

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

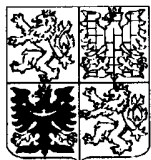
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2031-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 12. 94**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.12.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94US/9413268**

(33) Země priority: **WO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 09. 98**
(**Věstník č. 9/98**)

(86) PCT číslo: **PCT/US94/13268**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/20724**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/28
C 12 N 15/17

(71) Přihlášovatel:

BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.,
Iselin, NJ, US;

(72) Původce:

Hartman Jacob R., Holon, IL;
Mendelovitz Simona, Tel Aviv, IL;
Gorecki Marian, Rehovot, IL;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob produkce rekombinantního
humánního inzulinu**

(57) Anotace:

Způsob produkce insulínu, který zahrnuje: a/
"správné sbalení" /folding/ hybridního poly-
peptidu obsahujícího proinsulin v pod-
mínkách, které umožňují vytvoření pří-
slušných /"správných"/ disulfidických vazeb;
b/ vystavení sbaleného hybridního polypepti-
du obsahujícího "správné" disulfidové vazby
působením enzymů jejichž působením dojde k
vytvoření insulínu; c/ purifikaci insulínu.

CZ 2031-97 A3

Oblast techniky

Předmětem vynálezu je způsob přípravy lidského insulínu, který zahrnuje "sbalení" hybridního polypeptidu obsahujícího proinsulin, a to za podmínek, které umožňují vytvoření "správných" disulfidových vazeb, štěpení "sbaleného" polypeptidu se "správně" vytvořenými disulfidovými vazbami pomocí enzymů, přičemž výsledkem zmíněného enzymatického štěpení je vznik aktivního lidského insulínu, a dále purifikace tohoto aktivního lidského insulínu.

Předmětem vynálezu je dále polypeptid obsahující proinsulin a signální peptid připojený k N-konci proinsulinu, kde je tento polypeptid "sbalený" a obsahuje správné rozložení disulfidových vazeb.

Dosavadní stav techniky

V této přihlášce jsou odkazy k jednotlivým citacím uvedeny arabskými číslicemi v kulatých závorkách a celé citace mohou být nalezeny na konci přihlášky (před oddílem Patentové nároky).

Insulin je polypeptidový hormon, který je nezbytný pro kontrolu metabolismu glukózy. Je denně podáván pacientům trpícím cukrovkou (diabetes melitus), což je metabolická porucha charakterizovaná nedostatečným zásobováním organismu insulinem.

In vivo, je hormon nejprve syntetizován jako dlouhá prekurzorová molekula, která je dále přeměňována na svou biologicky aktivní formu. Tato biologicky aktivní forma se

skládá ze dvou řetězců, označovaných A a B. Podrobněji řečeno, gen pro preproinsulin se v β -buňkách slinivky přepisuje do prekurzorové mRNA. Tato mRNA je poté sestřižena a výsledkem tohoto sestřihu je vznik maturované mRNA, která je překládána v preproinsulin. Preproinsulin, který je možno schematicky znázornit vzorcem (NH_2 -pre-sekvence-řetězec B-peptid C-řetězec A-COOH), je následně přeměňován v proinsulin a nakonec v insulin. Prvním krokem přeměny je proteolytické odstranění pre-sekvence, která slouží jako signální hydrofobní sekvence pro přenos nascentního řetězce hormonu přes mikrosomální membránu drsného endoplasmatického retikula. V lidském preproinsulinu je délka této pre-sekvence 24 aminokyselinových zbytků.

V proinsulinu jsou obě oblasti polypeptidového řetězce, které posléze vytvoří maturovaný insulin, tedy řetězce A a B, navzájem spojeny peptidem C (nebo řetězcem C), který na svém N a C konci obsahuje dva páry bazických aminokyselin. U většiny peptidů C je tento bazický pár tvořen aminokyselinami Arg-Arg nebo Lys-Arg. Lidský peptid C se, včetně obou koncových párů bazických aminokyselin, skládá z 35 aminokyselin. Peptid C spojuje dvě oblasti polypeptidu tak, aby byl usnadněn vznik disulfidového můstku mezi segmenty A a B. Úloha peptidu C proto není příliš závislá na jeho struktuře. Ve skutečnosti nahrazení tohoto peptidu kratším syntetickým můstkem stále umožňuje vlastní "sbalení" molekuly proinsulinu (1, 2).

"Sbalení" molekuly proinsulinu je doprovázeno oxidací dvou disulfidových vazeb, které se nacházejí mezi jednotlivými řetězci a jedné disulfidové vazby uvnitř řetězce A. V posledním stádiu maturace uvolní proteolytické enzymy nastěpením v místě bazických aminokyselinových zbytků peptid C a vytvoří tak maturovaný insulin (3). V lidském insulinu

obsahuje řetězec A 21 aminokyselin, zatímco řetězec B je dlouhý 30 aminokyselinových zbytků.

Světová poptávka po insulinu dosahuje ročně několika tun, a tak nastává vážný nedostatek v jeho dodávkách. Tradičně se insulin připravuje z omezených zvířecích zdrojů, což jsou hlavně hovězí a vepřové pankreatické preparáty, které se liší od lidského insulinu a mohou tak vyvolat nepříznivou imunitní reakci.

Studie prováděné během šedesátých let prokázaly možnost přípravy insulinu in vitro. Syntézy insulinu bylo dosaženo kombinováním řetězců A a B v jejich S-sulfonované formě (4) nebo spontánní reoxidací redukováného proinsulinu (5). Posledně jmenovaný způsob přípravy nebyl prakticky využitelný pro výrobu insulinu ve velkém měřítku, protože v oxidační směsi byla velmi nízká koncentrace tohoto proteinu. Insulin mohl být následně získán působením trypsinu a karboxypeptidázy B (6).

V poslední době začíná být využíván semisyntetický a biosyntetický (rekombinantní) lidský insulin. Semisyntetický lidský insulin je připravován z prasečího insulinu pomocí trypsinem katalyzované výměny treoninu za alanin v pozici 30 řetězce B (což je jediný rozdíl mezi lidským a prasečím insulinem). Rekombinantní lidský insulin připravovaný buď v bakteriích *E. coli* nebo v kvasinkách v budoucnosti nahradí všechny další cesty přípravy.

Biosyntetický rekombinantní lidský insulin se běžně připravuje dvěma cestami, a to buď přípravou každého z řetězců A a B zvlášť v bakteriích *E. coli* a jejich následnou kombinací (7, 8) nebo enzymatickou konverzí proinsulinu exprimovaného ve formě polypeptidu buď v *E. coli* (1, 8) nebo kvasinkách (2, 9).

Ve většině případů je proinsulin připravován ve formě hybridního proteinu, který je akumulován ve formě intrace-

lulárního precipitátu. Tento hybridní protein je purifikován běžným způsobem a štěpen pomocí CNBr tak, aby byl uvolněn polypeptid proinsulinu. Tento polypeptid proinsulinu je dále modifikován oxidativní sulfitolýzou na proinsulin ve formě S-sulfonátu. Proinsulin S-sulfonát je poté purifikován a za redukčních podmínek "sbalen" na proinsulin (8). Konverze proinsulinu na insulin je dosaženo kombinovaným působením trypsinu a karboxypeptidázy B (6).

Patent číslo EP 1111195691 B1, udělený společnosti Novo Nordisk A/S popisuje proinsulin vzorce B-Lys-Arg-A a dále pak užití tohoto produktu pro přípravu insulinu v kvasinách.

Patent číslo EP 196056 B1, udělený společnosti Chiron Corp., popisuje protein hSOD-proinsulin produkovaný kvasinami. Před "sbalením" je protein hSOD-proinsulin štěpen pomocí bromkyanu a podroben sulfitolýze.

V patentu EPO číslo 379162 popisuje společnost Hoechst skutečnost, že "chybné rekombinanty (false recombinants) prekurzorů insulinu" (to jest rekombinantních produktů insulinu s nesprávnými nebo částečně nesprávnými intermolekulárními disulfidovými můstky) mohou být přeměněny na "správné" insulinové produkty bez toho, aby byly podrobeny sulfitolýze. Tento postup využívá reakci "chybných" rekombinantů ve vodném prostředí za použití nadbytku merkaptanu a za přítomnosti organického oxidačně-redukčního systému. Počáteční krok sulfitolýzy se používá, po odštěpení (chemicky nebo enzymaticky) aminokyselinových nebo peptidových zbytků z fúzních polypeptidů (což se uskutečňuje po lýze hostitelské buňky). Po tomto kroku je všech šest cysteinů nacházejících se v prekurzoru insulinu přeměněno na S-sulfonáty. V následujícím renaturačním kroku se z tohoto preinsulinu ve formě S-sulfonátu vytváří preinsulin za vzniku tří "správných" disulfidových můstků ve své přiroze-

né formě. V průběhu tohoto renaturačního kroku se vytvářejí takzvané "nepravé, chybné" rekombinanty.

Hoechst dále v Mezinárodním patentu PCT číslo WO 91/03550 uvádí způsob přípravy fúzních proteinů obsahujících požadovaný protein (to jest proinsulin) a "vedlejší složky". Sulfitolýza se provádí před "sbalením", zatímco "vedlejší složka" se odštěpuje průběžně po "sbalení" společně s C-řetězcem proinsulinu.

Hoechst dále v EP 347781 B1 popisuje, takzvaný "mini proinsulin" (B-Arg-A) a jeho využití pro přípravu mono-Arg insulinu a insulinu. Je zde rovněž popsán fúze proteinů zahrnujících B-Arg-A a "balastní složku". "Balastní složka" je odštěpena pomocí bromkyanu. Sulfitolýza probíhá ještě před "sbalením" polypeptidu.

Předmětem vynálezu je příprava rekombinantního lidského insulinu, a to pomocí vylepšeného a účinnějšího postupu. Rekombinantní hybridní polypeptidy proinsulinu zahrnující signální sekvenci jsou syntetizovány v bakteriích E. coli. Po částečné purifikaci jsou tyto rekombinantní polypeptidy "sbaleny" se signálním polypeptidem, a to za takových podmínek, které dovolují správné funkční sbalení. Biologicky aktivní lidský insulin je potom připraven kombinovaným působením trypsinu a karboxypeptidázy B. Působením těchto enzymů se souběžně odštěpuje signální peptid a řetězec C. Takto připravený a purifikovaný lidský insulin je totožný s přirozeně se vyskytujícím lidským insulinem.

Nebezpečné a těžkopádné postupy zahrnující štěpení hybridních polypeptidů pomocí CNBr a sulfitolýzu, užívanou k ochraně četných SH skupin, se v novém způsobu podle vynálezu nepoužívají. Vlastní hybridní polypeptid proinsulinu se může účinně "sbalit" do své vlastní přirozené struktury dokonce i v přítomnosti signálního peptidu a nechráněných cysteinových zbytků. Aktivní rekombinantní lidský insulin

se uvolňuje enzymatickým štěpením a je následně purifikován.

Přehled Obrázků na výkresech

V restričních mapách tří plazmidů zobrazených na Obrázcích 3 až 5 nejsou uvedena všechna restriční místa přítomná na těchto plazmidech. Jsou však zobrazena všechna restriční místa nezbytná pro úplné porozumění vynálezu.

Obrázek 1: Příprava lidského insulinu pomocí enzymatického štěpení "sbaleného", disulfidovými vazbami propojeného hybridního polypeptidu proinsulinu, který byl připraven expresí z plazmidu pBAST-R. Na obrázku je uvedena pouze část signální sekvence SOD. Zkratka CPB užitá v popisu obrázku znamená označení pro karboxypeptidázu B.

Obrázek 2: Příprava lidského insulinu pomocí enzymatického štěpení "sbaleného", disulfidovými vazbami propojeného hybridního polypeptidu proinsulinu, který byl připraven expresí z plazmidu pDBAST-LAT nebo z plazmidu p λ BAST-LAT. Na Obrázku je uvedena pouze část signální sekvence SOD. Použitá zkratka CPB má stejný význam jako v Obrázku 1.

Obrázek 3: Struktura plazmidu pBAST-R, expresivního plazmidu kódujícího hybridní polypeptid SOD-proinsulin, uloženého v ATCC pod přístupovým číslem 69362.

Obrázek 4: Struktura plazmidu pDBAST-LAT, expresivního plazmidu kódujícího hybridní polypeptid SOD-proinsulin. Tento plazmid je uložen v ATCC a bylo mu přiděleno přístupové číslo 69361.

Obrázek 5: Struktura plazmidu p λ BAST-LAT, expresivního plazmidu kódujícího hybridní polypeptid SOD-proinsulin. Tento plazmid je uložen v ATCC a bylo mu přiděleno přístupové číslo 69363.

Obrázek 6: Aminokyselinová a odpovídající nukleotidová sekvence (DNA) hybridního polypeptidu SOD-proinsulin exprimovaného z plazmidu pBAST-R.

Obrázek 7: Aminokyselinová a odpovídající nukleotidová sekvence (DNA) hybridního polypeptidu SOD-proinsulin exprimovaného z plazmidů pDBAST-LAT a p λ BAST-LAT.

Obrázek 8: Příprava lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pBAST-R jako funkce hodnot pH směsi používané ke "sbalení" proteinu.

Sbalení hybridního polypeptidu proinsulinu (připraveného tak, jak je popsáno v Příkladu 2) bylo prováděno při různých hodnotách pH, tak jak je označeno na tomto obrázku a to v pufru obsahujícím 100 mM glycin, při 4°C po dobu 16 hodin s koncentrací hybridního polypeptidu buď 1 mg/ml nebo 0,5 mg/ml. "Sbalený" polypeptid byl vystaven působení trypsinu (1:500 w/w; Sigma) a karboxypeptidázy B (CPB, Sigma, 1:200 w/w) po dobu 30 minut při teplotě 37°C a hodnotě pH 9. Vzniklý produkt byl analyzován na přítomnost imunoreaktivního insulinu (IR) pomocí radioimunostanovení využívajícího insulin značený izotopem ^{125}I (Amersham) a lidský rekombinantní insulin (Calbiochem) jako standardy.

Obrázek 9: Příprava lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT.

Hybridní polypeptid proinsulinu (připravený tak, jak je popsáno v Příkladu 2) byl rozpuštěn v pufru o složení 8M močovina, 5 mM HCl, v koncentraci přibližně okolo 30 mg/ml a poté byl naředěn na koncentraci 1 mg/ml v pufru o složení 100 mM glycín-NaOH, pH 11,0. "Sbalení" probíhalo při 22°C (za pokojové teploty) po dobu 20 hodin. pH roztoku bylo následně pomocí HCl upraveno na hodnotu 8,8. Do reakční směsi byla poté přidána karboxypeptidáza B (1:1000 w/w, Sigma) a trypsin (1:2000 w/w, Sigma). Reakční směs byla inkubována po dobu 60 minut při teplotě 37°C. pH této směsi bylo před ředěním 10 mM HCl upraveno na hodnotu 3. Vzorky o objemu 150 µl byly dále analyzovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na koloně s reverzní fází (RP -HPLC) o rozměrech 250 x 4 mm, obsahujícím 5µ Lichrosphere 100 RP-8 (Merck). Kolona byla ekvilibrována pufrem o složení 50 mM fosforečnan trimethylamonia, 162 mM NaClO₄, pH 3, obsahujícím 31,5 % (v/v) acetonitrilu. Vzorky byly z kolony vymývány lineárním gradientem acetonitrilu v rozsahu koncentrací 31,5 až 40,5 % po dobu 75 minut a při průtokové rychlosti 1 ml za minutu. Proměřovala se absorbance při vlnové délce 220 nm.

Následující části Obrázku označené písmeny odpovídají.

A: 5 µg standardního insulinu (Boehringer - Mannheim)

B: připravený rekombinantní lidský insulin vystavený enzymatickému působení

C: "sbalený" hybridní polypeptid SOD-proinsulin

Obrázek 10: Příprava lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT jako funkce hodnot pH směsi používané ke "sbalení" proteinu

Hybridní polypeptid proinsulinu (připravený tak, jak je popsáno v Příkladu 2) byl naředěn na koncentraci 1 mg/ml v pufru o složení 100 mM glycín-NaOH s hodnotami pH vyznače-

nými na ose x. "Sbalení" probíhalo po dobu 16 hodin při 22°C. Enzymatické zpracování polypeptidu a následná RP-HPLC analýza byla provedena tak, jak bylo popsáno v popisu k obrázku 9. Množství rekombinantního lidského insulinu připraveného z hybridního polypeptidu bylo počítáno z velikosti plochy píku, který měl stejný retenční čas jako standardní insulin.

Obrázek 11: Příprava lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT jako funkce koncentrace kyseliny askorbové ve směsi používané ke "sbalení" proteinu

"Sbalení" hybridního polypeptidu SOD-proinsulin (připraveného podle popisu v Příkladu 2) bylo prováděno při koncentraci polypeptidu 1 mg/ml v pufru o složení 100 mM glycin-NaOH, pH 11,2 při 22°C a v přítomnosti různých koncentrací kyseliny askorbové vyznačených na obrázku. Vzorky byly vystaveny působení trypsinu a karboxypeptidázy B (tak jak je popsáno pro Obrázek 9) po dobu 5 a 25 hodin, což jsou časové periody užité ke "sbalení". Produkce rekombinantního lidského insulinu byla analyzována pomocí RP-HPLC (tak jak je popsáno pro Obrázek 9).

Křivka proložená symboly trojúhelníku značí 5 hodin působení směsi enzymů. Křivka proložená kolečky označuje 25 hodin inkubace se směsí enzymů.

Obrázek 12: Ověření autenticity ("pravosti") lidského insulinu připraveného z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT

"Sbalení" hybridního polypeptidu SOD-proinsulin (připraveného podle popisu v Příkladu 2) bylo prováděno v koncentraci polypeptidu 1 mg/ml v pufru o složení 100 mM glycin-NaOH, pH 11,2 při teplotě 22°C po dobu 16 hodin a v

přítomnosti 1,2 mM kyseliny askorbové. Po provedení enzymatického štěpení (popsáno u Obrázku 9) byla směs chromatograficky rozdělena na koloně DEAE-Sepharózy, která byla ekvilibrována pufrům o složení 20 mM Tris-HCl, pH 8. Rekombinantní lidský insulin byl z kolony eluován pomocí lineárního gradientu v rozmezí koncentrací 0 až 0,4M NaCl v pufru o složení 20 mM Tris-HCl, pH 8.

Ve frakcích odpovídajících jednotlivým píkům eluovaných z kolony bylo kyselinou chlorovodíkovou upraveno pH na hodnotu 3. Rekombinantní lidský insulin byl dále čištěn ze směsi podobých molekul pomocí RP-HPLC, tak, jak je popsáno u obrázku 9. Hlavní odebraná frakce byla odsolena na koloně Sephadexu G-25 a byla převedena do roztoku 0,25 M octové kyseliny a lyofilizována. Vzorky (5 µg rekombinantního lidského insulinu) byly převedeny do 10 mM HCl a analyzovány pomocí RP-HPLC za stejných podmínek.

Následující symbolické označení částí obrázku velkými písmeny znamená popis křivek odpovídajících:

A: standardní insulin

B: lidský rekombinantní insulin purifikovaný pomocí HPLC

C: kombinovaný vzorek obsahující rekombinantní lidský insulin purifikovaný pomocí HPLC spolu se standardním insulinem

Obrázek 13: Příprava lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT jako funkce koncentrace proteinu ve směsi používané k jeho "sbalení".

Polypeptidový hybrid SOD-proinsulin (připravený dle popisu v Příkladu 2), jehož "sbalení" bylo provedeno v pufru o složení 100 mM glycin-NaOH, pH 11,2, za použití koncentrací proteinu, které se měnily v rozsahu od 0,5 mg/ml až po

10 mg/ml, tak jak je vyznačeno na obrázku. Každá ze směsí použitých ke sbalení proteinu byla doplněna 2,5 moly kyseliny askorbové na 1 mol SH skupin. "Sbalování" bylo prováděno při 24°C (za pokojové teploty) po dobu 16 hodin. Enzymatické štěpení a RP-HPLC analýzy byly provedeny podle popisu uvedeného pro Obrázek 9.

Obrázek 14: Příprava lidského insulínu z hybridního polypeptidu proinsulínu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT ze surového intracelulárního precipitátu jako funkce času používaného k jeho "sbalení".

Intracelulární precipitát byl rozpuštěn v pufru o složení 20 mM glycin-NaOH, 33 μ M EDTA, pH 11,2. Koncentrace rozpuštěného precipitátu byla přibližně rovna hodnotě 2,6 jednotek absorbance měřené při 280 nm na mililitr roztoku (2,6 A_{280} /ml). pH bylo upraveno 10 N hydroxidem sodným na hodnotu 12. Roztok byl míchán po dobu 10 minut. pH bylo následně upraveno titrací koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 11,2. Bylo přidáno aktivní uhlí (Sigma), promyté kyselinou, a to na výslednou koncentraci 0,1 % w/v a směs byla míchána po dobu dalších 30 minut. Suspenze byla centrifugována (20 minut, 12000 otáček/minuta) při teplotě 20°C. Částečně vyčištěný supernatant po centrifugaci měl absorbanci při vlnové délce 280 nm (A_{280}) přibližně 2,15. Do supernatantu byla přidána kyselina askorbová na výslednou koncentraci 3 mM. "Sbalení" hybridního polypeptidu proinsulínu probíhalo při pokojové teplotě (22 až 23°C) za intenzivního míchání, postupem popsáním výše.

V různých časových intervalech byly v průběhu experimentu odebírány vzorky směsi o objemu 10 ml, bylo u nich upraveno pH na hodnotu pH 8,8 a tyto vzorky byly po dobu jedné hodiny při teplotě 37°C v přítomnosti 50 μ M $ZnCl_2$ vystaveny působení karboxypeptidázy B (1:1000 w/w) a trypsinu

(1:2000 w/w). Štěpení bylo ukončeno okyselením směsi. Obsah insulinu v každém štěpeném vzorku byl určen pomocí RP-HPLC analýzy, tak jak je popsáno u obrázku 9. Průběh reakce "sbalování" je zřejmý ze zvýšení hladiny insulinu (po štěpení) a snížení hladiny volných thiolových skupin, jejichž množství je určeno pomocí Ellmanovy reakce (16).

Symbolem kolečka jsou označeny body křivky závislosti koncentrace insulinu vyjádřené v % na čase "sbalování", symboly kosočtverce prochází křivka závislosti koncentrace volných thiolových skupin vyjádřená v % na době trvání "sbalování" peptidu.

Podstata vynálezu

Plazmidy pBAST-R, pDBAST-LAT a pλBAST-LAT byly 26. července 1993 uloženy v hostitelských buňkách E. coli v souladu s Budapeštskou smlouvou o ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení v depozitní sbírce kultur ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 pod přístupovými čísly 69362 (pBAST-R), 69361 (pDBAST-LAT) a 69363 (pλBAST-LAT)

Termín "hybridní polypeptid", používaný v přihlášce, zahrnuje signální peptid kovalentně připojený k požadovanému polypeptidu. Hybridní polypeptid podle vynálezu obsahuje proinsulin a ve výhodném provedení obsahuje rovněž signální peptid SOD.

Termín "sbalení", používaný v přihlášce, zahrnuje "sbalení" hybridního polypeptidu obsahujícího proinsulin, který nebyl před "sbalením" štěpen bromkyanem ani podroben sulfitolýze, přičemž "správné sbalení" umožňuje vytvoření příslušných disulfidických vazeb v hybridním polypeptidu.

Slovní spojení "vytvoření "správných" (příslušných) disulfidických vazeb v hybridním polypeptidu" , používané v přihlášce, zahrnuje vznik tří disulfidických vazeb u insulínu, a to mezi Cys^{B7} a Cys^{A7}, Cys^{B19} a Cys^{A20} a mezi Cys^{A6} a Cys^{A11} (cysteinové zbytky jsou číslovány podle jejich číslování v maturovaném insulínu).

Termín "proinsulin", používaný v přihlášce, zahrnuje polypeptid, který obsahuje ve směru od N-konce k C-konci řetězce B, C a A insulínu.

Slovní spojení "peptidový řetězec C insulínu", používané v přihlášce, zahrnuje přirozeně se vyskytující peptid C a každé jiné oligopeptidy, dipeptidy nebo jednotlivé aminokyseliny, které mohou být odštěpeny působením trypsinu a karboxypeptidázy B.

Slovní spojení "signální peptid", používané v přihlášce, zahrnuje každý peptid nebo polypeptid kovalentně připojený k řetězci B insulínu, který umožňuje "správné sbalení" a vznik příslušných ("správných") disulfidických vazeb a může být odštěpen působením trypsinu. Signálním peptidem je ve výhodném provedení peptid SOD.

Termín "SOD", používaný v přihlášce, zahrnuje jakoukoliv podstatnou část aminokyselinové sekvence enzymů CuZnSOD nebo MnSOD. Výše zmíněná část nemusí nutně mít stejnou biologickou aktivitu jako peptid SOD, a rovněž nemusí mít, ve srovnání s aminokyselinovou sekvencí přirozeně se vyskytujícího peptidu SOD, identickou aminokyselinovou sekvenci. DNA kódující peptid SOD může být mutována způsoby, které jsou odborníkům známe, například Bauer a další, Gene 37: 73 až 81 (1985).

Slovní spojení "signální peptid" může zahrnovat, namísto peptidu SOD, jakýkoliv další peptid, polypeptid nebo protein nebo každou podstatnou část aminokyselinové sekvence takového peptidu, polypeptidu nebo proteinu, kde výše

zmíněná část nutně nemusí mít biologickou aktivitu výše zmíněného peptidu, polypeptidu nebo proteinu, a rovněž nemusí mít, ve srovnání s aminokyselinovou sekvencí přirozeně se vyskytujícího peptidu, polypeptidu nebo proteinu, identickou aminokyselinovou sekvenci; signální peptid musí nicméně umožnit "správné sbalení" a vytvoření "správných" disulfidických vazeb v hybridním polypeptidu.

Termín "insulin", používaný v přihlášce, může zahrnovat homolog přirozeně se vyskytujícího insulinu.

Termín "proinsulin", používaný v přihlášce, může zahrnovat homolog přirozeně se vyskytujícího proinsulinu.

Termín "homolog", používaný v přihlášce, vztahující se k polypeptidu insulinu produkovaného způsobem podle vynálezu, je polypeptid, který má v podstatě stejnou aminokyselinovou sekvenci a biologickou aktivitu jako insulin. Čili homolog, vzniklý způsobem podle vynálezu, se může lišit od polypeptidu insulinu přidáním, odstraněním nebo náhradou (substitucí) jednoho či více postradatelných aminokyselinových zbytků za předpokladu, že u vzniklého polypeptidu je zachována biologická aktivita insulinu. Odborníci mohou snadno určit, jaké aminokyselinové zbytky mají být přidány, odstraněny nebo nahrazeny (včetně toho pomocí jakých aminokyselin se takové náhrady mají provést) pomocí zavedených známých postupů. Takovými postupy jsou například postupy navržení a zhotovení sekvence DNA kódující gen pro bakteriální expresi polypeptidových homolog polypeptidu podle vynálezu, modifikace cDNA a genomových sekvencí pomocí místně specifických mutagenezí, konstrukce rekombinantních proteinů a expresivních vektorů, bakteriální exprese polypeptidů a měření biochemické aktivity polypeptidů použitím obvyklých biochemických stanovení.

Shora uvedené definice homolog insulinu platí stejně pro homologa proinsulinu.

Příkladem homolog insulinu, vytvořených způsoby podle vynálezu, jsou deleční homologa neobsahující všechny aminokyselinové zbytky přirozeně se vyskytujícího insulinu, substituční homologa, kde je jeden nebo přesně stanovený počet zbytků nahrazen jinými zbytky a adiční homologa, kde je přidán jeden nebo více aminokyselinových zbytků ke koncové nebo prostřední části polypeptidu insulinu, přičemž všechna tato homologa mají biologickou aktivitu insulinu.

Příklady homolog jsou analoga insulinu popsána v Přihlášce EP 384472 a také analog insulinu "Humalog" od firmy Eli Lilly, jak byl popsán v "Eli Lilly and Company Report to Shareholders 1992".

Slovní spojení "v podstatě stejné aminokyselinové sekvence", definované v přihlášce, zahrnuje substituce a/nebo delece a/nebo přidání aminokyselin do aminokyselinové sekvence a může zahrnovat až deset zbytků, které odpovídají homologickým nebo ekvivalentním skupinám, jak bylo popsáno například v publikacích Albert L. Lehninger, Biochemistry, druhé vydání, Worth Publishers Inc. (1975), kapitola 4; Creighton, Protein Structure, a Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England (1989); Margaret O. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, Svazek 5, The National Biomedical Research Foundation (1972), kapitola 9. Takové substituce jsou odborníkům známé.

DNA kódující polypeptid insulinu může být mutována odborníkům známými způsoby, popsány například v publikaci Bauer a další, Gene 37: 73 až 81 (1985). Mutovaná sekvence může být vložena do vhodných expresivních vektorů (popsaných v přihlášce), které jsou zavedeny do buněk a zpracovány tak, že mutovaná DNA umožňuje expresi polypeptidového homologu.

Plazmidy podle vynálezu, které obsahují sekvenci kódující hybridní polypeptid obsahující proinsulin, mohou být upraveny pro expresi v bakteriích, kvasinkách, houbách nebo živočišných buňkách jako jsou CHO (buňky křeččích ovárií), embryo kuřat, fibroblasty nebo další známé buněčné linie. Tyto plazmidy navíc obsahují regulační prvky nutné pro expresi introdukovaného genu v bakteriích, kvasinkách, houbách nebo v savčích buňkách, které jsou tak vzájemně umístěny vzhledem ke genu hybridního polypeptidu takovým způsobem, aby byla umožněna jeho exprese. Regulační prvky nutné pro expresi zahrnují promotorovou sekvenci pro navázání RNA polymerázy a ribozomální vazebné místo pro navázání na ribozom.

Z plazmidů podle vynálezu je exprimován hybridní polypeptid obsahující proinsulin.

Odborníci porozumí, že plazmidy uložené ve spojitosti s touto přihláškou mohou být snadno pozměněny známými postupy (například místně specifickou mutagenezí nebo vložním linkerů) tak, aby byl kódován gen pro expresi homologních polypeptidů. Takové postupy jsou popsány například v publikaci Sambrook, J., Fritsch, E. F. a Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

V plazmidu jsou vhodné regulační prvky umístěny, vzhledem k DNA kódující hybridní polypeptid zahrnující proinsulin tak, aby řídily expresi hybridního polypeptidu ve vhodné hostitelské buňce. Ve výhodném provedení vynálezu jsou tyto regulační prvky umístěny v protisměru transkripce v blízkosti DNA kódující hybridní polypeptid.

Různá ribozomální vazebná místa (ribosomal binding sites-RBS), například deo RBS, umožňují mRNA kódující hybridní polypeptid obsahující proinsulin (přepsané z DNA) vázat

se v hostitelské buňce na ribozómy, a jsou rovněž předmětem vynálezu.

Plazmidy podle vynálezu také obsahují iniciační kodon ATG. DNA kódující hybridní polypeptid zahrnující proinsulin je ve stejném čtecím rámci s iniciačním kodonem ATG.

Plazmidy podle vynálezu také zahrnují sekvenci DNA obsahující počátek replikace z takového bakteriálního plazmidu, který je schopen autonomní replikace v hostitelské buňce. Vhodné počátky replikace mohou být získány z různých zdrojů, například z plazmidu pBR322 (v ATCC pod přístupovým číslem 37017).

Plazmidy podle vynálezu také zahrnují sekvenci DNA obsahující gen, který je spojený se selektivním nebo fenotypovým znakem, který se projeví tehdy, je-li plazmid přítomen v hostitelské buňce, jako například gen pro rezistenci vůči nějakému antibiotiku, například vůči ampicilinu, chloramfenikolu nebo tetracyklinu.

Příkladem vektorů, které mohou být použity pro expresi DNA kódující hybridní polypeptidy (obsahující proinsulin) jsou viry, příkladem jsou bakteriální viry, například bakteriofágy (například bakteriofág lambda), kosmidy, plazmidy a jiné vektory. Do vhodných vektorů jsou, postupy v současnosti dobře známými, vloženy geny kódující hybridní polypeptidy zahrnující proinsulin. Například využitím konvenčních míst pro restriční endonukleázy může být vektor a inzert štěpen za vzniku komplementárních konců párujících se navzájem a pomocí DNA ligázy jsou tyto fragmenty spojeny dohromady. Další možností je využití syntetických linkerů obsahujících sekvenci bází komplementární k restričnímu místu na vektorové DNA. Tyto linkery mohou být připojeny k inzertu DNA a následně štěpeny restričním enzymem štěpícím v tomto místě. Jsou rovněž použitelné další způsoby.

Z bakteriálních hostitelských buněk jsou upřednostňovány buňky *E. coli*. Příkladem vhodných buněk *E. coli* jsou kmeny SΦ733 (cytRstrA) nebo 4300, avšak jako hostitelé pro plazmidy mohou být použity i další kmeny *E. coli* nebo jiné bakterie.

Jako hostitelé mohou být použity jakékoliv bakterie, včetně auxotrofních (například A1645), fototrofních (například A4255) a lyzogenních kmenů; kmenů F^+ a F^- ; kmenů obsahující sekvenci represoru cI857 z profága λ (například A1645 a A4255) a kmenů postrádajících represory deo a/nebo gen deo (viz Příhláška EP č. 0303972, publikovaná 22. února 1989). Kmeny *E. coli* SΦ733 a 4300 byly uloženy v ATCC pod přístupovým číslem 69361 resp. 69363.

Všechny hostitelské kmeny *E. coli* popsané výše mohou být "zbaveny" plazmidů, které obsahují, postupy v současnosti dobře známými, například metodou s využitím ethidiumbromidu popsanou v publikaci R. P. Novick: *Bacteriol. Review* 33, 210 (1969).

Vynález popisuje způsob produkce insulínu, což zahrnuje "správné sbalení" hybridního polypeptidu obsahující proinsulín v podmínkách, které umožňují vytvoření příslušných disulfidických vazeb, vystavení sbaleného hybridního polypeptidu obsahujícího tyto disulfidové vazby působení enzymů, jejichž činností dojde ke vzniku insulínu a purifikaci insulínu. Takto získaný insulín má stejnou aktivitu a vlastnosti jako komerčně dostupný lidský insulín.

Ve výhodném provedení vynálezu krok "sbalení" zahrnuje inkubaci hybridního polypeptidu při přibližně 4 až 37°C po dobu 1 až 30 hodin v roztoku o pH přibližně 8,5 až 12,0.

V jiném výhodném provedení vynálezu krok "sbalení" zahrnuje inkubaci hybridního polypeptidu při přibližně 4 až

37°C po dobu 1 až 30 hodin v roztoku o pH přibližně 8,5 až 12,0 za přítomnosti kyseliny askorbové.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu je během kroku "sbalení" pH v rozmezí 11,0 až 11,25.

V jiném zvláště výhodném provedení vynálezu je koncentrace kyseliny askorbové přibližně 2 moly na jeden mol skupin SH přítomných ve směsi, ve které dochází ke "sbalení" polypeptidu.

V ještě jiném výhodném provedení vynálezu je doba inkubace přibližně 5 hodin.

V jiném provedení vynálezu zahrnuje proces přípravy inulinu upravení pH roztoku na hodnotu přibližně 8,8 až 9,0 a štěpení hybridního polypeptidu působením trypsinu a karboxypeptidázy B při teplotě 16 až 37°C po dobu v rozmezí 30 minut až 16 hodin.

V jiném provedení vynálezu zahrnuje proces čištění chromatografii na DEAE-Sepharóze a metodu RP-HPLC.

V ještě jiném provedení vynálezu zahrnuje proces čištění dále ultrafiltraci a chromatografii na CM-Sepharóze.

V jiném zvláště výhodném provedení vynálezu je hybridní polypeptid proinsulinu exprimován z plazmidu pDBAST-LAT uloženého v ATCC pod přístupovým číslem 69361.

V jiném zvláště výhodném provedení vynálezu je hybridní polypeptid proinsulinu exprimován z plazmidu p λ BAST-LAT uloženého v ATCC pod přístupovým číslem 69363.

V jiném provedení vynálezu je hybridní polypeptid proinsulinu exprimován z plazmidu pBAST-R uloženého v ATCC pod přístupovým číslem 69362

Ve výhodném provedení vynálezu je hybridní polypeptid získán působením na bakteriální buňky obsahující DNA kódující hybridní polypeptid, přičemž toto působení vede k ex-

presi zmíněné DNA. Dalším krokem je získání hybridního polypeptidu z těchto buněk.

Zmíněné působení zahrnuje fermentaci v přítomnosti glukózy, glycerolu nebo galaktózy.

Dále se počítá s tím, že proces získání hybridního polypeptidu z buněk zahrnuje rozrušení buněčné stěny bakteriálních buněk nebo jejich částí za vzniku lyzátu, oddělení intracelulárního precipitátu od lyzátu pomocí centrifugace, solubilizaci precipitátu a možnost čištění hybridního polypeptidu chromatografií nebo ultrafiltrací.

Vynález dále popisuje polypeptid obsahující proinsulin a signální peptid připojený k N-konci proinsulinu, kde je zmíněný polypeptid správně "sbalen" a obsahuje odpovídající ("správné") disulfidické vazby.

Ve výhodném provedení vynálezu je signální peptid odvozen od N-koncové oblasti CuZnSOD.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu obsahuje signální peptid sekvenci 62 aminokyselin, kterým předchází methionin a po nichž následuje arginin.

Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje proinsulin řetězec B insulínu spojený s řetězcem A insulínu pomocí jediného argininového zbytku.

V jiném provedení vynálezu obsahuje proinsulin řetězec B insulínu spojený s řetězcem A insulínu pomocí dipeptidu Lys-Arg.

Výše zmíněné dvě molekuly proinsulinu musí být produkovány ve formě hybridních proteinů, jinak jsou hladiny exprese extrémně nízké a komerčně nevýznamné.

Ve všech výhodných provedeních vynálezu byly cysteinové zbytky v signálním peptidu nahrazeny serinovými zbytky.

Příklady provedení vynálezu

Následující Příklady provedení vynálezu jsou uvedeny za účelem snazšího porozumění vynálezu, a nejsou zamýšleny a ani by neměly být interpretovány, jako nějaká omezení vynálezu. V Příkladech provedení vynálezu nejsou uvedeny detailní popisy konvenčních způsobů využívaných při konstrukci vektorů, vkládání genů kódujících polypeptidy do takových vektorů nebo vnášení takto vzniklých plazmidů do hostitelských buněk. V Příkladech provedení vynálezu nejsou rovněž uvedeny detailní popisy konvenčních způsobů využívaných při analýze polypeptidů produkovaných z těchto vektorů umístěných v hostitelských buňkách. Tyto způsoby jsou odborníkům dobře známy a jsou popsány v řadě publikací včetně například následující publikace:

Sambrook J., Fritsch E. F. a Maniatis T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Příklad 1

Konstrukce expresivních plazmidů pBAST-R, pDBAST-LAT a p λ BAST-LAT exprimujících hybridní polypeptidy SOD-proinsulin.

Byly vytvořeny bakteriální expresivní vektory, které v nadměrné míře v buňkách E. coli produkují hybridní proteiny, přičemž exprese je řízena promotory P_{1P_2} nebo λP_L . Jelikož bylo zjištěno, že bakterie nesoucí expresivní vektor kódující "řetězec B insulinu-Lys-Arg-řetězec A insulinu" neprodukují tento polypeptid v detekovatelném množství, byl proinsulin produkován jako hybridní protein. Tyto hybridní proteiny obsahují signální peptid o délce 62 aminokyselin

je odvozen od N-konce sekvenční CuZnSOD (11), přičemž tomuto signálnímu peptidu předchází methioninový aminokyselinový zbytek a na C-konci je následován argininovým aminokyselinovým zbytkem, který jej připojuje k řetězci B insulínu. Řetězec B je k řetězci A insulínu připojen krátkým peptidem řetězce C, který obsahuje Lys-Arg nebo Arg. Dva cysteiny původně přítomné v oblasti SOD byly nahrazeny serinovými zbytky.

A. Plazmid pBAST-R

Byla vytvořena série plazmidů na jejímž konci je plazmid pBAST-R, který byl poté, co jím byly transformovány vhodné hostitelské buňky *E. coli*, schopný řídit expresi hybridního polypeptidu proinsulínu použitelného k produkci lidského insulínu.

Struktura plazmidu pBAST-R, který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulínu-Lys-Arg-řetězec A insulínu", je zobrazena na Obrázku 3; sekvenční DNA a odpovídající aminokyselinová sekvenční jsou zobrazeny na Obrázku 6.

Plazmid pBAST-R má velikost přibližně 4380 bp a obsahuje následující části (proti směru hodinových ručiček):

1. Fragment DNA o velikosti 1521 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy AatIII-MscI, která obsahuje gen pro rezistenci vůči tetracyklinu.
2. Fragment DNA o velikosti 1497 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy ScaI-HaeII, která obsahuje zkrácený gen pro rezistenci vůči ampicilinu a počátek replikace DNA.

3. Fragment DNA o velikosti 930 párů bází zahrnující oblast DNA bakterií *E. coli* ohraničenou restrikčními místy *AvaII*-*NdeI*, která obsahuje promotory *deo P₁P₂* a ribozomální vazebné místo (RBS) (13).
4. Fragment DNA o velikosti 188 párů bází zahrnující oblast lidské cDNA kódující *CuZnSOD* ohraničenou restrikčními místy *NdeI*-*PpuMI*. Cysteiny v pozicích 6 a 57 v maturovaném *SOD* byly nahrazeny, s využitím místně specifické mutagenese oligonukleotidů (12), serinovými zbytky.
5. Uměle připravený fragment DNA o velikosti 172 párů bází ohraničený restrikčními místy *PpuMI*-*BamHI*. Tato oblast kóduje "Arg-řetězec B insulínu-Lys-Arg-řetězec A insulínu".
6. Uměle připravený polylinker o velikosti 36 párů bází obsahující množství klonovacích míst a ohraničený restrikčními místy *BamHI* a *HindIII*.
7. Uměle připravený oligonukleotid o velikosti 44 párů bází obsahující terminátor transkripce *TrpA* a ohraničený restrikčními místy *HindIII* a *AatII* (10).

Plazmid *pBAST-R*, který nese gen pro rezistenci vůči tetracyklinu, a který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulínu-Lys-Arg-řetězec A insulínu", byl vnesen do buněk *E. coli* kmene *SΦ733* (*cytRstrA*) a 26. července 1993 uložen v ATTC pod přístupovým číslem 69362.

B. Plamid pDBAST-LAT

Byla vytvořena jiná série plazmidů na jejímž konci je plazmid pDBAST-LAT, který byl poté, co jím byly transformovány vhodné hostitelské buňky *E. coli*, schopný řídit vysokou hladinu exprese hybridního polypeptidu proinsulinu použitelného k produkci lidského insulinu.

Struktura plazmidu pDBAST-LAT, který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulinu-Arg-řetězec A insulinu", je zobrazena na Obrázku 4; sekvence DNA a odpovídající aminokyselinová sekvence jsou zobrazeny na Obrázku 7.

Plazmid pBAST-R má velikost přibližně 4377 bp a obsahuje následující části (proti směru hodinových ručiček):

1. Fragment DNA o velikosti 1521 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy AatII-MscI, která obsahuje gen pro rezistenci vůči tetracyklinu.
2. Fragment DNA o velikosti 1497 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy ScaI-HaeII, která obsahuje zkrácený gen pro rezistenci vůči ampicilinu a počátek replikace DNA.
3. Fragment DNA o velikosti 930 párů bází zahrnující oblast DNA bakterií *E. coli* ohraničenou restrikčními místy AvaII-NdeI, která obsahuje promotory deo P_1P_2 a ribozomální vazebné místo (RBS) (13).
4. Fragment DNA o velikosti 188 párů bází zahrnující oblast lidské cDNA kódující CuZnSOD ohraničenou restrikčními místy NdeI-PpuMI. Cysteiny v pozicích 6 a 57 v maturovaném SOD byly nahrazeny, s využitím místně specifické mu-

tageneze oligonukleotidů (12), serinovými zbytky a obsah párů CG v tomto fragmentu byl, rovněž s využitím místně specifické mutageneze oligonukleotidů (12), snížen na 38%.

5. Uměle připravený fragment DNA o velikosti 169 párů bází ohraničený restričními místy PpuMI-BamHI. Tato oblast kóduje "Arg-řetězec B insulínu-Arg-řetězec A insulínu".
6. Uměle připravený polylinker o velikosti 36 párů bází obsahující množství klonovacích míst a ohraničený restričními místy BamHI a HindIII.
7. Uměle připravený oligonukleotid o velikosti 44 párů bází obsahující terminátor transkripce TrpA a ohraničený restričními místy HindIII a AatII (10).

Plazmid pDBAST-LAT, který nese gen pro rezistenci vůči tetracyklinu, a který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulínu-Arg-řetězec A insulínu", byl vnesen do buněk *E. coli* kmene SΦ733 (cytRstrA) a 26. července 1993 uložen v ATTC pod přístupovým číslem 69361.

C. Plazmid pλBAST-LAT

Byla vytvořena jiná série plazmidů na jejímž konci je plazmid pλBAST-LAT, který byl poté, co jím byly transformovány geneticky upravené hostitelské buňky *E. coli* (nesoucí represor cI857), schopný řídit vysokou hladinu exprese hybridního polypeptidu proinsulínu použitelného k produkci lidského insulínu.

Struktura plazmidu p λ BAST-LAT, který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulinu-Arg-řetězec A insulinu", je zobrazena na Obrázku 5; sekvence DNA a odpovídající aminokyselinová sekvence jsou zobrazeny na Obrázku 7.

Plazmid p λ BAST-LAT má velikost přibližně 3777 bp a obsahuje následující části (proti směru hodinových ručiček):

1. Fragment DNA o velikosti 1521 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy AatIII-MscI, která obsahuje gen pro rezistenci vůči tetracyklinu.
2. Fragment DNA o velikosti 1497 párů bází zahrnující oblast plazmidu pBR322 ohraničenou restrikčními místy ScaI-HaeII, která obsahuje zkrácený gen pro rezistenci vůči ampicilinu a počátek replikace DNA.
3. Fragment DNA o velikosti 330 párů bází zahrnující oblast plazmidu pSOD α 13 (14) ohraničenou restrikčními místy BamHI-EcoRI, která obsahuje promotor λP_L a fragment o velikosti 30 párů bází obsahující ribozomální vazebné místo (RBS) ohraničený restrikčními místy AvrII-NdeI.
4. Fragment DNA o velikosti 188 párů bází zahrnující oblast lidské cDNA kódující CuZnSOD ohraničenou restrikčními místy NdeI-PpuMI. Cysteiny v pozicích 6 a 57 v maturovaném SOD byly nahrazeny, s využitím místně specifické mutagenese oligonukleotidů (12), serinovými zbytky a obsah párů CG v tomto fragmentu byl, rovněž s využitím místně specifické mutagenese oligonukleotidů (12), snížen na 38%.

5. Uměle připravený fragment DNA o velikosti 169 párů bází ohraničený restričními místy PpuMI-BamHI. Tato oblast kóduje "Arg-řetězec B insulínu-Arg-řetězec A insulínu".
6. Uměle připravený polylinker o velikosti 36 párů bází obsahující množství klonovacích míst a ohraničený restričními místy BamHI a HindIII.
7. Uměle připravený oligonukleotid o velikosti 44 párů bází obsahující terminátor transkripce TrpA a ohraničený restričními místy HindIII a AatII (10).

Plazmid p λ BAST-LAT, který nese gen pro rezistenci vůči tetracyklinu, a který kóduje hybridní polypeptid "SOD-řetězec B insulínu-Arg-řetězec A insulínu" pod kontrolou promotoru λ P_L, byl vnesen do buněk E. coli kmene 4300 (F⁻, bio, cI⁸⁵⁷) a 26. července 1993 uložen v ATTC pod přístupovým číslem 69363.

Bakteriální buňky byly množeny při 30°C. Produkce hybridních polypeptidů byla indukována zvýšením teploty na 42°C.

Příklad 2

Fermentace, podmínky růstu a purifikace hybridních polypeptidů proinsulínu.

1. Zásobní kultury

Zásobní kultura buněk E. coli kmene S Φ 733 nesoucí plazmid pDBAST-LAT (nebo pBAST-R) byla pěstována v kaseinovém médiu (20 g/litr hydrolyzátu kaseinu, 10 g/litr kvasničného hydrolyzátu a 5 g/litr NaCl) doplněném tetracykli-

nem (10 mg/litr). Buněčné kultury byly následně dvakrát zředěny zamrazovacím médiem a skladovány při -80°C .

Zamrazovací médium:

K_2HPO_4	6,3 gramů
KH_2PO_4	1,8 gramů
citronan sodný	0,45 gramů
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,09 gramů
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,9 gramů
glycerol	44 gramů
celkový objem	500 ml

II. Inokulum (kultura pro zaočkování)

Kultura pro zaočkování byla pomnožena v médiu pro produkci peptidů (viz. dále). Sterilní médium umístěné v kultivačních lahvích bylo zaočkováno ze zásobní kultury a inkubováno po dobu 15 hodin na třepačce při 37°C a rychlosti třepání přibližně 200 ot./min. Bylo-li to zapotřebí, byly následující fáze kultivace buněk prováděny za stálého třepání ve provzdušněných fermentorech. Pomocí 2 až 10% kultury z kultivačních lahví bylo inokulováno sterilní médium a takto inokulované médium bylo za stálého třepání a přívodu vzduchu (aby byla udržována hladina rozpuštěného kyslíku nad 20% nasycení vzduchem) inkubováno po dobu 15 hodin při 37°C při pH $7 \pm 0,5$.

III. Produkce peptidů (exprese)

Médium pro produkci peptidů:

K_2HPO_4	8 g/litr
--------------------------	----------

KH_2PO_4	2 g/litr
citronan sodný	2 g/litr
NH_4Cl	3 g/litr
K_2SO_4	0,6 g/litr
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/litr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 gramů
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/litr

roztok stopových prvků	3 ml/litr
tetracyklin	0,01 g/litr
glukóza	2 g/litr
glycerol	1 ml/litr

Roztok stopových prvků:

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g/litr
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78 g/litr
$\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g/litr
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 g/litr
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 g/litr
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,85 g/litr
H_3BO_3	0,5 g/litr
HCl (32%)	100 ml/litr

Médium pro produkci polypeptidů bylo zaočkováno pomocí 0,5 až 10% kultury pro inokulaci a inkubováno při 37°C.

Rychlost třepání a rychlost přísunu vzduchu byly nastaveny tak, aby byla udržována hladina rozpuštěného kyslíku na hodnotě 20% nasycení vzduchem. pH bylo udržováno pomocí NH_3 na hodnotě $7 \pm 0,2$.

K médiu byly, za účelem dodání energetického zdroje a zdroje uhlíku, přidány sterilní roztoky glukózy (50% roztok) a glycerolu (30% roztok). Jakmile dosáhla koncentrace

buněk hodnoty $OD_{660}=25$, byly do média přidány sterilní roztoky glukózy (10% roztok) a glycerolu (30% roztok) a růst pokračoval dalších přibližně 5 hodin, až koncentrace buněk dosáhla přibližně hodnoty $OD_{660}=60$. Kultura byla následně ochlazená a buňky byly odděleny centrifugací. Fermentace buněk *E. coli* za přítomnosti buď glukózy, glycerolu nebo galaktózy nebo jejich směsí jako zdroje uhlíku, usnadňovala expresi hybridních polypeptidů SOD-proinsulin.

IV. Purifikace

Hybridní polypeptidy SOD-proinsulin exprimované z plazmidů pBAST-R a pDBAST-LAT se hromadily v intracelulárním precipitátu (sraženině), odkud byly izolovány následujícím postupem: bakteriální peleta o hmotnosti 1 gram (hmotnost před vysušením) byla rozsuspendována v 10 ml pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8, a vzniklá suspenze byla na 2 hodiny při 37°C vystavena působení lysozymu (Merck, 2500 jednotek/ml). Následně byla směs sonikována a byl do ní přidán Nonidet-P-40 (Sigma) nebo Triton-X100 na výslednou koncentraci 2% a směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Precipitát byl izolován centrifugací a promyt vodou.

Hybridní polypeptidy byly, s využitím chromatografie na anexu, purifikovány téměř do homogenity následovně. Precipitát byl rozpuštěn v pufru o složení 8M močovina, 20 mM Tris-HCl, 200 mM β -merkapt ethanol, pH 8,2. Vzniklý roztok byl vyčeřen centrifugací a nanesen na kolonu Fast-Flow s DEAE-Sepharózou (Pharmacia LKB) předem ekvilibrovanou v pufru o složení 8M močovina, 20 mM Tris-HCl, 20 mM β -merkapt ethanol, pH 8,2. Materiál proteklý kolonou byl zachycen a hybridní protein byl vysrážen pomocí $(NH_4)_2SO_4$ při 40% saturaci (nasycení) nebo zakoncentrován ultrafiltrací

na membráně 10K, Poté následovala diafiltrace proti roztoku 100 mM glycin-HCl, pH 3,1.

V jiném postupu byl hybridní polypeptid SOD-proinsulin exprimovaný z plazmidu pBAST-R purifikován téměř do homogeneity rozpuštěním v pufru o složení 8M močovina, 20 mM di-thiothreitol, 50 mM octan sodný, pH 5 a následnou ultrafiltrací přes membrány 100 kD a 50 kD (Filtron). Tento hybridní polypeptid byl zakoncentrován na membráně 10 kD a vysrážen pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při 40% saturaci.

Příklad 3

"Sbalení" a enzymatické štěpení hybridních polypeptidů SOD-proinsulin

Hybridní polypeptidy proinsulinu, získané vysrážením pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo ultrafiltrací (Příklad 2), byly rozpuštěny v pufru o složení 8M močovina, 5 mM HCl a zředěny do pufru obsahujícího 100 mM glycin, pH 8,5 až 12,0 tak, aby výsledná koncentrace polypeptidů byla přibližně 1 mg/ml.

A. Aby bylo umožněno vytvoření "správných" disulfidových vazeb, probíhalo "sbalení" hybridního polypeptidu SOD-proinsulin, exprimovaného z plazmidu pBAST-R, při teplotě přibližně 4 až 37°C po dobu 1 až 24 hodin.

pH roztoku obsahujícího "sbalený" hybridní polypeptid se správně vytvořenými disulfidovými vazbami bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu přibližně 8,8 až 9,0 a protein byl při 16 až 37°C po dobu 30 až 120 minut vystaven působení trypsinu a karboxypeptidázy B.

Po provedení velkého množství experimentů bylo zjištěno, že optimální podmínky jsou následující: hybridní polypeptid exprimovaný z plazmidu pBAST-R byl rozpuštěn v

puftru o složení 8M močovina, 5 mM HCl a zředěn do puftru obsahujícího 100 mM glycin o pH 11 (Obrázek 8) tak, aby výsledná koncentrace polypeptidů byla přibližně 1 mg/ml. Následovalo "sbalování" hybridního polypeptidu při 25°C po dobu 6 až 16 hodin a poté byl "sbalený" hybridní polypeptid se správně vytvořenými disulfidovými vazbami při 37°C po dobu 30 až 60 minut štěpen trypsinem (1:500 w/w) a karboxypeptidázou B (1:200 w/w).

Vznik insulinu ze "sbaleného" hybridního polypeptidu, se správně vytvořenými disulfidovými vazbami, exprimovaného z plazmidu pBAST-R enzymatickým štěpením je schematicky znázorněn na Obrázku 1.

- B. Aby bylo umožněno vytvoření "správných" disulfidových vazeb, probíhalo "sbalení" hybridního polypeptidu SOD-proinsulin, exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT, při teplotě přibližně 7 až 31°C po dobu 5 až 30 hodin. pH roztoku obsahujícího "sbalený" hybridní polypeptid se správně vytvořenými disulfidovými vazbami bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu přibližně 8,8 až 9,0 a protein byl při 22 až 37°C po dobu 30 minut až 16 hodin vystaven působení trypsinu a karboxypeptidázy B.
- Po provedení velkého množství experimentů bylo zjištěno, že optimální podmínky jsou následující: hybridní polypeptid exprimovaný z plazmidu pBAST-R byl rozpuštěn v puftru o složení 8M močovina, 5 mM HCl a zředěn do puftru obsahujícího 100 mM glycin o pH 11,0 až 11,25 (Obrázek 8) tak, aby výsledná koncentrace polypeptidů byla přibližně 1 mg/ml. Následovalo "sbalování" hybridního polypeptidu při 25°C po dobu 5 hodin a poté byl "sbalený" hybridní polypeptid se správně vytvořenými disulfidovými vazbami při 25°C po dobu 16 hodin štěpen trypsinem (1:15000 w/w) a karboxypeptidázou B (1:10000 w/w).

Vznik insulinu ze "sbaleného" hybridního polypeptidu, se správně vytvořenými disulfidovými vazbami, exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT enzymatickým štěpením je schematicky znázorněn na Obrázku 2.

Příklady specifických podmínek pro výše zmíněné postupy A. a B. jsou detailně popsány v Popisu obrázků na Výkresech, Obrázky 8 až 14.

Příklad 4

Proteinová analýza a purifikace lidského insulinu produkovaného z hybridního polypeptidu SOD-proinsulin exprimovaného z plazmidu pBAST-R

Tvorba lidského insulinu z hybridního polypeptidu SOD-proinsulin exprimovaného z plazmidu pBAST-R byla analyzována radioimunostanovením (RIA) a HPLC na obrácené fázi (RP-HPLC) za použití komerčně dodávaného lidského insulinu jako standardu (Calbiochem). Teoretický výtěžek rekombinatního lidského insulinu, jak byl vypočítán z aminokyselinové sekvence hybridního polypeptidu proinsulinu, je 45,6%. Z Obrázku 8 je zřejmé, že optimální pH pro správné "sbalení" je 11. Při této hodnotě pH odpovídá množství vytvořeného insulinu přibližně 80% teoretického výtěžku (který odpovídá přibližně 40% hybridního polypeptidu na počátku). Lidský insulin produkovaný z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pBAST-R byl detekován pomocí RP-HPLC. Byla použita kolona Vydac 218TP54 o rozměrech 250 x 4,6 mm (vnitřní průměr, separační kolona), 5 μ m, velikost pórů 30 nm a měření probíhalo při pokojové teplotě při průtoku 1 ml/min. Jako eluant A byla použita 0,1% kyselina trifluoroctová (TFA) v H_2O a jako eluant B byla použita 0,08% kyselina trifluoroctová v acetonitrilu. Kolona byla

po dobu 5 minut promývána ekvilibračním pufrem (25% eluant B) a poté, v intervalu 37,5 minut, následovalo promývání gradientem eluantu B v rozmezí 25 až 50% objemu. Absorbance byla sledována při vlnových délkách 220 nm a 280 nm. Analýza lidského insulínu, která byla pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s kolonou s obrácenou fází prováděna po enzymatickém štěpení "sbaleného" hybridního polypeptidu se správně vytvořenými disulfidovými vazbami, odhalila hlavní pík s retenčním časem odpovídajícím retenčnímu času standardního lidského insulínu.

Byly připraveny dvě malé šarže lidského insulínu s vý-
těžky 13 mg. Lidský insulin byl purifikován z roztoku vy-
staveného působení enzymů (pH 9) s využitím ultrafiltrace
přes membrány 3K nebo 5K (Filtron) následované chromatogra-
fií na sloupci CM-Sepharózy (citrátový pufr, pH 3). Hlavní
frakce byly odsoleny, lyofilizovány a byla v nich určena
aminokyselinová analýza a N-koncová aminokyselinová sekven-
ce. Aminokyselinové složení obou vzorků rekombinantního
lidského insulínu bylo v podstatě identické s přirozeně se
vyskytujícím lidským insulinem (Tabulka 1, vzorek 1). Sek-
vence 5 aminokyselin na N-konci vzorků insulínu byla stano-
vena Edmanovým odbouráváním. Tyto sekvence se ukázaly být
identické s N-konci jak řetězce A, tak řetězce B lidského
insulínu, což potvrdilo autenticitu produktu připraveného
in vitro.

Výsledky sekvenace nicméně rovněž ukázaly přítomnost
argininového zbytku na první pozici a tento se vyskytoval u
přibližně 25% molekul (nevyskytuje se u "standardního" lid-
ského insulínu). Tento výsledek odpovídá štěpení trypsinem
mezi argininem a lysinem uvnitř spojovací sekvence Lys-Arg,
které zanechá argininový zbytek na N-konci řetězce A.

Bylo zjištěno, že specifické hydrolýzy za argininem
(tzn. na straně blíže k C-konci molekuly) pomocí trypsinu

může být dosaženo prováděním hydrolyzační reakce v roztoku o pH 11. Při takto zvýšeném pH je většina ϵ -aminových skupin lysinu nenabitá ($pK = 10,3$), a tudíž je umožněno selektivní štěpení. Po štěpení trypsinem při pH 11 (Tabulka 1, vzorek 2), následovaném štěpením karboxypeptidázou B v roztoku o pH 8,5, byly získány dvě šarže purifikovaného insulinu s výtěžky 1 mg a 6,5 mg. Sekvenování N-konce polypeptidu odhalilo, že množství insulinu obsahující nadbytečný arginin bylo sníženo na přibližně 5% z celkového množství.

Tabulka 1

Aminokyselinové složení rekombinantního lidského insulinu

Aminokyseliny	Počet aminokyselinových zbytků			
	Teoretický	Standardní insulin	Vzorek 1	Vzorek 2
Asx	3	3,20	3,38	3,26
Thr	3	2,98	2,83	2,68
Ser	3	2,84	2,53	2,77
Glx	7	7,15	7,73	7,23
Pro	1	1,28	1,13	1,09
Gly	4	4,24	4,39	4,25
Ala	1	1,00	1,28	1,04
Cys	6	5,88	5,11	5,79
Val	4	3,82	4,58	3,88
Ile	2	2,04	1,96	1,96
Leu	6	5,87	6,10	5,99
Tyr	4	3,80	3,80	3,87
Phe	3	3,15	3,56	3,03
His	2	2,04	2,05	2,08
Lys	1	1,01	1,05	1,02
Arg	1	0,96	1,30	1,18

Data ve sloupcích Vzorek 1 a Vzorek 2 znázorňují aminokyselinové složení rekombinantního lidského insulínu získaného z hybridního polypeptidu proinsulínu exprimovaného z plazmidu pBAST-R. Štěpení trypsinem probíhalo buď v pH 9 (vzorek 1) nebo v pH 11 (vzorek 2).

Aminokyselinová analýza byla provedena po oxidaci (prováděná kyselinou peroxomravenčí) a hydrolýze purifikovaných vzorků insulínu prováděné v plynné fázi.

Příklad 5

Peptidová analýza purifikovaného lidského insulínu získaného z hybridního polypeptidu SOD-proinsulinu exprimovaného z plazmidu pBAST-R

U purifikovaného insulínu získaného postupem popsáním v předchozích Příkladech byla provedena peptidová analýza s využitím endoproteinázy Glu-C (Sigma), která hydrolyzuje peptidové vazby za (tj. směrem k C-konci) glutamátovými aminokyselinovými zbytky.

Podrobnější popis: vzorky insulínu (100 µg) získané štěpením "sbaleného" hybridního polypeptidu proinsulínu, exprimovaného z plazmidu pBAST-R, byly po dobu 6 hodin při teplotě 37°C štěpeny působením 5 µg Glu-C v roztoku o objemu 100 µl o složení 0,1M Tris-HCl, pH 7,8. Analýza pomocí HPLC byla provedena tak, že vzorky komerčně dostupného (kontrolního) insulínu a insulínu získaného štěpením "sbaleného" hybridního polypeptidu proinsulínu, exprimovaného z plazmidu pBAST-R, byly okyseleny na hodnotu pH přibližně 3 a rozděleny pomocí RP-HPLC. Byla použita kolona Vydac 218TP54 o rozměrech 250 x 4,6 mm (vnitřní průměr, separační kolona), 5 µm, velikost pórů 30 nm. Kolona byla ekvilibrována pufrům o složení 50 mM fosforečnan tetrame-

thylamonia, 162 mM NaClO₄, pH 3 obsahujícím 31,5% (v/v) acetonitrilu. Při eluci byl použit lineární gradient 35 až 45% acetonitrilu po dobu 75 minut při průtoku 1 ml/minuta. Absorbance byla sledována při vlnové délce 220 nm.

V souladu s kontrolní reakcí vznikly všechny očekávané peptidy, i když za píkem odpovídajícím jednomu z fragmentů byla pozorována oblast, která pravděpodobně odpovídá molekule des-Thr (B₃₀) podobné insulinu (15).

Příklady 4 a 5 naznačují, že rekombinantní polypeptid exprimovaný z plazmidu pBAST-R obsahuje sekvenci přirozeně se vyskytujícího lidského insulinu. Menší část produkce exprimovaných proteinů zahrnuje formy molekul podobných insulinu jako například Arg (Ao), desamino- nebo des-Thr (B₃₀). Tyto nežádoucí vedlejší produkty mohou být odstraněny chromatografickými postupy, jako například RP-HPLC, jak jsou popsány výše.

Příklad 6

Proteinová analýza a purifikace lidského insulinu produkovaného z hybridního polypeptidu SOD-proinsulin exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT

Aby bylo možné vyhnout se vzniku vedlejšího produktu Arg (Ao) insulinu (Příklady 4 a 5), byl expresivní plazmid pBAST-R modifikován tak, aby obsahoval DNA kódující v hybridním polypeptidu proinsulinu mezi řetězcí A a B pouze pro argininový zbytek a ne dvojici Lys-Arg, nacházející se mezi řetězcí A a B v hybridním polypeptidu proinsulinu exprimovaném z plazmidu pBAST-R. Výsledkem jsou expresivní plazmidy pDBAST-LAT (Příklad 1B) a p λ BAST-LAT (Příklad 1C).

Po "sbalení" a enzymatickém působení trypsinem a CPB na "sbalený" hybridní polypeptid proinsulinu se správně vytvořenými disulfidovými můstky, exprimovaný z nového expresiv-

ního plazmidu pDBAST-LAT, bylo dosaženo účinné tvorby insulínu. Přítomnost kontaminujících látek podobných insulínu byla nevýznamná (Obrázek 9). K optimálnímu "sbalení" došlo při pH 11,25 (Obrázek 10) a správné "sbalení" bylo podstatně urychleno přítomností přibližně 2 molů kyseliny askorbové na jeden mol SH skupin v reakční směsi (Obrázek 11).

V sérii reakcí, za jinak optimálních podmínek pro správné "sbalení", byl stanovován vliv koncentrace proteinů na výtěžek insulínu získaného z hybridního polypeptidu proinsulínu. Optimální výtěžky byly získány v podmínkách, kdy koncentrace proteinu nepřesáhla 1,5 mg/ml (Obrázek 13).

Insulin byl purifikován chromatografií na koloně DEAE-Sepharózy a následnou RP-HPLC (jak je popsáno na Obrázku 9). Jak je zřejmé z Obrázku 12, získaný rekombinantní lidský insulin byl eluován ve stejném retenčním čase jako standardní (komerčně dostupný) lidský insulin. Aminokyselinové složení vzorku purifikovaného rekombinantního lidského insulínu je totožné s aminokyselinovým složením standardního insulínu (Tabulka 2, rekombinantní insulin).

Všimněte si, že Tabulka 2 ukazuje, že insulin získaný z hybridního polypeptidu proinsulínu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT neobsahuje přebytečný argininový zbytek připojený k řetězci A insulínu (Arg(Ao)insulin) popsáný v Příkladu 4. Plazmid pDBAST-LAT je tedy výhodnější pro produkci insulínu a upřednostňovaná sekvence kódující hybridní polypeptid proinsulínu je sekvence zobrazená na Obrázku 7.

Tabulka 2

Aminokyselinové složení rekombinantního lidského insulínu

Aminokyseliny	Počet aminokyselinových zbytků		
	Teoretický	Standardní insulin	Rekombinantní insulin
Asx	3	3,20	3,32
Thr	3	2,98	2,73
Ser	3	2,84	2,71
Glx	7	7,15	7,41
Pro	1	1,28	1,02
Gly	4	4,24	4,46
Ala	1	1,00	1,09
Cys	6	5,88	5,28
Val	4	3,82	4,00
Ile	2	2,04	1,91
Leu	6	5,87	6,34
Tyr	4	3,80	3,64
Phe	3	3,15	3,06
His	2	2,04	2,18
Lys	1	1,01	1,02
Arg	1	0,96	1,07

V tabulce je zobrazeno aminokyselinové složení standardního lidského insulínu a rekombinantního insulínu získaného z hybridního polypeptidu proinsulínu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT.

Aminokyselinová analýza byla provedena po oxidaci (prováděná kyselinou peroxomravenčí) a hydrolýze purifikovaných vzorků insulínu prováděné v plynné fázi.

Příklad 7

Produkce lidského insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT ze surového intracelulárního precipitátu

S využitím surového intracelulárního precipitátu byl skutečně vylepšený způsob "sbalení" a enzymatické přeměny hybridního polypeptidu proinsulinu na insulin. Při tomto postupu byl vypuštěn počáteční krok purifikace popsáný v Příkladu 2, oddíl IV. Výsledkem enzymatického štěpení "sbaleného" hybridního polypeptidu proinsulinu (s vytvořenými disulfidickými vazbami) pomocí trypsinu a karboxypeptidázy B (Obrázek 14 a Tabulka 3) byl vznik insulinu. Výtěžky insulinu byly spočítány jako procento z počáteční koncentrace proteinu (A_{280}), která byla stanovena při rozpouštění precipitátu v roztoku o pH 12 (Obrázek 14). Bylo prokázáno, že "sbalení" hybridního polypeptidu SOD-proinsulin ze surového intracelulárního precipitátu je optimální v čase přibližně 4,5 hodin od počátku experimentu (Obrázek 14).

V Tabulce 3 je shrnuta částečná purifikace insulinu z hybridního polypeptidu proinsulinu, exprimovaného z plazmidu pBAST-LAT, z intracelulárního precipitátu připraveného z jednoho litru buněčné kultury s $OD_{660} = 45$. Rozpuštění a "sbalování" bylo prováděno postupem popsáným pro Obrázek 14. V čase 4,5 hodin po rozpouštění bylo pH roztoku obsahujícího "sbalený" hybridní polypeptid proinsulinu s vytvořenými disulfidickými vazbami upraveno pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 8,8. K tomuto roztoku byl přidán $ZnCl_2$ (na výslednou koncentraci $50 \mu M$), karboxypeptidáza B (1:4000 w/w) a trypsin (1:6000 w/w). Štěpení probíhalo při $37^\circ C$ po dobu 3 hodin a bylo ukončeno přidav-

kem fenylmethylsulfonyl fluoridu (PMSF) na výslednou koncentraci 0,5 mM. Analýza prováděná metodou HPLC (popsanou v popisu pro Obrázek 9) ukázala, že výtěžek insulínu je 169 mg. Insulin byl purifikován chromatografií na aneksu a následnou chromatografií na hydrofobním nosiči. Roztok s insulinem (získaný enzymatickým štěpením hybridního polypeptidu proinsulínu) byl aplikován na kolonu (Fast-Flow) DEAE-Sepharózy (Pharmacia) předem ekvilibrovanou v pufru o složení 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8, v množství 50 jednotek A_{280} na jeden mililitr nosiče. Navázaný materiál byl promyt puftrem o složení 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 8 a insulin byl eluován puftrem o stejném složení, který ale obsahoval NaCl o koncentraci 250 mM. Spojené frakce obsahující insulin reprezentovaly 20% z celkového množství nanesených proteinů a jejich čistota byla 37,1%. Ke spojeným frakcím po chromatografii na DEAE-Sepharóze byl přidán síran amonný (na výslednou koncentraci 410 mM) a tento roztok byl aplikován na kolonu (Fast-Flow) Phenyl-Sepharózy (Pharmacia) předem ekvilibrovanou v pufru o složení 20 mM Tris-HCl, 540 mM síran amonný, v množství přibližně 12 jednotek A_{280} na jeden mililitr nosiče. Navázaný materiál byl promyt ekvilibračním puftrem a insulin byl eluován puftrem o složení 20 mM Tris-HCl, 540 mM síran amonný, pH 8. Frakce obsahující insulin reprezentovaly 42,3% z celkového množství naneseného proteinu a jejich čistota byla 74,1%. Výsledkem zmíněné částečné purifikace bylo 120 mg insulínu (totožného se standardním insulinem), což odpovídá výtěžku insulínu 5,16%. Může být rovněž provedena další purifikace s využitím metod v současnosti známých, jakými jsou například gelová filtrace, RP-HPLC a krystalizace (17).

Tabulka 3

Purifikace rekombinantního lidského insulínu, získaného z hybridního polypeptidu proinsulínu, exprimovaného z plazmidu pDBAST-LAT, rozpuštěním surového intracelulárního precipitátu, "sbalením" a enzymatickým štěpením trypsinem a karboxypeptidázou B.

Purifikační krok	A ₂₈₀	minimální množství insulínu (v mg) stanovované pomocí HPLC	čistota (v %)
Rozpuštění precipitátu	2326	-	-
Přídavek dřevěného uhlí	1915	-	-
"Sbalení" a enzymatické štěpení	1915	169	8,8
Spojené frakce po chromatografii na DEAE-Sepharóze	383	142	37,1
Spojené frakce po chromatografii na Phenyl-Sepharóze	162	120	74,1

Sloupec A₂₈₀ reprezentuje celkovou absorbanci při vlnové délce 280 nm při každém purifikačním kroku. Přítomnost insulínu byla stanovována analýzou pomocí HPLC (s využitím standardního insulínu) popsanou v popisu Obrázku 9 a odpovídá hlavnímu píku standardního insulínu.

Cousens L. S., Shuster J. R., Gallegos C., Ku L., Stempien M. M., Urdea M. S., Sanchez-Pescador R., Taylor A. a TeKamp-Olson P., Gene 61: 265 až 275, 1987.

Davidson H. W., Rhodes C. J. a Hutton J. C., Nature 333: 93 až 96, 1988.

Ellman G. L., Arch. Biochem. Biophys. 82:70 až 77, 1959.

Fischer M., Fytlovitch S., Amit B., Wortzel A. a Beck Y., Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 424 až 428, 1990.

Frank B. H. a Chance R. E. (1985), The preparation and characterization of human insulin of recombinant DNA origin, in Therapeutic agents produced by genetic engineering, Quo Vadis symposium, Sanofi Group, 29. až 30. květen 1985, Toulouse-Labege, Francie, strany 137 až 146.

Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K. a Riggs A. D., Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 106 až 110, 1979.

Grau U., Diabetes 34: 1174 až 1180, 1985.

Hartman a další, Patentová přihláška US číslo 5143836, 1. září, 1992.

Kemmler W., Peterson J. D. a Steiner D. F., J. Biol. Chem. 246: 6786 až 6791, 1971.

Morinaga Y., Franceschini T., Inouye S. a Inouye M., Biotechnology 2: 636 až 639, 1984.

Panayotis G., Katsoyannis G. a Tometsko A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55: 1554 až 1561, 1966.

Schlichtkrull J., Acta Chem. Scand. 10: 1459 až 1464, 1956.

Sherman L., Dafni L., Liehman-Hurwitz J. a Groner Y., Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 5465 až 5469, 1983.

Steiner D. F. a Clark J. L., Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 622 až 629, 1968.

Thim L., Hansen M. T., Norris K., Hoegh I., Boel E., Forstrom J., Ammerer G. a Fiil N. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6766 až 6770, 1986.

Wetzel R., Kleid D. G., Crea R., Heyneker H. L., Yansura D. G., Hirose T., Kraszewski A., Riggs A. D., Itakura K. a Gueddel D. V., Gene 16: 63 až 71, 1981.

Yanofsky C., Platt T., Crawford I. P., Nichols B. P., Christie G. E., Horowitz H., Van Cleemput M. a Wu A. M., Nucleic Acids Res. 9: 6647 až 6668, 1981.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

36485

1. Způsob produkce insulinu, který zahrnuje:
 - a) "správné sbalení" (folding) hybridního polypeptidu obsahujícího proinsulin v podmínkách, které umožňují vytvoření příslušných ("správných") disulfidických vazeb;
 - b) vystavení sbaleného hybridního polypeptidu obsahujícího "správné" disulfidové vazby působení enzymů jejichž působením dojde k vytvoření insulinu;
 - c) purifikaci insulinu.
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok (a) dále zahrnuje inkubaci hybridního polypeptidu při přibližně 4 až 37°C po dobu 1 až 30 hodin v roztoku o pH přibližně 8,5 až 12,0.
3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e inkubace probíhá za přítomnosti kyseliny askorbové.
4. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e pH je v rozmezí 11,0 až 11,25.
5. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e pH je v rozmezí 11,0 až 11,25.
6. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e koncentrace kyseliny askorbové je přibližně 2 moly na jeden mol skupin SH přítomných ve směsi, ve

které dochází ke "sbalení" polypeptidu.

7. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e doba inkubace je přibližně 5 hodin.
8. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e doba inkubace je přibližně 5 hodin.
9. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok (b) dále zahrnuje:
 - (i) upravení pH roztoku na hodnotu přibližně 8,8 až 9,0; a
 - (ii) štěpení hybridního polypeptidu působením trypsinu a karboxypeptidázy B při teplotě 16 až 37°C po dobu v rozmezí 30 minut až 16 hodin.
10. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok (c) dále zahrnuje purifikaci s využitím chromatografie na DEAE-Sepharóze a RP-HPLC (HPLC s využitím kolony s reverzní fází).
11. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok (c) dále zahrnuje purifikaci s využitím ultrafiltrace a chromatografie na CM-Sepharóze.
12. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok (c) dále zahrnuje purifikaci s využitím chromatografie na DEAE-Sepharóze a chromatografie na Phenyl-Sepharóze.

13. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e hybridní polypeptid proinsulinu je expri-
mován z plazmidu pDBAST-LAT uloženého v ATCC pod přístupov-
ným číslem 69361.
14. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e hybridní polypeptid proinsulinu je exprimován
z plazmidu pλBAST-LAT uloženého v ATCC pod přístupovým
číslem 69363.
15. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e hybridní polypeptid proinsulinu je expri-
mován z plazmidu pBAST-R uloženého v ATCC pod přístupovým
číslem 69362.
16. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e hybridní polypeptid v kroku (a) je získán
působením na bakteriální buňky obsahující DNA kódující
hybridní polypeptid, přičemž toto působení vede k expre-
si zmíněné DNA.
17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e hybridní polypeptid je získán ze zmíněných
buněk.
18. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e působení zahrnuje fermentaci v přítomnosti
glukózy, glycerolu nebo galaktózy.
19. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e
t í m, ž e proces získání hybridního polypeptidu zahr-
nuje:

- (i) rozrušení buněčné stěny bakteriálních buněk nebo jejich částí, jehož výsledkem je vznik lyzátu;
 - (ii) oddělení intracelulárního precipitátu od lyzátu pomocí centrifugace; a
 - (iii) solubilizaci precipitátu.
20. Polypeptid zahrnující proinsulin a signální polypeptid připojení k N-konci proinsulinu, kde zmíněný polypeptid je správně "sbalen" a obsahuje odpovídající ("správné") disulfidické vazby.
21. Polypeptid podle nároku 20, kde signální peptid je odvozen od N-koncové oblasti CuZnSOD.
22. Polypeptid podle nároku 21, kde signální peptid zahrnuje 62 aminokyselin, kterým předchází aminokyselina methionin, a po kterých následuje argininový aminokyselinový zbytek.



PV 2031-97

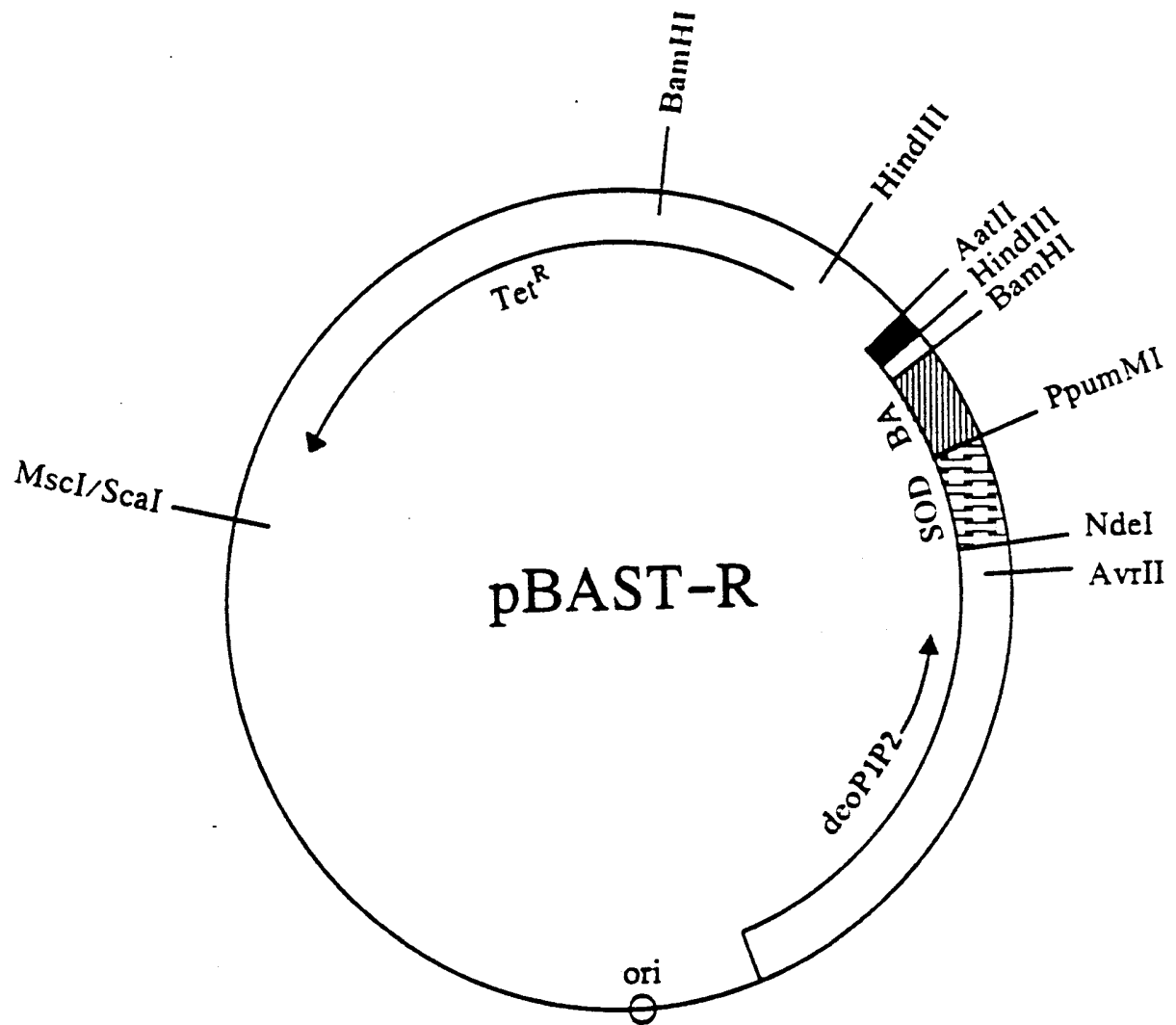
~~86435~~

The diagram illustrates the effect of trypsin on the structure of CPB. The top part shows the CPB structure with a specific disulfide bond (S-S) highlighted. The bottom part shows the CPB structure after trypsin treatment, where the disulfide bond is broken, and the protein chain is fragmented into several smaller pieces.

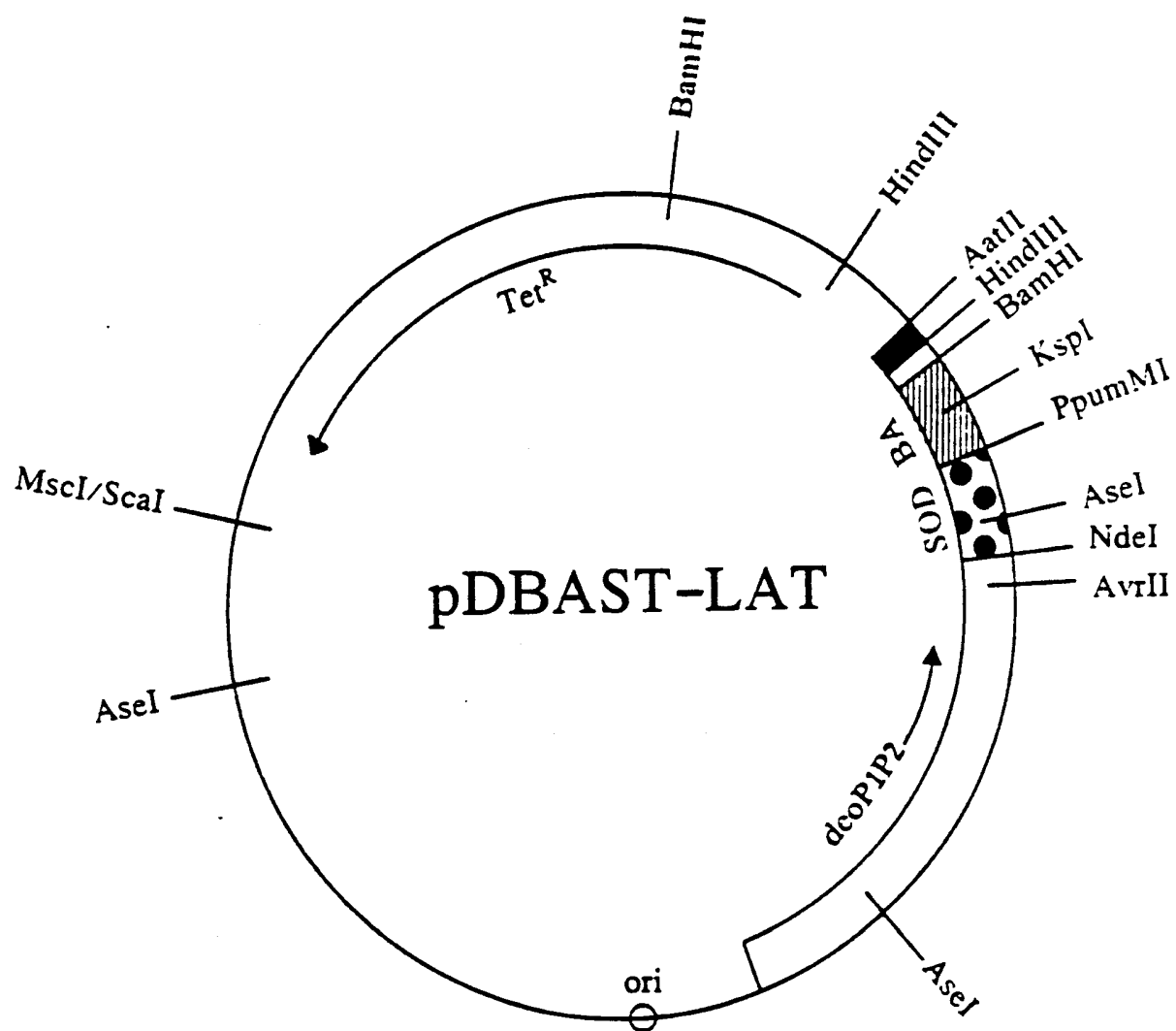
م



OBRÁZEK 3

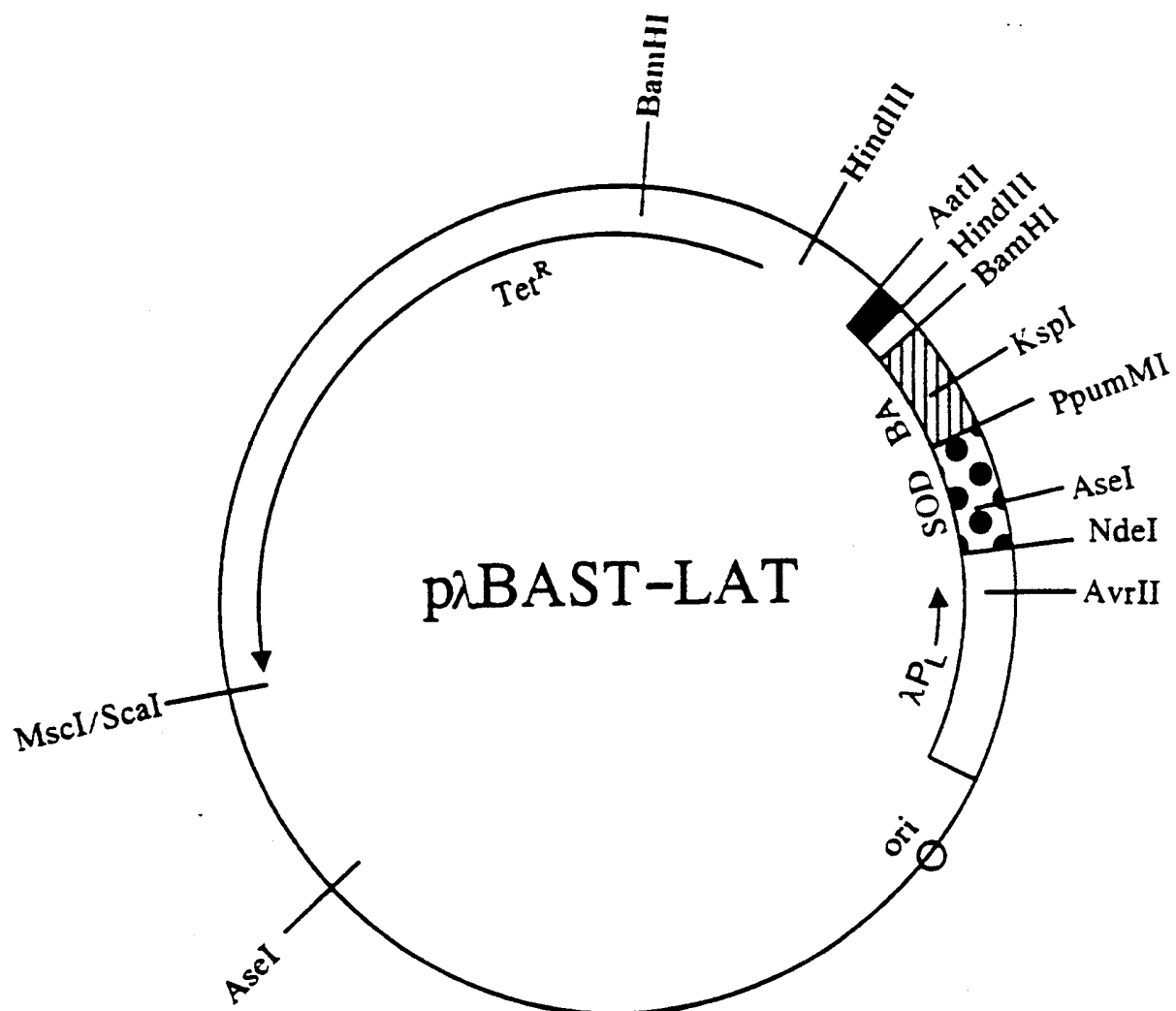


OBRAZEK 4



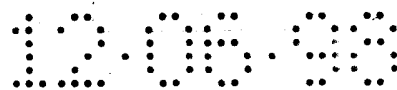
12.08.98

OBRÁZEK 5



OBRÁZEK 6

1	Met	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Lys	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Gln	16
1	ATG	GCT	ACT	AAA	GCC	GCT	AGC	GTG	CTG	AAG	GGC	GAC	GGC	CCA	GTG	CAG	48
17	Gly	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Gln	Lys	Glu	Ser	Asn	Gly	Pro	Val	Lys	Val	32
49	GGC	ATC	ATC	AAT	TTC	GAG	CAG	AAG	GAA	AGT	AAT	GGA	CCA	GTG	AAG	GTG	96
33	Trp	Gly	Ser	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Gly	Leu	His	Gly	Phe	His	Val	48
97	TGG	GGA	AGC	ATT	AAA	GGA	CTG	ACT	GAA	GGC	CTG	CAT	GGA	TTC	CAT	ATT	144
49	His	Glu	Phe	Gly	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	64
145	CAT	GAG	TTT	GGA	GAT	AAT	ACA	GCA	GGC	AGT	ACT	AGT	GCA	GGT	CCT	CGT	192
65	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	80
193	TTT	GTC	AAC	CAG	CAC	CTG	TGT	GGT	TCT	CAC	CTA	ATT	GAA	GCA	CTG	TAC	240
81	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Lys	Arg	96
241	CTG	GTA	TGT	GGC	GAA	CGT	GGT	TTC	TTC	TAC	ACT	CCT	AAA	ACA	AAG	CGC	288
97	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	112
289	GGC	ATC	GTT	GAA	CAG	TGC	TGT	ACC	TCT	ATC	TGT	TCC	CTG	TAC	CAA	CTG	336
113	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	***											
337	GAG	AAC	TAC	TGC	AAT	TAA											

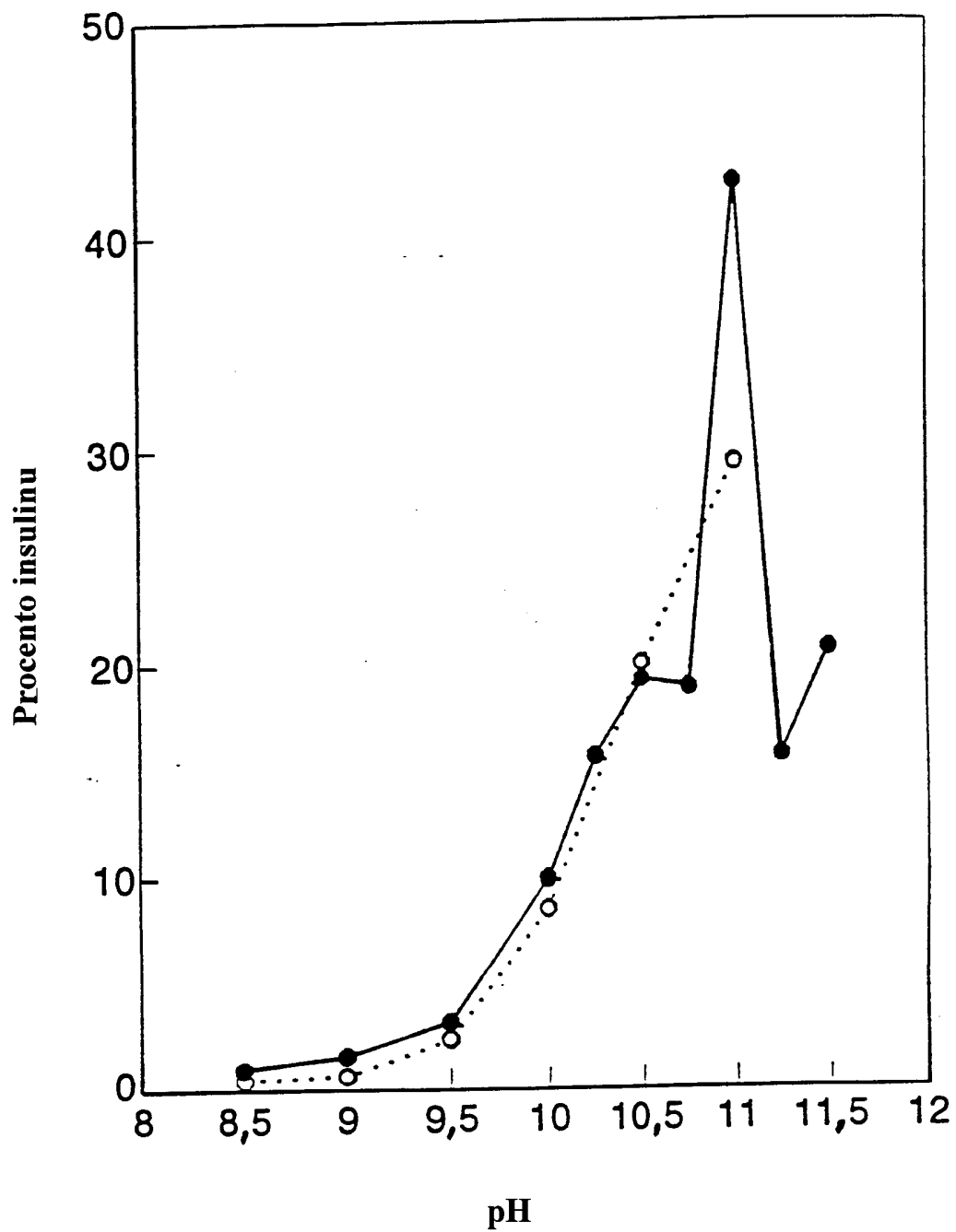


12.05.99

[illegible]

12.05.98

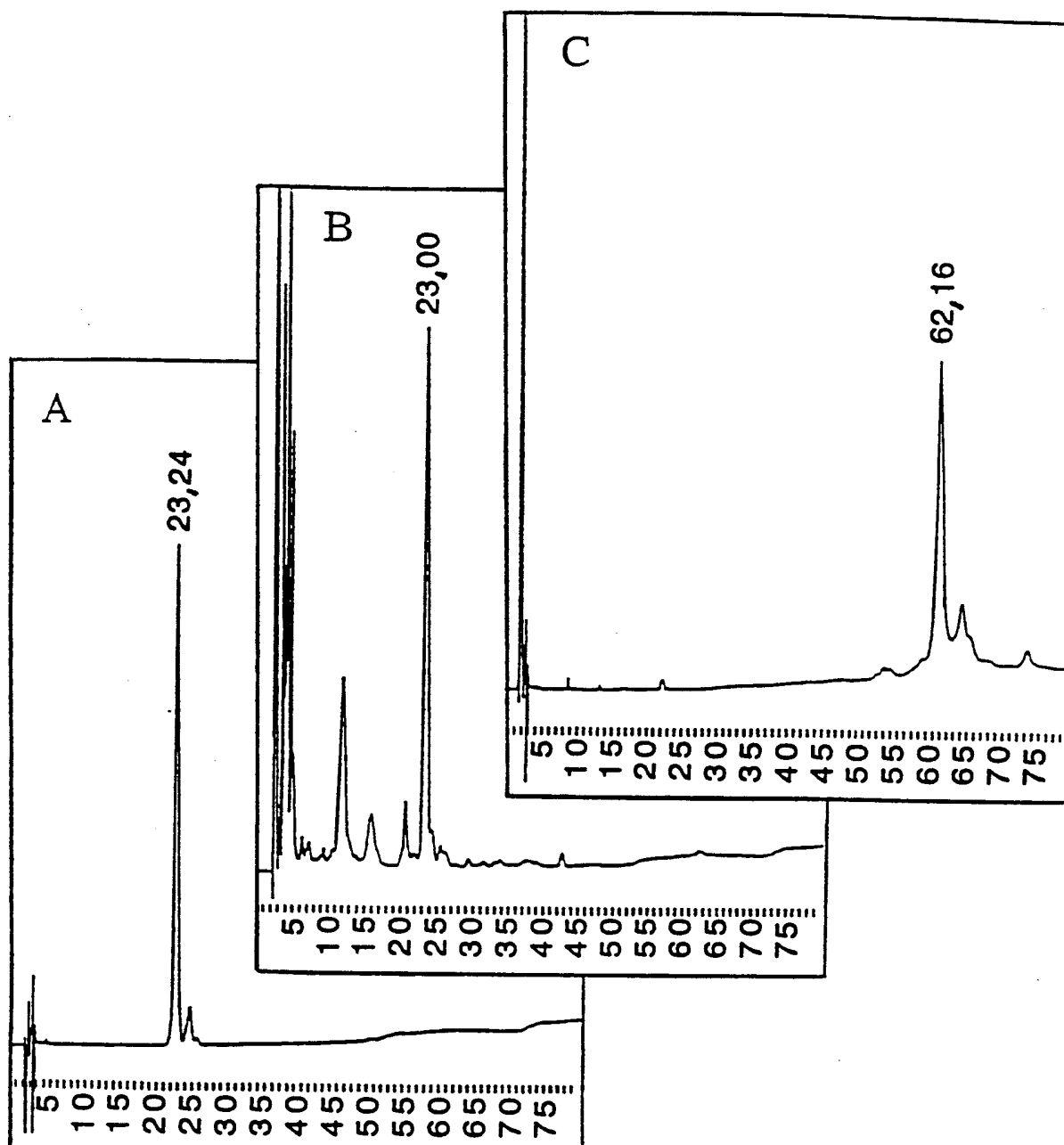
OBRÁZEK 8



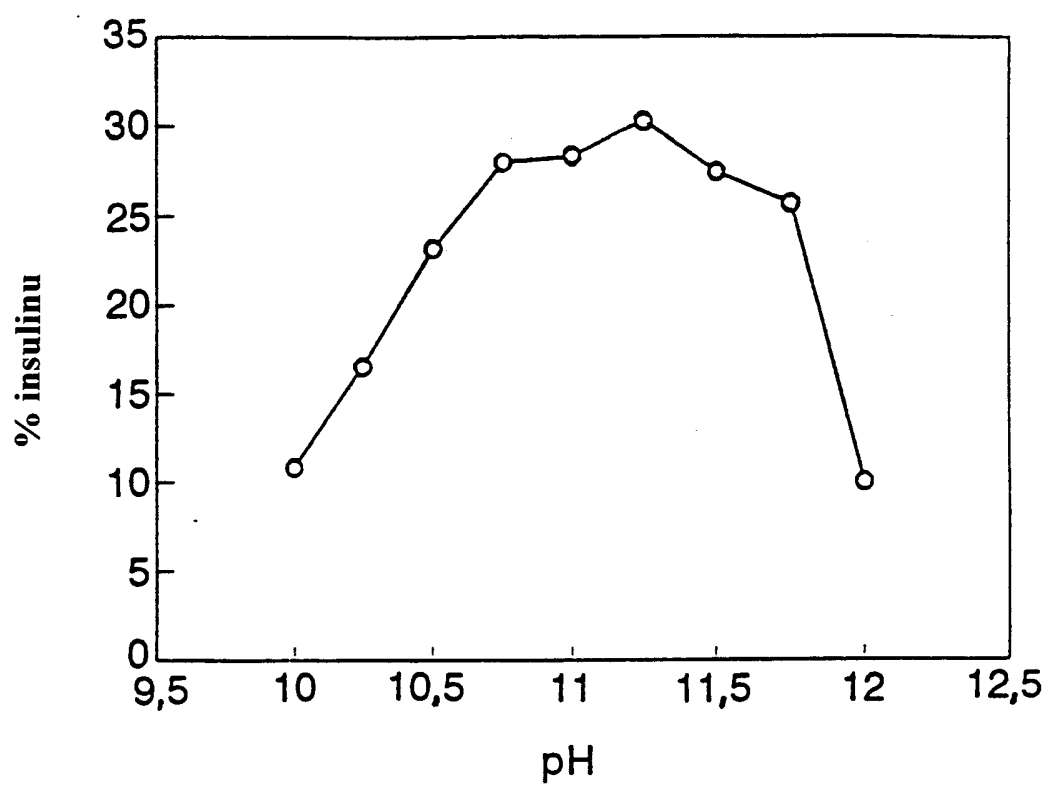
7

12.08.98

OBRÁZEK 9

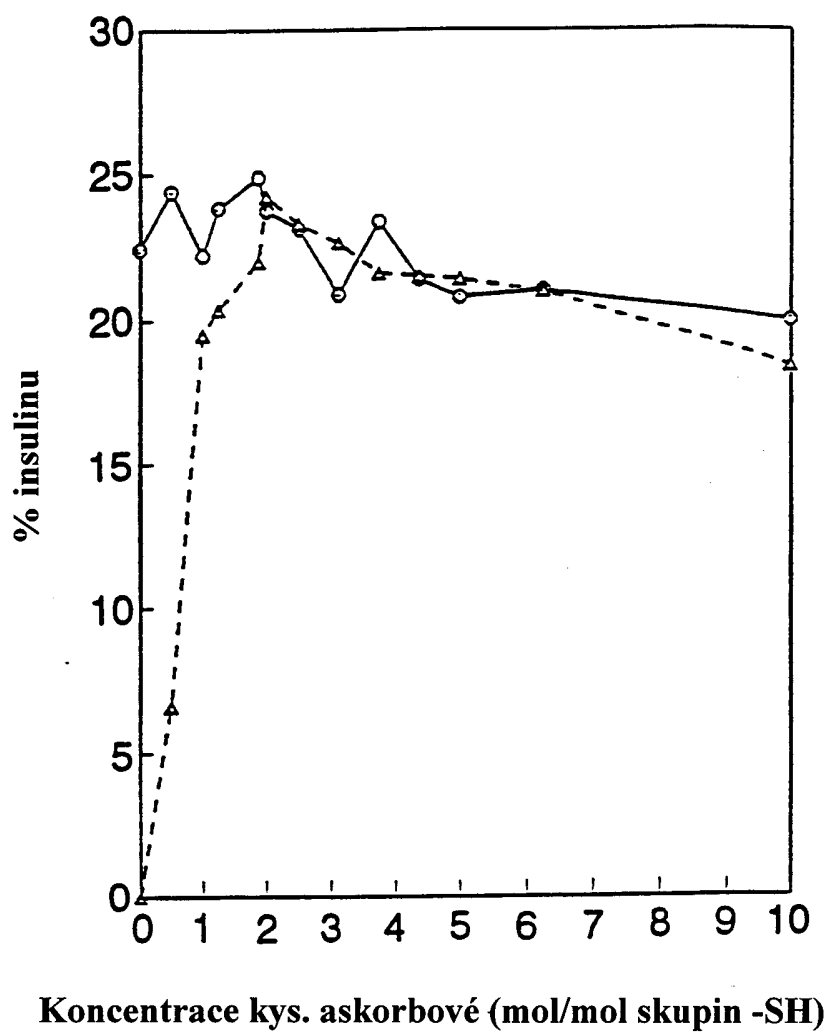


OBRÁZEK 10



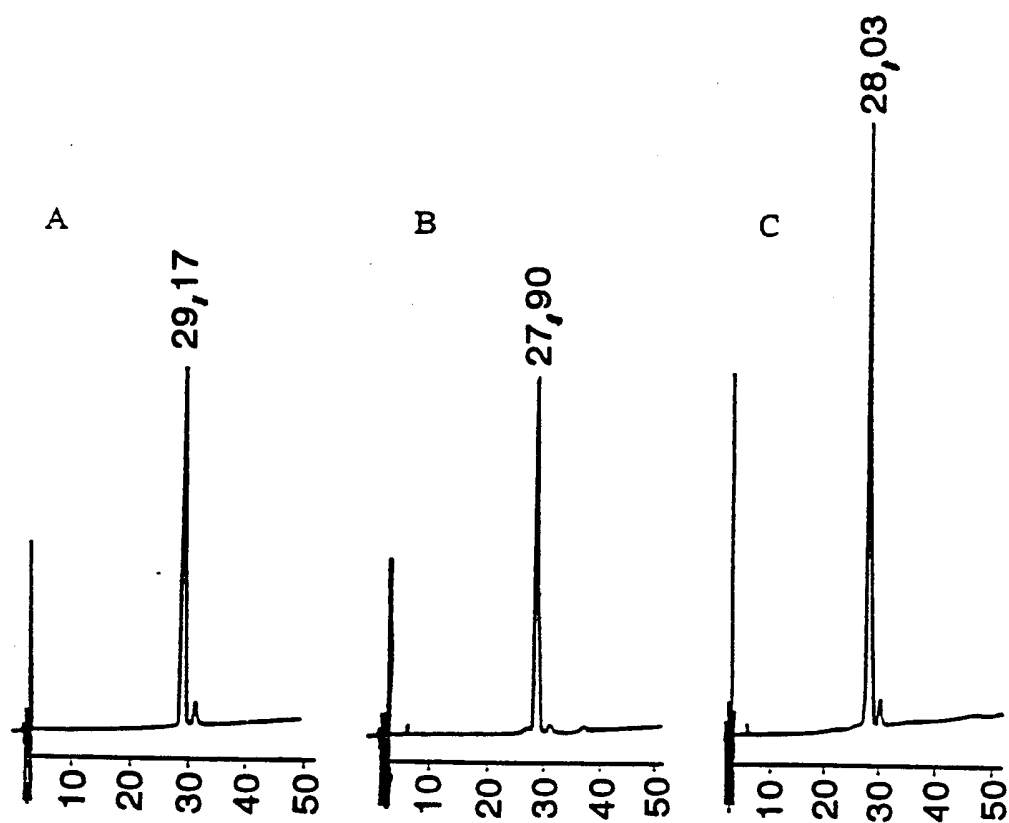
12.05.98

OBRÁZEK 11



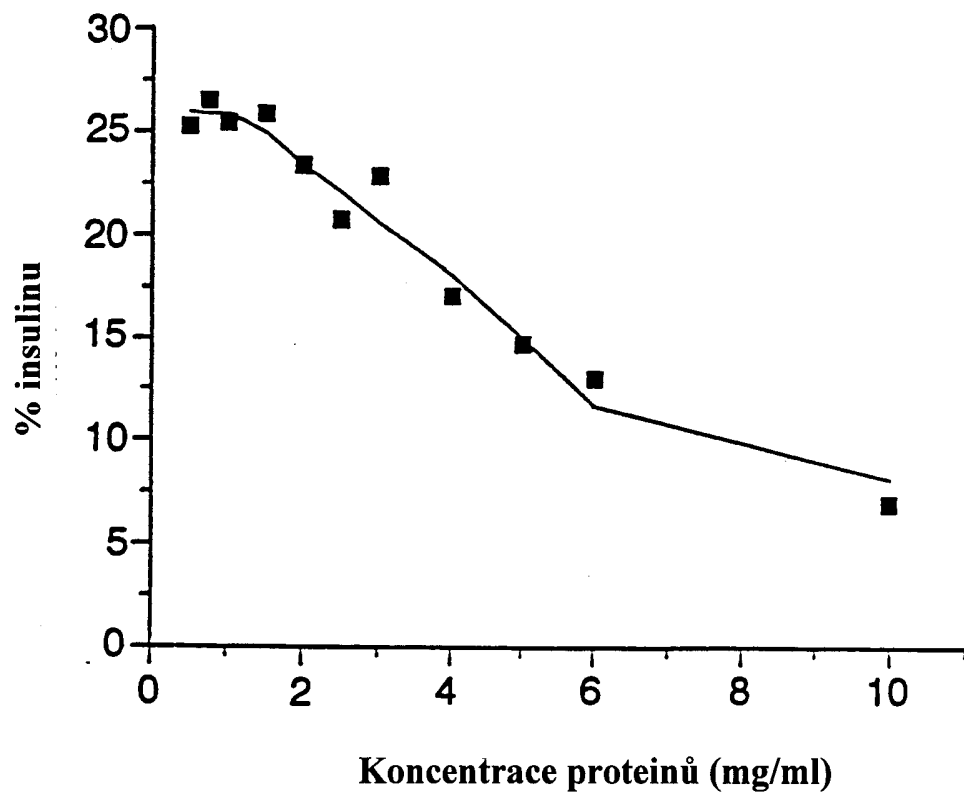
12.08.98

OBRÁZEK 12



12.05.98

OBRÁZEK 13



12.06.98

OBRÁZEK 14

