, jejichž cena se osvědčila v praxi. Dále obsahuje překlad iniciačních kodonů a několik míst pro štěpení restrikčními endonukleasami a terminační kodony ve všech třech útvarech následujících za překladovým iniciačním kodonem. Rekombinantní plasmid dle vynálezu se po inserci do genomu pox viru hodí pro expresi cizorodých bílkovin v cytoplasmě hostitelských buněk eukaryotů.

Rekombinantní plasmid

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy rekombinantního plasmidu, který obsahuje alespoň jeden replikon /ori1/, alespoň jeden selekční znak /sm1/, alespoň jeden promotor /pr1/ a DNA sekvence z genomu pox viru ohraničující tento promotor, postupu přípravy rekombinantního pox viru, použití rekombinantního pox viru, buněčné linie, peptidu nebo polypeptidu, složení, vakciny a virové vakciny, diagnostického činidla a použití vakcin.

Dosavadní stav techniky

Díky rozvoji moderních metod genového inženýrství bylo možné identifikovat a izolovat účtyhodné množství genů bílkovin, které mají diagnostický, profylaktický a terapeutický význam, tzn. genů pro koagulační faktory nebo antigenní virové bílkoviny. S tím souvisí i potřeba spolehlivých a výkonných expresivních systémů v prokaryotních a eukaryotních buňkách zajišťujících vyšší produkci žádané bílkoviny buď z infikovaných tkání nebo infikovaných buněčných kultur nebo např. využitím imunogenních vlastností bílkovin "in vivo" pro imunizaci. Eukaryotní virové vektorové systémy mají v této souvislosti obzvláštní význam.

Jedním ze známých eukaryotních vektorových systémů je papova virus SV40. SV40 má poměrně malý genom s 5,3 kb, jehož uspořádání je poměrně dobře známo. Malý genom tohoto viru má na jedné straně výhodu plynoucí z toho, že být manipulován do cílené podoby jestliže je použita vhodná endonukleasa. Avšak na druhé straně je nevýhodné, že klonovací kapacita je značně omezena odpovídajícím malým obalem viru a pevným, částečně se překrývajícím uspořádáním esenciálních genů.

Vývoj eukaryotního vektorového systému, založeného na viru kravských neštovic byl popsán v řadě nejnovějších prací /např. EP-A-0243029/. Virus kravských neštovic patří mezi orthopox viry. Jeho lineární genom tvoří dvouřetězcová DNA, asi 185 kb. Velikost viru kravských neštovic znemožňuje konstrukci rekombinantního genomu rozštěpením původního genomu

restrikční endonukleasou a následující ligací s vhodnou cizorodou DNA. A i když by byl tento proces proveditelný, produkce virů s rekombinovaným genomem by vyžadovala přítomnost pomocného viru, protože virová DNA přenášená "in vitro" sama o sobě není infekční. Transkripce viru kravských neštovic vyžaduje mimo jiné i odpovídající RNA polymerasu, která nemůže být nahrazena eukaryotní RNA polymerasou II a musí být přenesena do hostitelské buňky spolu s virovými částicemi. Z toho plyne, že virus kravských neštovic má speciální promotory rozpoznatelné RNA polymerasou kodovanou virem. To ovšem znamená další potíže při konstrukci rekombinantů, které mají přepisovat cizorodé geny včleněné do genomu viru kravských neštovic v eukaryotních buňkách. Použití virů kravských neštovic jako expresivních vektorů tedy vyžaduje, aby transkripce a replikace mohla být prováděna přirozenými enzymy viru kravských neštovic, nezávisle na hostiteli, to znamená na jedné straně, že nemohou být klonovány esenciální oblasti viru a na druhé straně, geny umožňující expresi musí být pod kontrolou promotorů viru kravských neštovic.

Z tohoto důvodu je obvykle používán proces zahrnující dva kroky. Nejdříve je konstruován plasmid, který obsahuje požadované cizorodé geny v kombinaci s promotorem viru kravských neštovic, a poté je tento rekombinantní plasmid včleněn "in vivo" do genomu viru kravských neštovic pomocí homologní rekombinace mezi virovou a plasmidovou DNA. Rekombinantní virus kravských neštovic např. popsán v EP-A-0243029, byl konstruován dle postupu popsaného výše a je používán pro expresi obalové bílkoviny HIV-1. Plasmid pSC25 užívaný ve zmíněném aplikačním Evropském patentu je vektorem, který je neobyčejně vhodný pro expresi obalové /env/ bílkoviny.

Avšak oba plasmidy, pSC25 a rodičovský plasmid pSC11, jsou zcela nevhodné pro další vývoj, to jest pro včlenění další cizorodé DNA. Na jedné straně pSC25 nemá další vhodné klonovací místo, a na druhé straně prekursor plasmidu pSC11 má označeno pouze jedno SmaI místo.

Klonování do SmaI místa vyžaduje ve většině případů opracování včleněných restrikčních fragmentů, protože SmaI je restrikční enzym vytvářející zarovnané konce. Mimoto je nemožné klonovat genové fragmenty do plasmidu pSC11, který neobsahuje žádné translační signály tzn. startovací nebo terminační kodon.

Ačkoliv plasmid pSC11 má mnoho výhod pro klonování nekompletních genů, genových fragmentů nebo dokonce syntetizované DNA, jeho použití vyžaduje rozsáhlé a nepříjemné konstrukční procesy.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je příprava dostupného plasmidu, který, pokud je to možné, usnadňuje klonování cizorodé DNA v plasmidu a je schopen rekombinace s pox virem.

Tento proces je umožněn rekombinantním plasmidem dle úvodního patentového nároku tím, že multi-funkční kazeta DNA sekvencí je umístěna okraji promotoru /pr1/.

Rekombinantní plasmid dle vynálezu je charakterizován tím, že multi-funkční kazeta DNA sekvencí je umístěna na okraji za promotorem. Tento způsob konstrukce je výhodný tím, že mohou být včleňovány různé funkční sekvence podle požadavků jakéhokoliv, předem stanoveného problému. To je např. možné při použití kazet sekvencí využívajících startovací kodon GUG, který je používán méně často ve srovnání s nejčastěji používaným kodonem AUG. Dají se používat kazety s jedním nebo několika terminačními kodony, které mohou být stejné nebo různé a zabraňují vzniku amber, ochre nebo opal supresorů. Systém vedle toho umožňuje včlenění polyadenylových signálů a jiných signálních struktur současně vedle včleňování žádaného cizorodého genu nebo genového fragmentu.

Plasmid dle vynálezu obsahuje s výhodou ve své multi-funkční kazetě DNA sekvencí mnohonásobné klonovací místo. Obvykle jsou zde upřednostňována klonovací místa pro restriční endonukleasy rozpoznávající hexamer, které vytvářejí lepivé konce. Využití těchto míst štěpených restričními endonukleasami umožňuje cílené klonování DNA fragmentů z genomu každého potřebného organismu. Z míst pro štěpení restričními endonukleasami, které jsou umístěny v multi-funkční kazetě DNA sekvencí, jsou přednostně vybírána místa vhodná pro komerčně vyráběné restriční endonukleasy, což je doporučováno i z ekonomických důvodů.

Příklady takových míst pro štěpení restričními endonukleasami jsou místa štěpení pro enzymy SteI, AvrII, SalI, AccI, HindII, NheI. Avšak dle vynálezu mohou být použita místa štěpe-

ní všech známých restričních endonukleas. V této souvislosti je možné odkázat na početný seznam známých restričních endonukleas /Kessler, C., Hölftke, H.J.: Gene 47, str. 1 a následující, 1986/. Použitelnost jednotlivých restričních endonukleas je v nejlepším případě omezena skutečností, že další štěpící místa pro tyto restriční endonukleasy jsou již přítomny v plasmidu dle vynálezu. V tomto případě rozhodne zkušený odborník, zda-li použije alternativní enzym nebo změni plasmid místně specifickou mutagenezí do takového tvaru, že má odpovídající štěpící místa pro restriční endonukleasu nebo použije částečně štěpenou DNA pro ligaci.

S výhodou umožňuje multi-funkční kazeta DNA sekvencí přepis startovacích a terminačních kodonů. Tyto kodony jsou přiměřeně použity v takové podobě, že mohou ovládat řadu obvyklých míst rozpoznávaných restričními endonukleasami. To znamená např. že sekvence ATG je včleněna do 5' oblasti místa štěpeného restričními endonukleasami v takové podobě, že je možné klonování v následujícím místě štěpení v několika různých sestavách. Při sledování oblasti obsahující místa štěpená restričními endonukleasami je patrné, že by mělo být použito několik terminačních kodonů, hlavně v takovém tvaru, kdy končí přepis ve všech myslitelných podobách. K zajištění 100% ukončení přepisu je výhodné, když různé terminační kodony následují jeden za druhým.

Podle vynálezu je promotor /pr1/ upotřebitelný multi-funkční kazetou DNA sekvencí. Navíc existuje možnost včlenění dalšího promotoru /pr2/ do jednoho z klonovacích míst, přednostně do místa štěpení restriční endonukleasou umístěného v 5' oblasti kazety sekvencí. To samo o sobě nabízí využití promotorů, které mohou např. být indukovány nebo které mají, v jiném ohledu, výhody ve srovnání s již existujícím promotorem /pr1/.

Mimo to může být multi-funkční kazeta DNA sekvencí navíc sestavena do takového tvaru, který obsahuje zesilující DNA sekvence v 5' nebo 3' oblasti násobných klonovacích míst /mcs/. Takové zesilující sekvence jsou především známy u virů, např. SV40, polyoma viru, papova viru a dalších. Jedná se o sekvence, které jsou schopné náhrady, např. 72 opakujících se párů bazí z SV40. Identifikované sekvence DNA se zesilovací schopností mají délku od několika málo párů bazí do 72 párů bazí.

Poněvadž funkce povahy klonovaných genů je exprimována a

s tím i spojené vlastnosti, např. rychlost exprese, toxicita buňky a další, je výhodné vzít do úvahy bílkoviny s hydrofobními v membráně zakotvenými nebo signálními proteiny. Podle toho DNA sekvence mohou být včleněny do multi-funkční kazety DNA sekvencí, které mohou být kódem buď pro hydrofobní v membráně zakotvené peptidy nebo pro požadovaný signální peptid, který se skládá převážně z hydrofilních N-terminálních oblastí a následujícího hydrofobního podílu. Zkušený odborník zná z literatury řadu použitelných signálních peptidů.

S výhodou obsahuje multi-funkční kazeta DNA sekvencí sekvence na svém 5'a/nebo 3'konci, které jsou komplementární ke známým nukleotidovým primerům. Obecně lze říci, že se to týká nukleotidů obvykle používaných pro klonování.

S výhodou sekvence komplementární ke známým primerům, uspořádané na 5'a/nebo 3'konci, odpovídají takovým sekvencím, které jsou např. rozpoznatelné SP6 polymerasou nebo T7 polymerasou. Znamé primery, které se vážou např. k SP6 nebo T7 promotorové oblasti jsou 5'- CACATACGATTTAGG -3'/15-mer/ end/or 5'- ATCGAAATT AATACG -3'/15-mer/. Příprava vhodných komplementárních sekvencí k takovým oligonukleotidům je výhodné, protože sekvence včleněného fragmentu DNA, který obsahuje cizorodý genový fragment, může být kontrolována kdykoliv známou metodou pro sekvenování dvouřetězcové DNA.

S výhodou plasmid dle vynálezu obsahuje následující multi-funkční kazety DNA sekvencí:

5'- GCACATACGATTTAGGCCTAGGATGTCGACTAGTTAGCTAGCGTATTAATTTTCGATC-3'

Funkce nukleotidů je podrobněji vysvětlena na obr.1.

Plasmid sestavený dle vynálezu je s výhodou používán u obvyklých mikroorganismů, např. prokaryotních organismů, s výhodou u gram-negativních bakterií. Z tohoto důvodu plasmid dle vynálezu obsahuje oblasti sekvencí, které jsou nezbytné pro replikaci a amplifikaci všech požadovaných prokaryot, např. počátek replikace v návaznosti na jeho funkci nutnou pro rekombinaci v cytoplasmě eukaryotních buněk. Replikon zodpovědný za replikaci plasmidu u prokaryot : možné je používat ori1. Pro přípravu rekombinantního plasmidu je výhodné, že transformace a amplifikace rekombinantního plasmidu probíhají u gram-negativních bakterií, např. u *Escherichia coli*. Takže Col E 1 replikon

z *Escherichia coli* je speciálně výhodný replikon.

Avšak různé kroky nutné pro konstrukci nebo amplifikaci rekombinantního plasmidu mohou také probíhat u eukaryot. V tomto případě je vhodným organismem kvasinka. Kvasinky patří mezi dobře známé eukaryotní organismy, se kterými se poměrně snadno pracuje. V tomto případě se může s výhodou použít např. replikon 2u plasmidu ze *Saccharomyces*.

Postupy nutné pro konstrukci plasmidu dle vynálezu např. selekce transformovaných bakterií je usnadněna použitím vhodného selekčního znaku. Výhodný selekční znak pro transformaci prokaryotů je např. inaktivace antibiotik. Zkušený odborník zná pluralitu rezistentních genů pro expresi bílkovin inaktivujících antibiotika u gram-negativních a gram-positivních organismů.

Jestliže je, na druhé straně, prováděna příprava rekombinantního plasmidu v eukaryotech, např. v kvasinkách, mohou být jako selekční znak využity geny metabolismu aminokyselin a nukleových kyselin. Použijí-li se vhodné mutanty kvasinek, může být selekce prováděna pomocí transformovaných kvasinek, které jsou schopny exprimovat poškozené geny v transformovaném kmeni. Isolované kvasinkové geny mohou rovněž sloužit pro komplementaci mutantů metabolismu aminokyselin u několika eukaryotních organismů, např. primitivních řas, *Physarum* nebo *Dictyostelium*.

Výhodou vynálezu je použití promotoru p_{7,5} jako speciálně silného promotoru, za účelem zvýšení exprese požadovaných cizorodých genů. Je nutné používat promotor, který je rozpoznán pox RNA polymerasou v pox systému. Jak již bylo výše podotknuto, přepis pox genů probíhá v cytoplasmě eukaryotních buněk a je prováděna výlučně vlastními pox- RNA polymerasami.

Speciálně výhodným promotorem je promotor viru kravských neštovic, promotor p_{7,5}, který je zodpovědný za polypeptid s molekulovou hmotností 7,5 kD produkováný divokým typem viru kravských neštovic. Tento promotor je zvláštní tím, že exprese genu, kterou kontroluje, je prováděna téměř po celou dobu replikačního cyklu viru kravských neštovic. Promotor p_{7,5} je jediným charakterizovaným promotorem, o kterém je známo, že má celistvou expresi během úplného životního cyklu viru kravských neštovic.

Dále je promotor p_{7,5} s výhodou nahrazen chemicky synteti-

lou promotoru pox viru. Samozřejmě může být také použit jakýkoliv jiný promotor systému pox viru.

Promotor používaný s výhodou pro tyto účely je pozdní promotor p11, který koduje polypeptid s molekulovou hmotností 11 kD v divokém typu viru kravských neštovic. P11 je také silným promotorem, který způsobuje expresi dostatečného množství β -galaktosidasy, takže je možné enzym detegovat pomocí výše zmíněného chromogenního substrátu.

Vedle lacZ genu jako sm2 lze alternativně použít dominantního selekčního znaku. Příkladem takového dominantního selekčního znaku je např. gpt gen, který koduje xantin guanin fosforibosyl transferasu. Tento enzym je produktem genu z *Escherichia coli*, analogicky k hypoxantin guanin fosforibosyl transferase z buněk savců. Enzym ze savčích buněk katalyzuje kondenzaci fosforibosyl pyrofosfátu s hypoxantinem nebo guaninem za vzniku inosinu nebo guaninové kyseliny /IMP a/nebo GMP/. Avšak bakteriální enzym má navíc schopnost fosforylovat xantin za vzniku XMP. Tuto reakci enzym ze savčích buněk nemůže provádět buď vůbec nebo pouze velmi slabě. Rekombinantní virus, který nese gpt gen umožňuje tudíž savcím buňkám infikovaným tímto virem syntetizovat GMP a tudíž i dGTP a DNA za přítomnosti XMP syntetizované v přítomnosti mykofenolové kyseliny, zatímco syntéza XMP v přítomnosti mykofenolové kyseliny je v neinfikovaných buňkách inhibována, utilizace nabízeného xantinu je nemožná vzhledem k různé specifitě analogického enzymu savčích buněk.

Alternativa exprese gpt genu jako selekčního znaku by bylo použití genu pro hygromycin-B-fosfotransferasu. Hygromycin-B je antibiotikum syntetizované *Streptomyces*, které inhibuje syntézu bílkovin u prokaryot a eukaryot, inhibicí ribosomální translokace a tudíž interferuje s aminoacyl-t-RNA rozpoznávací schopností. Působení antibiotika může být inaktivováno fosfotransferasovou aktivitou izolovanou z *Escherichia coli*.

Plasmid, který je k dispozici dle vynálezu, může být používán pro klonování kompletních genů. Nadbytek promotorů, který v souvislosti s tím může vyskytnout, je nevýznamný pokud pouze vlastní pox promotor se bude projevovat v cytoplasmě buněk infikovaných pox virem.

Avšak, plasmid podle vynálezu slouží s výhodou pro klonování sekvencí, které neobsahují žádný translační a transkrip-

ční startovací signál. To se aplikuje např. při cíleném klonování oblastí s vyjímečnou funkcí a/nebo klonování antigenních částic. Klonování takovýchto částí má stoupající význam především ve spojení s přípravou vakcín. Ve speciálních případech replikační funkce viru získaného pomocí rekombinace s plasmidem dle vynálezu, může být omezena vložení kompletního genu nebo buňka může být předčasně poškozena v příliš velkém rozsahu. Mimo to v mnoha případech pouze části bílkovin jsou nezbytné pro specifické účely.

DNA včleněná do plasmidu dle vynálezu může být jak přírodního tak syntetického původu. DNA přírodního původu bude přednostně buď přímo DNA genomu, např. izolovaná z genomu prokaryota nebo cDNA ze složitějších eukaryotických genů. Zvláštností systému pox viru je to, že není možné detegovat žádný sestřih mRNA. To lze pravděpodobně připsat na vrub skutečnosti, že všechny na viru závislé procesy probíhají v cytoplasmě infikovaných buněk, zatímco buněčný aparát sestřihu je umístěn v jádru. Takže musí být věnována pozornost konstrukci plasmidů, které jsou používány pro rekombinaci s virem kravských neštovic kdy DNA bez intronu je použita v případě použití eukaryotních genů.

Zpravidla syntetická DNA je předem sestavena z oligonukleotidů připravených synteticky a následně přenesena do plasmidu dle vynálezu. Použití syntetické DNA má výhodu, že může být modifikována tak, aby vyhověla pozdějším požadavkům během produkce, a že místa pro štěpení restričními endonukleasami, později využívaná při klonování, mohou být umístěna na koncích. Mimo to, spojení přírodní a syntetické DNA je umožněno v důsledku toho, že další kazeta je včleněna do již existujícího mcs, které obsahuje štěpící místo pro restriční endonukleasu nutné pro speciální klonovací problém.

Bílkoviny klonované přednostně jsou bílkoviny nebo jejich deriváty z patogenů, které mohou např. být používány pro imunizaci. Příkladem jsou černý kašel, tetanus, malarie, AIDS, klíšťová encefalitida, žloutenka B a herpes infekce. Tento výčet není samozřejmě uzavřený. Ve většině případů bílkoviny používané pro imunizaci indukují neutralizující protilátky a/nebo odezvu na T buňky. To se ve většině případů týká obalových bílkovin. Příklady, které to potvrzují jsou viry chřipky, herpes a flavi virus.

Další možnost využití plasmidu dle vynálezu pro produkci rekombinantních pox virů je produkce bílkovin s biologickými funkcemi alespoň jedné z následujících bílkovin : jeden z koagulačních faktorů II, VIII, IX, XII, XIII, von Willebrandův faktor, bílkovina C a S, antitrombin III, plasminogen, hirudin, NGF, FGF, TNF, B-buňku stimulující faktory, bílkoviny z interleukinové skupiny, apolipoproteiny nebo glykoproteiny nebo nestrukturální bílkoviny virů. Prokazatelná výhoda izolace těchto bílkovin z expresního systému pox viru je fakt, že např. koagulační faktor, který se běžně izoluje z krevního séra, nebude kontaminován jinými viry, např. AIDS viry. Isolace těchto faktorů z buněčné kultury navíc umožňuje využití v provozním měřítku. Produkce rekombinantního pox viru za použití plasmidu dle vynálezů je proveden "in vivo" za použití rekombinace hraničních sekvencí pox viru tj. genových sekvencí thimidin kinasy plasmidu s pox virem. Původní intaktní virální gen je narušen a potom inaktivován rekombinací.

S výhodou se využívá plasmid dle vynálezu, což je pSC11-Orth. pSC11-Orth je odvozen od známého plasmidu pSC11. Způsob přípravy je znázorněn na obr.2. pSC11-Orth byl uložen s DSM v Braunschweigu 9.ledna 1990 a obdržel depoziční číslo DSM 5734.

Příprava rekombinantních pox virů je uskutečněna infikováním vhodné buněčné linie jako je TK⁻buněčná linie, která je infikovaná aktivním pox virem např. virem kravských neštovic adaptovaným na laboratorní podmínky ve zvláštním vakcínovém kmeni. Preferovanými viry jsou atenuované viry, např. takové kmeny jehož hr /vyskytující se v lidském hostiteli/gen nebo VGF /růstový faktor viru kravských neštovic/ gen je inaktivní v důsledku úplné nebo částečné delece nebo mutace. Příklady takových virů jsou popsány v Altenburger a kol., Arch.Virol. 105, str.15 až 27, 1989 a C.Kaplan, Arch.Virol. 106, str. 127 až 139, 1989.

Mezi známé procesy, které používají zkušení odborníci při transformaci patří např. srážení fosforečnanem vápenatým, fúze liposomů, elektroporace. Plasmid dle vynálezu, který byl přenesen do buňky za účelem transformace, bude rekombinován "in vivo" s již přítomným genomem viru bez dalšího přispění experimentátora. Jak již bylo podotknuto výše, úspěšná transformace může být může být testována přidáním X-gal, když sm2

je gen pro β -galaktosidasu. Úspěšnost rekombinace musí být mimo to ověřena bromdesoxyuridinovou selekcí. Pouze rekombinantní TK⁻ viry přežívají v TK buňkách, protože nemohou včlenit nabízený bromdesoxyuridin do své DNA.

Rekombinantní pox viry jsou tvořeny rekombinací, která zahrnuje, vedle přírodních pox částic, cizorodý gen nebo části, které jsou pod kontrolou přidaného promotoru jako funkce povahy plasmidu dle vynálezu. Jako vyjádření funkce povahy promotoru, tento cizorodý gen je přepisován buď během časně nebo pozdní fáze přepisu viru nebo po celou dobu přepisu.

S výhodou jsou výše uvedené pox viry, viry kravských neštovic. Systém viru kravských neštovic je již velmi dobře charakterizován a nabízí velké výhody s ohledem na množství vhodných znalostí.

Jak již bylo podotknuto, pox viry dle vynálezu mohou být používány pro expresi DNA sekvencí cizorodých pro pox virus. Systém poxu viru nenabízí pouze výhodu schopnosti exprese, ale mimo to výhodu, která v kontrastu s expresí u prokaryotů, zajišťuje, že vznikající produkty jsou správně modifikovány.

Vznikající přepisy jsou překládány v cytoplasmě infikovaných buněk a následně post-translačně modifikovány tzn. např. glykosylovány, karboxylovány a acetylovány. Systém dle vynálezu může být tedy použit pro expresi cizorodých eukaryotních DNA sekvencí v pox viru a vede k autenticky modifikovaným bílkovinám.

Bílkoviny, které mohou být s výhodou produkovány tímto systémem jsou např. již výše zmíněné funkční bílkoviny z patogenů. Rekombinantní pox viry kodují jak funkci plasmidu použitého pro rekombinaci bílkovin, tak jejich derivátů nebo také částí takových bílkovin.

Důležité patogeny, jejichž bílkoviny mohou být produkovány tímto způsobem jsou např. černý kašel, tetanus, malarie, AIDS, klíšťová encefalitida, žloutenka B a herpes.

Koagulační faktory II, VIII, IX, XII, XIII, von Willebrandův faktor, bílkovina C a S, antitrombin III, plasminogen, hirudin, NGF, FGF, TNF, B-stimulační faktory buňky, bílkoviny z interleukinové skupiny, apolipoproteiny nebo glykoproteiny nebo nestrukturální bílkoviny např. FSME virus může být produkován tímto způsobem. Rekombinantní viry kravských neštovic dle vyná-

lezu mohou být udržovány v buněčných kulturách. Z hlediska trvanlivosti je vhodné buněčnou kulturu infikovanou viry dle vynálezu lyofilizovat nebo zmrazit.

Buněčná kultura s výhodou používaná, se skládá z TK⁻buněk nebo Vero buněk pro vytvoření většího množství virů, např. buněk linie TK⁻143 /CNCM ; I-732 /.

Peptid nebo polypeptid kodovaný cizorodou DNA je syntetizován v buněčné kultuře dle vynálezu plynule nebo pouze po určité době virového cyklu s ohledem na funkci používaného promotoru. Peptidy nebo polypeptidy produkované tímto způsobem mohou být izolovány z buněk metodami, které jsou známy zkušeným odborníkům a čistěny obvyklými metodami používanými v chemii bílkovin. Zvláštní výhodou systému je to, že bílkoviny exprimované pod kontrolou promotoru p7,5 mohou být včleněny do vnější membrány, jistě mají kotevní sekvence a potom mohou být již rozpoznány jako antigeny.

Peptidy nebo polypeptidy dle vynálezu jsou vhodné pro produkci skladby, která může obsahovat volně pouze jeden, nebo také několik z produkovaných bílkovin, aby produkovala např. polyvalentní vakcinu. Skladba může obsahovat fyziologicky tolerovatelná aditiva, k tomu ještě peptidy nebo polypeptidy, jejichž podstata bude záviset na zamýšleném použití skladby. Možná aditiva jsou např. adjuvans, stabilizatory, pufrы, osmoticky aktivní látky.

Skladba dle vynálezu může být potom použita pro přípravu vakcíny. Jako funkce podstaty produkovaného peptidu nebo polypeptidu, produkovaného v buňkách, může být tato vakcína použita u lidí i u zvířat např. domácí zvířata a domácí dobytek.

Skladba dle vynálezu může být navíc použita jako diagnostické činidlo. V tomto případě detekce protilátek proti specifickým bílkovinám patogenního viru v infikovaných jedincích by např. bylo možné reakcí antigen/protilátka mezi peptidem nebo polypeptidem produkovaným dle vynálezu a sérem lidského nebo zvířecího pacienta.

Popis k obrázkům.

Obr.1A ukazuje 57 bp-insert, který byl vložen do vektoru pSC11 dle vynálezu. V obrázku jsou zdůrazněna různá místa pro štěpní restriktivními endonukleasami, vhodná pro přípravu rekombinantních plasmidů, dále oblasti sekvencí, které hybridizují s SP6 primerem nebo T7 primerem ; translační startovací kodon obsažený v 57 bp-insertu a terminační kodony jsou zvýrazněny různými rámečky.

Obr.1B ukazuje sekvenci gel, na které byla ověřena sekvence insertu, za použití SP6 primeru /vzorek na levé straně/ na jedné straně a na druhé straně za použití T7 primeru. Sekvence gel ukazuje jasně, že plasmid pSC11-Orth dle vynálezu obsahuje sekvenci s 57 páry bazí.

Obr. 2 ukazuje schéma konstrukce, na kterém je založena konstrukce a izolace plasmidu pSC11-Orth.

Obr. 3 dokládá včlenění DNA sekvence popsané v příkladě 2, která koduje část povrchového antigenu HIVu-1. HIV-1 jsou konstruovány vektorovými sekvencemi popsanými kurzivou.

Obr.4 dokládá příklad 3, ve kterém je popsána inserce sekvence DNA, která koduje část povrchového antigenu glykoproteinu E FSME viru. Při konstrukci vektoru odvozeného z pSC11-Orth, který exprimuje povrchový antigen, musel být v tomto případě včleněn syntetický adaptor, aby nebyl narušen překlad. Tento adaptor je odlišen od sekvencí plasmidu dle vynálezu výrazným typem písma. Sekvence mající původ v TBE viru jsou popsány kurzivou.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce plasmidu pSC11-Orth

Při konstrukci plasmidu pSC11-Orth, odvozeného z plasmidu pSC11, byla dvouřetězcová sekvence, složená z 57 párů bazí, včleněna do rodičovského plasmidu pSC11 /DSM 4381 ; Chakrabarti a kol., Mol. and Cell. Biol. 5, str.3404 až 3409, 1985/, který obsahuje několik funkčních sekvencí. Tento postup je zachycen na obr.2.

Všechny kroky prováděné v popsaném postupu jsou známy zkušeným odborníkům a jsou popsány např. T.Maniatis a kol., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor, 1982.

Příklad 2

Včlenění DNA sekvence kodující část povrchového antigenu gp160 HIVu-1

DNA pSC11-Orth plasmidu byla linearizována pomocí restriční endonukleasy Sall. Vyčnívající 5'konce v pSC11-Orth, vzniklé po linearizaci restriční endonukleasou, byly degradovány S1 nukleasou za vzniku PvuII/BglII fragmentu /Hahn a kol., Nature 312, str.166 až 169, 1984/ z plasmidu pBH10 /Rather a kol., Aids Res. and Human Retroviruses 3, str.57 až 65, 1987/, který koduje část povrchového antigenu gp160. Po tomto kroku byla včleněna DNA pro ligaci s HIV-specifickým fragmentem Pvu/BglII /536bp/. Pro tento případ BglII konec fragmentu PvuII/BglII byl buď ošetřen S1 nukleasou nebo vyplněn Klenow DNA polymerasou, k získání zarovnaného klonovatelného 3'konce /5'konec PvuII štěpeného místa je již zarovnaný/. V každém případě ATG pochází z pSC11-Orth. Jestliže je použita Klenow polymerasa pro vyplnění, aminokyseliny jsou postupně získávány na 3'konci. Terminační kodony pocházejí naopak z pSC11-Orth; po vyplnění místa štěpeného BglII přepis končí na "stop 1"/viz obr.1/, po natrávení vyčnívajících jednořetězcových sekvencí S1 nukleasou končí na "stop3".

Správná poloha HIV insertu byla kontrolována pomocí analýzy různými restričními endonukleasami.

Příklad 3

Včlenění DNA sekvence kodující část povrchového antigenu glykoproteinu E TBE viru

DNA pSC11-Orth plasmidu byla linearizována restriční endonukleasou SalI a defosforylována. Sekvence oblasti kodující část glykoproteinu E byla vyštěpena z cDNA-klonu pA5 /DSM 4382 ; Mandl a kol., Virology 166, str.197 až 205, 1988/ viru TBE restriční endonukleasou PvuII a vzniklý fragment byl izolován z agarosového gelu. Insercí tohoto PvuII fragmentu do SalI místa plasmidu by nevznikla přeložitelná nukleotidová sekvence. Tudíž musel být použit SalI/SmaI adaptor. Adaptor, který má 10 nukletidů byl nejdříve ligován cestou zarovnaných konců s PvuII fragmentem. V druhém kroku byla vytvořena požadovaná struktura s přečnívajícími SalI konci na adaptoru a dále byl linearizován pSC11-Orth vektor SalI. Byla vytvořena přeložitelná sekvence nukleotidu, která však má čtyři nebo pět aminokyselin navíc na 5'konci nebo na 3'konci FSME sekvence. Aby se upevnila poloha FSME fragmentu s ohledem na vektor, byla DNA analyzována dalšími restričními endonukleasami. Při této konstrukci končí překlad na "stop 2".

189-910

č.j.	004481
doc.	28. 1. 91
ÚŘAD PRO VYHLEDÁVÁNÍ A OBLASTNÍ PRŮM.	

PATENTOVÉ NÁROKY

- 1/ Rekombinantní plasmid obsahující alespoň jeden replikon /ori1/, alespoň jeden selekční znak /sm1/, alespoň jeden promotor /pr1/ a DNA sekvence z genomu pox viru ohraničující tento promotor, v y z n a č u j í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí je napojena po směru promotoru.
- 2/ Plasmid dle bodu 1, v y z n a č u j í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí obsahuje násobné klonovací místo /mcs/.
- 3/ Plasmidy dle bodů 1 nebo 2, v y z n a č u j í s e t í m , že klonovací místa pro jeden nebo několik z následujících enzymů jsou přítomny :
SteI, AvrII, SalI, AccI, HindII, SpeI, NheI.
- 4/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí zajišťuje překlad startovacího a terminačního kodonu.
- 5/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že multifunkční kazeta DNA sekvencí obsahuje promotor /pr2/.
- 6/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí obsahuje aktivované DNA sekvence.
- 7/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí obsahuje DNA sekvence pro hydrofobní peptidy zakotvené v membráně nebo signální peptidy.
- 8/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí obsahuje sekvence na svém 5'konci a/nebo 3'konci, které jsou komple-

mentární ke známým oligonukleotidovým primerům.

9/ Plasmid dle bodu 8, v y z n a č u j í s e t í m , že sekvence jsou komplementární k primérům SP6 polymerasy nebo T7 polymerasy na 5'a/nebo 3'konci.

10/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 9, v y z n a č u j í s e t í m , že multi-funkční kazeta DNA sekvencí má následující sekvence :

5'-GCACATACGATTTAGGCCTAGGATGTCGACTAGTTAGCTAGCGTATTAATTTTCGATC-3'

11/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 10, v y z n a č u j í s e t í m , že replikon /ori1/ slouží pro replikaci plasmidu v prokaryotech, s výhodou v gram-negativních bakterii.

12/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 10, v y z n a č u j í s e t í m , že replikon /ori1/ slouží pro replikaci plasmidu v eukaryotech, s výhodou v kvasinkách.

13/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 11, v y z n a č u j í s e t í m , že selekční znak /sm1/ slouží pro selekci u prokaryotů, s výhodou u gram-negativních bakterii.

14/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 10 nebo 12, v y z n a č u j í s e t í m , že selekční znak slouží pro selekci u eukaryotů, s výhodou u kvasinek.

15/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 14, v y z n a č u j í s e t í m , že promotor /pr1/ je silným pox promotorem.

16/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 15, v y z n a č u j í s e t í m , že promotor /pr1/ je promotorem z viru kravských neštovic.

17/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 16, v y z n a č u j í s e t í m , že promotor p7,5 pro polypeptid s molekulovou hmotností 7,5 kD je používán jako promotor viru kravských neštovic.

18/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 15 až 17, v y z n a -
č u j í s e t í m , že promotor /pr1/ je pox promotorem změ-
něným mutagenézí nebo je syntetickým promotorem.

19/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 18, v y z n a -
č u j í s e t í m , že hraniční DNA sekvence viru kravských
neštovic se shodují s neesenciálními oblastmi virového genomu.

20/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 19, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že hraniční DNA sekvence se shodují
úplně nebo částečně s genem pro thymidin kinasu.

21/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 20, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že obsahuje druhý selekční znak /sm2/.

22/ Plasmid dle bodu 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že selekčním znakem /sm2/ je lacZ gen.

23/ Plasmid dle bodu 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že selekční znak /sm2/ je dominantní.

24/ Plasmid dle bodu 23, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že selekční znak /sm2/ je genem pro xanthin guanin fosforibosyl
transferasu.

25/ Plasmid dle bodu 23, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že selekční znak /sm2/ je genem pro bílkovinu inaktivující
antibiotikum hygromycin.

26/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 21 až 25, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že exprese selekčního znaku /sm2/ je
pod kontrolou promotoru pox viru.

27/ Plasmid dle bodu 26, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že promotor p11 pro polypeptid s molekulární hmotností 11 kD je
používán jako promotor viru kravských neštovic.

28/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 27, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že celá kodovací sekvence genu je

včleněna do mcs / násobného klonovacího místa/.

29/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 28, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že kodovací sekvence, pro funkční
oblasti a/nebo antigenních částic bílkovin, jsou včleněny.

30/ Plasmid dle každého z bodů 28 nebo 29, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že včleňovaná DNA je přírodního a/nebo
syntetického původu.

31/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 28 až 30, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že včleňovaná DNA se shoduje úplně
nebo částečně s kodujícími sekvencemi pro bílkoviny nebo je-
jich deriváty z patogenů.

32/ Plasmid dle bodu 31, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že patogeny jsou patogeny působící nákazu černým kašlem, te-
tanem, malarií, AIDS, klíšťovou encefalitidou / Centrální
Evropskou encefalitidou /, žloutenkou B nebo herpes.

33/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 28 až 32, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že včleňovaná cizorodá DNA koduje
úplně nebo částečně bílkovinu vykazující biologickou akti-
vitu; alespoň jednu z následujících bílkovin : koagulační fak-
tory II, VIII, IX, XII, XIII, von Willebrandův faktor, bílkovi-
nu C a S, antitrombin III, plasminogen, hirudin, NGF, FGF, TNF,
B-buňku stimulující faktory, bílkoviny z interleukinové skupi-
ny, apolipoproteiny nebo glykoproteiny z virů.

34/ Plasmid dle alespoň jednoho z bodů 1 až 10, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že to je pSC11-Orth /DMS 5734/.

35/ Způsob přípravy rekombinantního pox viru, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že pox virus je rekombinován s plasmidem
dle alespoň jednoho z bodů 1 až 34.

36/ Způsob dle bodu 35, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že pox virus je atenuovaným virem, s výhodou pomocí inaktiva-
ce hr genů nebo VGF genu.

- 37/ Rekombinantní pox virus, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje cizorodé geny, které jsou pod kontrolou dodatečného promotoru, mimo částí jeho přírodní DNA a může být produkován způsobem dle bodů 35 nebo 36.
- 38/ Rekombinantní pox virus dle bodu 37, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že je to virus kravských neštovic.
- 39/ Použití rekombinantního pox viru dle bodu 37 nebo 38 pro expresi DNA sekvencí cizorodých pro pox virus.
- 40/ Použití rekombinantního pox viru dle bodu 39, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že DNA sekvence cizorodé pro pox virus kodují úplně nebo částečně bílkoviny nebo jejich deriváty z patogenů.
- 41/ Použití rekombinantního pox viru dle bodu 40, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že patogeny mohou způsobit nákazu černým kašlem, tetanem, malarií, AIDS, klíšťovou encefalitidou, žloutenkou B a herpes.
- 42/ Použití rekombinantního pox viru dle bodu 39, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že DNA sekvence cizorodé pro pox virus kodují úplně nebo částečně bílkovinu vykazující biologickou aktivitu; alespoň jednu z následujících bílkovin : koagulační faktory II, VIII, IX, XII, XIII, von Willebrandův faktor, bílkovinu C a S, antitrombin III, plasminogen, hirudin, NGF, FGF, TNF, B-buňku stimulující faktory, bílkoviny z interleukinové skupiny, apolipoproteiny nebo glykoproteiny z virů.
- 43/ Buněčná kultura, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že obsahuje pox virus dle bodu 37 nebo 38.
- 44/ Buněčná kultura dle bodu 43, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že to je kultura TK⁻ buněk, s výhodou TK⁻ 143 / CNCM ; I - 732 /.
- 45/ Peptid nebo polypeptid, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že může být produkován v buněčné kultuře dle bodu 43 nebo 44.

46/ Farmaceutická skladba, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že obsahuje jeden nebo více peptidů a/nebo polypeptidů dle
bodu 45.

47/ Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahu-
je jeden nebo několik peptidů a/nebo polypeptidů dle bodu 45.

48/ Virová vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , že
obsahuje alespoň jeden rekombinantní pox virus dle bodů 37
nebo 38.

49/ Diagnostické činidlo, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že obsahuje jeden nebo několik peptidů a/nebo polypeptidů dle
bodu 45.

50/ Použití vakcíny dle bodů 47 nebo 48 pro produkci protilá-
tek.

J. A. Kříž
UDr. Jarmila Traplová

ORAC
PROVINCIAL
A08151

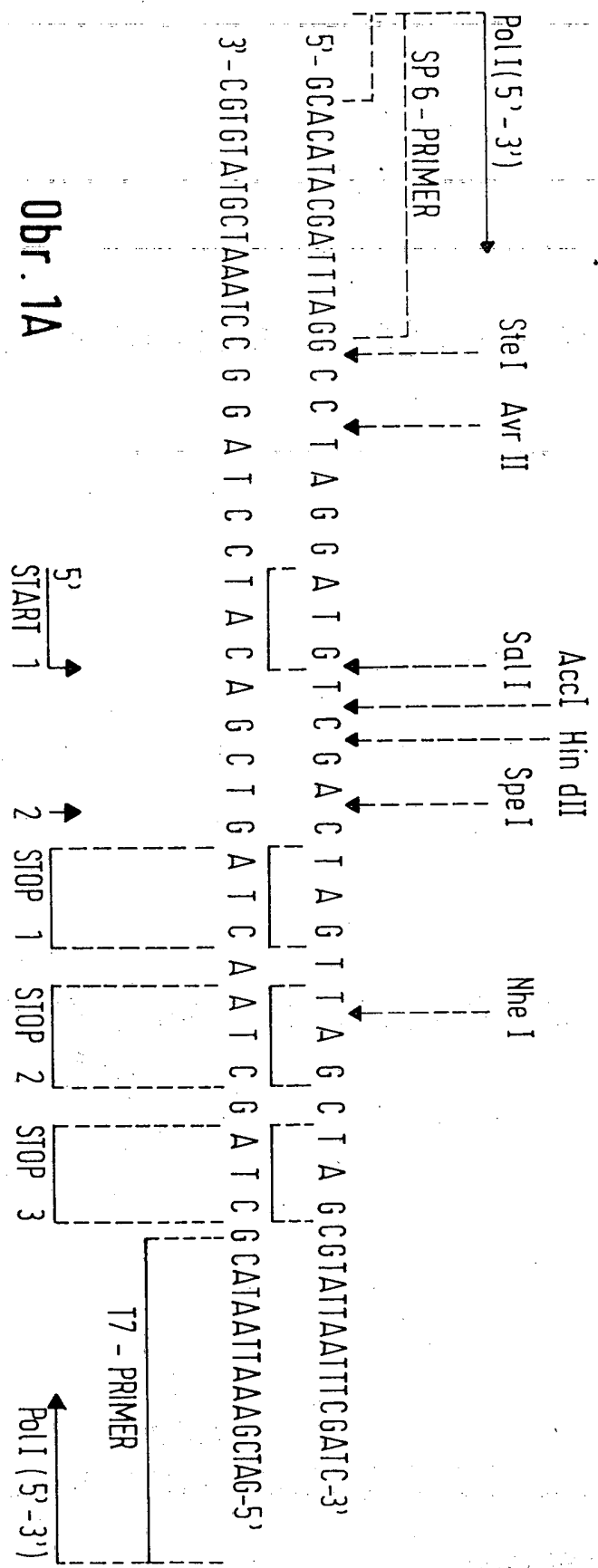
07 08 91

00500

00600

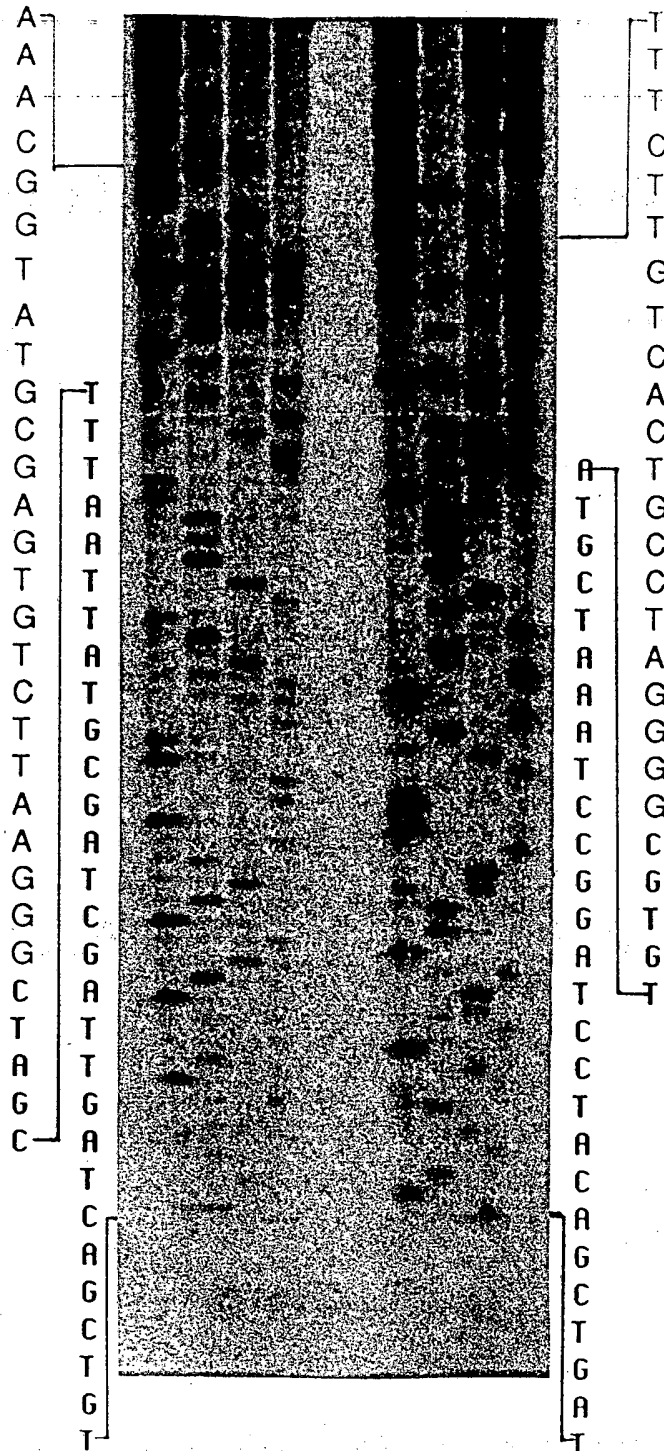
6

57bp - INSERT

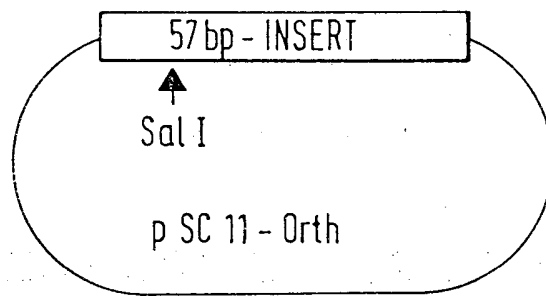
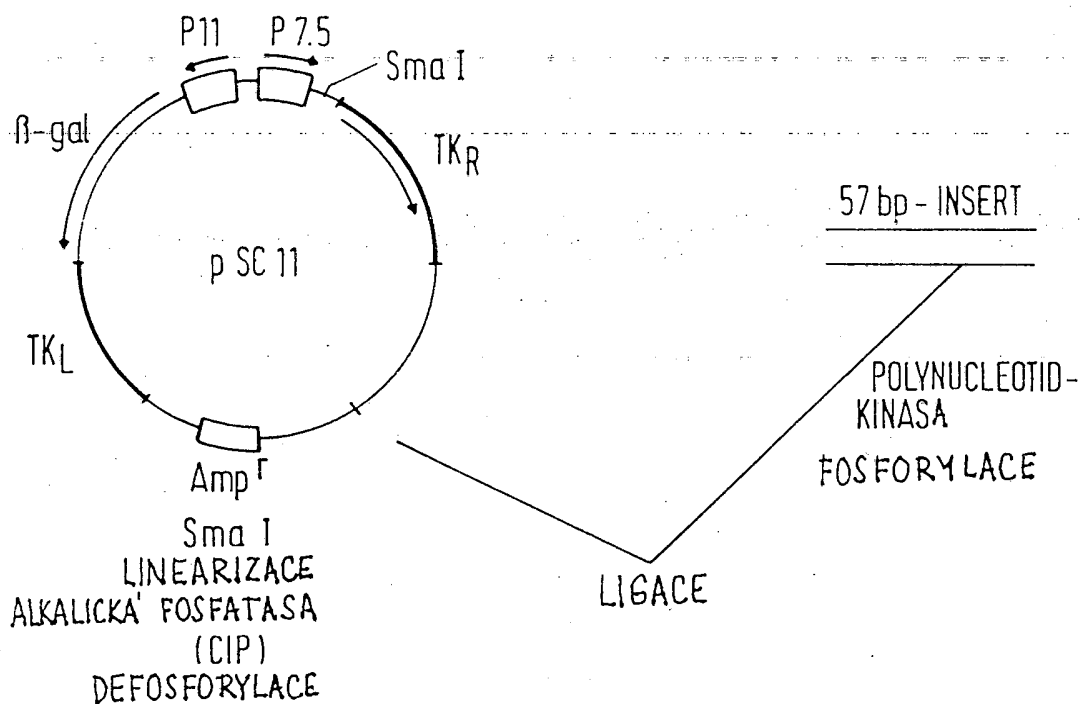


Obt. 1A

AGCT AGCT



p SC 11 - Orth. SCHEMA KONSTRUKCE



TRANSFEKCE (HB 101)

SELEKCE Amp^r - KOLONIÍ

DNA - MINIPREPARACE

Sal I - TEST ŠTĚPENÍ

SEKVENOVÁNÍ KLONŮ ŠTĚPITELNÝCH Sal I

Obr. 2

9110	Pvu II	7120	7640	7650	Bgl II	pBH 10
"	"	"	"	"	"	
GTA	AAC	AAC	AAT	GAG	GAG	TTC
CAG	CTG	CAA	GAG	CTC	ATC	ATC
GTC	GAC			Glu	TAG	TA
	Leu	Gln	Asn	Ser		
	Asn	Asn	Glu			

Sal I

AIG
TAC
TCG
AGC
ACT
TGA
AGT
TAG
CTA
GCG

SC11 - Orth

a) Sal I und Bgl II: ZAROVNANE KONCE ZISKANE PUSOBENIM S1 - NUKLEASY

ATG	CTG	AAC	CAA	...	AAC	AAT	GAG	TCC	GAC	TAG
Met	Leu	Asn	Gln		Asn	Asn	Glu	Ser	Asp	

b) Sd I : ZAROVNANE KONCE ZISKANE PUSOBENIM S1 - NUKLEASY

BqI II: ZAROVNANE KONCE ZISKANE VYPLNENIM POMOCI KLENOW POLYMERASY

ATG	CTG	AAC	CAA	...	AAC	AAT	GAG	TCC	GAG	ATC	CTA	GTT	AGC	TAG
Met	Leu	Asn	Gln		Asn	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Leu	Val	Ser	

Obt. 3

UKRA
PROVINCIAL
A OBLEST
PRIL

07.11.90

11052

00608

C.J.

