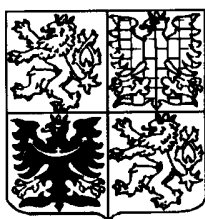


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 28.04.94
(32) 29.06.93
(31) 93/086427
(33) US
(40) 17.07.96

(21) 3437-95

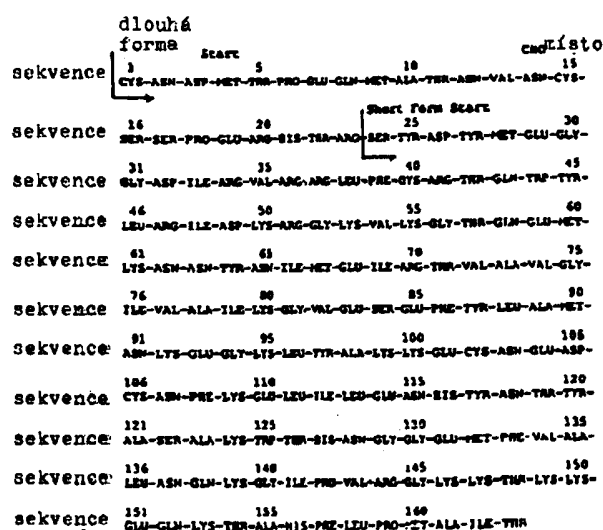
(13) A3

6(51)

C 12 N 15/12
C 07 K 14/50
A 61 K 38/18
A 61 K 47/48

- (71) CHIRON CORPORATION, Emeryville, CA, US;
(72) Gospodarowicz Denis J., Lafayette, CA, US;
Masiarz Frank, San Francisco, CA, US;
(54) **Zkrácený keratinocytový růstový faktor /KGF/,
mající zvýšenou biologickou aktivitu**

- (57) Předložený vynález se týká fragmentu keratinocytového růstového faktoru, KGF_{desl-23}, který je složen z části aminokyselinové sekvence zralého keratinocytového faktoru plné délky, KGF₁₆₃. Část vykazuje alespoň 2násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým, rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem, rKGF postrádá sekvenci, zahrnující prvních 23 aminokyselinových zbytků, C-N-D-M-T-P-E-Q-M-A-T-N-V-N-C-S-S-P-E-R-H-T-R z KGF₁₆₃ N-konce. Předložený vynález se také týká DNA molekuly, kodující KGF_{desl-23}, expresního vektoru a transformovaného hostitele, obsahujícího DNA molekulu a způsobu produkce KGF_{desl-23} kultivací transformovaného hostitele. Předložený vynález se dále týká KGF_{desl-23} a toxinové molekuly a jeho použití pro léčbu hyperproliferativní choroby epidermu. Navíc se předložený vynález týká terapeutické kompozice, obsahující KGF_{desl-23} a farmaceuticky přijatelný nosič a jejího použití pro uzdravování ran.



JUDr. Otakar ŠVORČÍK
advokát

Zkrácený keratinocytový růstový faktor (KGF), mající
zvýšenou biologickou aktivitu

Oblast techniky

Předložený vynález se týká obecně keratinocytového růstového faktoru (keratinocyte growth factor - KGF). Specifičtěji se tento vynález týká zkráceného KGF fragmentu a jeho analogů, majících zvýšenou biologickou aktivitu a sníženou toxicitu ve srovnání s rekombinantním KGF plné délky, exprimovaným v systému hmyzích buněk. Tento KGF fragment, označený zde jako KGF_{deal-23} postrádá prvních 23 aminokyselinových zbytků od N- konce zralého KGF plné délky, kde tento konec zahrnuje glykosylační místo při aminokyselinových zbytcích 14 až 16 od N-konce jak je uvedeno Finchem P.W. a spol., Science 245:752-755 (1989) a byl dříve považován za propůjčující KGF jeho epitheliální buněčnou specifitu.

Oblast techniky

KGF patří do rodiny fibroblastových růstových faktorů ("FGF"), jejichž prototypem je bázeický FGF ("bFGF"). KGF je proto také označován jako FGF-6. Podobně jiné FGF, je KGF heparin vázající protein, ale na rozdíl od jiných FGF, má jedinečnou specifitu cílových buněk. Podrobněji jsou FGF obecně schopny stimulovat proliferaci a diferenciaci různých typů buněk odvozených od primárního nebo sekundárního mesodermu jakož i z neuroectodermu. KGF je podobný jiným FGF ve své schopnosti stimulovat epitheliální buněčnou proliferaci, ale liší se od jiných FGF svojí neschopností stimulovat endotheliální buňky nebo proliferaci fibroblastů, jak popisuje Finch P.W. a spol. (loc.cit.)

FGF, zahrnující acidický fibroblastový růstový faktor ("aFGF") a bázeický fibroblastový růstový faktor ("bFGF"), jsou známy jako mající heparin vázající vlastnosti a mající schopnost indukovat diferenciaci a proliferaci ventrálního i dorsálního mesodermu v ranných blastulích, jak popisuje Gospodarovicz a spol., Cell.Biol.Rev. 29:307-314 (1991) a Basilico a spol., Adv.Cancer Res. 59:115-165 (1992). Odezva buněk na FGF je zprostředkována jejich vazbou k buněčným povrchovým receptorům ("FGFR"), od kterých jsou odvozeny tři intertypy, jak popisuje Hou a spol., Science 251:665-668 (1991). Vysoce afinitní FGFR jsou tyrosin kinázy a zahrnují Flg receptor ("FGFR-1"), bek receptor ("FGFR-2") a K Sam receptor ("FGFR-3"), jak uvádí Lee a spol., Science 245:57-60 (1989); Dionne a spol., EMBO 9:2685-2692 (1990); Miki a spol., Science 251:72-75 (1991); Miki a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89:246-250 (1992) a Dell a spol., J.Biol.Chem. 267:21225-21229 (1992).

Jak FGFR-1 tak FGFR-2 jsou silně exprimovány v mesodermálních a neuroendodermálních tkáních a oba jsou schopny vázat aFGF a bFGF s podobnými afinitami. FGFR-3 je KGF receptor, který je specifický k epitheliálním buňkám. Je to alternativní transkript FGFR-2. Na rozdíl od FGFR-2, který vykazuje vysokou afinitu jak pro aFGF tak bFGF a nevykazuje afinitu pro KGF, FGFR-3 váže KGF a aFGF s afinitou přibližně 20 až 1000krát vyšší než bFGF, jak popisuje Miki a spol. (loc.cit.) a Dell a spol. (loc.cit.).

Úzce omezená aktivita profilu KGF k epitheliálním buňkám je žádoucí například jak v mnoha typech aplikací hojení ran tak při léčbě hyperproliferativních chorob epidermu jako je psoriasis a karcinom bazálních buněk. V

současnosti, s výjimkou KGF neexistuje pro tyto aplikace žádný vysoce vhodný mitogenický faktor. Je proto žádoucí, aby KGF byl modifikován pro zvýšení své potence s snížení své cytotoxicity pro terapeutické aplikace

V poslední době zjistili Ron a spol., J.Biol.Chem., 268:2984-2988 (únor 1993), že jestliže byl KGF₁₆₃ exprimován v T7 prokaryotickém expresním systému, měl by být získán rekombinantní KGF ("rKGF") polypeptid, který vykazuje mitogenickou aktivitu. Jestliže byla rKGF molekula zkrácena delecí 3,8,27, 38 a 48 aminokyselinových zbytků, od N- konce zralého KGF₁₆₃ polypeptidu, mění se biologická aktivita výsledných molekul. S delecí 3 a 8 aminokyselinových zbytků se mitogenická aktivita výsledných molekul nejeví jako býti ovlivněná v porovnání s rKGF plné délky ("rKGF₁₆₃"). Delece 27 aminokyselinových zbytků nicméně vede k 10 až 20krát snížené mitogenické aktivitě. Delece 38 a 48 aminokyselinových zbytků, vede k úplné ztrátě mitogenické aktivity a heparin vázající aktivity. Ron a spol. nebyli úspěšní při produkci jakýchkoliv zkrácených KGF fragmentů, které vykazují zvýšenou mitogenickou aktivitu ve srovnání s rKGF₁₆₃ molekulou.

Podstata vynálezu

Jedním objektem předloženého vynálezu je poskytnout KGF fragment, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci zralého KGF plné délky, KGF₁₃₆ a vykazuje alespoň 2násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání s rekombinantním KGF plné délky, rKGF₁₃₆. Zvláštním objektem je poskytnutí KGF fragmentu, který postrádá sekvenci, obsahující prvních 23 N-koncových

aminokyselinových zbytků, C-N-D-M-T-P-E-Q-M-A-T-N-V-N-C-S-S-P-E-R-H-T-R- z rKGF₁₆₃.

Dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnutí KGF fragmentu, který má sníženou cytotoxicitu ve srovnání s KGF₁₆₃. Ještě dalším objektem je poskytnout konjugát, který obsahuje KGF fragment popsany výše a toxinovou molekulu. Toxinovou molekulou může být alespoň jedna z molekul ricinu A, difteria toxinu a saporinu.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí terapeutické kompozice, která obsahuje KGF fragment jak je popsán výše a farmaceuticky přijatelný nosič, například některý z těch, které jsou vhodné pro topickou aplikaci na lidskou kůži.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnout DNA molekulu, která je složena z nukleotidové sekvence, která koduje KGF fragment popsany výše.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnout expresní vektor, který obsahuje DNA molekulu, která koduje KGF fragment, popsany výše, a regulátorovou sekvenci pro expresi DNA molekuly. Expresním vektorem může být například bakulovirus.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnutí hostitelské buňky transformované výše popsáním expresním vektorem. Hostitelskou buňkou může například být bakteriální buňka, kvasinková buňka, savčí buňka nebo hmyzí buňka.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnutí způsobu produkce KGF fragmentu kultivací

transformované hostitelské buňky jak popsáno výše a izolace KGF fragmentu z kultury.

Ještě dalším objektem předloženého vynálezu je poskytnutí metody stimulace růstu epitheliálních buněk aplikací KGF fragmentu na plochu, ve které je požadován růst epitheliálních buněk a ponechání těchto buněk růst.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnout metodu pro hojení ran aplikací terapeutické kompozice popsané výše na plochu ošetřované rány a ponechání rány, aby se zahojila.

Ještě dalším z objektů předloženého vynálezu je poskytnout způsob léčby hyperproliferativní choroby epidermu aplikací konjugátu popsaného výše na ošetřovanou plochu.

Další objekty, rysy a výhody předloženého vynálezu by měly být zřejmé odborníkům v oboru a není třeba je zde uvádět. Předložený vynález zahrnuje varianty a modifikace výše uvedeného, které jsou zjevné odborníkům v oboru a které podstatně nemění charakter a aktivitu fragmentu, konjugátu, terapeutické kompozice, vektoru, hostitele a způsobů použití.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr.1 představuje aminokyselinovou sekvenci zralého, lidského KGF polypeptidu plné délky, začínající N-koncem a obsahující 163 aminokyselinových zbytků a jediným N-připojeným glykosylačním signálem při aminokyselinových zbytcích 14-16.

Obr. 2 představuje pAc13 expresní vektor, do kterého byla inzertována 163 aminokyselinová sekvence KGF.

Obr.3 ilustruje další čištění KGF fragmentu podle předloženého vynálezu z SFP buněčného kondicionovaného media po eluci z Heparin Sepharosové ("HS") kolony pomocí 1M NaCl. Bioaktivní frakce HS kolony byly spojeny, zředěny 5-násobně 10 mM Tris, pH 7,3 a vloženy na Mono S HR5/5 kationtovýměnnou FLPC.

Obr. 4 porovnává biologickou aktivitu dlouhé, tj. fKGF₁₃₆ a krátké tj. KGF_{des1-23} formy KGF proti aFGF na buňkách buněčné linie Balb/Mk.

Obr. 4 porovnává biologickou aktivitu dlouhé, tj. fKGF₁₃₆ a krátké tj. KGF_{des1-23} formy KGF proti bFGF na vaskulárních endotheliálních buňkách získaných z velkých cév (A:ABAE buňky) nebo kapilár (B:ACE buňky).

S překvapením bylo objeveno, že zkrácený, neglykosylovaný KGF, zde označený jako KGF fragment nebo KGF_{des1-23}, mající delecí zahrnující prvích 23 N-koncových aminokyselinových zbytků z rKGF₁₆₃, vykazuje větší biologickou aktivitu a sníženou cytotoxicitu na epitheliálních buňkách ve srovnání s rKGF₁₆₃.

V souladu s výše uvedeným je preferovaným provedením předloženého vynálezu nový zkrácený, neglykosylovaný KGF fragment, KGF_{des1-23}, který není spojen s nečistotami, které normálně doprovázejí nativní molekulu, je-li produkována in vivo. Tento fragment má zjevnou molekulovou hmotnost asi 18 kDa podle její migrace v Na Dod SO₄/PAGE jako jediný pík. Specifická aktivita čištěného KGF_{des1-23} Balb/Mk buněk je přibližně $2,5 \times 10^1$

jednotek na miligram (ED_{50} 40 pg/ml), asi 7- až 10-krát větší než rKGF₁₆₃ protein, nebo aFGF při srovnání ve studii buněčné proliferace a 100krát větší než při biostudii rKGF₁₆₃ zkoušením iniciace DNA syntézy v Balb/Mk buňkách v chemicky definovaném mediu, jak je popsáno v PCT patentové přihlášce č. WO 90/08771.

V dalším výhodném provedení předloženého vynálezu je produkován KGF_{des1-23} rekombinantní DNA technologií, zejména pro komerční výrobu ve velkém měřítku. V dalším výhodném provedení, rekombinantní DNA molekula a expresní vektor, obsahující každý KGF_{des1-23} nebo jejich analogy, v souladu s předloženým vynálezem je provedena standardní technologií genové exprese použitím metod dobře v oboru známých.

V dalším provedení mohou být DNA nebo vektor, obsahující DNA, kodující KGF_{des1-23}, exprimovány v bakteriálním, savčím, kvasinkovém nebo hmyzím buněčném expresním systému. Ve výhodném provedení je bakteriální nebo kvasinkový buněčný expresní systém ideální pro produkci KGF_{des1-23} fragmentu. V dalším výhodném provedení jsou DNA nebo vektor exprimovány v expresním systému hmyzích buněk.

KGF fragment podle předloženého vynálezu může být použit pro identifikaci receptor rozpoznávajících míst jakož i pro sestavení peptidových agonistů nebo antagonistů. Navíc, vzhledem k jedinečné specifitě KGF pro keratinocyty, jeho neschopnosti indukovat proliferaci vaskulárních endotheliálních buněk nebo fibroblastů a jeho netoxicitě je v jiném výhodném provedení předloženého vynálezu KGF_{des1-23} výhodně použit pro aplikaci při hojení ran, zejména tam, kde je žádoucí

promotovat reepitelizaci kůže. Výhodné provedení využívá KGF_{des1-23} v obnově corneálního epitelu. Jiné aplikace KGF_{des1-23} může být založeno na jeho specifitě k epiteliálním buňkám nacházejícím v gastrointestinálním traktu.

Volba KGF fragmentu z jiných růstových faktorů jako je epidermální růstový faktor ("EGF"), od destiček odvozený faktor ("PDGF") a jiné FGF pro hojení kůže závisí na odborníkovi v oboru. Jiné růstové faktory například indukují fibroplasi a angiogenesi, navíc ke stimulaci, buď přímo nebo nepřímo, keratinocytové proliferace. Při hojení kůže by takové další aktivity mohly produkovat nežádoucí vedlejší účinky jako je škárování. V corneálním hojení zahrnujícím buď rány nebo chirurgické zákroky, by toto použití jiných faktorů mohlo indukovat invazi krevních cév do cornea, což by mohlo vést k nežádoucí opacitě cornea nebo k edému. KGF, naopak, má jedinečnou specifitu pro keratinocyty a nevyvolává proliferaci vaskulárních endotheliálních buněk nebo fibroblastů a proto by mohl být činidlem volby pro tyto konkrétní aplikace při hojení ran.

Dále KGF fragment podle předloženého vynálezu může být použit v jiném provedení předloženého vynálezu, ve formě konjugátu KGF fragment/toxin. Takový konjugát může zpomalovat nebo ukončovat chorobný proces v takových chorobách jako je psoriasis, což vyplývá z hyperproliferace bazální vrstvy keratinocytů z epidermis. Tento konjugát by neměl ovlivňovat další dva hlavní buněčné typy jako jsou vaskulární endotheliální buňky a fibroblasty, přítomné v těchto tkáních.

V dalším provedení předloženého vynálezu může být konjugát KGF fragment/toxin k zabránění proliferace nádorových buněk, například bazálních buněk karcinomu.

Praktické provedení předloženého vynálezu bude využívat, pokud není uvedeno jinak, konvenční techniky molekulární biologie, mikrobiologie, rekombinantní DNA a imunologie, které jsou běžné v oboru. takové techniky jsou zcela vysvětleny v literatuře. Viz např. Sambrook a spol., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2.vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); DNA CLONING VOLUMES I AND II, D.N.Glover vyd. IRL Press (1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS M.J.Gait vyd., IRL Press (1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, B.D.Hames & S.J.Higgins vd. IRL Press (1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION, B.D.Hames & S.J.Higgins vyd. IRL Press (1984); ANIMAL CELL CULTURE, R.I.Freshney vyd., IRL Press (1986); B.Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING, [vydavatel] (1984); serie, METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, Inc.; GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS, J.H.Miller a M.P.Calos vyd., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); METHODS IN ENZYMOLOGY, sv. 154 a sv. 155, Wu a Grossman a Wu vyd., [Mayer a Walker, vyd.??? [vydavatel] (1987), IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Academic Pres, Londýn, Scopes[autor?], PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, 2.vyd. (Springer-Verlag, N.Y. rok?) a HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY? VOLUMES I-IV, D.M.Weir a C.C.Blackwell vyd. (vydavatel ? 1986); Kitts a spol., Biotechniques 14:810-817 (1993); Munemitsu a spol., Mol. and Cell.Biol. 10:59777-5982 (1987). [Další].

Na obr.1 byly použity standardní zkratky pro aminokyseliny a stejné jsou použity v tomto popise.

Všechny publikace, patenty a patentové přihlášky jsou zde citovány jako odkazy. Pro přesnost jsou dále definovány nejčastěji se vyskytující výrazy.

Definice

Použitý výraz "keratinocytový růstový faktor" nebo "KGF" označuje polypeptidy, které patří do rodiny strukturně odlišných proteinů, fibroblastových růstových faktorů, FGF, které vykazují různé stupně sekvenční homologie potvrzující, že jsou kodovány příbuznou rodinou genů. KGF má charakteristiky popsané v tomto popise, například se váže k FGFR-3 a je schopen stimulovat růst epitheliálních buněk, zejména keratinocytů. KGF plné délky je tvořen 163 aminokyselinovými zbytky.

Jak je zde použit, podle předloženého vynálezu je KGF fragment polypeptid, který je složen z části aminokyselinové sekvence zralého KGF plné délky. Analog KGF fragmentu, jak je zde označován, zahrnuje minoritní inserce, delece nebo substituce KGF fragmentu, které podstatně neovlivňují. Například, jsou přijatelné náhrady konzervativních aminokyselin. Takové náhrady jsou například ty, které jsou prováděny ve skupině aminokyselin, které jsou příbuzné ve svých postranních řetězcích. Skupiny aminokyselin jsou (1) kyselé: kyselina aspartová, kyselina glutamová; (2) báze: lysin, arginin, histidin; (3) nepolární: alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan a (4) nenabitě polární: glycin, asparagin, glutamin, cystin, serin, threonin, tyrosin. Fenylalanin, tryptofan a tyrosin jsou někdy klasifikovány dohromady jako skupina aromatických aminokyselin. Obecně je přijímáno, že konzervativní aminokyselinové náhrady sestávají z

izolované náhrady leucinu isoleucinem nebo valinem, nebo aspartové kyseliny kyselinou glutamovou, nebo threoninu serinem nebo podobná konzervativní náhrada aminokyseliny strukturně příbuznou aminokyselinou, v oblasti mimo polypeptidové aktivní místo, ještě nebudou mít podstatný vliv na vlastnosti polypeptidu.

Vlastnosti KGF fragmentu zahrnují (i) jeho biologickou aktivitu, která je 2 až 10krát větší, výhodně 2krát, nejvýhodněji 7 až 10krát zvýšená ve stimulaci proliferace epitheliálních buněk ve srovnání s molekulou maturovaného nativního KGF plné délky a(ii) jeho schopnost vázat se k FGFR-3.

Výraz "rekombinantní polynukleotid" jak je zde použit znamená polynukleotid polosyntetického nebo syntetického původu, nebo kodovaný cDNA nebo genomovou DNA ("gDNA"), který (1) není spojen s celým nebo s částí polynukleotidu, se kterým je spojen v přírodě, (2) je spojen s polynukleotidem jiným než tím, ke kterému je připojen v přírodě, nebo (3) nevyskytuje se v přírodě.

"Replikon" je jakýkoliv genetický prvek, jako je plasmid, chromosom, virus, kosmid atd., který se chová jako autonomní jednotka polynukleotidové replikace v buňce; tj. je schopen replikace pod vlastní kontrolou. Replikon může obsahovat například selektující markery.

"Rekombinantní vektor" je replikon, ve kterém je připojen další polynukleotidový segment, takže přináší replikaci a/nebo expresi připojeného polynukleotidového segmentu.

"Regulátorová sekvence" je polynukleotidová sekvence, která je nezbytná pro regulaci exprese kodující sekvence, ke které je polynukleotidová sekvence operabilně připojena. Charakter takových regulátorových sekvencí se liší v závislosti na hostitelské buňce, ve které má být kodující sekvence exprimována. V prokaryotech takové regulátorové sekvence obecně zahrnují například promotor, ribosomální vazebné místo a/nebo transkripční terminační sekvenci. V eukaryotech obecně takové regulátorové sekvence zahrnují promotor a/nebo transkripční terminační sekvenci. Výraz "regulátorová sekvence" může také zahrnovat další složky, jejichž přítomnost je výhodná, například, sekreční leader sekvenci pro sekreci polypeptidu, který je exprimován.

"Operabilně připojený" znamená polohu, kdy jsou složky spojeny ve vztahu, který jim umožňuje působit jejich zamýšleným způsobem. Například regulátorová sekvence je "operabilně připojena" ke kodující sekvenci, která je spojena tak, že exprese kodující sekvence se dosáhne za podmínek kompatibilních s regulátorovou sekvencí.

"Kodující sekvence" je polynukleotidová sekvence, která je translatována do polypeptidu, je-li umístěn pod kontrolou vhodné regulátorové sekvence. Vazby kodující sekvence jsou obecně determinovány translačním start kodonem při jejich 5'-konci a translačním stop kodonem na jejich 3'-konci. Kodující sekvence může zahrnovat, například, cDNA a rekombinantní polynukleotidové sekvence.

"PCR" označuje techniku polymerázové řetězové reakce jak je popsána Saiki-m a spol., Nature 324:163(1986) a Scharfem a spol. Science 233:1076-1078 (1986); US patent č. 4683195 a US patent č. 4683202.

Zde použitý výraz "polypeptid" se týká polymeru aminokyselin a netýká se specifické délky produktu. Peptidy, oligopeptidy a proteiny jsou tak zahrnuty v tomto výrazu. Tento výraz také zahrnuje translační modifikace polypeptidu, například glykosylace, acetylace, fosforylace a podobně. Dále v této definici jsou například zahrnuty polypeptidy se substituovanými vazbami, jakož i jinými modifikacemi známými v oboru, jak přirozeně se vyskytující tak nepřirozeně se vyskytující.

"Terminátory" jsou regulátorové sekvence, jako jsou polyadenylační a transkripční terminační sekvence, umístěné 3' nebo ve směru od stop kodonu kodujících sekvencí.

"Rekombinantní hostitelské buňky", "hostitelské buňky", "buňky", "buněčné kultury" a jiné výrazy znamenají, například, mikroorganismy, hmyzí buňky a savčí buňky, které mohou být nebo byly použity jako příjemce pro zavedení rekombinantního vektoru nebo jiné transferové DNA a zahrnují předky buňky, která byla transformována. Takoví předci zahrnují ty, které musí být nezbytně shodné v morfologickém nebo genomickém nebo celkovém DNA komplementu jako původní rodič a které mohou být produkovány jako výsledek přirozené, accidentální nebo deliberační mutace. Příklady takových hostitelských buněk zahrnují buňky vaječníků čínského křečka ("CHO") a opičích ledvin ("COS").

Zde použitý výraz "mikroorganismus" zahrnuje prokaryotické a eukaryotické mikrobiální druhy jako jsou bakterie a plísňe, kde posledně uvedené zahrnují kvasinky a vláknité plísňe.

"Transformace" jak je zde použita, označuje přenesení exogenního polypeptidu do hostitelské buňky, včetně způsobu použitého pro přenesení, kterým může například být infekce, přímý příjem, transdukce, F-mating, mikroinjekce nebo elektroporace. Exogenní polynukleotid může být udržován jako neintegrováný vektor, například plasmid, nebo alternativně může být integrován do hostitelova genomu.

"Čištěný" a "izolovaný" v souvislosti s polypeptidem nebo nukleotidovou sekvencí znamená, že uvedená molekula je přítomna za v podstatě nepřítomnosti jiných biologických makromolekul stejného druhu nebo typu. Výraz "čištěný" jak je zde použit znamená, že je přítomno alespoň 75 % hmotn., výhodně alespoň 85 % hmotn., výhodněji alespoň 95 % hmotn. a nejvýhodněji alespoň 98 % hmotn. biologických makromolekul stejného typu, ale mohou rovněž být přítomny voda, pufrý a jiné malé molekuly, zejména molekuly, mající molekulovou hmotnost menší než 1000.

"Farmaceuticky přijatelným nosičem je míněn jakýkoliv nosič, který může být použit odborníky v oboru pro podání člověku, který sám nevyvolává jakékoliv nežádoucí vedlejší účinky jako je produkce protilátek, horečku atd. Vhodné nosiče jsou typicky velké, pomalu metabolizující makromolekuly, kterými mohou být protein, polysacharid, polymléčná kyselina, polyglykolová kyselina, polymerní aminokyselina, aminokyselinové

kopolymery nebo inaktivní virová částice. Jiné nosiče mohou být ty, které jsou známy odborníkům v oboru. Výhodně nosič obsahuje thyroglobulin.

Terapeutický přípravek typicky bude obsahovat farmaceuticky přijatelné nosiče jako je voda, salinický roztok, glycerol, ethanol atd. Dále mohou být v takových přípravcích přítomny pomocné složky jako jsou smáčecí nebo emulgační činidla, pH pufrující složky a podobně.

"Terapeuticky účinným množstvím" je zde míněno množství, které je účinné pro dosažení požadovaného výsledku. Toto množství se mění v závislosti na zdravotním a fyzickém stavu léčeného jednotlivce, schopnosti imunitního systému jednotlivce syntetizovat protilátky, na stupni požadované ochrany, přípravku, hodnocení situace ošetřujícím lékařem a jiných relevantních faktorech. Předpokládá se, že množství bude spadat do relativně širokého rozmezí, které je možno stanovit rutinními pokusy.

Neočekávaně bylo nalezeno, že je-li KGF exprimován ve hmyzích buňkách, *Spodoptera frugiperda* ("SF9"), při infekci rekombinantním bakulovirem, *Autographa californica*, obsahujícím cDNA, kodující KGF₁₆₃, tyto produkují KGF fragment, který postrádá prvních 23 aminokyselinových zbytků KGF₁₆₃ N-koncové domény, obsahující jediné glykosylační místo, navíc ke KGF₁₆₃. Zkrácený a neglykosylovaný KGF fragment KGF_{des1-23} nebo KGF₁₄₀, narozdíl od nativní dlouhé formy identifikované jako KGF₁₆₃, má 7- až 10-krát zvýšenou potenci u cílových buněk. Specifita cílových buněk pro KGF_{des1-23} je nezměněna. Dále, při vysokých koncentracích KGF fragmentu, není pozorován na rozdíl od KGF₁₆₃ žádný

toxický účinek. Tato pozorování potvrzují, že na rozdíl od toho, co bylo popsáno v PCT přihlášce č. WO 90/08771, specifita KGF pro cílové buňky není dána jeho N-koncovou doménou. Dále předložený vynález ukazuje, že N-koncově zeslabená verze KGF ve skutečnosti představuje zlepšenou verzi KGF s vyšší biologickou aktivitou a sníženou cytotoxicitou pro terapeutickou aplikaci.

Velké množství KGF fragmentu může být produkováno rekombinantními DNA technikami, což je výhodné oproti alternativnímu způsobu izolace a čištění KGF z přírodních zdrojů a štěpení prvních 23 aminokyselinových zbytků z jejich N-konce. KGF produkováný rekombinantními technikami umožňuje, aby byl KGF izolován za nepřítomnosti kontaminujících molekul, které jsou normálně přítomny v buňkách. Ve skutečnosti, KGF kompozice zcela prosté jakýchkoliv stop lidských proteinových kontaminantů mohou být snadno produkovány například v bakteriálních buňkách, kvasinkových buňkách a hmyzích buňkách. Při použití rekombinantních DNA technik mohou být také produkovány místně řízenou mutagenesí.

Jakýkoliv promotor, který by mohl umožnit expresi KGF fragmentu v požadovaném hostiteli, může být použit v předloženém vynálezu. Například v *E.coli* může být použita regulátorová sekvence lac operonu. Jiným příkladem je kvasinkový alkohol dehydrogenáza ("ADH") promotor, který má sekvenci proti směru aktivátoru (upstream activator sequence "UAS"), která moduluje aktivitu ADH promotoru. Dále mohou být také použity určité virové enhancery. Takové enhancery nejen amplifikují, ale také regulují expresi v savčích buňkách. Tyto enhancery mohou být inkorporovány do savčích promotorových sekvencí, které budou aktivovány pouze za přítomnosti induktoru jako je

hormonový nebo enzymový substrát jak je popsáno v Sassone-Corsi a Borelli, Trends Genet. 2:215 (1986); Maniatis a spol., Science 236:1237 (1987). Promotory, které mohou být použity v předloženém vynálezu také zahrnují bakulovirový polyhedron hybridní promotor a p10 promotor.

Příklady terminačních sekvencí, které mohou být použity v předloženém vynálezu jsou *Saccharomyces cerevisiae* alfa-faktor terminátor a bakulovirus terminátor. Dále mohou také být použity virální terminátory, které jsou operabilní v určité hostitelské buňce. Například SV40 terminátor je funkční v buňkách vaječníku čínského křečka (CHO).

Při vytváření zkrácených proteinů jsou některé KGF preferovány při praktickém provedení vynálezu. Jedním je neglykosylovaný KGF, například zkrácením 23 aminokyselin nativního KGF. cDNA, kodující preferovaný zkrácený KGF je uvedena na obr.1. Jiné druhy KGF fragmentů existují nebo mohou být vytvořeny rutinními metodami. V uvedené sekvenci se může objevit pro zkrácený protein štěpící místo označené závorkou (a), což poskytne protein mající molekulovou hmotnost asi 18000 Da. Použitím sekvenčních dat na obr. 1 jakož i uvedených charakteristik zkráceného KGF, může odborník v oboru získat jiné DNA sekvence, kodující zkrácený KGF. Například může být strukturální gen může být zpracován měněním jednotlivých nukleotidů, při zachování správných aminokyselin, nebo měněním nukleotidů, tak, že se modifikují aminokyseliny, bez ztráty biologické aktivity. Nukleotidy mohou být nahrazeny, inzertovány nebo deletovány známými technikami, zahrnujícími například *in vitro* mutagenezi a primerovou reparaci. Strukturální gen může být zkrácen na

svém 3'-konci a/nebo svým 5'-konci a udržet si svoji biologickou aktivitu.

KGF fragment kodující sekvenční může být konstruována syntézou DNA sekvenční, kodující KGF fragment nebo změnou existující nebo nativní KGF kodující sekvenční pro produkci požadované sekvenční. Nativní KGF kodující sekvenční nebo polypeptid jsou ty, které se objevují v přírodě. Aminokyselinová sekvenční nativního KGF je uvedena na [obr. X]. Syntetický KGF fragment může být vyroben na bázi známé aminokyselinové sekvenční KGF použitím kodonů preferovaných zvolenou hostitelskou buňkou jak doporučuje Urdea a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80:7461 (1983). Alternativně může být požadovaný KGF fragment kodující sekvenční klonována z knihoven nukleových kyselin za použití sond na bázi nukleokyselinové sekvenční uvedené na [obr.X]. Techniky pro produkci a sondování knihoven nukleokyselinových sekvencí jsou popsány např. v práci Sambrooka a spol., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Jiné rekombinantní techniky jako je místně specifická mutagenese, PCR, enzymatické štěpení a ligace, mohou být také použity pro konstrukci analogů a derivátů kodující sekvenční KGF fragmentu. Nativní KGF polypeptid kodující sekvenční může být snadno modifikovatelná pro vytvoření jiných tříd KGF polypeptidů.

Například mohou být vytvořeny analogy KGF fragmentu konzervativními aminokyselinovými substitucemi, které nezhoršují aktivitu KGF fragmentu. Předložený vynález dále zahrnuje podskupinu analogů KGF fragmentu zvaných muteiny, ve kterých jsou nesulfidové vazby přítomných cysteinů v KGF fragmentu substituovány, obecně seriny.

Tyto mutace musí být stabilní v širším teplotním rozmezí než nemodifikovaný KGF fragment. Muteiny mohou také obsahovat a minokyselinové delece ve srovnání s nativním KGF fragmentem. Muteiny si budou udržovat alespoň 20 %, výhodně alespoň 50 %, a nejvýhodněji alespoň 80 % aktivity nativního KGF fragmentu. Kodující sekvence muteinů mohou být konstruovány in vitro mutagenezí kodující sekvence nativního KGF fragmentu.

Fragmenty se liší od nativní KGF molekuly amino a/nebo karboxyl terminálními aminokyselinovými delecemi. Počet aminokyselin, které jsou zkráceny není podstatný, pokud KGF fragment neobsahuje N-terminální glykosylační místo a udržuje si alespoň 20 % KGF aktivity nativní KGF molekuly. Kodující sekvence takových fragmentů mohou být snadno konstruovány odštěpením neočekávaných nukleotidů od nativní KGF kodující sekvence nebo jejích variant.

Expresní vektor podle předloženého vynálezu obsahuje promotor, který je operabilní v hostitelské buňce a je operativně připojen ke kodující sekvenci KGF fragmentu nebo analogu. Expresní vektor může popřípadě obsahovat signální sekvenci pro sekreci, terminátor, selektující marker, počátek replikace a sekvence homologní k hostitelským buněčným sekvencím. Tyto další prvky mohou být obsaženy pro optimalizaci exprese.

Mohou také být použity funkčně nepřirozené promotory, například syntetické promotory založené na shodných sekvencích rozdílných promotorů. Také účinnými promotory mohou být hybridní promotory, které obsahují regulátorový region spojený s heterologním expresním iniciačním regionem. Příklady hybridních promotorů jsou E.coli lac operátor spojený s E.coli tac transkripčním

aktivačním regionem; kvasinková alkoholová dehydrogenásová ("ADH") regulátorová sekvence napojená ke kvasinkový glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenásovému ("GAPDH") transkripčnímu aktivačnímu regionu jak je popsáno v US patentech č. 4876197 a 4880734, zahrnuté zde jako odkaz; a cytomegalovirus ("CMV") enhancer napojený k promotoru opičího viru SV40.

Kodující sekvence pro KGF fragment nebo analog podle předloženého vynálezu může být také napojena ve čtecím rámci k signální sekvenci. Signální sekvence typicky koduje aminokyselinovou sekvenci pro sekreci, zahrnující hydrofobní aminokyseliny, které řídí KGF fragment nebo analog k buněčné membráně. Ve výhodném provedení je místo upravení umístěno mezi signální sekvenci a KGF fragment, aby umožnilo štěpení mezi signální sekvencí a KGF fragmentem buď in vivo nebo in vitro. Vhodné signální sekvence jsou ty, které jsou odvozeny od genů pro proteiny sekretované endogenními hostitelskými buňkami, jako je gen kvasinkové invertázy popsáný v EP č. 12873 a japonském patentu č. 62,096,086, gen A-faktoru jak je popsán v US patentu č. 4588684 a intriferonová signální sekvence jak je popsána v EP 60057.

Preferovanou třídou sekrečních leaderů pro použití v předloženém vynálezu pro kvasinkovou expresi je zkrácená kvasinková alfa-faktor sekvence, která obsahuje alespoň část "pre" signální sekvence a "pro" region. alfa-Faktor leaderové sekvence, které mohou zde být použity, zahrnují pre-pro alfa faktor leader plné délky, mající asi 83 aminokyselinových zbytků, jakož i zkrácené alfa-faktor leadery, typicky asi 25 až asi 50 aminokyselinových zbytků, jak je popsáno v US patentech č. 4546083 a 4870008 (a US pat. přihlášce xxxxxx) a evropském patentu

č. EP 324274, zahrnutém zde jako odkaz. Další leadery využívající alfa-faktorový leader fragment, které zde mohou být použity, zahrnují hybridní alfa-faktorové leadery vyrobené s presekvencí od první kvasinkové signální sekvence, ale pro-regionem ze druhého kvasinkového alfa-faktoru (viz např. PCT WO 89/02463).

f. Expresní systémy

KGF fragmenty a jejich analogy mohou být exprimovány rekombinantními technikami, kdy se DNA sekvence, kodující KGF fragment nebo analog operativně napojí do vektoru ve správném čtecím rámci a orientaci, jak jsou tyto známy odborníkům v oboru. Jestliže se produkuje genetický konstrukt, obsahující KGF fragment je preferovaným výchozím materiálem cDNA, kodující KGF fragment. Typicky bude zkrácený KGF gen inzertován ve směru od promotoru a bude následován terminační sekvencí, ačkoliv KGF fragment může být produkován jako hybridní protein, který může být štěpen, je-li to žádoucí. Obecně budou použity sekvence specifické pro hostitelskou buňku, zlepšující produkční výtěžek zkráceného KGF a zkrácených KGF polypeptidových derivátů, a vhodné kontrolní sekvence, jako jsou enhancerové sekvence, polyadenylační sekvence a ribosomová vazebná místa budou přidány k expresnímu vektoru. Když je vhodná kodující sekvence izolována, může být exprimována v mnoha různých expresních systémech; jako jejich příklady mohou být použity savčí buňky, bakuloviry, bakterie a kvasinky. Tyto jsou zde diskutovány dále.

i. Savčí systémy

Savčí expresní systémy jsou v oboru známé. Savčí promotor je jakákoliv DNA sekvence schopná vazby savčí RNA polymerázy a iniciace transkripce ve směru (3') od kodující sekvence (např. strukturální gen) do mRNA. Promotor bude mít transkripční iniciační region, který je obvykle umístěn blízko k 5' kodující sekvence a TATA box, obvykle umístěný 25-30 bázových párů (bp) proti směru od místa počátku transkripce. TATA box je považován za řídící RNA polymerázu II tak, aby začala RNA syntéza na správném místě. Savčí promotor bude také obsahovat protisměrový promotorový prvek, typicky umístěný ve 100 až 200 bp proti směru od TATA boxu. Protiproudový promotorový prvek determinuje rychlost, kterou započne transkripce a může působit v jiné orientaci [Sambrook a spol. (1989) "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells". In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.vyd J.] .

Savčí virální geny jsou často vysoce exprimovány a mají široký hostitelský rozsah; proto sekvence, kodující savčí virální geny poskytují zejména vhodné promotorové sekvence. Příklady zahrnují SV40 časný promotor, promotor viru nádoru myší mléčné žlázy LTR, adenovirus hlavní late promotor (Ad MLP) a promotor herpes simplex viru. Dále sekvence odvozené od nevirálních genů jako je myší metallothioneinový gen, poskytují také vhodné promotorové sekvence. Exprese může být buď konstitutivní nebo regulovaná (inducibilní), v závislosti na promotoru může být indukována glukokortikoidy v buňkách, odpovídajících na hormon.

Přítomnost enhancerového prvku (enhanceru), kombinovaného s promotorovými prvky popsány výše, budou typicky zvyšovat expresní hladiny. Enhancer je

regulátorová DNA sekvence, která může stimulovat transkripci až 1000krát, je-li napojena k homologním nebo heterologním promotorům, se syntézou začínající při normálním RNA start místě. Enhancery jsou také aktivní, jsou-li umístěny proti směru nebo po směru od místa počátku transkripce, buď v normální nebo obrácené orientaci nebo ve vzdálenosti větší než 1000 nukleotidů od promotoru [Maniatis a spol. (1987) *Science* 236:1237; Alberts a spol. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2.vyd.]. Zejména mohou být použity enhancerové prvky odvozené od viru, protože typicky mají širší hostitelský rozsah. Příklady zahrnují SV40 časný genový enhancer [Dijkema a spol. (1985) *EMBO J.* 4:761] a enhancer/promotory odvozené z dlouhých terminálních opakování (long terminal repeat - LTR) viru Rousova sarkomu [Gorman a spol. (1982b) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 79:6777] a z lidského cytomegaloviru [Boshart a spol. (1985) *Cell* 41:521]. Dále jsou některé enhancery regulovatelné a stávající se aktivními pouze za přítomnosti induktoru, jako je hormon nebo kovový iont [Sassone-Corsi a Borelli (1986) *Trends Genet.* 2:215; Maniatis a spol. (1987) *Science* 236:1237].

DNA molekula může být exprimována extracelulárně v savčích buňkách. Promotorová sekvence může být přímo spojena s DNA molekulou, a v tomto případě bude první aminokyselinou při N-konci rekombinantního proteinu methionin, který je kodován ATG start kodonem. Je-li to žádoucí může být N-konec odštěpen z proteinu in vitro inkubací bromkyanem.

Alternativně mohou být také cizí proteiny sekretovány z buňky do růstového media vytvořením chimérních DNA molekul, které kodují fuzní protein,

obsahující leader sekvenční fragment, který poskytuje sekreci cizího proteinu v savčích buňkách. Výhodně jsou zde opracovávaná místa kodována mezi leader fragmentem a cizím genem, která mohou být štěpena buď *in vivo* nebo *in vitro*. Leader sekvenční fragment typicky koduje signální peptid, obsahující hydrofobní aminokyseliny, které řídí sekreci proteinu z buňky. Adenovirus tripartitní leader je příkladem leader sekvence, která poskytuje sekreci cizího proteinu v savčích buňkách.

Typicky transkripční terminační a polyadenylační sekvence rozpoznávané savčími buňkami jsou regulátorové regiony umístěné 3' k translačnímu stop kodonu a tak, spolu s promotorovými prvky, lemují kodující sekvenci. 3' konec zralého mRNA je vytvořen místně specifickým posttranskripčním štěpením a polyadenylací [Birnstiel a spol. (1985) *Cell* 41:349; Proudfoot a Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. In *Transcription and splicing* (vyd. E.D.Hames a D.M.Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem.Sci.* 14:105]. Tyto sekvence řídí transkripci mRNA, která může být translatována do polypeptidu, kodovaného DNA. Příklady transkripčních signálů terminátor/polyadenylace zahrnují ty, které jsou zahrnují ty, které jsou odvozeny z SV40 [Sambrook a spol. (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells". In *Molecular Cloning: A laboratory Manual*.

Některé geny mohou být exprimovány mnohem účinněji, když jsou přítomny introny (nazývané také intervenční sekvence). Některé cDNA byly však účinně exprimovány z vektorů, které postrádají signály pro střih (také nazývané střihová donorová a akceptorová místa) [viz např. Gothing a Sambrook (1981) *Nature* 293:620]. Introny

jsou intervenční nekodující sekvence v kodující sekvenci, která obsahuje stříhová donorová a akceptorová místa. Jsou odstraněny způsobem nazvaným "sestřih", po polyadenylaci primárního transkriptu [Nevins (1983) Annu.Rev.Biochem. 52:441; Green (1986) Annu.Rev.Genet. 20:671; Padget a spol. (1986) Annu.Rev.Biochem.55:1119; Krainer a Maniatis (1988) "RNA splicing" v Transcription and splicing (vyd.B.D.Hames a D.M.Glover)].

Typicky výše uvedené složky, obsahující promotor, polyadenylační signál, a transkripční terminační sekvence se zavedou do expresních konstruktů. Enhancery, introny s funkčními stříhovými donorovými a akceptorovými místy a leader sekvence mohou být také obsaženy v expresním konstruktu, je-li to žádoucí. Expresní konstrukty jsou často udržovány v replikonu, jako je extrachromosomální element (např. plasmidy) schopném stabilního udržování v hostiteli, jako jsou savčí buňky nebo bakterie. Savčí replikační systémy zahrnují ty, které jsou odvozeny od živočišných virů, které pro replikaci vyžadují trans-působící faktory. Například plasmidy, obsahující replikační systémy papovavirů jako je SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] nebo polyomavirus, replikují extrémně vysoký počet kopií za přítomnosti vhodného virálního T antigenu. Další příklady savčích replikonů zahrnují ty, které jsou odvozeny od hovězího papillomaviru a Epstein-Barrové viru. Dále může replikon mít dva replikační systémy a je tak umožněno, aby byl udržován například v savčích buňkách pro expresi a v prokaryotickém hostiteli pro klonování a amplifikaci. Příklady takových savčích-bakteriálních vektorů zahrnují pMT2 [Kaufman a spol. (1989) Mol.Cell.Biol.9:946 a pHEBO [Shimizu a spol. (1986) Mol.Cell.Biol. 6:1074]].

Použitý transformační proces závisí na hostiteli, který má být transformován. Způsoby zavedení heterologních polynukleotidů do savčích buněk jsou známy v oboru a zahrnují dextranem zprostředkovanou transfekci, srážení fosforečnanem vápenatým, polybrenem zprostředkovanou transfekci, protoplastovou fuzi, elektroporaci, enkapsulaci polynukleotidu(ů) do liposomů a přímé mikroinjektování DNA do jádra.

Savčí buněčné linie dostupné jako hostitelé pro expresi jsou známy v oboru a zahrnují mnoho imortalizovaných buněčných linií dostupných od American Type Culture Collection (ATCC), zahrnující, ale neomezujičích se na ně, buňky vaječníků čínského křečka (CHO), HeLa buňky, buňky ledvin novorozenců křečka (BHK), buňky opičích ledvin (COS), lidské hepatocelulární karcinomové buňky (např. Hep G2) a mnoho jiných buněčných linií.

ii. Baculovirové systémy

Polynukleotid kodující KGF může být inzertován do vhodného expresního vektoru, například, hmyzího buněčného expresního vektoru a operabilně být připojen ke kontrolním prvkům v témže vektoru. Vektorová konstrukce využívá technik, které jsou známy v oboru. Zejména, pro účely předloženého vynálezu, je konstruován bakulovirový expresní vektor v podstatě podle Kittse a spol., BioTechniques 14:810-817 (1993).

Stručně, nejprve se zkonstruuje KGF expresní kazeta inzercí KGF₁₆₃ kodující sekvence do transfer vektoru, obsahujícího polynukleotidovou sekvenci, která je homologní k části bakulovirového genomu (označena zde

jako "bakulovirová sekvence") a je s ní schopna homologní rekombinace. Bakulovirová sekvence obsahuje alespoň podstatnou polynukleotidovou sekvenci, jak je popsána dále. KGF kodující sekvence se inzertuje do transfer vektoru takovým způsobem, že lemuje oba konce bakulovirové sekvence.

Transfer vektor, obsahující KGF kodující sekvenci je transferován do hostitelských buněk spolu s mutantem přirozeného typu bakulovitu, který postrádá podstatnou polynukleotidovou sekvenci nezbytnou pro produkci funkčního viru. Z tohoto hlediska může být funkční virus produkován v hostitelských buňkách po transfekci, jestliže se mutantní bakulovirus rekombinuje s KGF expresní kazetou.

Funkční baculovirus produkován tímto způsobem má tak inkorporovanou KGF expresní kazetu a je vhodný pro transfekci do nových hostitelských buněk pro produkci rekombinantního KGF a rekombinantního KGF_{des1-23}. Alternativně může být tento způsob proveden s KGF_{des1-23} kodující sekvencí místo KGF₁₆₃ kodující sekvence. Obecně zahrnují složky expresního systému transfer vektor, obvykle bakteriální plasmid, který obsahuje jak fragment bakulovirového genomu tak obvyklé restriční místo pro inzerci heterologního genu nebo genů, které jsou exprimovány; přirozený typ bakuloviru se sekvencí homologní k bakulovirus-specifickému fragmentu v transfer vektoru (tato umožňuje homologní rekombinaci heterologního genu do bakulovirového genomu); a vhodné hmyzí hostitelské buňky a růstová media.

Po inzerci zkrácené KGF DNA sekvence do transfer vektoru jsou vektor a genom přirozeného typu vektoru

transfektovány do hmyzích hostitelské buňky, kde proběhne rekombinace vektoru a virového genomu. Vzniklý rekombinantní virus je exprimován a rekombinantní plaky jsou indentifikovány a čištěny. Materiály a způsoby pro expresní systémy bakulovirus/ hmyzí buňka jsou komerčně dostupné ve formě kitu od, inter alia, Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" kit). Tyto techniky jsou obecně známy odborníkům v oboru a jsou popsány v práci Summerse a Smitha, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987)(dále zde "Summers a Smith"), která je zde zahrnuta jako odkaz.

Před inzercí zkrácené KGF DNA sekvence do bakulovirového genomu, jsou výše uvedené složky, zahrnující promotor, leader (je-li to žádoucí), žádanou kodující sekvenci a transkripční terminační sekvenci, typicky seataveny do meziproductového přenášejícího konstrukt (transfer vektor). Tento konstrukt může obsahovat jediný gen a operativně připojené regulátorové elementy; více genů, které jsou každý operativně připojeny k regulátorovým prvkům; nebo více genů, regulovaných stejnou sadou regulátorových prvků. Meziproductové přenášející konstrukty jsou často udržovány v replikonu, jako je extrachromosomální element (např. plasmidy) schopný stabilního udržení v hostiteli jako je bakterie. Replikon bude mít replikační systém, který mu umožňuje být zachován ve vhodném hostiteli pro klonování a amplifikaci.

V současnosti je nejběžněji používaným transfer vektorem pro zavedení cizích genů do AcNPV pAc373. Je rovněž možno sestavit mnoho jiných vektorů, jak bude zřejmé odborníkům v oboru. Tyto například zahrnují pVL985 (který mění polyhedrin start kodon z ATG na ATT a který

zavádí BamHI klonovací místo 32 bázových párů po směru exprese od ATT; viz Luckow a Summers, Virology (1989) 17:31).

Plasmid obvykle také obsahuje polyhedrin polyadenylační signál (Miller a spol.(1988) Ann.Rev.Microbiol., 42:1;77) a gen prokaryotické ampicilinové rezistence (amp) a počátek replikace selekce a propagace v E.coli.

Bakulovirus transfer vektory obvykle obsahují bakulovirový promotor. Bakulovirový promotor je jakákoliv DNA sekvence schopná vázat bakulovirus RNA polymerázu a iniciovat proti směru exprese (5' ke 3') transkripci kodující sekvence (např. strukturálního genu) do mRNA. promotor bude mít transkripční iniciační region, který je obvykle umístěn v blízkosti 5' konce kodující sekvence. Tento transkripční iniciační region typicky obsahuje RNA polymerásové vazebné místo a transkripční počáteční místo. Bakulovirus transfer vektor může také mít druhou doménu nazvanou enhancer, která, je-li přítomna, je obvykle vzdálena od strukturálního genu. Exprese může být buď regulovaná nebo konstitutivní.

Strukturální geny, v poslední době hojně transkribované ve virálním infekčním cyklu, poskytují zvláště vhodné promotorové sekvence. Příklady zahrnují sekvence odvozené od genu, kodujícího virální polyhedron protein, Friesen a spol., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", v: The Molecular Biology of Baculoviruses (vyd. Walter Doerfler); EPO č. 127839 a 155476; a genu, kodujícího p10 protein Vlák a spol., (1988). J.Gen.Virol 69:765.

DNA, kodující vhodné signální sekvence může být odvozena z genů pro sekreci hmyzích nebo bakulovirových proteinů, jako je bakulovirus polyhedrin gen (Carbonell a spol.(1988) *Gene*, 73:409). Alternativně, protože signály prosavčí buněčné posttranslační modifikace (jako je signální peptidové štěpení, proteolytické štěpení a fosforylace) se jeví být rozpoznávané hmyzími buňkami a signály vyžadované pro sekreci a akumulaci v jádru, se také jeví být konzervovány mezi invertebrálními buňkami a vertebrálními buňkami, mohou být také použity pro sekreci ve hmyzu leadery nehmyzího původu, jako jsou ty, které jsou odvozeny od genů, kodujících lidský α -interferon, Maeda a spol.(1985), *Nature* 315:592; lidský gastrin uvolňující peptid, Labacq-Verheyden a spol.(1988), *Molec.Cell.Biol.* 8:3129; lidský IL-2, Smith a spol., (1985) *Proc.Nat'l Acad.Sci. USA*, 82:8404; myší IL-3, (Miyajima a spol., (1987) *Gene* 58:273; a lidskou glukocerebrodisázu, Martin a spol. (1988) *DNA*, 7:99.

Rekombinantní polypeptid nebo polyprotein může být exprimován intracelulárně nebo, je-li exprimován se správnými regulátorovými sekvencemi, může být sekretován. Dobrá intracelulární exprese nefuzovaných cizích proteinů obvykle vyžaduje heterologní geny, které ideálně mají krátkou leader sekvenci, obsahující vhodné translační iniciační signály předcházející ATG start signálu. Je-li to žádoucí, může být methionin na N-konci odštěpen ze zralého proteinu invitro inkubací bromkyanem.

Alternativně, rekombinantní polyproteiny nebo proteiny, které nejsou přirozeně sekretovány, mohou být sekretovány ze hmyzí buňky vytvořením chimérních DNA molekul, které kodují fuzní protein, obsahující leader sekvenční fragment, který poskytuje sekreci cizího

proteinu ve hmyzu. Leader sekvenční fragment typicky koduje signální peptid, obsahující hydrofobní aminokyseliny, které řídí translokaci proteinu do endoplasmického retikula.

Po inzerci zkrácené KGF DNA sekvence a/nebo genu, kodujícího prekurzor expresního produktu, je hmyzí hostitelská buňka ko-transformována s heterologní DNA transfer vektoru a genomovou DNA přirozeného typu bakuloviru - obvykle ko-transfekcí. Promotorová a transkripční terminační sekvence konstruktu bude typicky obsahovat 2-5kb sekci bakulovirového genomu. Způsoby zavedení heterologní DNA do požadovaného místa bakuloviru jsou známy v oboru. (Viz Summers a Smith *supra*; Ju a spol., *Mol.Cell.Biol.*(1983) 3:2156 a Luckow a Summer (1989)). Například inzerce do genu jako je polyhedrin gen, může být provedena homologní dvojitou cross-over rekombinací; inzerce může také být do místa restriktivního enzymu zapracovaného do požadovaného bakulovirového genu. Miller a spol., (1989), *Bioessays* 4:91. DNA sekvence, je-li klonována místo polyhedrinového genu v expresním vektoru, je lemována jak 5' tak 3' polyhedrin-specifickými sekvencemi a je umístěna po směru exprese polyhedrinového promotoru.

Nově vytvořený bakulovirus expresní vektor je následně umístěn do infekčního rekombinantního bakuloviru. Homologní rekombinace probíhá při malé frekvenci (mezi asi 1 % a asi 5 %); to znamená, že podstatná část viru produkovaného po kotransfekci je ještě standardního typu. Proto je potřebná metoda pro identifikaci rekombinantních virů. Výhodou expresního systému je vizuální screening, umožňující rozlišení rekombinantních virů. Polyhedrin protein, který je

produkován nativním virem, je produkován ve velmi vysokých hladinách v jádru infikovaných buněk po virové infekci. Akumulovaný polyhedrin protein vytváří okluzní tělíška, která také obsahují uzavřené částice. Tato okluzní tělíška, až do velikosti 15 μm , jsou vysoce odrážející, a proto jsou jasně třpytivého vzhledu, který je snadno vizualizován pod světelným mikroskopem. Buňky infikované rekombinantními viry postrádají okluzní tělíška. Pro rozlišení rekombinantního viru od přirozeného viru se transfekční supernatant plakuje na monovrstvu hmyzích buněk technikami, které jsou odborníkům v oboru známe. Totiž, plaky se screenují pod světelným mikroskopem na přítomnost (indikující přírodní typ viru) nebo nepřítomnost (indikující rekombinantní virus) okluzních tělíšek. "Current Protocols in Microbiology" č.2 (Ausubel a spol.vyd.) 16.8(dod.10,1990); Summers a Smith, supra; Miller a spol. (1980).

Rekombinantní bakulovirus expresní vektory byly vyvinuty pro infekci do některých hmyzích buněk. Například, byly vyvinuty rekombinantní bakuloviry pro, inter alia: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* a *Trichoplusia ni* (PCT č. pub. WO89/046699; Carbonell a spol., (1985) J.Virol, 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith a spol., (1983) Mol.Cell.Biol. 3:2156 a viz obecně Fraser a spol., (1989) In Vitro Cell, Dev.Biol.25:225).

Buňky a buněčná media jsou komerčně dostupné jak pro přímou tak fuzní expresi heterologních polypeptidů v bakulovirus/expresním systému; technologie buněčné

kultury je obecně odborníkům v oboru dobře známá. Viz např. Summers a Smith, supra.

Modifikované hmyzí buňky mohou pak růst ve vhodném živném mediu, které umožňuje stabilní zachování plasmidu(ů) přítomných v modifikovaném hmyzím hostiteli. Je-li genový expresní produkt pod indukční kontrolou, hostitel může růst ve vysoké hustotě a indukovat expresi. Alternativně, je-li exprese konstitutivní, produkt bude kontinuálně exprimován do media a živné medium musí plynule cirkulovat při odstraňování požadovaného produktu a doplňování vyčerpaných živin. Produkt může být čištěn takovými technikami jako je chromatografie, např. HPLC, afinitní chromatografie, iontovýměnná chromatografie atd.; elektroforéza; odstředování s hustotním gradientem; extrakce rozpouštědly a podobně. Je-li to vhodné, produkt může být dále čištěn podle požadavků tak, že se odstraní v podstatě jakékoliv hmyzí proteiny, které jsou také sekretovány do media nebo jsou výsledkem lýze hmyzích buněk tak, že se poskytne produkt, který je alespoň v podstatě prostý zlomů hostitelských buněk, např. proteinů, lipidů a polysacharidů.

Za účelem získání exprese zkráceného KGF, se rekombinantní hostitelské buňky získané z transformantů inkubují za podmínek, které umožňují expresi rekombinantní zkrácení KGF kodující sekvence. Tyto podmínky se budou měnit v závislosti na zvolené hostitelské buňce. Podmínky bude však snadné stanovit pro odborníky na základě toho, co je v oboru známo.

iii. Bakteriální systémy

Bakteriální expresní techniky jsou známy v oboru. Bakteriální promotor je jakákoliv DNA sekvence schopná vazby bakteriální RNA polymerázy a iniciace transkripce po směru exprese (3') kodující sekvence (např. strukturního genu) do mRNA. Promotor bude mít transkripční iniciační region, který je obvykle umístěn blízko 5' konce kodující sekvence. Transkripční iniciační region typicky zahrnuje RNA polymerásové vazebné místo a transkripční iniciační místo. Bakteriální promotor může také mít druhou doménu nazvanou operátor, která může přesahovat připojené RNA polymerásové vazebné místo, při kterém začíná RNA syntéza. Operátor umožňuje negativně regulovanou (indukovatelnou) transkripci, protože gen represor proteinu může vázat operátor a tím inhibovat transkripci specifického genu. Konstitutivní exprese může probíhat za nepřítomnosti negativních regulátorových prvků jako je operátor. Navíc, pozitivní regulace může být dosaženo gen aktivátor proteinovou vazebnou sekvencí, která, je-li přítomna je obvykle blízko (5') k RNA polymerásové vazebné sekvenci. Příkladem gen aktivátor proteinu je katabolitový aktivátor protein (CAP - catabolite activator protein), který napomáhá počátku transkripce lac operonu v *Escherichia coli* (*E.coli*)/Raibaud a spol. (1984) *Annu. Rev.Genet.*, 18:173/. Regulovaná exprese může být proto jak pozitivní tak negativní, čímž se buď zvyšuje nebo redukuje transkripce.

Sekvence, kodující metabolickou dráhu enzymů, poskytují zvláště vhodné promotorové sekvence. Příklady zahrnují promotorové sekvence odvozené z enzymů, metabolizujících cukr jako je galaktosa, laktosa (lac)

/Chang a spol.(1977) Nature 198:1056/ a maltosa. Další příklady zahrnují promotorové sekvence odvozené z biosyntetických enzymů jako je tryptofan (trp) /Goeddel a spol. (1980) Nuc.Acids Res. 8:4057; Yelverton a spol. (1981) Nucl.Acids Res., 9:731; US 4738921; EPO pub.č. 036776 a 121775/. g-Laotamasa (bla) promotorový systém /Weissmann (1981) "The cloning of interfaron and other mistakes". V Interferon 3 (vyd.I.Gresser)/, bakteriofág lamda PL /Shimatake a spol. (1981) Nature 292:128/ a T5 /US 4689406/ promotorové systémy poskytují také vhodné promotorové sekvence.

Dále mohou syntetické promotory, které se nevyskytují v přírodě také působit jako bakteriální promotory. Například transkripční aktivační sekvence jednoho bakteriálního nebo bakteriofágového promotoru mohou být spojeny s operonovými sekvencemi jiného bakteriálního nebo bakteriofágového promotoru, za vytvoření syntetického hybridního promotoru /US patent č. 4551433/. Například tac promotor je hybrid trp-lac promotoru, obsahující jak trp promotorovou tak lac operonovou sekvenci, která je regulována lac represorem /Amann a spol., (1983) Gene 25:167; de Boer a spol. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. 80:21/. Navíc může bakteriální promotor obsahovat přirozeně se vyskytující promotory nebakteriálního původu, které mají schopnost se vázat k bakteriální RNA polymeráse a iniciovat transkripci. Přirozeně se vyskytující promotor nebakteriálního původu může být také kondenzován s kompatibilní RNA polymerásou pro získání vysokých hladin exprese stejných genů v prokaryotech. Systém bakteriofágová T7 RNA polymerása/promotor je příkladem kondenzovaného promotorového systému /Studier a spol. (1986) J.Mol.Biol.:113; Tabor a spol. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.

82:1074/. Navíc může hybridní promotor také obsahovat bakteriofágový promotor a E.coli operátor region (EPO pub.č. 267851).

Navíc k funkční promotorové sekvenci je také účinné ribosom vazebné místo pro expresi cizích genů v prokaryotech. V E.coli je ribosomové vazebné místo nazváno Shine-Dalgarno (SD) sekvence a obsahuje iniciační kodon (ATG) a sekvenci 3-9 nukleotidů délky umístěnou 3-11 nukleotidů proto směru exprese od iniciačního kodonu /Shine a spol.(1975) Nature 254:34/. SD sekvence je považována za promotující vazbu mRNA k ribosomu párováním bází mezi SD sekvencí a 3' a E.coli 16S rRNA /Steitz a spol. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA" v Biological Regulation and Development: Gene Expression (vyd.R.F.Goldberger)/. Pro expresi eukaryotických genů a prokaryotických genů se slabým ribosom-vazebným místem /Sambrook a spol.(1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli" v Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

DNA molekula může být exprimována intracelulárně. Promotorová sekvence může být přímo spojena s DNA molekulou a v tomto případě bude vždy první aminokyselinou na N-konci methionin, který koduje ATG start kodon. Je-li to žádoucí, může být methionin na N-konci odštěpen z proteinu in vitro inkubací s bromkyanem nebo in vivo nebo in vitro inkubací s bakteriální methionin N-koncovou peptidásou (EPO pub.č. 219237).

Alternativou pro řízenou expresi jsou fuzní proteiny. Typicky DNA sekvence, kodující N-koncovou část andogenního bakteriálního proteinu, nebo jiného stabilního proteinu, je fúzována k 5' konci heterologních

kodujících sekvencí. Při expresi tento konstrukt bude poskytovat fuzi dvou aminokyselinových sekvencí. Například bakteriofág lambda buněčný gen může být připojen k 5' konci cizího genu a exprimován v bakterii. Výsledný fuzní protein si výhodně udržuje místo pro opracovávající enzym (faktor Xa) pro štěpení bakteriofágového proteinu z cizího genu /Nagai a spol.(1984)Nature 309:810/. Fuzní proteiny mohou také být vyrobeny se sekvencemi z lacZ /Jia a spol.(1987) Gene 60:197//; trpE /Allen a spol.(1987) J.Biotechnol.5:93; Makoff a spol. (1989) J.Gen.Microbiol. 135:11/ a Chey /EPO pub.č. 324647/ genů. DNA sekvence při spojení dvou aminokyselinových sekvencí může nebo nemusí kodovat místo štěpení. Jiným příkladem je ubiquitin fuzní protein. takový fuzní protein se vyrobí s ubiquitinovým regionem, který si výhodně zachovává místo pro opracovávající enzym (např. ubiquitin specifickou opracovávající proteázu) pro štěpení ubiquitinu z cizího proteinu. Touto metodou může být izolován nativní cizí protein /Miller a spol.(1989) Bio/Technology 7:698/.

Alternativně cizí proteiny mohou být také sekretovány z buněk vytvořením chimérních DNA molekul, které kodují fuzní protein, obsahující signální peptidový sekvenční fragment, který poskytuje sekreci cizího proteinu v bakterii (US 4336336/. Signální sekvenční fragment typicky koduje signální peptid obsahující hydrofobní aminokyseliny, které řídí sekreci proteinu z buňky. Protein je buď sekretován do růstového media (gram-pozitivní bakterie) nebo do periplasmického prostoru, umístěného mezi vnitřní a vnější membránou buňky (gram-negativní bakterie). Výhodně jsou zde taková místa pro úpravu, která mohou být štěpena buď in vivo nebo in

vitro, zakodována mezi signální peptidový fragment a cizí gen.

DNA kodující vhodná signální sekvence může být odvozena z genů pro sekretované bakteriální proteiny, jako je *E.coli* vnější membránový proteinový gen (*ompA*) /Masiu a spol. (1983) v: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb a spol. (1984) *EMBO J.* 2:2437/ a *E.coli* alkalická fosfatáza signální sekvence (*phoA*) /Oka a spol. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82:7212/. Jako další příklad může být použita signální sekvence alfa-amyláza genu z různých *Bacillus* kmenů k sekretování heterologních proteinů z *B.subtilis* /Palva a spol. (1982) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79:5582; EPO pub.č. 244042/.

Typicky jsou transkripční terminační sekvence rozpoznávané bakteriemi umístěny 3' k translačnímu stop kodonu a tak spolu s promotorem lemují kodující sekvenci. Tyto sekvence řídí transkripci mRNA, která může být translatována do polypeptidu kodovaného DNA. Transkripční terminační sekvence často zahrnují DNA sekvence o asi 50 nukleotidech schopné tvorby kmenových smyčkových struktur, které napomáhají terminační transkripci. Příklady zahrnují transkripční terminační sekvence odvozené od genů se silnými promotory, jako je *trp* gen v *E.coli* jakož i jiné biosyntetické geny.

Typicky spolu výše uvedené složky, zahrnující promotor, signální sekvenci (je-li žádoucí), požadovanou kodující sekvenci transkripční terminační sekvenci, tvoří expresní konstrukty. Expresní konstrukty jsou často udržovány v replikonu jako je extrachromosomální element (např. plasmidy) schopný stabilního zachování v hostiteli, jako je bakterie. Replikon bude mít replikační

system, který umožňuje, aby byl zachován v prokaryotickém hostiteli pro expresi nebo pro klonování a amplifikaci. Dále může být replikon plasmid o buď vysokém nebo nízkém počtu kopií. Plasmid o vysokém počtu kopií bude obecně mít počet kopií v rozmezí od asi 5 do asi 2000 a typicky asi 10 až asi 150. Hostitel, obsahující plasmid o vysokém počtu kopií bude výhodně obsahovat alespoň asi 10 a výhodněji alespoň asi 20 plasmidů. Může být zvolen vektor jak o vysokém počtu kopií tak o nízkém počtu kopií v závislosti na účinku vektoru a cizího proteinu na hostitele.

Alternativně mohou být expresní konstrukty integrovány do bakteriálního genomu s integračním vektorem. Integrační vektory typicky obsahují alespoň jednu sekvenci homologní k bakteriálnímu chromosomu, která umožňuje vektoru se integrovat. Integrace se jeví být výsledkem rekombinací mezi homologní DNA ve vektoru a bakteriálním chromosomu. Například integrační vektory konstruované s DNA z různých *Bacillus* kmenů integrují do *Bacillus* chromosomu (EPO pub.č. 127328). Integrující vektory mohou také obsahovat bakteriofágové nebo transposonové sekvence.

Typicky mohou extrachromosomální a integrační expresní konstrukty obsahovat selektovatelné markery pro umožnění selekce bakteriálních kmenů, které byly transformovány. Selektovatelné markery mohou být exprimovány v bakteriálním hostiteli a mohou zahrnovat geny, které udělují bakterii rezistenci k léčivům jako je ampicilin, chloramfenikol, erythromycin, kanamycin (neomycin) a tetracyklin /Davies a spol. (1978) Annu.Rev:Microbiol. 32:469/. Selektovatelné markery mohou

také obsahovat biosyntetické geny jako jsou geny ve drahách biosyntézy histidinu, tryptofanu a leucinu.

Alternativně mohou některé z výše popsaných složek spolu vstupovat do transformačního vektoru. Transformační vektory typicky obsahují selektovatelný marker, který je buď udržován v replikonu nebo vypěstován v integračním vektoru jak popsáno výše.

Expresní a transformační vektory, buď extrachromosomální replikony nebo integrační vektory, byly vyvinuty pro transformaci do mnoha bakterií. Například byly inter alia expresní vektory vyvinuty pro následující bakterie: *Bacillus subtilis* /Palva a spol. (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:5582; EPO pub.č. 036259 a 063953; PCT WO 84/04541/; *Escherichia coli* /Shimatake a spol. (1981) Nature 292:128; Amann a spol. (1985) Gene 40:183; Studier a spol. (1986) J.Mol.Biol. 189:113; EPO pub.č. 036776, 136829 a 136907/; *Streptococcus cremoris* /Powell a spol. (1988) Appl.Environ.Microbiol. 54:655/; *Streptococcus lividans* /Powell a spol. (1988) Appl.Environ.Microbiol., 54:655/; *Streptomyces lividans* /US 4745056/.

Způsoby zavedení exogenní DNA do bakteriálních hostitelů jsou v oboru dobře známé a typicky zahrnují buď transformaci bakterií ošetřených CaCl_2 nebo jinými činidly, jako jsou divalentní kationty a DMSO. DNA může být také zaveden do bakteriálních buněk elektroporací. Transformační postupy se obvykle mění podle transformovaných bakteriálních druhů. Viz např. /Masson a spol. (1989) FEMS Microbiol.Lett.60:273; Palva a spol., (1982) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79:5582; EPO pub.č. 036259 a 063953; PCT pub.č. WO84/04541, *Bacillus*/, /Miller a

spol. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85:856; Wang a spol., (1990) J.Bacteriol.172:949, Campylobacter/; /Cohen a spol.(1973) Proc Natl.Acad.Sci. 69:2110; Dower a spol. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of Escherichia coli with ColE1-derived plasmids. V Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engeneering (vyd. H.W.Boyer a S.Nicosia); Mandel a spol. (1970) J.Mol.Biol. 53:159; Takeo (1988) Biochim.Biophys.Acta 949:318; Escherichia/;/Chassy a spol.(1987) FEMS Microbiol.Lett.44:173 Lactobacillus/;/Fiedler a spol.(1988) Anal.Biochem 170:38, Pseudomonas/; /Augustin a spol.(1990) FEMS Microbiol.Lett.66:203, Staphylococcus/;/Barany a spol.(1980)J.Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of Sterptococcus lactis by electroporation, v: Streptococcal Genetics (vyd.J.Ferretti a R.Curtis III); Perry a spol. (1981) Infec.Immun.32:1295; Powell a spol. (1988) Appl.Environ. Microbiol.54:665; Somkuti a spol.(1987) Proc.4th Evr.Cong.Biotechnology 1:412, Streptococcus/.

iv. Kvasinková exprese

Kvasinkové expresní systémy jsou odborníkům v oboru dobře známé. Kvasinkový promotor je jakákoliv DNA sekvence schopná vázat kvasinkovou RNA polymerásu a iniciovat po směru (3') transkripci kodující sekvence (např.strukturální gen) do mRNA. Promotor bude mít transkripční iniciační region, který je obvykle umístěn blízko 5' konce kodující sekvence. Tento transkripční iniciační region typicky obsahuje RNA polymerásové vazebné místo ("TATA box") a transkripční iniciační místo. Kvasinkový promotor může mít také druhou doménu

nazvanou protisměšná aktivátorová sekvence ("upstream activator sequence - UAS), která, je-li přítomna, je obvykle distální ke strukturálnímu genu. UAS umožňuje regulovanou (indukovatelnou) expresi. Konstitutivní exprese se objevuje za nepřítomnosti UAS. Regulovaná exprese může být buď pozitivní nebo negativní, čímž se buď zvyšuje nebo redukuje transkripce.

Kvasinka je fermentující organismus s aktivní metabolickou dráhou, proto sekvence, kodující enzymy v metabolické dráze poskytují zvláště vhodné promotorové sekvence. Příklady zahrnují alkohol dehydrogenázu (ADH) (EPO pub.č. 284044), enolázu, glukosa-6-fosfát isomerázu, glyceraldehyd-3- fosfát-dehydrogenázu (GAP nebo GAPDH), hexokinázu, fosfofruktokinázu, 3- fosfoglycerát mutázu a pyruvát kinázu (PyK) (EPO pub.č. 329203). Kvasinkový PHO5 gen, kodující kyselou fosfatázu poskytuje také vhodné promotorové sekvence /Myanohara a spol.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:1/.

Dále syntetické promotory, které se nevyskytují v přírodě také působí jako kvasinkové promotory. Na příklad UAS sekvence jednoho kvasinkového promotoru mohou být spojeny s transkripčním aktivačním regionem jiného kvasinkového promotoru, vytvoří se tak syntetický hybridní promotor. Příklady takových hybridních promotorů zahrnují ADH regulátorovou sekvenci napojenou ke GAP transkripčnímu aktivačnímu regionu (US 4876197 a US 4880734). Jiné příklady hybridních promotorů zahrnují promotory, které obsahují regulátorové sekvence buď ADH2, GAL4, GAL10 nebo PHO5 geny, spojené s transkripčním aktivačním regionem glykolytického enzymu jako je GAP nebo PyK (EPO pub.č. 164556). Dále může kvasinkový promotor zahrnovat přirozeně se vyskytující promotory

nekvaskinkového původu, které mají schopnost vázat kvasinkovou RNA polymerázu a iniciují transkripci. Příklady takových promotorů zahrnují, inter alia, /Cohen a spol.(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:1078; Henikoff a spol. (1981) Nature 283:835; Hollenberg a spol. (1981) Curr.Topics Microbiol.Immunol. 96:119; Hollenberg a spol.(1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*" v: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (vyd. K.N.Timmis a A.Puhler); Mercerau-Puigalon a spol. (1980) Gene 11:163; Panthier a spol.(1980) Curr.Genet,2:109/.

DNA molekula může být exprimována intracelulárně ve kvasince. Promotorová sekvence může být přímo spojena s DNA molekulou a v tomto případě první aminokyselina na N-konci rekombinantního proteinu vždy bude methionin, který je kodován ATG start kodonem. Je-li to žádoucí, methionin na N-konci může být odštěpen z proteinu in vitro inkubací s bromkyanem.

Fuzní proteiny poskytují alternativu pro kvasinkové expresní systémy, jakož savčí, bakulovirové a bakteriální systémy. Typicky DNA sekvence, kodující N-koncovou část endogenního kvasinkového proteinu, nebo jiného stabilního proteinu, je fuzována k 5' konci heterologní kodující sekvence. Při expresi bude tento konstrukt poskytovat fuzi dvou aminokyselinových sekvencí. Například gen kvasinkové nebo lidské superoxid dismutázy (SOD), může být připojen k 5' konci cizího genu a exprimován ve kvasince. DNA sekvence ve spojení dvou aminokyselinových sekvencí může nebo nemusí kodovat štěpitelné místo. Viz např. EPO pub.č. 196056. Dalším příkladem je ubiquitinový fuzní protein. Takový fuzní protein je připraven s

ubiquitinovým regionem, který si výhodně udržuje místo pro upravující enzym (např. ubiquitin-specificky upravující proteázu) pro odštěpení ubiquitinu z cizího proteinu. Touto metodou tak může být izolován nativní cizí protein (viz např. PCT publč. WO88/024066).

Alternativně mohou být také cizí proteiny sekretovány z buňky do růstového media vytvořením chimérních DNA molekul, které kodují fuzní protein, obsahující leader sekvenční fragment, který poskytuje sekreci cizího proteinu ve kvasince. Výhodně jsou zde upravující místa kodovaná mezi leader fragmentem a cizím genem, která budou štěpena buď in vivo nebo in vitro. Leader sekvenční fragment typicky koduje signální peptid, obsahující hydrofobní aminokyseliny, který řídí sekreci proteinu z buňky.

DNA, kodující vhodné signální sekvence mohou být odvozeny z genů pro sekreci kvasinkových proteinů, jako je kvasinkový invertásový gen (EPO pub.č. 012873; JPO pub.č. 62,096,086) a A-faktorový gen (US 4588684). Alternativně existují leadry nekvasinkového původu, jako je interferon leader, které také poskytují sekreci ve kvasince (EPO pub.č. 060057).

Preferovanou třídou sekrečních leaderů jsou ty, které využívají fragment genu kvasinkového alfa faktoru, který obsahuje "pre" signální sekvenci a "pro" region. Typy alfa faktorových fragmentů, které mohou být použity, zahrnují plnou délku pre-pro alfa faktorového leaderu (asi 83 aminokyselinových zbytků) jako i zkrácené alfa-faktorové leadery (typicky asi 25 až asi 50 aminokyselinových zbytků) (US 4546083 a US 4870008; EPO pub.č. 324274). Další leadery, využívající alfa-faktorový

leader fragment, které poskytují sekreci, zahrnují hybridní alfa faktor leadery vyrobené s presekvencí první kvasinky, ale s pro-regionem druhého kvasinkového alfa faktoru. Viz např. PCT pub.č. WO89/02463.

Typicky jsou transkripční terminační sekvence rozpoznávané kvasinkou regulátorové regiony umístěné 3' ke translačnímu stop kodonu a tak spolu s promotorem lemují kodující sekvenci. Tyto sekvence řídí transkripci mRNA, která může být translatována do polypeptidu, kodovaného DNA. Příklady transkripční terminační sekvence a jiných kvasinkou rozpoznávaných terminačních sekvencí, jako jsou například ty, které kodují glykolytické enzymy.

Typicky výše popsané složky, obsahující promotor, leader (je-li požadován), požadovanou kodující sekvenci a transkripční terminační sekvenci, společně vstupují do expresních konstruktů. Expresní konstrukty jsou často udržovány v replikonu, jako je extrachromosomální element (např. plasmidy) schopném stabilního uchování v hostiteli, jako je kvasinka nebo bakterie. Replikon může mít dva replikační systémy, které umožňují, aby byl uchován, například ve kvasince pro expresi a v prokaryotickém hostiteli pro klonování a amplifikaci. Příklady takových kvasinka-bakterie shuttle vektorů zahrnují YEp24 /Botstein a spol.(1979) Gene 8:17-24/; pCl1/1 /Brake a spol.(1984) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81:4642-4646/; a YRp17 /Stinchcomb a spol.(1982) J.Mol.Biol.158:157/. Navíc může být replikon plasmid o buď vysokém nebo nízkém počtu kopií. Vysokokopiový plasmid bude obecně mít počet kopií v rozmezí od asi 5 do asi 200 a typicky asi 10 až asi 150. Hostitel, obsahující vysokokopiový plasmid, bude obecně mít alespoň asi 10 a

výhodněji alespoň asi 20. Vstup vysoko nebo nízkokopiového vektoru může být zvolen, v závislosti na účinku vektoru a cizího proteinu na hostitele. Viz Brake a spol., supra.

Alternativně mohou expresní konstrukty být integrovány do kvasinkového genomu s integračním vektorem. Integrační vektory typicky obsahují alespoň jednu sekvenci homologní ke kvasinkovému chromosomu, který umožňuje vektoru integrovat, a výhodně obsahuje dvě homologní sekvence lemující expresní konstrukt. Integrace se jeví být výsledkem rekombinace mezi homologní DNA ve vektoru a kvasinkového chromosomu /Orr-Weaver a spol.(1983) Methods in Enzymol.101:228-245/. Integrační vektor může být řízen ke specifickému místu ve kvasince výběrem vhodné homologní sekvence pro zahrnutí do vektoru. Viz Orr-Weaver a spol., supra. Integrovat může jeden nebo více expresních konstruktů, což ovlivňuje hladiny produkovaného rekombinantního proteinu /Rine a spol. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80:6750/. Chromosomální sekvence zahrnuté ve vektoru se mohou objevovat jako jediný segment ve vektoru, který vede k integraci celého vektoru, nebo dva segmenty homologní k připojeným segmentům ve chromosomu a lemující expresní konstrukt ve vektoru, který může vést ke stabilní integraci pouze expresního konstruktů.

Typicky extrachromosomální a integrační expresní konstrukty mohou obsahovat selektující markery pro umožnění výběru kvasinkových kmenů, které byly transformovány. Selektovatelné markery mohou zahrnovat biosyntetické geny, které mohou být exprimovány ve kvasinkovém hostiteli, jako je gen ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 a ALG7 a G418 rezistence, který uděluje rezistenci ve

kvasinkách k tunicarmycinu a G418. Navíc vhodný selektující marker může také poskytnout kvasinku se schopností růst za přítomnosti toxických sloučenin, jako je kov. Například přítomnost CUIP umožňuje kvasinkám růst za přítomnosti iontů mědi /Butt a spol. (1987) Microbiol.Rev.51:351/.

Alternativně mohou některé z výše popsaných složek spolu vstupovat do transformačních vektorů. Transformační vektory typicky obsahují selektující marker, který je buď udržován v replikonu nebo vyvinut v integračním vektoru, jak popsáno výše.

Expresní a transformační vektory, buď extrachromosomální replikony nebo integrační vektory, byly vyvinuty pro transformaci do mnoha kvasinek. Například byly vyvinuty expresní vektory pro, inter alia, následujících kvasinek: *Candida albicans* /Kurtz a spol.(1986) Mol.Cell.Biol.6:142/; *Candida maltosa* /Kunze a spol., 1985/ J.Basic Microbiol. 25:141/; *Hansenula polymorpha* /Gleeson a spol.(1986) J.Gen.Microbiol. 132:3459; Roggenkamp a spol. (1986) Mol.Gen.Genet. 202:302/; *Kluyveromyces fragilis* /Das a spol.(1984) J.Bacteriol. 158:1165/; *Kluyveromyces lactis* /De Louvencourt a spol. (1983) J.Bacteriol. 154:737; Van den Berg a spol. (1990) Bio/Technology 8:135/; *Pichia guillierimondii* /Kunze a spol. (1985) J.Basic Microbiol. 25:141/; *Pichia pastoris* /Cregg a spol. (1985) Mol.Cell.Biol. 5:3376; US 4837148 a US 4929555/; *Saccharomyces cerevisiae* /Hinnen a spol. (1978) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 75:1929; Ito a spol. (1983) J.Bacteriol.153:163/; *Schizosaccharomyces pombe* /Beach a Nurse (1981) Nature 300:706/ a *Yarrowia lipolytica*

/Davidow a spol. (1985) Curr.Genet. 10:380-471;
Gaillardin a spol. (1985) Curr.Genet.10:49/.

Způsoby zavedení exogenní DNA do kvasinkových hostitelů jsou v oboru známé a typicky zahrnují transformaci sferoplastů nebo intaktních kvasinkových buněk zpracovaných s alkalickými kationty. Transformační postupy se obvykle mění s transformovanými kvasinkovými druhy. Viz např. /Kurtz a spol.(1986) Mol.Cell.Biol. 6:142; Kunze a spol. 91985) J.Basic Microbiol. 25:141, Candida//;Gleeson a spol. 91986) J.Gen.Microbiol. 132:3459; Roggenkamp a spol. (1986) Mol.Gen.Genet. 202:302, Hanseluna//; /Das a spol.(1984) J.Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt a spol. (1983) J.Bacteriol 154:1165; Van den Berg a spol. (1990) Bio/Technology 8:135, Kluyveromyces//; Cregg a spol.(1985) Mol.Cell.Biol. 5:3376; Kunze a spol. (1985) J.Basic Microbiol. 25:141; US 4837148 a US 4929555, Pichia//;Hinnen a spol. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75; 1929; Ito a spol. (1983) J.Bacteriol.153:163, Sacharomyces//;Beach a Nurse (1981) Nature 300:706, Schizosacharomyces//; /Davidow a spol.(1985) Curr.Genet. 10:39; Gaillardin a spol. (1985) Curr.Genet. 10:49, Yarrowia/.

V předloženém vynálezu mohou být v expresním vektoru obsaženy selektující markery, počátek replikace a homologní sekvence hostitelských buněk. Selektující marker může být použit pro prohledání hostitelských buněk, za potenciálně obsahují expresní vektor. Takové markery zahrnují ty, které činí hostitelskou buňku rezistentní k léčivům jako je ampicilin, chloramfenikol, erythromycin, neomycin a tetracyklin. Markery mohou také zahrnovat biosyntetické geny jako jsou geny ve drahách histidinu, tryptofanu a leucinu, které jsou vyžadovány

pro růst v hostitelské buňce. Jestliže je použita například leu(-) hostitelská buňka jako příjemce ve transformaci expresním vektorem a leucin je nepřítomen v mediu, budou přežívat pouze buňky, které nesou plasmid s leu(+) genem.

V předloženém vynálezu může být počátek replikace inkorporován do expresního vektoru pro umožnění autonomní replikace v hostitelské buňce. Takový počátek replikace zahrnuje ty, které umožňují, aby expresní vektor byl reprodukován ve vysokém počtu kopií za přítomnosti vhodných proteinů v buňce, například 2 μ m a autonomně se replikující sekvence, které jsou účinné ve kvasince; a počátek replikace virálního T-antigenu, který je účinný COS-7 buňky.

Pro účel předloženého vynálezu mohou být expresní vektory buď integrovány do genomu hostitelské buňky nebo zůstávají v buňce autonomní. Pro integraci do hostitelského genomu může expresní vektor obsahovat polynukleotidové sekvence, které jsou homologní se sekvencemi v genomu hostitelské buňky. Homologní sekvence nutně nemusí být připojeny k expresnímu vektoru. Například mohou expresní vektory být integrovány do CHO genomu přes nepřipojený gen dihydrofolat reduktázy. Ve kvasince je preferováno, když homologní sekvence lemuje expresní kazetu. Zvláště výhodné homologní sekvence kvasinkového genomu podle předloženého vynálezu jsou ty, které jsou popsány v PCT WO90/01800 a sekvence HIS4 genu, popsané v Genbank, přír.číslo J01331.

Volba promotoru, terminátoru a jiných případných prvků expresního vektoru bude také záviset na zvolené hostitelské buňce jak je známo odborníkům v oboru.

Předložený vynález není závislý na vybrané hostitelské buňce. Je známo v oboru mnoho hostitelů pro expresi a jsou dostupné z American Type Culture Collection (ATCC).

Například bakteriální hostitelé vhodné pro expresi KGF fragmentu nebo analogu zahrnují: *Campylobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Mohou být použiti kvasinkoví hostitelé z následujících rodů: *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sacharomyces*, *Schizosaccharomyces* a *Yarrowia*. Imortalizované savčí buňky, které mohou být použity jako hostitelé zahrnují CHO buňky, HeLa buňky, buňky ledvin mláďete křečka ("BKB"), buňky opičích ledvin ("COS") a buňky lidského hepatocelulárního karcinomu, např. Hep G2. Pro expresi KGF fragmentu nebo jeho analogu je vhodných mnoho hmyzích buněčných hostitelů, kteří zahrnují: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* a *Spodoptera frugiperda* jak jsou popsáni v PCT WO 89/046699; Carbonell a spol., J.Virol. 56:153(1985); Wright Nature 321:718(1986); Smith a spol., Mol.Cell.Biol. 3:2156(1983) a obecně Fraser a spol. in vitro Cell.Dev.Biol.25:225 (1989).

Expresní vektor, obsahující KGF fragment nebo jeho analog se inzertuje do hostitelské buňky. Pro inzertování expresních vektorů do hostitelské buňky mohou být použity jakékoliv transformační techniky, které jsou známy v oboru. Například transformace bakteriálních hostitelů typicky zahrnuje první upravení bakterie buď s CaCl_2 nebo jinými činidly, jako jsou divalentní kationty a ponechání exogenní DNA, aby byla zavedena do ošetřených bakteriálních buněk. DNA může být také zavedena do bakteriálních buněk elektroporací nebo virální infekcí.

Transformační postupy pro bakteriálníhoho hostitele, které mohou být použity, zahrnují ty, které jsou popsány v Masson a spol.(1989) FEMS Microbiol.Lett.60:273; Palva a spol., (1982) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79:5582; EPO pub.č. 036259 a 063953; PCT pub.č. WO84/04541, Bacillus/, /Miller a spol. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85:856; Wang a spol., (1990) J.Bacteriol.172:949, Campylobacter/; /Cohen a spol.(1973) Proc Natl.Acad.Sci. 69:2110; Dower a spol. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner "An improved method for transformation of Escherichia coli with ColE1-derived plasmids. V Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (vyd. H.W.Boyer a S.Nicosia) (1978); Mandel a spol. (1970) J.Mol.Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim.Biophys.Acta 949:318; Escherichia/;/Chassy a spol.(1987) FEMS Microbiol.Lett.44:173 Lactobacillus/;/Fiedler a spol.(1988) Anal.Biochem 170:38, Pseudomonas/; /Augustin a spol.(1990) FEMS Microbiol.Lett.66:203, Staphylococcus/;/Barany a spol.(1980)J.Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, v: Streptococcal Genetics (vyd.J.Ferretti a R.Curtis III); Perry a spol. Infec.Immun.32:1295 (1981); Powell a spol. Appl.Environ. Microbiol.54:665(1988); Somkuti a spol.Proc.4th Evr.Cong.Biotechnology 1:412 (1987), Streptococcus/.

Transformační metody pro kvasinkové hostitele jsou dobře známé v oboru a typicky zahrnují transformaci buď sferoblastů nebo intaktních kvasinkových buněk zpracovaných s alkalickými kationty. Kvasinkové buňky mohou být také transformovány elektroporací jak je popsáno v Methods in Enzymology, díl 194, 1991, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology". Podle předloženého vynálezu se použitý transformační postup

mění podle transformovaných kvasinkových ruhů a zahrnuje ty, které jsou popsány v Kurtz a spol.(1986) Mol.Cell.Biol.6:142/; *Candida maltosa* /Kunze a spol., 1985/ J.Basic Microbiol. 25:141/; *Hansenula polymorpha* /Gleeson a spol.(1986) J.Gen.Microbiol. 132:3459; Roggenkamp a spol. (1986) Mol.Gen.Genet. 202:302/; *Kluyveromyces fragilis* /Das a spol.(1984) J.Bacteriol. 158:1165/; *Kluyveromyces lactis* /De Louvencourt a spol. (1983) J.Bacteriol. 154:737; Van den Berg a spol. (1990) Bio/TEchnology 8:135/; *Pichia guilliermondii* /Kunze a spol. (1985) J.Basic Microbiol. 25:141/; *Pichia pastoris* /Cregg a spol. (1985) Mol.Cell.Biol. 5:3376; US 4837148 a US 4929555/; *Saccharomyces cerevisiae* /Hinnen a spol. (1978) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 75:1929; Ito a spol. (1983) J.Bacteriol.153:163/; *Schizosaccharomyces pombe* /Beach a Nurse (1981) Nature 300:706/ a *Yarrowia lipolytica* /Davidow a spol. (1985) Curr.Genet. 10:380-471; Gaillardin a spol. (1985) Curr.Genet.10:49/.

Způsoby zavedení exogenní DNA do kvasinkových hostitelů jsou v oboru známy a typicky zahrnují transformaci sferoplastů nebo intaktních kvasinkových buněk zpracovaných s alkalickými kationty. Transformační postupy se obvykle mění s transformovanými kvasinkovými druhy a zahrnují ty, které jsou popsány v práci Kurtz a spol.(1986) Mol.Cell.Biol. 6:142; Kunze a spol. (1985) J.Basic Microbiol. 25:141, *Candida*; Gleeson a spol. (1986) J.Gen.Microbiol. 132:3459; Roggenkamp a spol. (1986) Mol.Gen.Genet. 202:302, *Hansenula*; Das a spol.(1984) J.Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt a spol. (1983) J.Bacteriol 154:1165; Van den Berg a spol. (1990) Bio/Technology 8:135, *Kluyveromyces*; Cregg a spol.(1985) Mol.Cell.Biol. 5:3376; Kunze a spol. (1985) J.Basic

Microbiol. 25:141; US 4837148 a US 4929555, Pichia; Hinnen a spol. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75; 1929; Ito a spol. (1983) J.Bacteriol.153:163, Sacharomyces; [Beach a Nurse (1981) Nature 300:706, Schizosacharomyces; Davidow a spol.(1985) Curr.Genet. 10:39; Gaillardin a spol. (1985) Curr.Genet. 10:49, Yarrowia.

Způsoby zavedení heterologních polypeptidů do savčích buněk jsou známy v oboru a zahrnují, například virovou infekci, dextranem zprostředkovanou transfekci, srážení fosforečnanem vápenatým, polybrenem zprostředkovanou transfekci, protoplastovou fúzi, elektroporaci, enkapsulaci polynukleotidu(ů) v liposomech a přímé mikroinjektování DNA do jádra.

Způsoby pro zavedení heterologní DNA do bakulovirového viru pro vytvoření expresního vektoru a pro transformaci hmyzích hostitelských buněk jsou také v oboru známy jak je popsáno v Smith a spol., Mol.Cell.Biol. 3:2156 (1983); a Lucklow a Summers, Virology 17:31 (1989). Například může být KGF fragment DNA inzertována do polyhedron genu homologní dvojitou crossover rekombinací. Inzerce může být také provedena zapracováním místa pro restriční enzym do požadovaného bakulovirového genu, jak popisuje Miller a spol., Bioessays 4:91 (1989). DNA sekvence KGF fragmentu, je-li klonována místo polyhedron genu v expresním vektoru, je lemována jak 5' tak 3' polyhedron-specifickými sekvencemi a je umístěna ve směsu polyhedronového promotoru.

V provedení předloženého vynálezu může být nově formovaný bakulovirus expresní vektor následně vložen do infekčního rekombinantního bakuloviru. V bakulovirovém expresním systému se objevuje homologní rekombinace málo

Často, mezi asi 1 % a asi 5 %. Proto obvykle většina viru produkuje po transfekci ještě přirozený typ viru.

Rekombinantní viry nicméně mohou být identifikovány známými metodami. Například nativní virus produkuje polyhedron protein ve velmi vysokých hladinách v jádru infikovaných buněk během pozdního stadia virové infekce. Akumulovaný polyhedron protein tvoří okluzní tělíska, která také obsahují zapouzdřené virové částice. Tato okluzní tělíska mající velikost až 15 μm , mají vysokou odrazivost, což je činí velmi jasnými a proto jsou snadno vizualizované pod světelným mikroskopem. Buňky infikované rekombinantními viry postrádají okluzní tělíska.

Rekombinantní virus a přirozený virus mohou být rozlišeny umístěním na plotně, transfekcí supernatantu nebo jeho ředěním do monovrstvy hmyzích buněk standardními technikami. Plaky mohou pak být screenovány pod světelným mikroskopem na přítomnost, indikující přirozený typ viru, nebo nepřítomnost, indikující rekombinantní virus, okluzních tělísek jak je popsáno v "Current Protocols in Microbiology", sv.2 (Ausubel a spol. vyd.) 16.8 (dod.10, 1990).

Imunozkoušky a zkoušky aktivity, které jsou známe v oboru mohou být použity pro stanovení, zda transformované hostitelské buňky exprimují požadovaný KGF fragment. Například imunofluorescence může být provedena na transformovaném hostiteli bez oddělení KGF fragmentů z buněčné membrány. V této zkoušce jsou hostitelské buňky nejprve fixovány do pevného nosiče, jako jsou mikroskopické žezly nebo mikrotitrační jamka. Potom jsou hostitelské buňky vystaveny anti-KGF protilátcě. Výhodně pro zvýšení citlivosti zkoušky, jsou fixované buňky vystaveny druhé protilátce, která je značena a váže se k anti-KGF protilátce. Například může být sekundární

protilátka značena fluorescentním markerem. Hostitelské buňky, které exprimují KGF fragmenty budou fluorescenčně značeny a mohou být vizualizovány pod mikroskopem.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Lidská KGF cDNA byla inzertována do bakulovirového expresního systému klonováním cDNA do pAcC13Pst/Not 1 expresního vektoru, jak je uvedeno na obr. 1. Tento plasmid byl odvozen z pAcC12, jak popsal Munemitsu a spol., Mol.Cell.Biol. 10:5977-5982 (1990).

PCR oligonukleotidové primery byly vytvořeny pro zkrácení 19 kd KGF na bázi dostupných N-terminálních aminokyselinových sekvencí KGF popsaných v práci Finche a spol. Science 2:752-755 (1989). Lemující restriční místa (PstI a NotI) byla inkorporována do primerů pro usnadnění subklonování do pAcC13 expresního vektoru, derivátu pVL941 transfer vektoru, jak popisuje Luckow a spol., Virology 170:31-39 (1989) a Quiliam a spol., Mol.Cell.Biol. 10:2900102908 (1990). Tento expresní vektor byl konstruován inzercí KGF-kodujícího fragmentu do PstI/NotI polylinkerového místa pAcC13. KGF cDNA koduje zralou upracenou formu KGF, která byla složena ze 163 aminokyselinových zbytků, s potenciálním N-glykosylačním místem u zbytků 16 až 16.

Příprava kondičního media

Spodoptera Frugiperda, Sf9 hmyzí buňky, byly infikovány bakulovirem, Autographa Californica, obsahujícím cDNA pro KGF₁₋₁₆₃. Po zředění ($X \times 10^X$)

buněk/ml, byly buňky kultivovány po 48 až 72 h v Excell-400 za nepřítomnosti serového doplňku, antibiotik nebo fungicidů. Kapalina z kultury byla shromážděna a odstředěna při 10000 x g po 30 min pro odstranění plovoucích buněk a jiných buněčných zbytků. Kondiční medium bylo pak filtrováno 0,8 μ -filtrem (Millipore) a přibližně 5 litrů tohoto media bylo koncentrováno na 200 ml za použití filtron kazetového systému (Omega membrána), majícího dělicí schopnost 3 kDa mol.hmotnosti.

Po koncentraci bylo kondicionované medium z transfektovaných Sf9 buněk odděleno odstředováním při 10000 x g po 20 minut a medium bylo čištěno následující heparin Sepharose ("HS") afinitní chromatografií. V jednom provedení vynálezu byl přibližně 1 litr Sf9 buněčného kondicionovaného media ultra-filtrován za získání 200 ml ultrafiltračního retentátu za použití Omega membrány (Filtron), mající dělicí schopnost 3-kDa.

HSAC a Mono S kationtovýměnná chromatografie

Supernatant byl upraven na pH 7,2. 30ml vzorek byl vložen na heparin Sepharose pryskyřici, která byla ekvilibrována v 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 150 mM NaCl. Pryskyřice byla promývána intenzivně ekvilibračním pufrem až do navrácení absorbance na základní hodnotu a pak postupně eluována zvyšujícími se NaCl koncentracemi od 0,45 M do 1 M a 2 M NaCl. Z frakcí byly odebrány podíly pro použití v buněčných proliferačních studiích a 1M NaCl frakce s nejvyšší bioaktivitou byly spojeny. Spojené frakce byly zředěny pětinasobně s 10 mM TRis pH 7,2 (konečná koncentrace soli 0,2 M NaCl) a vzorek byl aplikován se Super smyčkou na Mono S kolonu připojenou k FPLC systému (Pharmacia, Piscataway, NJ). Eluce byla

provedena s lineárním gradientem (10 mM Tris pH 7,3, 0,2M NaCl až 10 mM Tris pH 7,3, 1M NaCl). Po testování frakcí na bioaktivitu byly aktivní frakce spojeny.

Retentát byl upraven na pH 7,3 a vložen na HS kolonu, obsahující lože přibližně o objemu 30 ml. Kolona byla ponechána protékat přibližně 2 hodiny při 4 °C. Kolona byla promyta 150 ml ekvilibračního pufru, obsahujícího 10 mM Tris-HCl a 0,15M NaCl při pH 7,3. Zadržovaný protein byl eluován 0,45M NaCl a 1M NaCl. Průtoková rychlost během eluce byla upravena na přibližně 90 ml/h a byly odebírány frakce o velikosti 3 ml.

Bioaktivní 1M NaCl frakce ze stupňů HS afinitní chromatografie byly spojeny a zředěny 5-krát 10 mM Tris pH 7,3 a přímo vneseny na Mono S HR 5/5 kolonu (Pharmacia). Zadržené proteiny byly eluovány za použití 0,2M NaCl až 1M NaCl gradientu. Biozkouška aktivní frakce byla provedena použitím Balb-Mk buněčné linie. Byla provedena SDS PAGE analýza frakcí bioaktivního proteinu izolovaných Mono S kationtovýměnnou chromatografií. Frakce 37-39 a frakce 41-42 byly spojeny a 10 ml podíly byly přidány k SDS a 10 mM DTT. Vzorky byly tepelně denaturovány a elektroforézovány ve 12% polyakrylamidovém gelu, který byl následně vybarven stříbrem. Byla pozorována podobná migrace u vzorků, které prošly jak redukčním prostředím tak prostředím neredukčním. 25 kDa byla zjevná molekulová hmotnost proteinu získaného z frakcí 37-39 a 18 kDa byla zjevná molekulová hmotnost proteinu obsaženého ve frakcích 41-42.

Chromatogram HS bioaktivní frakce ukazuje profil Balb/Mk bioaktivity, pokrývající frakce 31 až 47

demonstrující přítomnost 12 molekulových druhů, jedny eluující při 0,55 M NaCl a druhé eluující při 0,6M NaCl.

Stanovení KGF aktivity

Přítomnost KGF aktivity v získaných frakcích byla hodnocena schopností frakcí promotovat růst BALB/C-Mk buněk. Za tím účelem byly 10 μ l frakce zředěny 1 ml 0,2% želatiny ve fosfátem pufovaném salinickém roztoku ("PBS") a 10 μ l zředěných frakcí bylo testováno na růst stimulační aktivitu BALB/C-Mk buněk vysetých na 12 jamkové plotny (cluster plate), obsahující každá 22mm jamky, v množství 5×10^3 buněk na jamku. Veškerá aktivita KGF byla zadržena v koloně a byla eluována 1M NaCl.

KGF bioaktivní frakce eluované z HS kolony 1M NaCl byly dále čištěny kationtovýměnnou FPLC sloupcovou chromatografií. Tyto frakce byly spojeny, zředěny 5-násobně 10 mM Tris na pH 7,3 a přímo vloženy na Mono S HR 5/5 kolonu od fy Pharmacia.

Protein zadržенý v Mono S HR 5/5 koloně byl eluován gradientem 2,2M NaCl až 1M NaCl. Bioaktivita frakcí byla hodnocena jak je popsáno výše za použití BALB/C-Mk buněk. Obr. 3 ilustruje aktivní profil, pokrývající frakce 31 až 47.

V mitogenické studii bylo 10^4 ABAE a 5×10^3 buněk na jamku vyseto na 12 jamkové "cluster" plotny v hustotě 5×10^3 buněk na jamku v 1 ml DMEM doplněném 10% telecím sérem a antibiotiky jak je popsáno Bohlenem a spol. EMBO 4:1951-1956 (1985) a Gospodarowiczem a spol., J.Cell.Physiol 127:121-136 (1986) a Bellostou a spol.,

J.Cell.Biol. 121:705-713(1993). Po šesti hodinách inkubace byly sady vždy tří jamek tryptinizovány a buňky byly spočteny pro stanovení účinnosti upravení na plotně. Mikrolitrové podíly vhodného ředění každého vzorku pak byly přidány do uvedených tří jamek v miskách v den 0, 2 a 4. Po 5.tém dnu v kultuře byly plotny tryptinizovány a stanoveny buněčné hustoty pomocí Coulter čítače (Coulter Electronics, Hialeh, FL).

Přídavky KGF nebo bázeického KGF byly provedeny v den 0 a každý další den v uvedené koncentraci. Po 5 dnech v kultuře byly buňky tryptinizovány a konečná buněčná hustota byla stanovena pomocí Coulter čítače.

Elektroforéza (NaDodSO_4)

Polyakrylamidové gely byly připraveny s NaDodSO_4 postupem podle Laemmli-ho a spol. Nature 227:680-685(1970). Vzorky byly vařeny 3 min za přítomnosti 10 mM DTT a elektroforézovány ve 12% polyakrylamidovém gelu. Gely byly fixovány a vybarveny stříbrem za použití činidel a protokolu od BioRad a jak je diskutováno v práci Merrila a spol. Science 211:1437-1438. Vhodné markery molekulové hmotnosti byly od BioRad.

Zkouška buněčné proliferace

Mitogenická aktivita kolonových frakcí a čištěných vzorků byla stanovena za použití Balb/Mk buněk jako cílových buněk. Zásobní kultury rostly a byly udržovány nízkým obsahem vápníku modifikovaném Eagle mediu doplněném 10% FCS, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicinu, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ fungizonu a 10 ng/ml aFGF jak popsal Gospodarowicz a spol. J.Cell Physiol. 142:325-333. Pro mitogenickou

szkoušku byly buňky vysety do 12 jamkových "cluster" ploten v hustotě 5×10^3 až 10^4 buněk na jamku v 1 ml MEM s nízkým obsahem vápníku, doplněném 10% FCS podle Gospodarowicze a spol. Přídavky vzorků a konečná stanovení buněčné hustoty byly provedeny po 5 dnech v kultuře jak popsal Gospodarowicz a spol.

Mitogenická aktivita konečného čištěného materiálu byla testována na dospělých hovězích aortických endotheliálních buňkách ("ABAE" - adult bovine aortic endothelial cells) a kapilárních buňkách získaných z adrenálního kortexu ("ACE" buňky) jak popsal Gospodarowicz a spol. *Pro.Natl.Acad.Sci.* 73:412-4124 (1976). Zásobní kultury byly udržovány za přítomnosti DMEM doplněného 10% CS, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicinu a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ fungizonu pasážováním na slabě gelovaných miskách tkáňovou kulturu při poměru dělení 1:10.

Použitím standardní metody dobře v oboru známé byla stanovena jednoznačná aminokyselinová sekvence pro polohu 1 až 20 od NH_2 konce $\text{KGF}_{\text{des1-23}}$ jako následující:

S₁ Y D M₅ E G G D I R V R R L F X R T Q

Předložený vynález také zahrnuje DNA segmenty, kodující $\text{KGF}_{\text{des1-23}}$ a jinou kratší formu KGF postrádající nekonzervovanou NH_2 koncovou charakteristiku KGF_{163} proti jiným členům KGF rodiny.

Proteinové mikrosequencování

Dva nominální 100 pikomolové vzorky KGF_{163} a $\text{KGF}_{\text{des1-23}}$ byly analyzovány Edmanovou degradací a AA analýzou po odstředovací adsorpci k

polyvinylidendifluoridu (PVDF, Applied Biosystems Biospin). Vzorby byly vloženy do proteinového sekvenátoru v plynné fázi Applied Biosystems 477A. Bylo provedeno dvacet cyklů za použití standardního softwaru a chemikálií dodávaných Applied Biosystems a identifikace PTH aminokyselin byly provedeny na automatizované on-line HPLC koloně (model 120A, Applied Biosystems).

05-02-1996

JUDr. Otakar ŠVORČÍK
advokát

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Keratinocytový růstový faktorový fragment obsahující část aminokyselinové sekvence zralého keratinocytového faktoru plné délky, kde část vykazuje alespoň 2násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým, rekombinantním keratinocytovým faktorem plné délky, a postrádá sekvenci, obsahující prvních aminokyselinových zbytku z N-konce zralého keratinocytového faktoru plné délky.

2. Fragment keratinocytového růstového faktor u podle nároku 1, kde fragment vykazuje 7-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem plné délky.

3. Fragment keratinocytového růstového faktor u podle nároku 1, kde fragment vykazuje 10-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem plné délky.

4. Fragment keratinocytového růstového faktor u podle nároku 1, kde fragment vykazuje snížení cytotoxicity ve srovnání se zralým rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem plné délky.

5. Konjugát, obsahující

a) fragment keratinocytového růstového faktoru, který obsahuje část aminokyselinové sekvence zralého keratinocytového růstového faktoru plné délky, kde část vykazuje alespoň 2-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým keratinocytovým růstovým faktorem plné délky a postrádá sekvenci, obsahující prvních 23-N-

koncových aminokyselinových zbytků zralého,
keratinocytového růstového faktoru plné délky a
b) toxinovou molekulu.

6. Konjugát podle nároku 5, kde toxinová molekula je vybrána ze skupiny, zahrnující ricin A, difteria toxin a saporin.

7. Konjugát podle nároku 5, kde fragment vykazuje 7-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem plné délky.

8. Konjugát podle nároku 5, kde fragment vykazuje 10-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým rekombinantním keratinocytovým růstovým faktorem plné délky.

9. Terapeutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

a) fragment keratinocytového růstového faktoru, který obsahuje část aminokyselinové sekvence zralého keratinocytového růstového faktoru plné délky, kde část vykazuje alespoň 2-násobné zvýšení mitogenické aktivity ve srovnání se zralým keratinocytovým růstovým faktorem plné délky a postrádá sekvenci, obsahující prvních 23-N-koncových aminokyselinových zbytků zralého, keratinocytového růstového faktoru plné délky a
b) farmaceuticky přijatelný nosič.

10. DNA molekula, obsahující nukleotidovou sekvenci, která koduje fragment keratinocytového růstového faktoru podle nároku 1.

č.j.	031031
DOŠLO	26. IV. 96
UŘAD PRŮMYSLového VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

11. DNA molekula, obsahující nukleotidovou sekvenci, která koduje fragment keratinocytového růstového faktoru podle nároku 2.
12. DNA molekula, obsahující nukleotidovou sekvenci, která koduje fragment keratinocytového růstového faktoru podle nároku 3.
13. Expresní vektor, obsahující DNA molekulu podle nároku 10 a regulátorovou sekvenci pro expresi DNA molekuly.
14. Expresní vektor podle nároku 13, kde vektorem je bakulovirus.
15. Hostitelská buňka transformovaná expresním vektorem podle nároku 13.
16. Hostitelská buňka podle nároku 15, kde buňka je vybrána ze skupiny, zahrnující bakteriální buňku, kvasinkovou buňku, savčí buňku a hmyzí buňku.
17. Způsob přípravy fragmentu keratinocytového faktoru, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje stupně kultivace hostitelské buňky podle nároku 15 a izolaci fragmentu keratinocytového růstového faktoru z kultury.
18. Použití fragmentu keratinocytového růstového faktoru podle nároku 1 pro výrobu kompozice vhodné pro hojení ran.
19. Použití konjugátu podle nároku 5 pro výrobu kompozice vhodné pro léčení hyperproliferativní nemoci epidermu.

20. Použití konjugátu podle nároku 5 pro výrobu kompozice vhodné pro léčení lupénky nebo karcinomu bazálních buněk.

1437-95

1/5 Obr. 1

dlouhá
forma start

CHO místo

1 5 10 15

sekvence CYS-ASN-ASP-MET-THR-PRO-GLU-GLN-MET-ALA-THR-ASN-VAL-ASN-CYS-

16 20 25 30

sekvence SER-SER-PRO-GLU-ARG-HIS-THR-ARG-SER-TYR-ASP-TYR-MET-GLU-GLY-

31 35 40 45

sekvence GLY-ASP-ILE-ARG-VAL-ARG-ARG-LEU-PHE-CYS-ARG-THR-GLN-TRP-TYR-

46 50 55 60

sekvence LEU-ARG-ILE-ASP-LYS-ARG-GLY-LYS-VAL-LYS-GLY-THR-GLN-GLU-MET-

61 65 70 75

sekvence LYS-ASN-ASN-TYR-ASN-ILE-MET-GLU-ILE-ARG-THR-VAL-ALA-VAL-GLY-

76 80 85 90

sekvence ILE-VAL-ALA-ILE-LYS-GLY-VAL-GLU-SER-GLU-PHE-TYR-LEU-ALA-MET-

91 95 100 105

sekvence ASN-LYS-GLU-GLY-LYS-LEU-TYR-ALA-LYS-LYS-GLU-CYS-ASN-GLU-ASP-

106 110 115 120

sekvence CYS-ASN-PHE-LYS-GLU-LEU-ILE-LEU-GLU-ASN-HIS-TYR-ASN-THR-TYR-

121 125 130 135

sekvence ALA-SER-ALA-LYS-TRP-THR-HIS-ASN-GLY-GLY-GLU-MET-PHE-VAL-ALA-

136 140 145 150

sekvence LEU-ASN-GLN-LYS-GLY-ILE-PRO-VAL-ARG-GLY-LYS-LYS-THR-LYS-LYS-

151 155 160

sekvence GLU-GLN-LYS-THR-ALA-HIS-PHE-LEU-PRO-MET-ALA-ILE-THR-

Polyhedrin seq. > +1 +35

TATAAATATtCCG---GGCGcggatcggtaccagatctgcagaattctaga

KpnI PstI XbaI

BglII EcoRI

+637

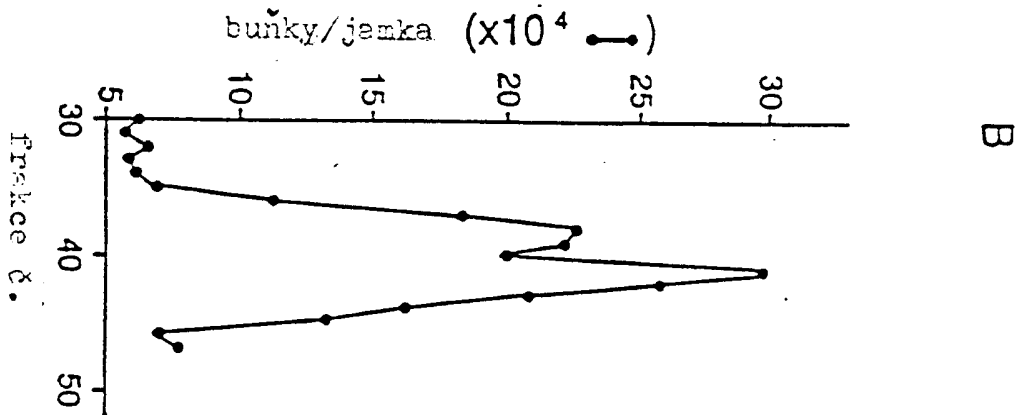
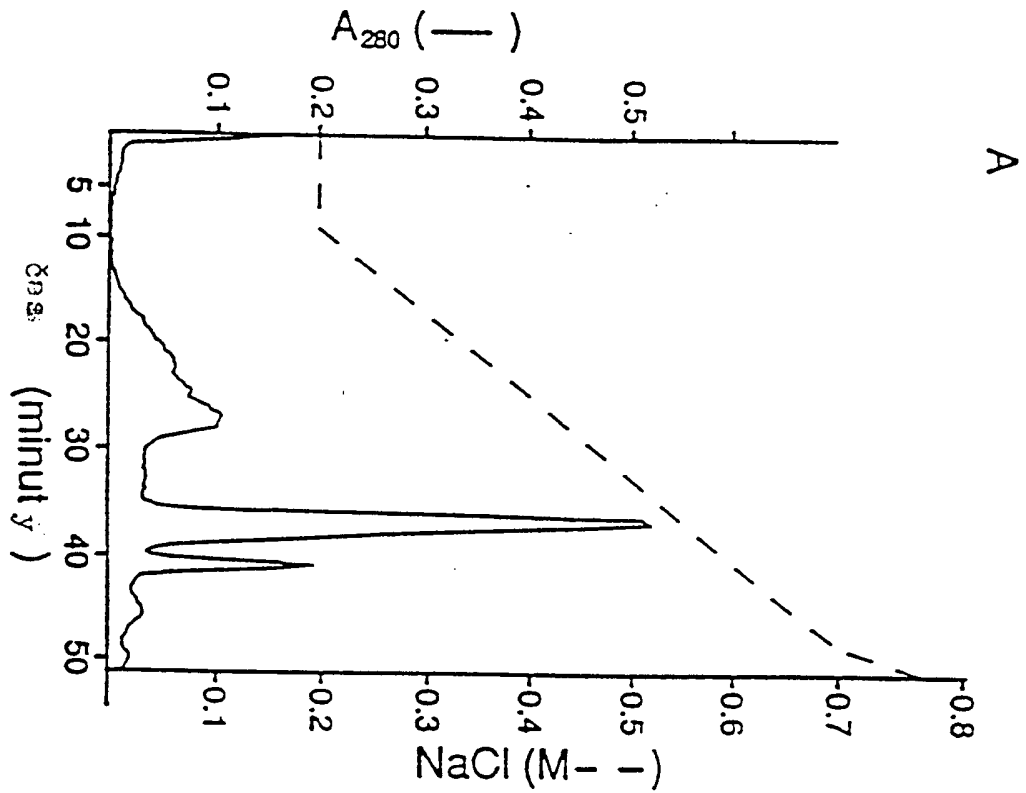
ggatcctgatcagctagcagagctcgcgccgcccgggcccgtaccGACTCT

BamHI NheI NotI SmaI

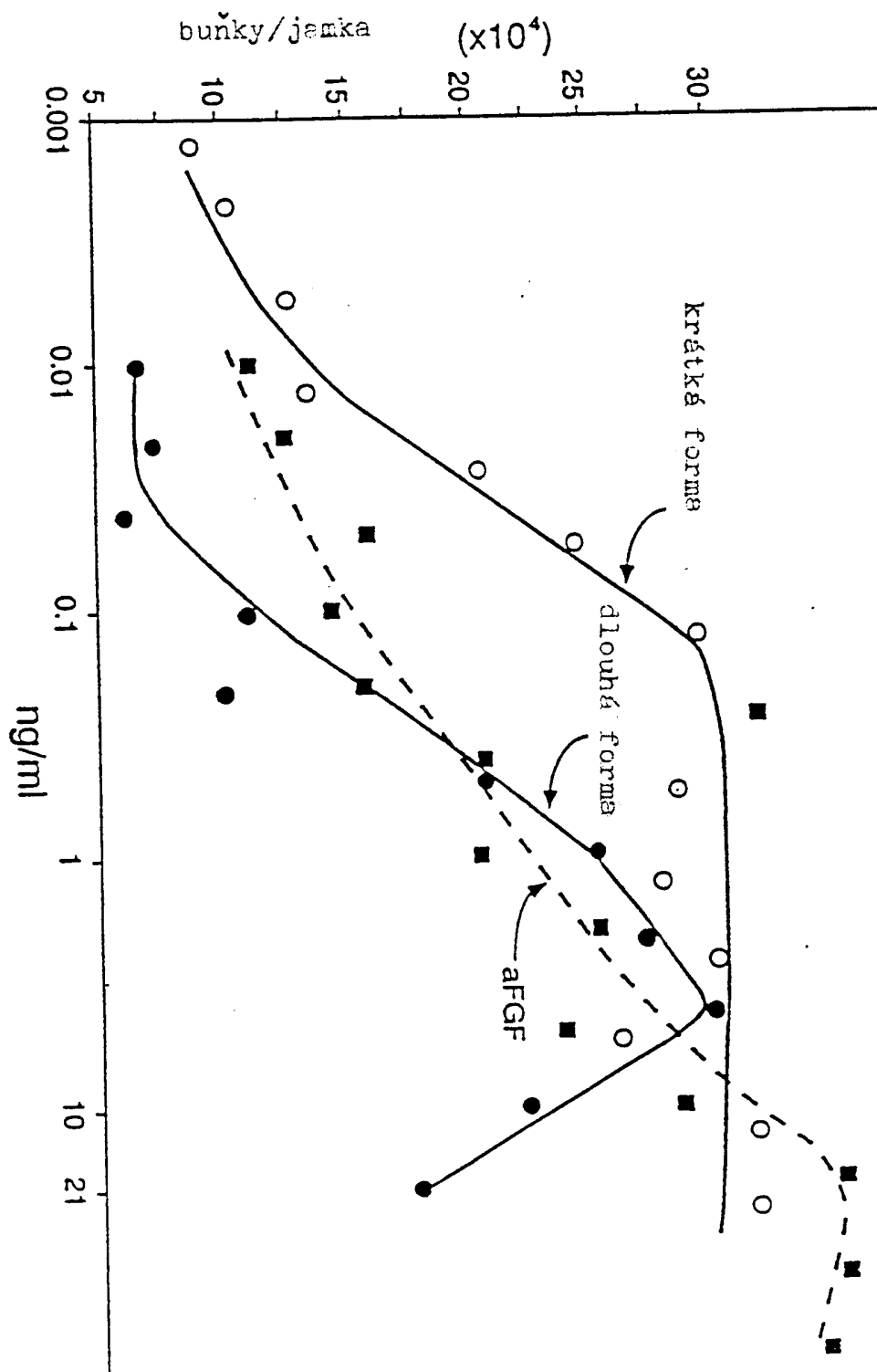
SacI SfiI

3437-95

3/5
Obr 3



4/5
Obr. 4



3437-95

5/5
Obr. 5

