

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 279

(13) Druh dokumentu:

B6

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-214**
(22) Přihlášeno: **19.01.2000**
(30) Právo přednosti: **20.01.1999 EP 1999/99100967**
(40) Zveřejněno: **16.08.2000**
(Věstník č. 08/2000)
(47) Uděleno: **15.09.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **10.11.2004**
(Věstník č. 11/2004)

(51) Int. Cl. : ⁷

C 12 N 15/70

C 12 N 15/72

C 12 N 15/24

C 07 K 14/54

(73) Majitel patentu:

BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT, Leverkusen, DE

(72) Původce:

Apeler Heiner, Wuppertal, DE
Wehlmann Hermann, Wuppertal, DE

(74) Zástupce:

JUDr. Miloš Všeckčka, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

**Vektor pro výrobu IL-4 a muteinů IL-4 ve
kmeni Escherichia coli, vektor obsahující DNA
sekvenci, Escherichia coli transformovaná
jedním nebo více vektory a použití vektoru**

(57) Anotace:

Vektor pro výrobu IL-4 a muteinů IL-4 ve kmeni Escherichia coli, sestávající z operativně spojených elementů ve směru 5' ke 3': regulovatelného promotoru sestávajícího z promotoru fáze T5 E. coli a dvou lac operátorových sekvencí, vazebného místa pro ribosom z bakteriofága T7g10 E. coli, iniciačního translačního kodonu, strukturního genu pro IL-4 nebo mutein IL-4 a transkripčního terminátoru za strukturním genem. Do rozsahu řešení náleží rovněž Escherichia coli transformovaná jedním nebo více těchto vektorů a použití tohoto vektoru v metodě přípravy IL-4 a muteinů IL-4.

CZ 294279 B6

Vektor pro výrobu IL-4 a muteinů IL-4 ve kmeni *Escherichia coli*, vektor obsahující DNA sekvenci, *Escherichia coli* transformovaná jedním nebo více vektory a použití vektoru

5 Oblast vynálezu

Vynález se týká vektoru pro výrobu IL-4 a muteinů IL-4 ve kmeni *Escherichia coli*, vektoru obsahujícího DNA sekvenci znázorněnou jako Seq. ID. NO. 2 viz dále, *Escherichia coli* transformovaného jedním nebo více těmito vektory a použití tohoto vektoru v metodě přípravy IL-4 a muteinů IL-4. Konkrétně se vynález týká konstrukce a použití expresních plazmidů ve výrobě rekombinantního interleukinu-4 (IL-4) a muteinů IL-4.

15 Dosavadní stav techniky

Zralý lidský interleukin-4 (IL-4) je složen ze 129 aminokyselin a je z 50 % homologní s myším IL-4. IL-4 je jediný známý cytokin, který řídí diferenciaci pomocných T buněk na fenotyp T_{H2} (Mosmann and Sad. Immunol. Today 17, 138-146, 1996). IL-4 předává signál lymfocytům a dalším buňkám přes heterodimerický aggrekomplex dvou receptorů cytokinu. IL-4Rα a běžný γ-řetězec (γc). V publikacích podle dosavadního stavu techniky byly popsány antagonistické mutanty IL-4 (Kruse a kol., EMBO J. 11, 3237 - 3244, 1992). Tři aminokyseliny blízko C-konce (R121, Y124 a S125) jsou důležité pro vazbu k γc-řetězci. Zavedení Asp (D) do těchto pozic blokuje dimerizaci receptoru a přenos signálů přes membránu.

25 Dvojitý mutein interleukinu-4 (IL-4 DM) je varianta IL-4 s dvěma změnami aminokyselin v pozicích 121 a 124 nazvaná IL-4 121RD Y124D. IL-4 DM je schopen blokovat obě aktivity IL-4 a IL-13. Na rozdíl od všech bodových mutantů žádné zbytkové agonistické aktivity nebyly pro tento mutein nikdy nalezeny. Má se za to, že tyto antagonistické vlastnosti IL-4 DM jsou užitečné pro léčbu onemocnění, která zahrnují vývoj TH2 a/nebo produkci IgE (Ryan. J. Allergy Clin. Immunol. 99, 1-5, 1997).

35 Jak bylo popsáno v různých publikacích, k produkci rekombinantního IL-4 a muteinů IL-4 mohou být využity prokaryotické organismy. Bohužel, popisované systémy mají řadu nedostatků (nízká hladina exprese, nízká stabilita expresního vektoru), které znemožňují produkci IL-4 a muteinů IL-4 ve velkém měřítku nebo jsou ekonomicky nerealizovatelné.

Hlavní kritéria pro účinný a bezpečný expresní systém jsou:

- vysoký výtěžek produktu;
- 40 - regulovatelná stabilní exprese;
- stabilita expresního vektoru.

Pro tato výše uvedená kritéria jsou důležité některé znaky expresního plazmidu (viz Hannig a kol., TIBTECH. 16, 54-60, 1998). Jsou to:

- 45 - promotor;
- ribosomální vazebné místo (rbs);
- využití kodonu příslušného genu;
- transkripční terminátor;
- 50 - gen pro rezistenci;

- regulace exprese;
- počátek replikace (ori).

5 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je vektor pro výrobu IL-4 a muteinů IL4 ve kmeni *Escherichia coli*, sestávající z operativně spojených elementů ve směru 5' ke 3': regulovatelného promotoru sestávajícího z promotoru fága T5 *Escherichia coli* a dvou lac operátorových sekvencí, vazebného místa pro ribosom z bakteriofága T7g10 *Escherichia coli*, iniciačního translačního kodonu, strukturálního genu pro IL-4 nebo mutein IL-4 a transkripčního terminátoru za strukturálním genem.

Do rozsahu tohoto řešení podle vynálezu rovněž náleží vektor obsahující DNA sekvenci znázorněnou jako Seq. ID. NO. 2, viz dále.

Do rozsahu řešení podle vynálezu rovněž náleží *Escherichia coli* transformovaná jedním nebo více výše uvedenými vektory podle vynálezu.

Do rozsahu řešení podle vynálezu rovněž náleží použití tohoto vektoru podle vynálezu v metodě přípravy IL-4 a muteinů IL-4.

Podle vynálezu byly vytvořeny expresní plazmidy pro IL-4 a muteiny IL-4 s modifikacemi ve všech příslušných elementech pro účinný a bezpečný expresní systém. Kvalita a vhodnost příslušného expresního systému byla klasifikována zejména podle následujících kritérií:

- výtěžek IL-4 a muteinů IL-4;
- stabilita plazmidu; a
- udržení indukční schopnosti.

Cílem předmětného vynálezu bylo proto vytvoření metody pro konstrukci na použití expresního plazmidu pro výrobu rekombinantního interleukinu-4 (IL-4) a muteinů interleukinu-4 ve velkém měřítku. Navíc by měl nově vytvořený systém hostitele/vektoru být vhodný pro expresi dalších proteinů (cytokinů, růstových faktorů, rozpustných receptorů, protilátek atd.). Podle předmětného vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že bakterie transformované plazmidem podle tohoto vynálezu poskytují mnohonásobně větší rychlosti exprese a stabilitu plazmidu a exprese než bylo pozorováno po transformaci stejného hostitele jinými známými plazmidy z dosavadního stavu techniky. Proto je použití plazmidů podle tohoto vynálezu mnohem výhodnější pro produkci rekombinantního interleukinu-4 a muteinů interleukinu-4 ve srovnání se všemi dříve známými plazmidy.

Nově vyvinutý vektorový systém obsahuje následující prvky:

T5 promotor

Promotor bakteriofága T5 *E. coli* společně se dvěma lac operátorovými sekvencemi je odvozen z plazmidu poE30 (OiaGen), náležícího do skupiny plazmidů pDS (Bujard a kol., *Methods Enzymol.* 155, 416-433, 1987 a Stüber a kol., *Immunological Methods*, I. Lefkowitz and B. Pernis, eds., Academic Press, Inc. Vol. IV, 121-152, 1990).

T7 g10 ribosomální vazebné místo

Vazebné místo ribosomu (rbs) je odvozeno z oblasti před genem 10 bakteriofága T7 (T7g10 vedoucí sekvence). Gen 10 fága T7 kóduje plásoový protein, který je hlavním proteinem

exprimovaným po infekci fágem T7. T7 g10 rbs byl získán z vektoru pET-9a (*Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60-89, 1990*). T7 g10 vedoucí sekvence zahrnuje oblast okolo 100 bp (Olins et al., *Gene* 227-235, 1988). Ve finálním expresním konstruktu je oblast před XbaI místem odstraněna. T7 g10 vedoucí sekvence nyní tedy zahrnuje 42 bp a obsahuje záměnu jedné báze z G na A v pozici 3638 v tomto zde popisovaném plazmidu.

Využití kodonů přirozené sekvence IL-4

Jakožto účinné měřítko využití synonymních kodonů přirozené sekvence může být index adaptace kodonu (codon adaptation index (CAI) použit pro předpovězení hladiny exprese daného genu (*Sharp a kol., Nucleic Acids Res. 15, 1281-1295, 1987 and Apeler a kol., Eur. J. Biochem. 247, 890-895, 1997*). CAI je počítán jako geometrický střed hodnot relativního využití kodonů (RSCU) odpovídajících každému z kodonů použitých v genu, děleno maximálním možným CAI pro gen pro stejné aminokyselinové složení. RSCU hodnoty jsou pro každý kodon počítány z velmi vysoce exprimovaných genů určitého organismu, např. *E. coli*, a reprezentují pozorovanou frekvenci kodonu dělenou frekvencí očekávanou za předpokladu stejného využití synonymních kodonů pro aminokyselinu. Vysoce exprimované geny, například geny kódující ribosomální proteiny, obecně mají vysoké hodnoty $CAI \geq 0,46$. Slabě exprimované geny jako *lacI* a *trpR* v *E. coli* mají nízké hodnoty $CAI \leq 0,3$.

Vypočítaná hodnota CAI v *E. coli* je pro přirozenou sekvenci IL-4 0,733. To znamená, že přirozený gen by měl být vhodný pro vysokou hladinu exprese v *E. coli*. Nicméně má syntetický gen s optimálním využitím *E. coli* kodonů (hodnota CAI = 1) potenciál k dalšímu zvýšení hladiny exprese. Proto byly navrženy a klonovány syntetické geny pro IL-4 a muteiny IL-4.

Transkripční terminátor

Fragment z T7 DNA obsahující transkripční terminátor T ϕ je odvozen z vektoru c (*Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60-89, 1990*). Transkripční terminátory určují místa, kde komplex mRNA-RNA polymerasa-DNA disociuje a tím končí transkripce. Přítomnost transkripčního terminátoru na konci vysoce exprimovaného genu má několik výhod: minimalizují nedostupnost RNA polymerasy, která by byla zahrnuta v nadbytečné transkripci, omezují délku mRNA na minimální potřebnou délku a tím omezuje výdej energie. Vzhledem k tomu, že silná transkripce by mohla interferovat s počátkem replikace, zvyšuje terminátor transkripce stabilitu plazmidu prostřednictvím udržení počtu kopií (*Balbas a Bolivar. Methods Enzymol. 185, 14-37, 1990*).

Gen kódující rezistenci

Gen kanamycinové rezistence je odvozen z vektoru pET-9a (*Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60-89, 1990*). Původně se jedná o kan gen Tn903 z vektoru pUC4KISS (*Barany, Gene* 37, 111-123, 1985). Ve zde popisovaném plazmidu je kan gen v opačné orientaci než geny pro IL-4 a mutein IL-4, takže nedochází ke zvýšení množství produktu kan genu po indukci v důsledku pročení terminátoru transkripce z T5 promotoru. Kanamycin byl vybrán jako selekční marker nebo je preferovaným antibiotikem pro GMP-účely. Navíc jsou vektory založené na rezistenci ke kanamycinu stabilnější než plazmidy s ampicilinovou (*bla*) rezistencí. Selektce na ampicilinu má tendenci ke ztrátám neboť tato látka je degradována sekretovaným enzymem: β -laktamasou. Způsob bakteriální rezistence ke kanamycinu závisí na aminoglykosidové fosfotranferase, která inaktivuje antibiotikum.

Regulace exprese

Kontrolovaná genová exprese je absolutně nezbytná pro nastavení stabilního plazmidového systému, obzvláště, je-li požadovaný protein zhoubný pro hostitelské buňky. Výhodný plazmid

podle předmětného vynálezu využívá indukovatelný systém založený na *lac* systému sestávajícího z genu pro *lac* represor (*lacI*) a dvou syntetických sekvencí *lac* operátoru předcházejících ve fúzi promotor bakteriofága T5 *E. coli*. Promotor *lacI*^a a strukturní gen *lacI* byl izolován z vektoru pTrc99A (Amman et al., Gene 69, 301-315, 1988). I^a představuje promotorovou mutaci vedoucí k nadprodukci *lacI* represoru. *Lac* represor standardního typu je tetramerní molekula sestávající ze čtyř identických podjednotek, každá o 360 aminokyselinách. Tetramer *lac* represoru je dimerem dvou funkčních dimerů. Čtyři podjednotky jsou drženy pohromadě svazkem čtyř helixů tvořených zbytky 340-360. Vzhledem k izolaci *lacI* genu z vektoru pTrc99A pomocí štěpu NarI byly zbytky za aminokyselinou 331 odstraněny a bylo přidáno 10 aminokyselin které nejsou normálně kódovány *lacI* genem. Je známo, že mutace nebo delece probíhající v C-terminální části *lacI*, za aminokyselinou 329, poskytují funkční dimery které se jeví jako fenotypově podobné standardnímu represoru (Pace a kol., TIS 22, 334-339, 1997).

Počátek replikace (ori)

Počátek replikace (ori) zde popisovaného výhodného plazmidu je odvozen z vektoru pET-9a, jehož ori pochází z pBR322. Výhodný plazmid podle předmětného vynálezu proto nese pMBI (COIEI) replikon. Plazmidy s tímto replikonem jsou mnohakopiové plazmidy, které se replikují "relaxovaným" způsobem. Za normálních růstových podmínek je v každé bakteriální buňce udržováno minimálně 15 až 20 kopií plazmidu. Běžný počet pro výhodný plazmid, popisovaný v tomto textu, je v tomto rozmezí. Replikace ori COIEI-typu je iniciována 555-nukleotidovým transkriptem RNA, RNAII, který tvoří stabilní hybrid se svým DNA templátem poblíž ori. Hybrid RNAII-DNA je poté štěpen RNasou H v ori za vzniku volného 3'OH, který slouží jako primer pro DNA polymerasu I. Tato iniciace syntézy DNA je negativně regulována RNA I, což je 108-nukleotidová molekula RNA komplementární k 5' konci RNA II. Interakce antisense RNA I s RNA II způsobuje konformační změnu RNA II, která inhibuje vazbu RNA II k DNA templátu a následně zabraňuje iniciaci syntézy plazmidové DNA. Vazba mezi RNA I a II je zvýšena malým proteinem o velikosti 63 aminokyselin (Rop proteinem, Represor of primer), který je kódován genem umístěným 400 nukleotidů po směru transkripce od počátku replikace (Sambrook a kol., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). Delece *rop* genu vede ke zvýšení počtu kopií a prostřednictvím dávkovacího efektu genu ke zvýšení hladiny exprese heterologních genů kódovaných plazmidem. Toto zjištění bylo rovněž učiněno v případě zkoušených expresních vektorů pro IL-4. Ale ukázalo se, že *rop*-plazmidy jsou nestabilní a při fermentaci za neselektivních podmínek dochází k jejich ztrátě. Proto obsahuje replikon zde popisovaného plazmidu *rop* gen pro zajištění vysoké stability plazmidu. V popisu předmětného vynálezu popisovaný plazmid postrádá *mob* gen, který je nutný pro mobilizaci a proto není schopen řídit svůj vlastní konjugací přenos z jedné bakterie do jiné.

Ve výhodném provedení podle předmětného vynálezu jsou z plazmidu odstraněny všechny prvky, které nejsou nezbytné pro jeho replikaci, rezistenci a regulaci exprese.

V rozsahu předmětného vynálezu nemusí být pro konstrukci expresního plazmidu podle předmětného vynálezu použity všechny výše uvedené znaky. Například místo syntetického genu pro optimalizované využití kodonů v *E. coli*, může být použit gen pro přirozený interleukin-4 nebo mutain interleukinu-4. Transkripční terminátor je ve výhodném provedení Tφ, ale rovněž je možno použít i další terminátory jako *rrnB* T2 nebo *aspA*. Podobně je možné použít pro konstrukci výhodného plazmidu podle předmětného vynálezu prvky z jiných než zde popsanych, komerčně dostupných vektorů.

Metody použité během vývoje expresního systému jsou uvedeny níže.

Materiály a metody

Enzymy

- 5 Restrikční endonukleasy, alkalická fosfatáza z telecího střeva. T4 polynukleotid kinasa a T4 DNA ligáza byly získány od firmy Boehringer Mannheim a GIBCO-BRL a byly použity dle doporučení dodavatele.

Metody práce s rekombinantní DNA

- 10 Standardní konovací postupy byly popsány v *Sambrook a kol., (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989)*. Transformace byly provedeny dle *M. Scott (Seed and Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365 - 3369, 1987)*. Kmeny *E. coli* DH5 α (GIBCO BRL) a W3110 (ATCC 27325) byly použity primárně jako hostitelské buňky. Genotyp W3110 je K12, F', [N(rrnD-rrnE)]lamb-
- 15 da⁻.

- Pro izolace ve velkém měřítku byly použity špičky "Oiagen-tips" (Oiagen). Extrakce fragmentů DNA z agarosových gelů byla provedena za použití Jetsorb (Genomed) dle doporučení dodavatele.

- 20 Oligonukleotidy pro řízenou mutagenezi, PCR reakce a sekvenování pocházely od MWG Biotech, Pharmacia Biotech nebo GIBCO BRL.

- 25 Experimenty zaměřené na mutagenezi byla použita metoda Denga a Nickoloffa (*Deng and Nickoloff, Anal. Biochem. 200, 81 - 88, 1992*) používající systém "Mutagenese s eliminací unikátního místa" od Pharmacia Biotech. Primer používaný pro znovuvytvoření T7g10 rbs má následující sekvenci:

- 30 5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAA3' (Sekv. 1)

Všechny konstrukty a sekvence DNA byly potvrzeny použitím sekvenování terminační metodou s AmpliTaq DNA polymerasy. FS na ABI 373A sekvenátoru (Applied Biosystems).

- 35 Vynález je detailněji vysvětlen následujícími příklady, obrázky a informacemi o sekvencích.

Přehled obrázků na výkresech

- 40 OBR.1 až OBR. 4:

Konstrukce zde popisovaného expresního plazmidu. (Zkratky: IL-4 TM, trojitý mutein IL-4; IL-4 DM, dvojitý mutein IL-4).

- 45 OBR.5:

- Plazmidová stabilita expresních vektorů muteinu IL-4 pRO21.1.O a pRO2.1.O. Vektor pRO2.1.O zůstává zcela stabilní přes 78 generací bez selekce antibiotiky. Na rozdíl od tohoto je expresní vektor pRO21.1.O, který je založen na komerčně dostupném plazmidu pET-30a (Novagen), ztracen velmi rychle. Pouze 16 % kolonií obsahuje plazmid po 78 generacích bez
- 50 kanamycinové selekce.

OBR.6:

Udržení schopnosti indukce a exprese zde popisovaného expresního vektoru IL-4 a muteinu IL-4.

Příklady provedení vynálezu

10 Příklad 1

Test stability plazmidu

15 Testy stability plazmidu byly vždy startovány kulturou zmraženou v tekutém dusíku. Po roztátí kultury byla stanovena OD_{600} a kultura byla zředěna na 10^{-4} PBS pufrém a poté byla rozetřena na misky s LB médiem ztuženým agarem bez antibiotika.

20 Při provádění tohoto testu byl 1 mililitr roztáté kultury inokulován do 100 mililitrů peptonového média (30 gramů sojového peptonu, 20 ramů kvasničného extraktu, 5 gramů KH_2PO_4 , 20 ramů glycerolu, 1 miligram $MgSO_4 \times 7 H_2O$ na litr, pH 7, 0) a inkubován při 37 °C za třepání 280 rpm po dobu 24 hodin.

25 Byla stanovena OD_{600} narostlé kultury, kultura byla zředěna až do koncentrace 10^{-4} v PBS pufru a poté byla rozetřena na misky s LB médiem ztuženým agarem bez antibiotika aby byly získány dobře oddělené kolonie.

100 μ l narostlé kultury bylo inokulováno do 100 mililitrů peptonového média a inkubováno při 37 °C za třepání 280 rpm po dobu 24 hodin. Tento postup byl opakován osmkrát.

30 100 dobře oddělených kolonií z LB misek bylo očkováno na LB misky s kanamycinem (25 μ g/ml) a LB misky bez kanamycinu a inkubováno při 37 °C po dobu přes noc. Procentuální zastoupení rezistentních kolonií bylo určováno každý den.

35 Počty generací za den byly vypočteny podle následujícího vzorce: $\log [OD_{600 \text{ END}} / OD_{600 \text{ BEG}}] / \log 2$.

Pro expresní studie byl 1 mililitr narostlé kultury zředěn 100-krát LB médiem a bylo s ním nakládáno dle popisu (viz příklad 2).

40 Příklad 2

Expres

45 Pro expresi interleukinu-4 a muteinu interleukinu-4 v malém měřítku byly buňky kultivovány v LB médiu (10 gramů Bacto tryptonu, 5 gramů kvasničného extraktu, 10 gramů NaCl na litr, pH 7,5) dokud OD_{600} nedosáhla 0,8 až 1,0. Expres byla indukována přidavkem IPTG do finální koncentrace 0,5 mM a inkubace pokračovala po dobu 5 hodin. Buňky byly z média získány centrifugací.

50 Pro SDS-PAGE analýzu byly buněčné pelety resuspendovány ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE do koncentrace 1 jednotka $OD_{600}/100 \mu$ l.

SEKVENCE

<110> Bayer AG

<120> PLASMIDY, JEJICH KONSTRUKCE A JEJICH UŽITÍ PŘI VÝROBĚ INTERLEUKINU-4 A MUTEINŮ INTERLEUKINU-4

<130> Plasmidy pro muteiny IL-4

<160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> neznámý

<220>

<223> Popis neznámého organismu: primer

<400> 1

tcaattgtga gcggataaca atttcacaca tctagaaata atttgta actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNA

<213> Neznámý

<220>

<223> Popis neznámého organismu: Člověk

<400> 2

```

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacoga ggcagttcca 120
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgcacac 240
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttcttcc cagacttggt caacaggcca 300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcaactcgc atcaaccaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata 480
ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac 540
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaaagggc ataaattccg tcagccagtt 600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
caactctggc gcatcgggct tccatacaaa tcgatagatt gtgcacactg attgcccgac 720
attatcgcca gccatttat accatataaa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg 780
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat 840
gtaagcagac agttttattg ttcattgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 900
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg 960
taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgtaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1020
aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag atacaaaata 1080
ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 1140
catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgct 1200
ttaccgggtt ggactcaaga cgtatgttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 1260
ggggttcgtg cacacagccc agcttgagag gaacgacct caccgaactg agatacctac 1320
agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcgag aggtatccgg 1380
taagcggcag ggtcggaaca ggagaagcga cgaggagct tccaggggga aacgcctggt 1440

```

```

atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 1500
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg 1560
ccttttgctg gctttttgct cacatgttct ttctgtcggt atccccgat tctgtggata 1620
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgtcgcgcg cagccgaacg accgagcgca 1680
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcata 1740
tgtgcggtat ttacacaccg aatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 1800
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 1860
ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 1920
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt ttccaccgtc atcaccgaaa 1980
cgcgcgaggc agctgcggtt aagctcatca gcgtggctgt gaagcgattc acagatgtct 2040
gcctgttcat ccgcgtccag ctggttgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 2100
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tctgttttgg tcaactgatgc ctccgtgtaa 2160
gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata 2220
cgggttactg atgatgaaca tgcccgggtt ctggaacggt gtgagggtta acaactggcg 2280
gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg ctcatgagcc 2340
cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg 2400
cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatccatt 2460
tacgttgaca ccatcgatg gtgcaaaacc ttctcgggtt tggcatgata gcgcccgaa 2520
gagagtcaat tcagggtggg gaatgtgaaa ccagtaacgt tatacgatgt cgcagagtat 2580
gcgggtgtct cttatcagac cgtttcccg cgtgtgaacc aggccagcca cgtttctgcg 2640
aaaaacgggg aaaaagtggg agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccggctg 2700
gcacaacaac tggcgggcaa acagtctgtg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc 2760
ctgcacgcgc cgtcgcaaat tgcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc 2820
agcgtgggtg tgcgatggg agaacgaag gcgctcgaag cctgtaaacg ggcggtgcac 2880
aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat 2940
gccattgctg tggaaagtgc ctgcaactaa gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac 3000
cagacaccca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcggtggg 3060
catctggctg cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggccatt aagtctctgc 3120
tcggcgcgtc tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg 3180
atagcgggaa gggaaggcga ctggagtgc atgtccggt ttcaacaaac catgcaaatg 3240
ctgaatgagg gcatcggtcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc 3300
gcaatgcgcg ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga 3360
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt taaccaccat caaacaggat 3420
tttgcgctgc tggggcaaac cagcgtggac cgcttgcctc aactctctca gggccaggcg 3480
gtgaagggca atcagctgtt gccgtctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggctcga 3540
gaaatcataa aaaatttatt tgctttgtga gcggataaca attataatag attcaattgt 3600
gagcgataaa caatttcaca catctagaaa taattttatt taactttaag aaggagatat 3660
acatatgcac aaatgcgata tcacctgca ggaatcatc aaaacctga attctctgac 3720
cgaacagaaa accctgtgca ccgaactgac cgttaccgac atcttgcctg cttcgaaaaa 3780
caccaccgaa aaagaaacct tctgccgtgc tgctaccgtt ctgcgtcagt tctactctca 3840
ccacgaaaaa gacaccggtt gcctgggtgc taccgctcag cagttccacc gtcacaaaaa 3900
gctgatccgt ttctgaaac gtctggaccg taacctgttg ggtctggctg gctctgaacg 3960
ctgcccgtt aaagaagcta accagtctac cctggaaaaa ttcttgaaac gctctgaaac 4020
catcatggac gaaaaagact ctaaatgctc ttcttaataa ggatccggct gctaacaaag 4080
ccgaaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacctctg 4140
gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggataat 4200

```

4202

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Vektor pro výrobu IL-4 a muteinů IL-4 ve kmeni *Escherichia coli*, sestávající z operativně spojených elementů ve směru 5' ke 3': regulovatelného promotoru sestávajícího z promotoru fága T5 *E. coli* a dvou lac operátorových sekvencí, vazebného místa pro ribosom z bakteriofága T7g10 *E. coli*, iniciačního translačního kodonu, strukturního genu pro IL-4 nebo mutein IL-4 a transkripčního terminátoru za strukturním genem.

10

2. Vektor obsahující DNA sekvenci znázorněnou jako Seq. ID. NO. 2.

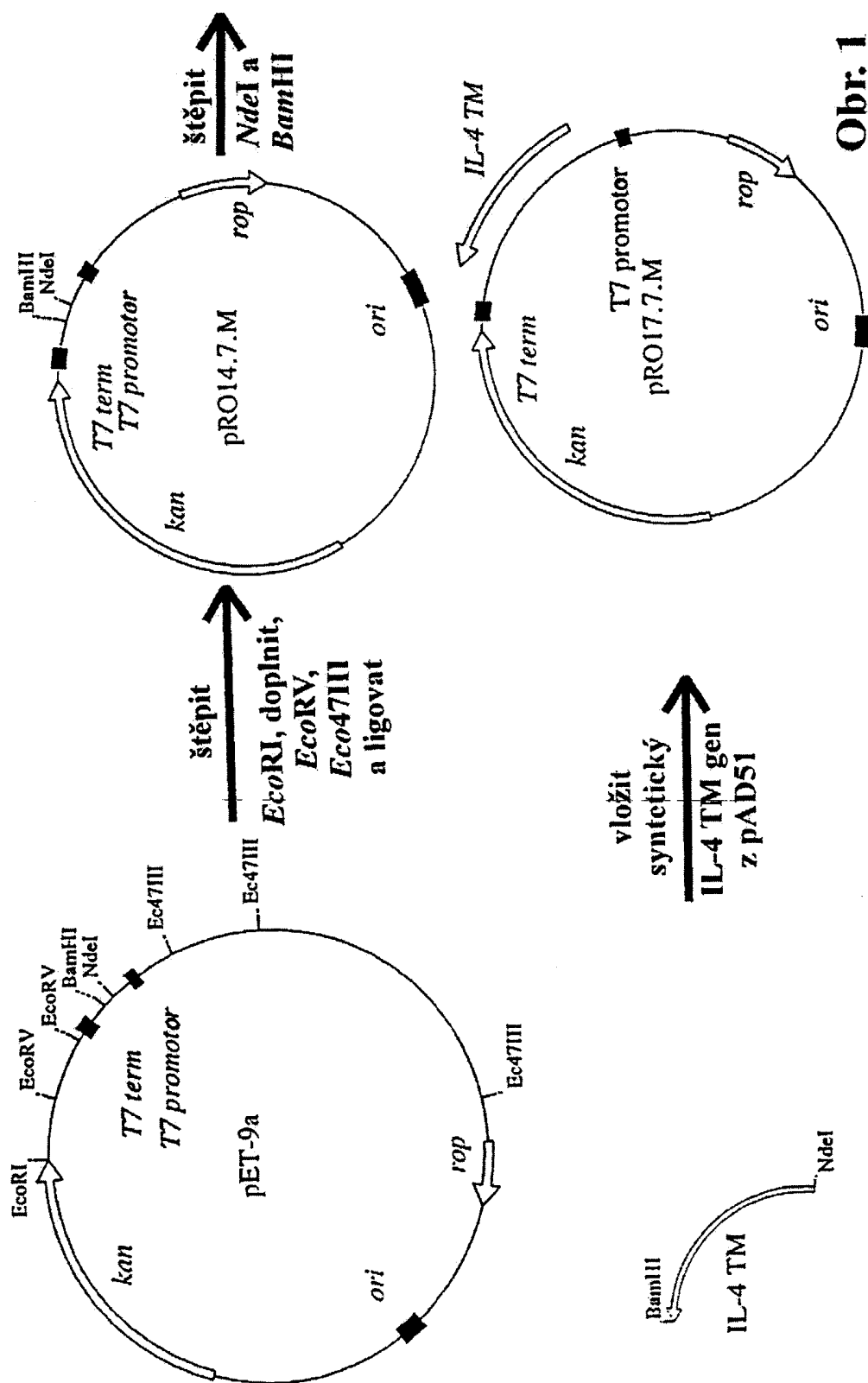
15

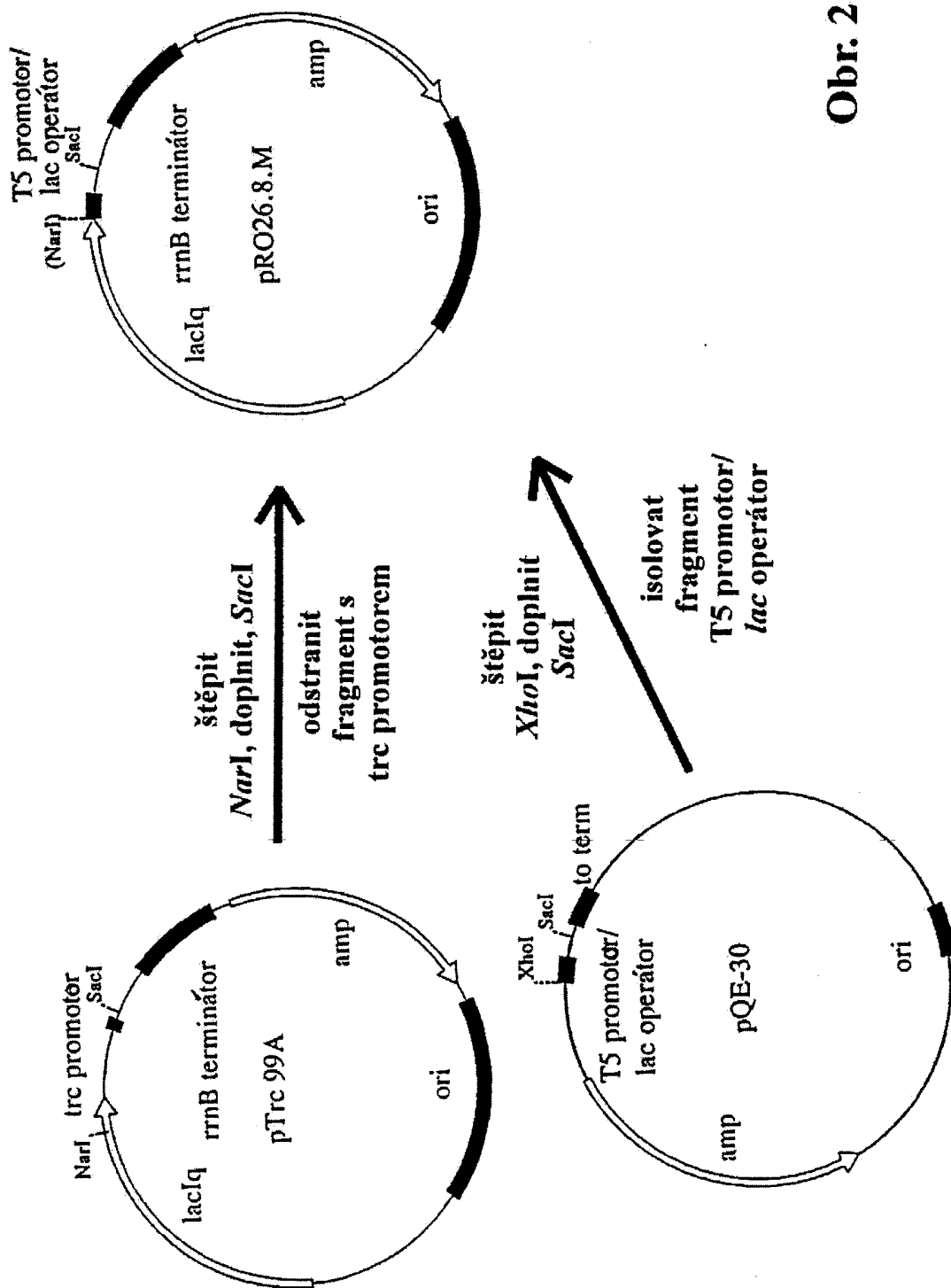
3. *Escherichia coli* transformovaná jedním nebo více vektory podle nároku 1 nebo 2.

4. Použití vektoru podle nároku 1 nebo 2 v metodě přípravy IL-4 a muteinů IL-4.

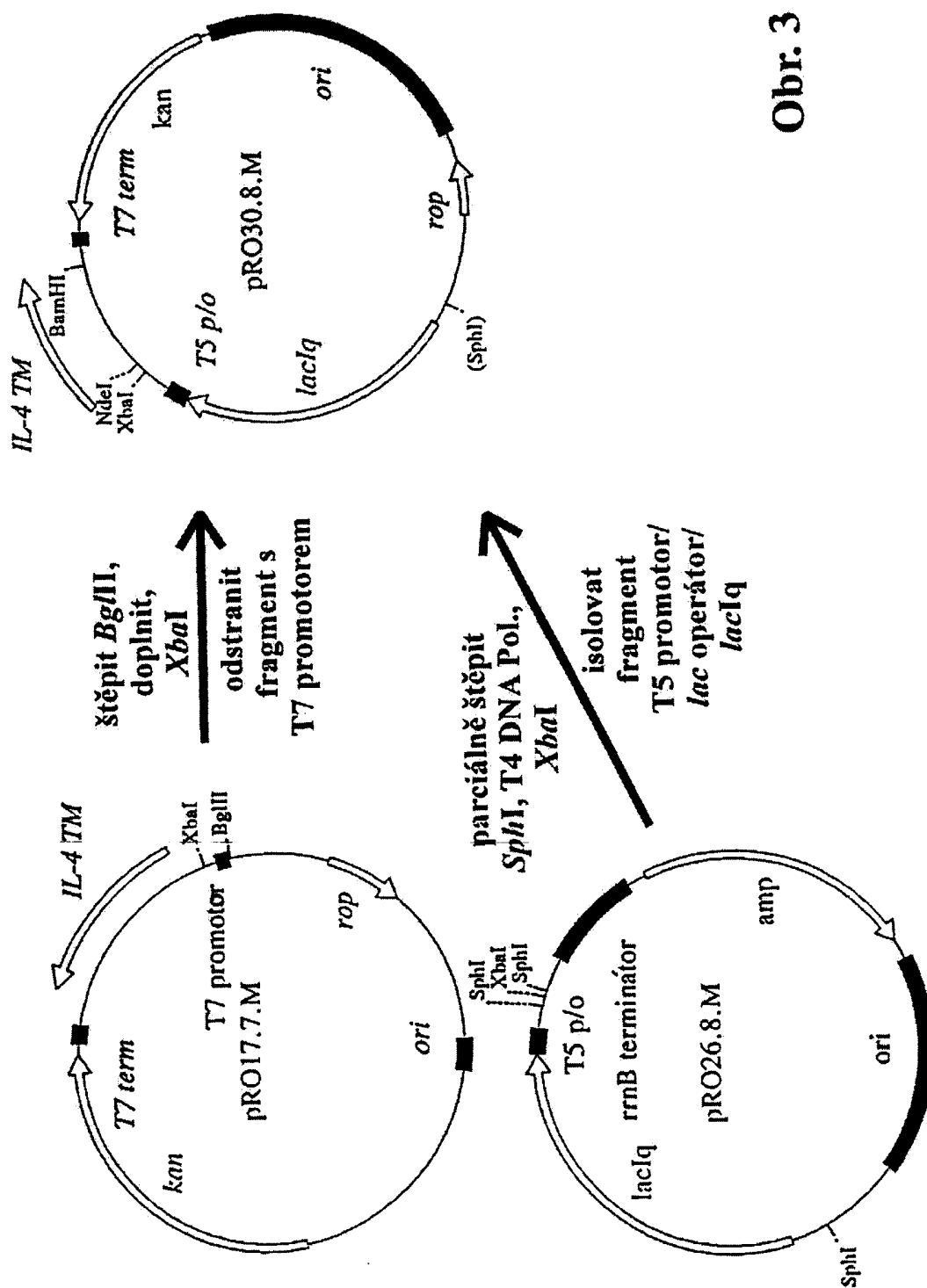
20

6 výkresů

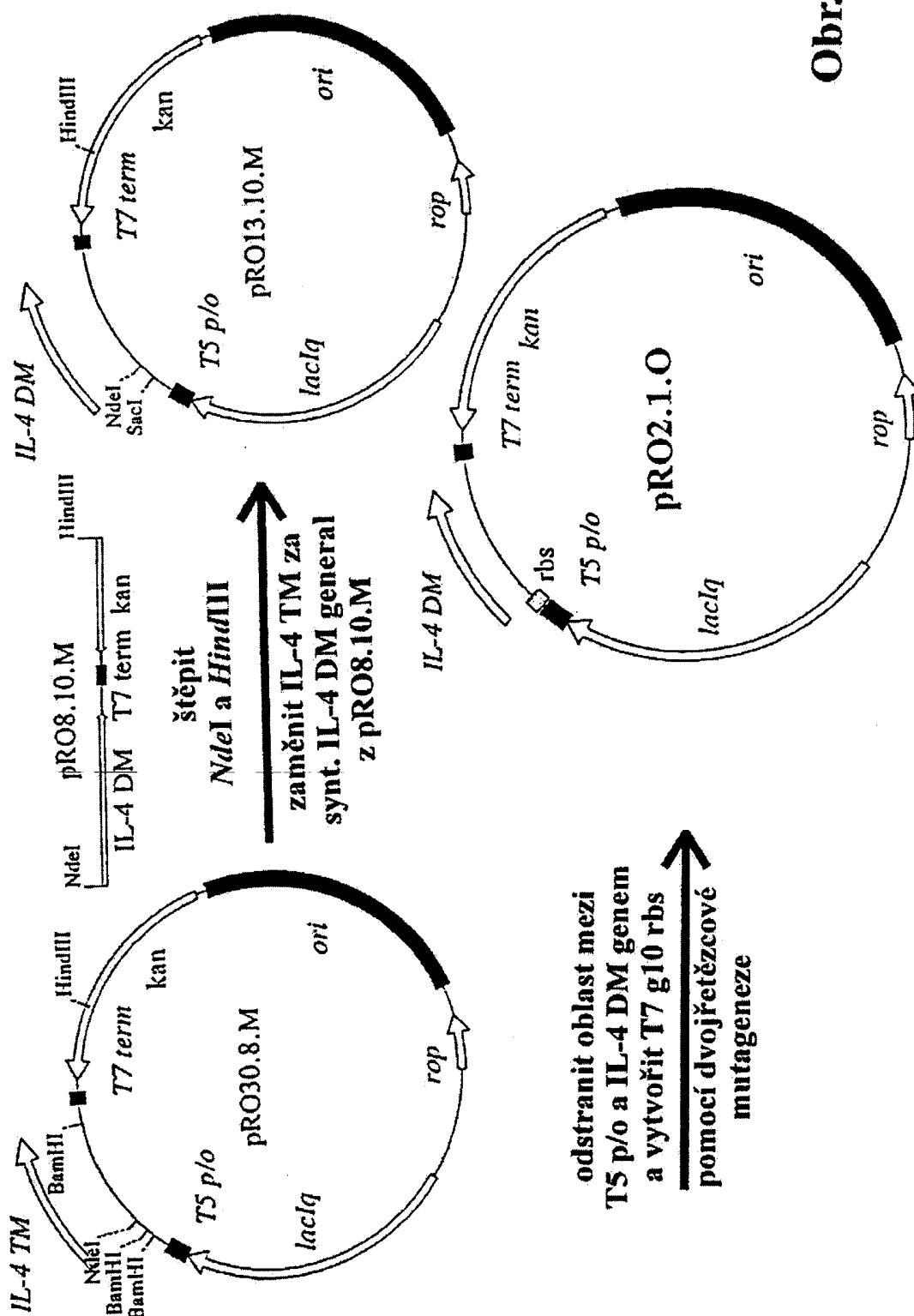




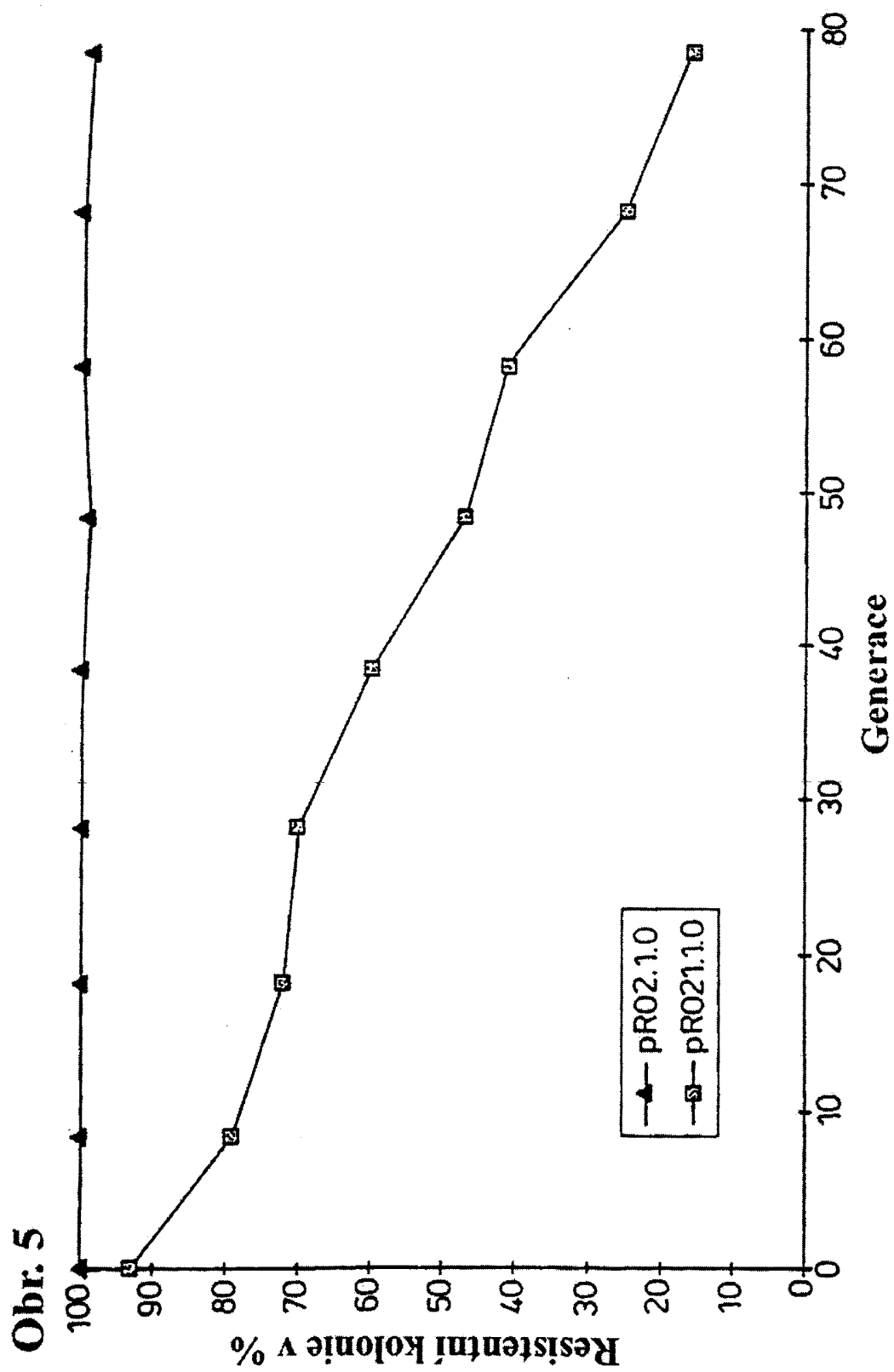
Obr. 2



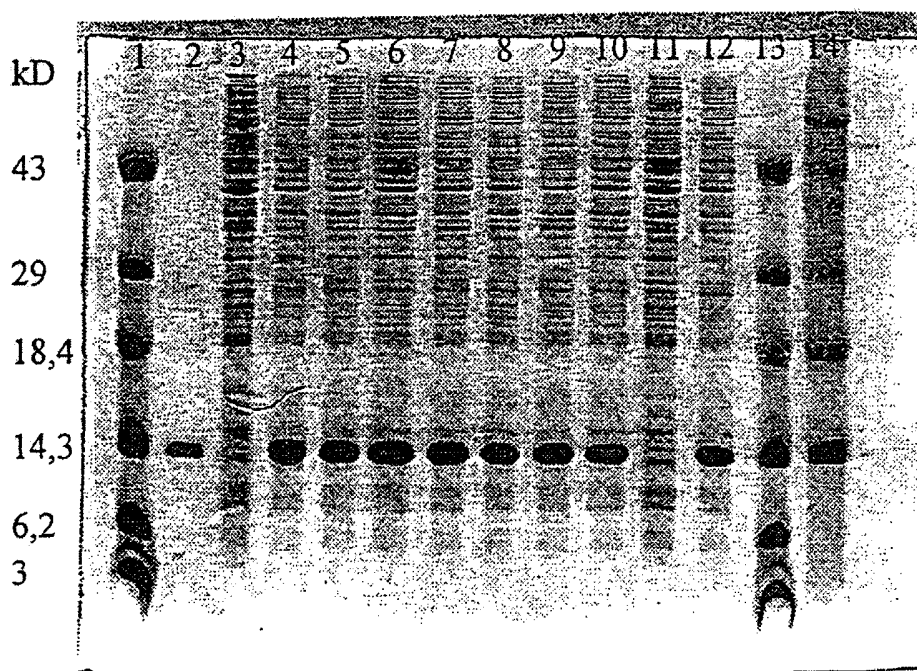
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 6



SDS-PAGE (15%) analýza celkových extraktů z *E. coli*/pRO2.1.0 pěstovaných různý počet generací bez selekce antibiotiky 5 hodin po indukci IPTG. 10 μ l resuspendovaných buněčných pelet bylo aplikováno do každé jamky. Elektroforesa proběhla za denaturačních podmínek a gel byl barven pomocí Coomassie brilliant blue.

- Dráha 1: Marker molekulových hmotností (Malý Rozsah, Life Technologies)
- Dráha 2: IL-4 mutein (μ g)
- Dráha 3: *E. coli*/pRO2.1.0 (8 generací) před indukcí
- Dráha 4: *E. coli*/pRO2.1.0 (8 generací) po indukci
- Dráha 5: *E. coli*/pRO2.1.0 (18 generací) po indukci
- Dráha 6: *E. coli*/pRO2.1.0 (28 generací) po indukci
- Dráha 7: *E. coli*/pRO2.1.0 (38 generací) po indukci
- Dráha 8: *E. coli*/pRO2.1.0 (48 generací) po indukci
- Dráha 9: *E. coli*/pRO2.1.0 (58 generací) po indukci
- Dráha 10: *E. coli*/pRO2.1.0 (68 generací) po indukci
- Dráha 11: *E. coli*/pRO2.1.0 (78 generací) před indukcí
- Dráha 12: *E. coli*/pRO2.1.0 (78 generací) po indukci
- Dráha 13: Marker molekulových hmotností (Malý Rozsah, Life Technologies)
- Dráha 14: Marker molekulových hmotností (Vysoký Rozsah, Life Technologies)

Konec dokumentu
