

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

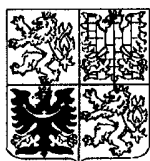
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 4213-97

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01. 07. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9513683**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 04. 98**  
(Věstník č. 4/98)

(86) PCT číslo: **PCT/GB96/01577**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/02351**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 15/70**

**C 12 N 15/62**

**C 12 N 9/24**

**C 12 N 1/21**

**A 61 K 38/47**

**C 12 Q 1/34**

// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

(71) Přihlášovatel:

**ENDOZYME LIMITED, Billingshurst, GB;**

(72) Původce:

**Taylor Peter William, Billingshurst, GB;**

**Luzio John Paul, Little Eversden, GB;**

**Bryant Jonathan Mark, Topsham, GB;**

(74) Zástupce:

**Guttman Michal JUDr. Ing., Nad Štolou  
12, Praha 7, 17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Rekombinantní protein mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy**

(57) Anotace:

Rekombinantní protein mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy, získatelný expresí z rekombinantního vektoru zahrnujícího sekvenci DNA, kodující bakteriofágovou endosialidázu, vázanou na sekvenci DNA expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy, nebo analog tohoto proteinu, jímž je mutanta, funkční fragment nebo derivát tohoto proteinu mající endosialidázovou enzymatickou aktivitu.

CZ 4213-97 A3

Rekombinantní protein mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy

### Oblast techniky

Vynález se týká rekombinantního proteinu majícího enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy, způsobu jeho výroby a rekombinantních expresních systémů pro použití při jeho výrobě.

### Dosavadní stav techniky

Bakteriofág E je členem fágové skupiny PK1A-PK1E; tyto fágy byly původně izolovány z odpadů v Evropě na podporu klinické identifikace infekcí *Escherichia coli* K1, které mohou způsobovat vysokou úmrtnost v případech novorozenecké meningitidy. Má se za to, že endosialidáza bakteriofága E (endosialidáza K1 E) je enzymem odpovědným za počáteční vazbu na hostitelskou bakterii tak, že specificky rozpoznává a hydrolyzuje v glykocalyxu K1 uhlohydrátové polymery  $\alpha$ -2,8-vázané poly-N-acetylneuraminové kyseliny (kyseliny polysialové, PSA).  $\alpha$ -2,8-vázaná PSA je exprimována také na buněčném povrchu několika dalších patogenních bakterií a různých nádorových buněk a buněčných linií. V patentu US č. 4,695.541 se navrhuje, že díky vysoké specifitě endosialidázy K1E pro hydrolýzu  $\alpha$ -2,8-sialosylových vazeb je možno tento enzym používat při diagnóze a terapii meningitidy K1, septicemie nebo bakteremie. Bylo uváděno, že PSA může působit jako marker onkologického vývoje v lidských nádorech ledviny a neuroendokrinních tkání a může rovněž přispívat k invazivnímu a metastatickému potenciálu některých nádorů.

V J. Bacteriol. 1993, 175, 4354-4363, jsou popsány pokusy získat enzymaticky účinný protein expresí z konstruktů DNA, odvozeného od příbuzného fága K1F; tyto pokusy byly neúspěšné.

Nyní bylo zjištěno, že protein mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy, tj. protein, který se specificky váže na  $\alpha$ -2,8-polysialovou kyselinu nebo ji štěpí, je možno získat expresí z konstruktů DNA, který je odvoditelný z genu endosialidázy K1E a je klonován do expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázové sekvence.

### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je tedy jednak rekombinantní protein, mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy, získatelný expresí z rekombinantního vektoru zahrnujícího sekvenci DNA, kódující bakteriofágovou endosialidázu, vázanou na sekvenci DNA expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy, nebo analog tohoto proteinu, jímž je mutanta, funkční fragment nebo derivát tohoto proteinu mající endosialidázovou enzymatickou aktivitu.

Uvedenou mutantou může být například protein s nahrazenou nebo vypuštěnou aminokyselinou v jedné nebo několika polohách. Funkčním fragmentem může být fragment zkrácený na C- nebo N-terminálním konci nebo fragment z vnitřku polypeptidického řetězce, který má endosialidázovou enzymatickou aktivitu. Derivátem může být například farmaceuticky přijatelná sůl s kyselinou, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina pyrofosforečná, kyselina benzensulfonová, kyselina p-toluensulfonová, kyselina methansulfonová, kyselina mléčná, kyselina palmová, kyselina vinná, kyselina askorbová nebo kyselina citronová; s bázi, obvykle dusíkatou bázi, jako je báze obsahující sodík, draslík, hořčík nebo amonný dusík; nebo vnitřní sůl.

Dále je předmětem vynálezu rekombinantní vektor zahrnující sekvenci DNA, kódující bakteriofágovou endosialidázu, vázanou na sekvenci DNA expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy, přičemž tento rekombinantní vektor je schopen řídit expresi uvedeného proteinu v kompatibilní hostitelské buňce.

Dále je předmětem vynálezu způsob výroby proteinu, majícího enzymatickou aktivitu endosialidázy bakteriofága E, zahrnující kultivaci hostitelské buňky transformované výše definovaným rekombinantním vektorem za podmínek umožňujících expresi uvedeného proteinu a izolaci takto získaného proteinu. Dále je předmětem vynálezu hostitelská buňka, transformovaná výše definovaným rekombinantním vektorem.

Přednostním proteinem podle vynálezu je protein získatelný expresí z výše definovaného rekombinantního vektoru, kde sekvence DNA, kódující endosialidázu, je odvozena od konstruktu DNA kódujícího zbytky aminokyselin, kódované nukleotidy 172 až 1744 genu endosialidázy bakteriofága E, tj. nukleotidy 172 až 1744 dále definované sekvence SEQ ID No. 1, nebo mutanta, funkční fragment nebo derivát tohoto proteinu, mající endosialidázovou enzymatickou aktivitu. Zvláště výhodným proteinem podle vynálezu je protein získatelný expresí z výše definovaného rekombinantního vektoru, kde sekvence DNA, kódující endosialidázu, je odvozena od konstruktu DNA kódujícího zbytky aminokyselin, kódované nukleotidy 1 až 2436 genu endosialidázy bakteriofága E, tj. nukleotidy 1 až 2436 dále definované sekvence SEQ ID NO. 1, nebo mutanta, funkční fragment nebo derivát tohoto proteinu mající endosialidázovou enzymatickou aktivitu.

Protein podle vynálezu je obvykle exprimován ve formě fúzního proteinu zahrnujícího endosialidázu, vázanou přímo nebo přes raménko na polypeptid odvozený z expresního vektoru, tj. vektoru použitého pro expresi proteinu ve vhodné hostitelské buňce, přičemž výhodným takovým polypeptidem je glutathion S-transferáza. Je-li žádoucí, aby byly polypeptidické komponenty fúzního proteinu oddělitelné, jestliže fúzní protein přirozeně neobsahuje oblast, která může být specificky chemicky nebo enzymaticky štěpena, je možno takovou oblast běžnými postupy zabudovat. Příklady selektivních štěpících činidel nebo štěpících enzymů pro fúzní proteiny jsou proteáza V8, trypsin, thrombin, faktor X, CNBr, peptidáza ysc $\alpha$  a yscF.

Ve zvlášť výhodném provedení vynálezu je protein podle vynálezu ve formě fúzního proteinu zahrnujícího endosialidázu bakteriofága E, vázanou na glutathion

S-transferázu, přičemž tento fúzní protein má přednostně molekulovou hmotnost asi 100 kDa.

Konstrukt DNA, tj. rekombinantní molekula DNA, vhodná pro expresi proteinu podle vynálezu, může být tvořena izolovaným fragmentem DNA kódujícím bakteriofágovou endosialidázu, například tvořeným pouze kódující oblastí nebo prodlouženým o homologní nebo heterologní sekvence DNA. Konstrukt může tvořit fragment DNA kódující endosialidázu, klonovaný do vhodného klonovacího vektoru, přednostně bakteriálního vektoru, jako je pBR317, pBR322, pUC18, pSF2124 nebo zejména Bluescript SK<sup>+</sup>. Pokud v takovém klonu chybějí konvenční restrikční místa pro izolaci pouze otevřeného čtecího rámce endosialidázy, je možno je amplifikovat pomocí polymerázové reakce (PCR) s použitím primerů zahrnujících požadovaná restrikční místa.

Fragment DNA, kódující bakteriofágovou endosialidázu, může být získán z genomové DNA bakteriofága E nebo syntetické DNA, která je s ní v podstatě homologní, tj. homologní z 80 až 100 %. Čištění bakteriofága E a extrakci celkové genomové DNA je možno provádět běžnými postupy. Extrakt DNA je pak možno štěpit příslušným restrikčním enzymem, jako je Bgl II, Eco RI, Hinc II, Hind III, Bam HI nebo Pst I. Produkt štěpení může být podroben preparativní elektroforéze s nízkotajícím agarózovým gelem pro obohacení frakcí DNA o určité délce za účelem obohacení fragmentů DNA kódujících protein podle vynálezu.

Je-li známa nukleotidová sekvence kódující bakteriofágovou endosialidázu nebo její aminokyselinová sekvence, je možno DNA kódující endosialidázu připravit také metodami vedoucími přímo k požadované DNA, jako jsou konvenční postupy PCR nebo chemická syntéza in vitro.

Pro expresi proteinu podle vynálezu je konstrukt DNA klonován do expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy a poskytuje tak rekombinantní vektor podle vynálezu. Expresní vektor se samozřejmě volí podle charakteru hostitelské buňky, vybrané pro expresi proteinu. Vhodné takové expresní vektory jsou komerčně dostupné. Expres se přednostně provádí v prokaryotickém hostiteli, zejména v mikrobiálním hostiteli, zvláště v *E. coli*, je-li vhodným expresním vektorem prokaryotický expresní vektor,

jako je fág  $\lambda$  nebo bakteriální plasmid. Příklady konkrétních prokaryotických expresních vektorů jsou vektory pGEX, například pGEX-2T (Pharmacia Biotech), které vyvolávají expresi fúzního proteinu endosialidáza - glutathion S-transferáza (GST), pMAL (New England Biolabs), který vyvolává expresi fúzního proteinu endosialidáza - maltózový vazebný protein, systém „pinpoint“ fy Promega, který biotinyluje exprimovaný protein, systém „strep-tag“ fy Biometra, který na exprimovaný protein umísťuje streptavidinový vazebný peptid, systém Ni-NTA fy Qiagen, který k exprimovanému proteinu přidává 6 histidinů pro vazbu niklu, a systém Xpress fy Invitrogen, pracující na podobném principu jako systém Ni-NTA.

Výhodnými expresními vektory jsou vektory pGEX, které mají promotor tac, vnitřní gen lac I<sup>q</sup> a rozpoznávací místo proteázy thrombinu nebo faktoru Xa, zejména pGEX-2T, který má sekvenci

Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp  
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG

Klonování konstruktů DNA do expresního vektoru pro získání rekombinantního vektoru podle vynálezu může být prováděno s použitím konvenčních metod restrikce a ligace. Jestliže tedy konstrukt DNA obsahuje restrikční místa Bam HI a Eco RI, která mohla být vložena amplifikací pomocí PCR, je možno tento konstrukt DNA a expresní vektor štěpit současně pomocí Bam HI a EcoRI a ligaci pomocí DNA ligázy provádět podle pokynů výrobce.

Jak výše uvedeno, jsou hostitelské buňky, používané pro expresi proteinu podle vynálezu, přednostně prokaryotické, zejména mikrobiální buňky, včetně buněk bakterií, jako je *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* nebo zvláště *E. coli*.

Transformace hostitelských buněk může být prováděna běžnými metodami, pro tyto buňky vhodnými. Při transformaci buněk se tak například buňky podrobí předem působení Ca<sup>2+</sup> pro umožnění příjmu DNA a pak inkubaci s rekombinantním vektorem. Následnou selekci transformovaných buněk je možno například provádět přenesením buněk do selektivního živného média, které umožňuje separaci

transformovaných buněk od buněk rodičovských, nebo restriční analýzou vzorku DNA miniprep získaného z inkubovaných buněk.

Transformované hostitelské buňky mohou být kultivovány známými metodami v kapalném médiu s obsahem asimilovatelného zdroje uhlíku, například uhlohydrátu, jako je glukóza nebo laktóza, dusíku, jako je aminokyselina, peptid, protein nebo jejich degradační produkt, jako je pepton, amonná sůl apod., a anorganické soli, například síranu, fosforečnanu a/nebo uhličitanu sodného, draselného, hořečnatého nebo vápenatého. Médium může dále například obsahovat látku pro podporu růstu, jako je stopový prvek, například železo, zinek, mangan apod.

Kultivace může být prováděna postupy, které jsou v oboru známé. Podmínky kultivace, jako je teplota, hodnota pH média a doba fermentace, se volí tak, aby se dosáhlo maximální úrovně exprese proteinu podle vynálezu. Kmen *E. coli* se tak přednostně kultivuje za aerobních podmínek v submersní kultuře za třepání nebo míchání při teplotě asi 20 až 40 °C, přednostně při asi 37 °C, a hodnotě pH 4 až 8, přednostně asi 7, po dobu asi 4 až 30 h, přednostně do dosažení maximálního výtěžku proteinu podle vynálezu.

Exprimovaný protein může být extrahován z mikrobiálních buněk, jako jsou buňky *E. coli*, nebo ze supernatantu buněčné kultury běžnými metodami, které zahrnují například rozklad buněk, chromatografii, například chromatografii s výměnou iontů, hydrofobní nebo rozdělovací chromatografii, srážení, například síranem amonným nebo kyselinou, preparativní elektroforézu, jako je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), nebo isoelektrickou fokusací apod. Je-li, jako ve zvlášť výhodných provedeních vynálezu, exprimovaným proteinem fúzní protein endosialidáza - glutathion S-transferáza, může být čištěn navázáním na glutathionové kuličky, jak je popsáno v Smith a Johnson (1988) *Gene* 67, 31-40. Štěpení čištěného fúzního proteinu je pak možno provádět thrombinem, například podle pokynů Pharmacia Biotech, výrobce expresního vektoru pGEX-2T.

Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutický přípravek, obsahující jako účinnou složku protein podle vynálezu nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, popřípadě spolu s fyziologicky přijatelným nosičem, kterým může být například

vehikulum, ředidlo nebo jiný běžný pomocný prostředek do farmaceutických přípravků.

Proteiny podle vynálezu mohou být používány při diagnóze nebo ošetřování medicinských stavů, zejména lidského organismu, včetně různých onemocnění, zejména meningitidy a typů rakoviny, charakterizovaných expresí polysialové kyseliny na povrchu nádorové buňky, jako je Wilmův ledvinový nádor, malobuněčný plicní karcinom, neuroblastom, medulární karcinom štítné žlázy, nádor močového traktu, neuroektodermální nádor, teratom, rhabdomyosarkom, feochromocytom, Ewingův sarkom, insulinom, rakovina prsu a nádor hypofýzy. Tyto proteiny mohou být používány k inhibici metastázy nádorů, například postchirurgické metastázy. Mohou být používány rovněž při diagnóze nebo ošetřování dalších stavů, vyvolávaných *E. coli* K1, jako je sepse a infekce močového ústrojí, nebo jinými bakteriemi exprimujícími na povrchu svých buněk polysialovou kyselinu.

Vynález dále umožňuje způsob léčení stavu vyvolaného bakterií, exprimující na svém buněčném povrchu polysialovou kyselinu, rakoviny charakterizované expresí polysialové kyseliny na povrchu nádorových buněk nebo metastáz nádorů, při němž se protein nebo jeho výše definovaný analog podle vynálezu podává teplokrevnému savci, vyžadujícímu takovou léčbu.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu, zejména pro výše uvedené indikace, může být podáván parenterálně, například intravenózně, intrakutánně, subkutánně nebo transkutánně. Dávkování závisí v zásadě na způsobu podávání a na účelu ošetření. Jednotlivé dávky a režim podávání je možno určit nejlépe jednotlivým posouzením konkrétního případu onemocnění. Terapeuticky účinné množství proteinu podle vynálezu, podává-li se injekčně, činí obvykle od asi 0,005 do asi 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti.

Kromě účinné složky může injekční farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahovat pufr, například fosfátový pufr, chlorid sodný, mannitol nebo sorbitol pro úpravu isotonicity a antibakteriálně účinný konzervační prostředek, jako je methyl- nebo ethylester p-hydroxybenzoové kyseliny.

Proteiny podle vynálezu mohou být vzhledem ke své enzymatické aktivitě používány také při analýze glykoproteinů, například pro detekci a sekvenování

oligosacharidových skupin zdobících glykoproteiny, protože mohou z glykoproteinů selektivně odstraňovat konkrétní cukerné zbytky.

### Příklady provedení vynálezu

Pro osvětlení vynálezu jsou uvedeny příklady provedení, které se vztahují ke zvlášť výhodným provedením.

#### Příklad 1

#### Příprava konstruktů DNA obsahujícího otevřený čtecí rámec endosialidázy bakteriofága E

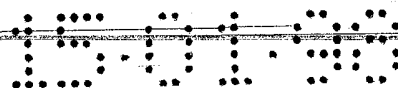
Není-li uvedeno jinak, provádějí se všechny postupy způsobem popsaným v Sambrook a spol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).

Degenerované oligonukleotidové sondy se navrhuje s odkazem na tabulky používání kodonu *E. coli* (Holm (1986), *Nuc. Acids Res.* 14, 3075-3087), připravují se použitím automatického syntetizátoru DNA Applied Biosystems PCR-MATE model 391 a značí na 5'-konci pomocí [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Amersham International Plc., Amersham, Bucks, U.K.) s použitím T4 polynukleotid kinázy. Radioaktivně značené oligonukleotidové sondy se hybridizují s produkty štěpení DNA bakteriofága E restričními enzymy, podrobí elektroforéze na agarózových gelech a přenesou na nylonovou membránu Hybond-N (Amersham International Plc.) Fragmenty DNA bakteriofága E, reagující se sondami, se identifikují autoradiografií, čistí z agarózových gelů stupně čistoty NA (Pharmacia Biosystems Ltd., Milton Keynes, Bucks, U.K.) a ligují pomocí T4 DNA ligázy (NEB Inc.) do Bluescript SK+ (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA). Transformace buněk *E. coli* Epicurian SURE (Stratagene Inc.) pomocí Bluescript SK+ se provádějí metodou elektroporace (Dower a spol. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145) s použitím zařízení pro generování a

řízení pulsů Bio-Rad nebo se alternativně vysoce účinné kompetentní buňky *E. coli* JM109 (Promega Inc. Madison, WI, USA) transformují teplotním šokem po dobu 60 s při 42 °C. Klony transformované rekombinantním plasmidem se identifikují kultivací na agarových destičkách 2TY/ampicilin a pomocí směsi 50 mg/ml 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosidu (X-Gal) a 0,1 M isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) pro rozdělení kolonií podle modré a bílé barvy. Provádí se sekvenování dvouvláknové DNA pomocí soupravy Sequenase verze 2.0 od United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH, USA, a sekvenovacího zařízení model SA od BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA. Sekvenování je usnadněno metodou hromaděných delecí nebo použitím syntetických oligonukleotidových primerů, připravených v British Biotechnology Products Ltd, Abingdon, Oxon, UK, nebo výše uvedeným způsobem.

Degenerovaná oligonukleotidová sonda - sonda 1 [5'-TAC(T)CAC(T)CAGGGT (G)GAC(T)GTG(T)GCG(C)CC-3'] - je odvozena od bromkyanového (CNBr) fragmentu endosialidázy K1E s nejdelší jednoznačnou aminokyselinovou sekvencí a jedná se o nejméně degenerovanou z pěti sond konstruovaných s použitím částečných aminokyselinových sekvencí, získaných z bromkyanových fragmentů. Jako fragment genomové DNA bakteriofága E, potenciálně kódující endosialidázovou sekvenci, je Southernovým přenosem pomocí <sup>32</sup>P-značené sondy 1 identifikován 1,9 kb produkt restriční štěpení BglII. Restriční endonukleázy BglII a BamHI vytvářejí u stejné sekvence kohezivní vyčnívající konce, což umožňuje ligaci 1,9 kb fragmentu BglII do místa BamHI klonovacího vektoru Bluescript SK+ (Promega Inc.). Plasmid miniprep DNA z klonu transformovaného vzniklým rekombinantním vektorem (klon I) poskytuje sekvenci DNA, která kóduje odvozenou proteinovou sekvenci obsahující identický úsek sekvence jako fragment CNBr použitý ke konstrukci sondy 1.

Sonda 2 [5'-GATCTTGGTCTAATCCCT-3'], nedegenerovaný 18-merový oligonukleotid, se syntetizuje s použitím sekvence na 5'-konci klonu I. Tato sonda identifikuje jeden ze dvou produktů štěpení genomové DNA bakteriofága E pomocí SmaI, který se projevuje jako singletový ekvivalent k asi 3,3 kb. Štěpením insertu DNA klonu I pomocí SmaI se ověří, že tento fragment kóduje sekvenci DNA před 5'-koncem klonu I. Výsledek tohoto štěpení ukazuje, že v insertu DNA klonu I jsou alespoň 3



místa *SinI* a největší fragment má 1,1 kb. Protože restriční analýza DNA bakteriofága E ukazuje, že v celém genomu jsou pouze dvě místa *BglII*, štěpí se gelově čištěné fragmenty *SinI* pomocí *BglII* a fragment obsahující sekvenci rozpoznávající sondu 2 a místo *BglII* poskytuje dva fragmenty 2,1 kb a 1,1 kb. 2,1 kb fragment štěpení *SinI* x *BglII* je klonován do Bluescript SK+ ligací konce *BglII* ke konci *BamHI* s následným vyplněním konců pomocí Klenowova fragmentu T4 DNA polymerázy a ligací vzniklých tupých konců pro vytvoření kruhového plasmidu. Porovnáním s N-terminální sekvencí aminokyselin ~ 76 kDa enzymové podjednotky se zjišťuje, že vzniklý klon (klon 2) obsahuje otevřený čtecí rámeček kódující N-terminální konec endosialidázy K1E. Pro klony 1 a 2 se získají ve směru 5' i 3' překrývající se sekvence a polohy otevřených čtecích rámečků se zjistí analýzou kodonové preference a polohové preference bází (Staden a spol. (1982) *Nuc. Acids Res.* 10, 141-156, a Staden (1990) *Meth. Enzymol.* 183, 163-180).

Z klonu 2 se čistí rekombinantní plasmidová DNA, linearizuje štěpením v jediném místě *EcoRI* a RNA, navázaná na čepičku 5', se přepíše pomocí SP6 RNA polymerázy a soupravy mCAP pro navázání mRNA na čepičku (Stratagene Inc.). Translační reakce (25  $\mu$ l) *in vitro* se provádějí s použitím 0,1  $\mu$ g transkriptu RNA, 20  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]methioninu a systému králíčího retikulocytového lyzátu podle pokynů výrobce (Promega Inc.). Potvrzení, že systémy SP6 RNA polymerázy a translace *in vitro* jsou funkční, se získá současným prováděním pozitivních kontrol. Kontrolní plasmid je linearizovaný konstrukt SV64-karboxypeptidáza E s předřazenou oblastí promotoru SP6 (Fricker a spol. (1989), *Mol. Endocrinol.* 3, 666-673).

Z klonu 1 se pomocí *EcoRI* a *XbaI* vyřízne fragment DNA bakteriofága E o velikosti 1892 bp, obsahující kompletní insert klonu 1. Ten je směrově klonován do vektoru pGEM-IIz (Promega Inc.), vyříznutého stejnými restričními enzymy, takže místo *SacI* je umístěno v poloze 3' vzhledem k insertu klonu 1. Z tohoto nového konstrukt se vyřízne fragment *SacI*/*AvrII* 707 bp. Tento fragment 707 bp kóduje předpokládaných C-terminálních 114 aminokyselin endosialidázy a 3' nepřeloženou oblast DNA K1E. Liguje se do 3253 bp produktu štěpení klonu 2 pomocí *SacI*/*AvrII*. Vzniklý plasmid (klon 3) obsahuje pouze krajní oblasti 5' a 3' původně klonované DNA K1E ve vektoru Bluescript SK+ a skutečně neobsahuje středových 2975 bp sekvence DNA, která zahrnuje sekvenci kódující předpokládaný otevřený čtecí

rámec endosialidázy. Ke klonu 3, štěpenému pomocí AvrII, se liguje fragment 2975 bp, odvozený od produktu štěpení celkové DNA K1E pomocí AvrII. Vzniklý konstrukt v Bluescript SK+ (klon 4) obsahuje plnou délku genu endosialidázy, předtím kódovaného v klonech 1 a 2; gen se sekvenuje pomocí soupravy Sequenase 2.0 (USB Corp.). Jeho sekvence je znázorněna jako SEQ ID NO: 1.

## Příklad 2

### Příprava rekombinantního plasmidu pro expresi endosialidázy bakteriofága E

Klon 4, tj. konstrukt DNA obsahující kompletní otevřený čtecí rámec endosialidázy, připravený podle příkladu 1, se s použitím primerů

5'-CCGGGGATCCATGATTCAAAGACTAGGTTCTTCATTA-3' a

3'-CGTTAGACGACGTGCGGTCTTGTGTATCTTAAGACAC-5'

podrobí PCR pro usnadnění amplifikace otevřeného čtecího rámce endosialidázy se zabudováním restrikčního místa BamHI na 5'-konci a restrikčního místa EcoRI na 3'-konci otevřeného čtecího rámce.

Produkt PCR 2483 bp se čistí extrakcí nejprve směsí stejných objemů fenolu (ekvilibrovaného na pH 8,0 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diolem) a směsí chloroformu a isoamylalkoholu 24:1, pak samotnou směsí chloroform : isoamylalkohol s následujícím srážením ethanolem a resuspendováním v pufru TE (10 mM 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diolhydrochlorid, 1 mM EDTA, pH 8,0). Přečištěný produkt PCR a expresní vektor pGEX-2T (Pharmacia Biotech) se současně štěpí pomocí BamHI a EcoRI a čistí elektroforézou na agarózovém gelu a extrakcí Qiaex (Quiagen Corp.). Vyříznutý produkt PCR se liguje podle pokynů výrobce pomocí T4 DNA ligázy (New England Biolabs) s expresním vektorem za vzniku rekombinantního vektoru, který se sekvenuje pomocí soupravy USB Sequenase 2.0 přes dvě klonovací místa pro potvrzení, že byl zachován správný čtecí rámec.

## Příklad 3

## Transformace a exprese

Produkt ligace podle příkladu 2 se použije k transformaci elektrokompetentních buněk *E. coli* MC 1061 pomocí elektroporačního zařízení Bio Rad a transformované buňky se selektují restriční analýzou vzorku miniprep DNA získaného z buněk.

Za účelem exprese fúzního proteinu se transformované buňky kultivují přidavkem IPTG do konečné koncentrace 0,5 mM, kdy  $OD_{600}$  dosáhla 0,3, a pak se nechají růst ještě 4 h při 37 °C za míchání s rychlostí otáčení 250 min<sup>-1</sup>. Exprimovaný fúzní protein se čistí z kultivačního média vazbou na glutathionové kuličky postupem podle Smitha a Johnsona (1988) *Gene* 67, 31-40.

Vzorky bakteriální kultury a čištěných frakcí fúzního proteinu se podrobí SDS-PAGE, elektroforeticky přenesou na nitrocelulózovou membránu, promyjí a hybridizují s antiendosialidázovým polyklonálním antisérem metodou podle Sambrooka a spol. (1989). Imunoreaktivní pásy se detekují vazbou sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou a reakcí s (a) 50 mg/ml roztoku nitromodři tetrazoliumchloridu ve směsi dimethylformamidu a vody 70:30 a (b) 50 mg/ml roztoku disodné soli 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfátu ve vodě.

Uvolňování N-acetylneuraminové kyseliny (NANA) z polysialové kyseliny čištěnými frakcemi fúzního proteinu se měří s použitím testu TBA podle Horgana (1981) *Clin. Chim. Acta* 116, 409-415. Měření ukazují, že rychlost uvolňování NANA je přímo úměrná koncentraci fúzního proteinu. Je-li fúzní protein nahrazen proteinem glutathion S-transferázou samotným, není pozorováno žádné uvolňování NANA.

## SEKVENČNÍ PROTOKOL

- (I) INFORMACE PRO SEQ ID NO: 1
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 2436 párů bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: dvouřetězcová
  - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)
  - (iv) PŮVODNÍ ZDROJ:
    - (A) ORGANISMUS: bakteriofág E
  - (ix) ZNAK:
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: CDS
    - (B) POZICE: 1..2436
  - (D) JINÉ INFORMACE: /produkt = „kódující oblast pro endosialidázu bakteriofága E“
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1

H I O R L G S S L V K F K S K I A G A I H R N L D D K L T E V V S L K D F G A K  
 ATGTTCAAGACGTA GGTTCATTAAGT NAAITCAAGATGAA ATGACGGTCAATC TCCCTTAAGTCAAT GACAAAGTCAAGCAG GTTGAATGCTTAA GATTTGACGACAA  
 G D G K T N D O D A V N A A N H A S G K R I D G A G A T Y R V S S L P D H E R F Y  
 GGTATGCTAGACA AACGACCAAGTGA GAAATCCAGGAC GCTTCAAGACGA ATTCAGTCAAGTA TCAITTTAGCTGA ATGACGCAATAT  
 N T R F V H E R L A G O P L Y Y V S K G F I N G E L Y K I T D N P Y Y N A H P O  
 AACCCCGTTCGTA TGGAAAGCTTAGA GGTCAAGCTTTAC TATGATAGTAACT TITATCAATGCTGA CTCTAATCAATGACG GATTAAGCTTATAC ATGCTTGGCTTAA  
 D K A F V Y E N V I Y A P Y H G S D R H G V S R L H V S W V K S G D D G O T W S  
 GACAAAGCTTGA TATGAAAGGTA TATGACCTTACAG GTTAAAGCTTCAAT GGTGATGCTTCTG GATGATATGCTTGT AACCTTGTAGCAAT GGTCAAGATGCTT  
 T P E M L T D H H P D Y H T V N Y H G H S H G V G R N R L P A H I E T R T L A K  
 ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA GATTAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA ACTCAAGCTTGA  
 M E L T N C A L W D R P H S R S L H L T G G I T K A A N O R Y A T I H V P D H G  
 AACCAATCAAGCAI TGTGATGCTTGA GGTCAATGCTTGA GGTCAATGCTTGA GGTCAATGCTTGA GGTCAATGCTTGA GGTCAATGCTTGA GGTCAATGCTTGA  
 L F V G D F V N F S N S A V T G V S G D H K V A T V I D K D N F T V L T P N O O  
 CTCTGCTTGTCAI TTGTTACTTCTT MACTTGGCTTAA GGTGATGCTTGAAT ATGAAAGTTCAGCA GAAATCAATGACAG AACCTTCAAGCTTGT AACCTTCAAGCTTGT  
 T S D L N N A G K N M H H G T S F H K S P W R K T D L G L I P R S V T E V H S F A  
 ACTCAAGCTTGAI AACCTTCAAGCTTGT TGCACAGCTTGT TCTTCAATGCTTGT CCGTCAAGCTTGT CCGTCAAGCTTGT CCGTCAAGCTTGT CCGTCAAGCTTGT  
 T I D N N G F F V H G Y H O G D V A P R E V G L F Y F P D A F N S P S N Y V R R O  
 ACTTATCAAGCAI GCTTGTGATGCTTGT TATCAATGCTTGT GATCAAGCTTGT GATCAAGCTTGT GATCAAGCTTGT GATCAAGCTTGT GATCAAGCTTGT  
 I P S E Y E P D A A E P C I K Y Y D G V L Y L I T R G T R G D R L G S S L H R S  
 ATCAAGCTTGAAT GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA GACCAAGCTTGA  
 R D I G Q T W E S L R F P H N V H H T T I L P F A K V G D D L I H F G S E R A E N  
 AACCAATCAAGCAI ACTTCAAGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT  
 E H F A G A P D D R Y K A S Y P R T F Y A R L N V N N W N A D D I E M V N I T D  
 GATGCAAGCAAGT GCACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT  
 Q I Y O G D I V N S S V G V G S V V V K D S F I Y Y I F G G E N H F N P H T Y G  
 GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT GAAATCAAGCTTGT  
 D N K D K D P F K G H G H P T D I Y C Y K H O I A N D N R V S R K F T Y G A T P  
 GACCAAGCAAGCA GACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT TACCAAGCTTGT  
 G O A I P T F H G T D G I R N I P A P L Y F S D N I V T E D T K V G H L T L K A  
 GGTCAAGCTTACT ACTTCAAGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT TATCAATGCTTGT  
 S T S A N I R S E H O H E G E Y G F I G K S V P K D K P T G O R L I I C G G E G  
 AACCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT ATCAAGCTTCAAT  
 T S S S S G A O I T L H G S N S S N A K R I T Y N G N E H L F O G A P I H P A V  
 ACTTCAAGCTTCA GGTCAAGCTTCA TATCAAGCTTCA TATCAAGCTTCA TATCAAGCTTCA TATCAAGCTTCA TATCAAGCTTCA  
 D N O F A A G G P S N R F T T I Y L G S D P P V T T S D A D H K Y G I S S I N T K  
 GATTAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT  
 V L K A H S R V G F K O Y G L N S E A E R N L D S I H F G V L A O D I V A A F E  
 GGTTAAAGCTTGT AACCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT  
 A E G L D A I K Y G I V S F E E G R Y G V R Y S E V L I L E A A Y T R H R L D K  
 GGTAAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT  
 L E E H Y A T N K I S \*  
 TTAGCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT TATCAAGCTTGT

120  
 240  
 360  
 480  
 600  
 720  
 840  
 960  
 1080  
 1200  
 1320  
 1440  
 1560  
 1680  
 1800  
 1920  
 2040  
 2160  
 2280  
 2400  
 2436

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní protein mající enzymatickou aktivitu bakteriofágové endosialidázy, získatelný expresí z rekombinantního vektoru zahrnujícího sekvenci DNA, kódující bakteriofágovou endosialidázu, vázanou na sekvenci DNA expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy, přičemž uvedený protein zahrnuje endosialidázu vázanou k uvedenému polypeptidu přímo nebo přes raménko, nebo analog tohoto proteinu, jímž je mutanta, funkční fragment nebo derivát tohoto proteinu mající endosialidázovou enzymatickou aktivitu.

2. Protein nebo analog podle nároku 1, kde sekvence DNA kódující endosialidázu je odvozena z konstruktu DNA kódujícího aminokyselinové zbytky kódované nukleotidy 172 až 1744 SEQ ID NO: 1.

3. Protein nebo analog podle nároku 1, kde sekvence DNA kódující endosialidázu je odvozena z konstruktu DNA kódujícího aminokyselinové zbytky kódované nukleotidy 1 až 2436 SEQ ID NO: 1.

4. Protein nebo analog podle nároku 1, 2 nebo 3, kde polypeptidem je glutathion S-transferáza.

5. Protein podle nároku 4, zahrnující endosialidázu bakteriofága E vázanou na glutathion S-transferázu.

6. Protein nebo analog podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, kde sekvence DNA kódující endosialidázu je odvozena od konstrukt DNA zahrnujícího fragment DNA kódující endosialidázu, klonovaný do bakteriálního klonovacího vektoru.

7. Protein nebo analog podle nároku 6, kde fragment DNA je odvozen od genomové DNA bakteriofága E nebo syntetické DNA, která je s ní v podstatě homologní.

8. Protein nebo analog podle nároku 6 nebo 7, kde konstrukt DNA je amplifikován polymerázovou reakcí s použitím primerů zahrnujících restrikční místa.

9. Rekombinantní vektor, zahrnující sekvenci DNA kódující endosialidázu bakteriofága E, vázanou na sekvenci DNA expresního vektoru, který exprimuje polypeptid, který se aduje na N-terminální konec endosialidázy, přičemž uvedený rekombinantní vektor je schopen řídit expresi uvedeného proteinu v kompatibilní hostitelské buňce.

10. Rekombinantní vektor podle nároku 9, kde uvedenou kódující sekvencí DNA je konstrukt DNA podle kteréhokoli z nároků 6 až 8.

11. Rekombinantní vektor podle nároku 9 nebo 10, kde expresním vektorem je prokaryotický expresní vektor.

12. Rekombinantní vektor podle kteréhokoli z nároků 9 až 11, kde expresním vektorem je vektor pGEX.

13. Rekombinantní vektor podle kteréhokoli z nároků 9 až 12, kde expresním vektorem je vektor pGEX-2T.



14. Způsob výroby proteinu podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, vyznačující se tím, že se kultivuje hostitelská buňka transformovaná rekombinantním vektorem podle kteréhokoli z nároků 9 až 13 za podmínek umožňujících expresi uvedeného proteinu a takto získaný protein se izoluje.

15. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že hostitelskou buňkou je mikrobiální buňka.

16. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že hostitelskou buňkou je buňka E. coli.

17. Hostitelská buňka, transformovaná rekombinantním vektorem podle kteréhokoli z nároků 9 až 13.

18. Hostitelská buňka podle nároku 17, kterou je transformovaná mikrobiální buňka.

19. Hostitelská buňka podle nároku 17, kterou je transformovaná buňka E. coli.

20. Farmaceutický přípravek, vyznačující se tím, že zahrnuje protein nebo analog podle kteréhokoli z nároků 1 až 8 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, popřípadě spolu s fyziologicky přijatelným nosičem.

21. Protein nebo analog podle kteréhokoli z nároků 1 až 8 pro použití při diagnóze nebo léčení chorobného stavu.



22. Použití proteinu nebo analogu podle kteréhokoli z nároků 1 až 8 pro přípravu léčiva pro diagnózu nebo léčení meningitidy nebo jiného stavu vyvolaného *E. coli* K1 nebo jinou bakterií exprimující polysialovou kyselinu na svém buněčném povrchu, rakoviny charakterizované expresí polysialové kyseliny na povrchu nádorové buňky nebo nádorové metastázy.

23. Použití proteinu nebo analogu podle kteréhokoli z nároků 1 až 8 při analýze glykoproteinu.

24. Způsob léčení stavu vyvolaného bakterií exprimující polysialovou kyselinu na svém buněčném povrchu, rakoviny charakterizované expresí polysialové kyseliny na povrchu nádorové buňky nebo nádorové metastázy, vyznačující se tím, že se teplokrevnému savci, vyžadujícímu takové léčení, podává protein nebo analog podle nároku 1.