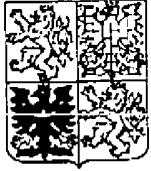


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21. 12. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.94, 16.08.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/9426192, 95/9516810**

(33) Země priority: **GB, GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/GB95/02991**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/20011**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 47/48

(71) Přihlášovatel:

ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce:

Taylorson Christopher John, London, GB;

Eggelte Hendrikus Johannes, Harrow, GB;

Tarragona-Fiol Antonio, London, GB;

Rabin Brian Robert, London, GB;

Boyle Francis Thomas, Macclesfield, GB;

Hennam John Frederick, Macclesfield, GB;

Blakey David Charles, Macclesfield, GB;

Marsham Peter Robert, Macclesfield, GB;

Heaton David William, Macclesfield, GB;

Davies David Huw, Macclesfield, GB;

Slater Anthony Michael, Macclesfield, GB;

Hennequin Laurent Francois André, Cergy
Cédex, FR;

(74) Zástupce:

Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha
7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutická kompozice obsahující
enzymatickou složku specifickou pro cílové
buňky**

(57) Anotace:

Popisuje se dvousložkový systém pro použití v
hostiteli, ve kterém (i) první složka sestává ze
specifické vazebné skupiny schopné vazby na
antigen asociovaný s nádorem, která je navá-
zána na zmutovanou formu enzymu, schop-
nou konverze neaktivního prekursoru účinné
látky na protinádorově účinnou látku, (ii) dru-
hou složkou je neaktivní prekursor účinné
látky, který je za přítomnosti enzymu
konvertován na protinádorovou účinnou
látku, přičemž zmutovaný enzym je mutantní
formou hostitelského enzymu, který ve své
přirozené formě rozeznává substrát na zákla-

dě interakcí iontového páru a ve zmuto-
vané formě je tato polarita převrácena
("reverzní polarita"); první složka není v
hostiteli v podstatě imunogenní a ne-
aktivní prekursor účinné látky není v
podstatě přirozenými, nemutovanými
hostitelovými enzymy konvertovatelný
na protinádorově účinnou látku. Dále se
popisují farmaceutické kompozice, které
tyto složky obsahují.



1952-97

I.

Farmaceutické kompozice obsahující enzymatickou složku specifickou pro cílové buňky

Oblast techniky

Vynález se týká léčby využívající enzymu specificky cíleného prostřednictvím protilátek, jehož substrátem je neaktivní forma účinné látky (antibody directed enzyme prodrug therapy - ADEPT). Při této léčbě je použita mutantní forma enzymu hostitele, která se běžně nevyskytuje, zvláště pak mutantní forma ribonukleázy.

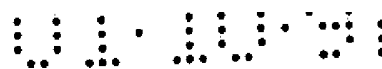
Dosavadní stav techniky

V lékařském výzkumu bylo po dlouhou dobu problémem nalézt způsob selektivního namíření léčiva proti rakovinným buňkám za účelem usmrcení těchto buněk v organismu pacienta. ADEPT je jedním z přístupů umožňujících překonat tento problém. ADEPT využívá protilátku konjugovanou s enzymem selektivně namířenou proti nádoru. Tento konjugát je administrován do organismu pacienta (obvykle intravenózně) a je mu ponechán dostatek času k lokalizaci v místě/místech nádoru. Pak následuje latentní perioda umožňující, aby mohla být tato první složka odstraněna krevního oběhu. Následně je do organismu pacienta administrována neaktivní forma účinné látky, která je prostřednictvím enzymu (lokalizovaného v místech nádoru) přeměněna na aktivní formu vykazující cytotoxickou aktivitu, která ničí nádorové buňky. Jelikož jedna molekula enzymu může katalyzovat vznik mnoha molekul cytotoxicky aktivní látky, je dosaženo zesílení účinku. Navíc nádorové buňky, které nenesou antigeny rozpoznávané použitou protilátkou (nádory obvykle vykazují určitou mikroheterogenitu) jsou rovněž usmrceny enzymaticky amplifikovanou tvorbou cytotoxicky aktivní látky. Je znám systém využívající jako enzymatickou komponentu



prokaryotický enzym karboxypeptidázu G2 (CPG2, viz. WO 88/07378). Nevýhodou systémů využívajících prokaryotické enzymy je skutečnost, že přirozená střevní mikroflóra může obsahovat prokaryotické organizmy schopné iniciovat neselektivní tvorbu cytotoxicky aktivní látky.

Dalším problémem vyskytujícím se ve známých systémech je skutečnost, že opakovaná administrace konjugátu (protilátka-enzym) vede k indukci imunitní odpovědi hostitele, která má za následek snížení účinnosti léčby. Část konjugátu tvořená protilátkou je obvykle myší monoklonální protilátka, která může být za účelem snížení imunogenicity humanizována pomocí známých technik. Nicméně snížení imunogenicity části konjugátu tvořené enzymem se ukázalo jako problematičtější. To je způsobeno tím, že enzym přítomný v konjugátu se nesmí přirozeně vyskytovat v krevním oběhu lidského hostitele, neboť by jinak došlo k předčasné přeměně neaktivní formy účinné látky v cytotoxicky účinnou látku, a nebylo by tudíž pozorováno cytotoxické působení selektivně namířené proti nádorům. Akzo ve WO 90/02939 navrhl k ADEPT použití lidských enzymů, přičemž selektivita je udržena výběrem lidského enzymu, který není za normálních okolností přítomen v krevním oběhu, jako například lysozym. Akzo si vybral lidský lysozym jako "svůj" enzym a vzhledem k substrátovým požadavkům (jelikož patří lysozym mezi endoglykosidázy potřebuje jako substrát ke štěpení polymery N-acetylglukosaminu spojené β_{1-4} vazbou (NAG-chitin)) je nucen produkovat neaktivní prekurzory účinných látek obsahující takové funkční části. Za účelem zabránění vstupu neaktivního prekurzoru dovnitř buňky dále přidal k oligomeru rezidua taurinu - spoléhající se na skutečnost, že sulfonové kyseliny zabrání vstupu dovnitř buněk a tudíž i naměřená cytotoxicita je 20-krát menší - Obrázek 13 v WO 90/02939.



Použití savčího enzymu jako například alkalické fosfatázy (Senter a další, US 4975278) nebo nějakého lidského enzymu jako například beta-glukuronidázy (Behringwerke DE 42336237) nebo lysozymu (Akzo, WO 90/07929) k ADEPT má tu výhodu, že takové enzymy by měly být, ve srovnání s enzymy získanými z jiných než savčích organismů, méně imunogenní nebo by neměly být imunogenní vůbec. Nevýhodou při použití savčího nebo lidského enzymu je skutečnost, že tento enzym je endogenně přítomen v organismu pacienta a v tomto organismu tudíž existuje určitý potenciál umožňující přeměnu neaktivního prekursoru na účinnou látku, přičemž tato přeměna není vyvolána působením administrovaného konjugátu protilátka-enzym. Je tudíž pravděpodobné, že tento přístup vede ke zvýšené toxicitě u tohoto typu ADEPT. Neaktivní prekursor sloužící jako substrát pro alkalickou fosfatázu jsou, při absenci jakéhokoliv administrovaného konjugátu, rychle přeměňovány na účinné látky jak u myši (Doyle W. T. a Vyas D. M., Cancer Treatment Reviews 17, 127 až 131, 1990) tak u člověka (Hande a další, Clinical Pharmacology and Therapeutics 53, 233, 1993). Tato skutečnost je způsobena značným rozšířením alkalické fosfatázy v organismu a dokazuje, že zmíněné rozšíření alkalické fosfatázy je kritickým problémem při využití tohoto enzymu. Data, kdy je jako neaktivní prekursor použit substrát pro beta-glukuronidázu nebo lysozym, nejsou u lidí k dispozici. Glukuronidáza a lysozym jsou přítomny v krevní plazmě a i v různých tkáních. Akzo popsal, že lysozym je přítomen v mléku, slzách, slinách, slezině, leukocytech a monocytech. Behringwerke popsal v DE 4236237, že glukuronidáza je sekretována aktivovanými makrofágy, granulocyty a krevními destičkami. Jelikož tyto buňky jsou značně rozšířeny v celém organismu, mohlo by docházet k nežádoucí aktivaci neaktivních prekursorů účinné látky. Behringwerke skutečně ukázal, že u myši dochází po administraci neaktivního

prekurzoru Doxorubicinu k akumulaci relativně vysoké hladiny volné aktivní látky ve slezině, která je bohatým zdrojem těchto buněk (viz. Tabulka 3 v DE 4236237).

Použití lidských enzymů při tomto přístupu k ADEPT je limitováno skutečností, že mohou být použity pouze enzymy s převážně intracelulární distribucí, a že neaktivní prekurzory používané jako substráty příslušných enzymů musí být udržovány vně buněk, aby byly minimalizovány cytotoxické účinky. Tyto skutečnosti silně limitují počet možností vedoucích k vytvoření systému k ADEPT. Ačkoliv je lysozym velmi malý enzym, má tento při využití k ADEPT některé nevýhody. Lysozym neuvolňuje aktivní látku, ale uvolňuje derivát, jehož farmakologická aktivita není známa. V příkladu uvedeném v práci jejíž autorem je Akzo, jsou spíše než volný Doxorubicin uvolňovány Dox-(GlcNac)₁ nebo Dox-(GlcNac)₅. Glukuronidáza může uvolnit účinnou látku, například adriamycin, z neaktivního glukuronidu a v těchto experimentech byly zjištěny protinádorové aktivity (Bosslet, K. a další, Cancer Research 54, 2151 až 59, 1994). Nicméně lidská glukuronidáza je enzym o vysoké molekulové hmotnosti (150 až 300 kDa) a vzniklý konjugát (selektivně namířený proti určitému nádoru) bude pravděpodobně velmi velký. Tato skutečnost bude pravděpodobně působit problémy při penetraci do tkání jako například při penetraci do nádorů, jelikož je dobře prokázáno, že menší proteiny pronikají do pevných nádorů daleko rychleji. Glukuronidáza je navíc glykosylována a tato glykosylace vede, při použití k ADEPT, k rychlému odstranění konjugátu protilátka-glukuronidáza z krevního řečiště. Rychlé odstranění konjugátu z krve má za následek skutečnost, že jenom malá frakce konjugátů je lokalizována na nádorovém xenogenních štěpech. Kombinace vysoké molekulové hmotnosti a skutečnosti, že dochází k rychlému odstranění konjugátu z krve bude pravděpodobně vést ke špatné lokalizaci těchto konjugátů na nádory přítomné v

organismu pacienta. Glukuronidáza není tudíž ideálním enzymem k ADEPT.

Podstata vynálezu

Vynález je založen na objevu, že enzym hostitele (například lidská ribonukleáza, enzym přirozeně se vyskytující v krevním oběhu) může být upraven tak, aby jeho mutantní forma rozpoznávala neaktivní prekursor účinné látky použitý při ADEPT, a aby tento prekursor nebyl velkou měrou rozpoznáván enzymem přirozeně se vyskytujícím v organismu hostitele. Jelikož "upravený" enzym je, co se týká aminokyselinového složení, velmi podobný nativnímu enzymu hostitele, je jeho velkou výhodou, ve srovnání s bakteriálními enzymy jako například CPG2, podstatně snížená imunogenita. Tento upravený enzym se přirozeně nevyskytuje a tudíž je výhodně snížena pravděpodobnost nespecifické aktivace neaktivního prekursoru účinné látky, způsobená přirozeně se vyskytující mikroflórou nebo přirozeně se vyskytujícími lidskými enzymy. Dalšími výhodami tohoto přístupu je skutečnost, že je tento přístup možné aplikovat na široké spektrum lidských nebo savčích enzymů, protože tento přístup není limitován přirozenou distribucí enzymu v organismu a může být rovněž využíván neaktivní prekursor účinné látky, který proniká dovnitř buněk.

Zmíněné problémy byly částečně popsány v Mezinárodní patentové přihlášce WO 95/13095 (Wellcome Foundation), která byla zveřejněna až po nejstarším datu priority této přihlášky. V této patentové přihlášce bylo k ADEPT navrženo použití mutantních savčích enzymů schopných aktivovat neaktivní prekursor účinných látek, které nejsou aktivovány odpovídajícím přirozeně se vyskytujícím enzymem, nicméně nepopisuje předmět nyní předkládaného vynálezu.

Je velmi překvapivé, že náhrada elektricky nabitého zbytku, který je umístěn poblíž nebo přímo uvnitř vazebného

místa pro substrát nebo v katalytickém místě enzymu, reziduem nesoucím opačný náboj, má za následek vznik mutantního enzymu, který má nedotčené katalytické centrum. Tento mutantní enzym se od nativního enzymu liší pouze substrátovou specifitou. Substráty jsou podobné, interagují s enzymem prostřednictvím komplementárních nábojů (interakce iontových párů), avšak substrát pro mutantní enzym musí mít opačný náboj než je tomu u substrátu pro nativní enzym.

Navíc kombinace neaktivní prekurzor/účinná látka popsané ve Wellcome (založené na methotrexátu a melphalanu) spoléhají při zamezení vstupu neaktivního prekurzoru dovnitř buňky na zablokování mechanismů aktivního transportu. Tato skutečnost limituje spektrum použitelných kombinací neaktivní prekurzor/účinná látka, pouze na ty látky, které jsou transportovány takovými mechanismy aktivního transportu. Narozdíl od této skutečnosti umožňuje přístup "převrácené polarity" popsaný v tomto vynálezu volbu takového náboje neaktivních prekurzorů (které mohou, ale nemusí, mít rovněž vlastnosti nezbytné k aktivnímu transportu), aby došlo k zablokování vstupu neaktivního prekurzoru dovnitř buňky. Použití tohoto vynálezu tudíž umožňuje volbu širšího spektra kombinací neaktivní prekurzor/účinná látka.

Jedna stránka vynálezu popisuje vzájemně komplementární dvojsložkový systém vytvořený za účelem použití v organismu hostitele. Tento systém obsahuje:

(i) první složku, kterou je část odpovědná za nasměrování. Tato část je schopná vázat se na antigen asociovaný s nádorem a je spojena s mutovaným enzymem, který je schopen přeměny neaktivního prekurzoru na antineoplasticky účinnou látku a;

(ii) druhou složku, kterou je neaktivní prekursor účinné látky, který je možné působením příslušného enzymu přeměnit na antineoplasticky účinnou látku;

kde:

mutovaný enzym je mutovaná forma enzymu hostitele, přičemž přirozeně se vyskytující enzym hostitele rozpoznává svůj přirozený substrát prostřednictvím interakce iontových párů a při tvorbě mutovaného enzymu a komplementárního neaktivního prekursoru je tato interakce iontových párů obrácená ("převrácená polarita");

první složka je v podstatě neimunogenní pro organismus hostitele a;

druhá složka tvořená neaktivním prekurzorem není v organismu hostitele působením nemutovaného enzymu hostitele přeměňována ve velké míře na antineoplasticky účinnou látku.

Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž první složka obsahuje mutovaný enzym odvozený od enzymu získaného ze stejného druhu, ke kterému náleží hostitel, u něhož bude systém použit.

Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž částí odpovědnou za nasměrování je nějaká protilátka anebo její fragment. Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž fragment protilátky je fragment $F(ab')_2$.

Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž mutovaný enzym je mutovaná ribonukleáza. Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž

mutovaný enzym je lidská ribonukleáza, která má v pozici 66 nějakou negativně nabitou aminokyselinu. Ve výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž negativně nabitá aminokyselina v pozici 66 ribonukleázy je Glu.

V jiném výhodném provedení vynálezu je systémem popsáným výše myšlen takový systém, v němž mutovaným enzymem je mutovaná glukuronidáza.

Vynález dále popisuje vzájemně komplementární dvojsložkový systém vytvořený za účelem použití v organismu hostitele. Tento systém obsahuje:

(i) první složku, kterou je část odpovědná za nasměrování. Tato část je schopná vázat se na antigen asociovaný s nádorem a je spojena s mutovaným enzymem, který je schopen přeměny neaktivního prekurzoru na antineoplasticky účinnou látku a;

(ii) druhou složku, kterou je neaktivní prekurzor účinné látky, který je možné působením příslušného enzymu přeměnit na antineoplasticky účinnou látku;

kde:

mutovaný enzym je mutovaná forma enzymu hostitele

první složka je v podstatě neimunogenní pro organismus hostitele a;

neaktivní prekurzor není v organismu hostitele působením nemutovaného enzymu hostitele přeměňován ve velké míře na antineoplasticky účinnou látku.

Termínem "neaktivní prekurzor není v organismu hostitele působením nemutovaného enzymu hostitele přeměňován ve velké míře na antineoplasticky účinnou látku" rozumíme skutečnost, že při administraci neaktivního

prekurzoru do organismu hostitele nedochází k výskytu nežádoucích problémů s necílenou toxicitou.

Termínem "v podstatě neimunogenní" rozumíme skutečnost, že první složka může být do organismu hostitele administrována více než jedenkrát, aniž by došlo k indukci silné imunitní odpovědi hostitele, jaká by v organismu hostitele byla například pozorovatelná při použití myší protilátky připojené k bakteriálnímu enzymu.

Ve výhodném provedení vynálezu je mutovaný enzym odvozen od enzymu získaného ze stejného druhu, ke kterému náleží hostitel, u něhož bude tento systém použit. Mutovaný enzym může být nicméně odvozen od enzymu získaného z organismů jiných druhů, a to za předpokladu, že struktura daného enzymu je mezi těmito druhy dostatečně konzervativní, aby nedocházelo ke vzniku problémů s imunogenicitou.

Ve výhodném provedení vynálezu je částí odpovědnou za nasměrování protilátka, zvláště pak fragment protilátky, jako například fragment $F(ab')_2$. Připojení protilátky nebo jejího fragmentu k enzymu může být dosaženo pomocí známých metod jako například použitím heterobifunkčních činidel sloužících jako "zesíťovače" nebo prostřednictvím fúze genů nebo použitím jiných vhodných metod. Protilátka může pocházet ze stejného hostitele (například použití myší protilátky v organismu myši) nebo může být tato protilátka pozměněna takovým způsobem, aby nebyla v organismu zvoleného hostitele rozpoznávána jako cizorodá (například použití chimérických myších protilátek, protilátek s vloženými myšími CDR úseky v organismu lidí).

V preklinických studiích prováděných na opicích a u pacientů bylo prokázáno podstatné snížení imunogenity protilátek hlodavců, které byly upraveny následovně: buď připojením variabilních domén protilátek hlodavců ke

konstantním doménám lidských protilátek (chimérické protilátky) nebo zabudováním vazebných míst pro antigen (CDR) z protilátek hlodavců do lidských protilátek (vkládání CDR úseků - CDR grafting). Dokonce i protilátky s vloženými CDR úseky obsahují v úseku základní struktury odvozeném od lidské protilátky velké množství (>50) aminokyselin pocházejících ze sekvence protilátky hlodavce. I přes tuto skutečnost, byla u opic i u pacientů zjištěna snížená imunogenita těchto protilátek. Toto zjištění poskytuje důkazy, že mutace omezeného množství aminokyselin v katalytickém místě enzymu hostitele bude mít pravděpodobně za následek vznik enzymu s minimální imunogenitou a zcela určitě s imunogenitou nižší, než jakou by měl enzym z jiného organismu než z organismu hostitele. Čtenáři nechtě se laskavě obrátí na následující citace: A. Mountain a J. R. Adair, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 10, 1 až 142, 1992; G. Winter a W. J. Harris, *Trends in Pharmacological Sciences*, 14, 139 až 143, 1993; I. I. Singer a další, *J. Immunol* 150, 2844 až 57, 1993; J. Hakimi a další, *J. Immunol*, 147, 11352 až 59, 1991 a J.D. Isacs a další, *The Lancet* 340, 748 až 752, 1992. Domény konstantních oblastí mohou být například domény lidského IgA, IgE, IgG nebo IgM. Použití lidského IgG2 a IgG3 (zvláště IgG2) je výhodnější, ale izotypy IgG1 a IgG4 mohou být rovněž použity. Mohou být rovněž použity samotné lidské protilátky, jako například protilátky produkované v myších geneticky manipulovaných za účelem produkce lidských protilátek.

V enzymu hostitele je provedena mutace (pomocí jakékoliv vhodné metody jako například chemickou nebo biotechnologickou syntézou genu nebo cílenou mutací) za účelem dosažení změny ve způsobu interakce mezi aktivním místem enzymu a neaktivním prekurzorem, ve srovnání s interakcí nativního enzymu hostitele.

Ve výhodném provedení vynálezu je mutací v enzymu taková změna polaritv v aktivním místě enzymu, že tento mutovaný enzym přeměňuje neaktivní prekurzor s komplementární polaritou; neaktivní prekurzor není v podstatě přeměňován nemutovaným enzymem hostitele. Ve výhodném provedení vynálezu rozpoznává přirozeně se vyskytující enzym hostitele svůj přirozený substrát prostřednictvím interakce iontových párů a tato interakce je "převrácená" v systému tvořeném mutovaným enzymem a komplementárním neaktivním prekurzorem účinné látky. Ve výhodném provedení vynálezu je zmíněným enzymem mutovaná ribonukleáza, zvláště pak lidská ribonukleáza s převrácenou polaritou (viz. Obrázky 12 až 15).

U lidské ribonukleázy tvoří lysin 66 pozitivně nabitý zbytek, který interaguje s negativně nabitými fosfátovými skupinami přítomnými na RNA, která je přirozeným substrátem tohoto enzymu. Polarita tohoto zbytku je převrácena například metodami genového inženýrství (ale je rovněž zvažována možnost chemické syntézy) za účelem produkce negativně nabitého zbytku, jakým je například kyselina glutamová. Výsledný enzym s "převrácenou polaritou" rozpoznává neaktivní prekurzor účinné látky podle vynálezu, který není v podstatě rozpoznáván nemutovaným enzymem hostitele. Za účelem optimalizace vazebných charakteristik pro substrát a čísla přeměny jsou zvažovány další záměny aminokyselinových zbytků přítomných v oblasti aktivního místa. Geneticky upravené formy ribonukleázy reprezentují další stránku vynálezu. Vzhledem ke své nízké molekulové hmotnosti (přibližně 13600 kDa; po administraci do organismu umožňuje dobrou penetraci do tumoru) a dobré tepelné stabilitě a odolnosti vůči proteolýze, je použití ribonukleázy velmi výhodné. Ve výhodném provedení vynálezu je neaktivním prekurzorem účinné látky derivát ribonukleotidu obsahující sloučeninu odvozenou od bis(2-chlor-ethyl)aminu (dále v textu bude namísto spojení "obsahující

sloučeninu odvozenou od bis(2-chlorethyl)aminu" používán anglický název "mustard", například mustard-nukleotid) obecného vzorce 1 znázorněného na obrázku 11, kde:

Q je O nebo NH (zvláště NH);

A je skupina obecného vzorce -X-Y- kde

Y je SO₂, CO nebo jednoduchá vazba (ve výhodném provedení CO) za podmínky, že

když Q je kyslík pak Y není SO₂;

X je -(CH₂)_n, kde n= 1 až 4 (ve výhodném provedení n = 1 s výjimkou případů, kdy Y představuje jednoduchou vazbu, pak n je výhodněji 2). X může být na kterémkoli uhlíkovém atomu substituováno alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku (u každého chirálního atomu jsou uvažovány R a/nebo S konfigurace)

nebo

když Y označuje CO a n=1 pak X může (ale nemusí) být na uhlíkovém atomu substituováno postranním řetězcem alaninu, valinu, leucinu, izoleucinu, methioninu, fenylalaninu, tryptofanu, serinu, threoninu, cysteinu, asparaginu, glutaminu, lysinu, argininu nebo histidinu (u každého chirálního atomu jsou uvažovány R a/nebo S konfigurace);

R1 je uracil nebo cytosin, jak je znázorněno na Obrázku 11;

R2 a R3 nezávisle jsou vždy vodík nebo alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku (ve výhodném provedení methyl a zvláště pak R2=R3=H);

R5 a R6 nezávisle reprezentují Cl, mesyl nebo tosyl (ve výhodném provedení R5=R6=Cl);

R7, R8, R9 a R10 nezávisle jsou vždy vodík nebo

alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku (ve výhodném provedení methylová skupina), alkokyskupina s 1 až 4 atomy uhlíku (ve výhodném provedení methoxyskupina), F nebo Cl (ve výhodném provedení Cl) a ve výhodném provedení symboly R8 a R9 představují jiné zbytky než atomy vodíku. Nicméně ve zvláště výhodném provedení $R7=R8=R9=R10=H$.

Ve výhodném provedení vynálezu je mustard-ribonukleotid jedním z mustard-ribonukleotidů v nichž:

Q je NH;

X je $-(CH_2)_n-$, kde n je 1 až 4;

Y je $-C(O)-$;

R1 je uracil nebo cytosin;

R2 a R3 jsou H;

R5 a R6 jsou Cl; a

R7, R8, R9 a R10 jsou H;

nebo jejich soli.

Zvláště výhodná je následující konkrétní sloučenina:

O-[(2R, 3S, 4R, 5R)-2-(2-aminoacetamidomethyl)-5-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-1-yl)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrofuran-3-yl]-O-[4-(bis[2-chlorethyl]amino)fenoxy]hydrogenfosforečnan, který je znázorněn jako koncový produkt na Obrázku 7.

Jinou výhodnou sloučeninou je cytosinový analog koncového produktu znázorněný na Obrázku 7.

Obecným termínem "alkyl" jsou zde míněny jak nevětvené alkylové skupiny tak alkylové skupiny s rozvětveným řetězcem. Nicméně pojmenování jedinečných alkylových skupin, jako například "propyl", jsou specifická pouze pro nerozvětvené řetězce a pojmenování jedinečných

alkylových skupin s rozvětveným řetězcem, jako například "izopropyl", se týkají pouze verzí s rozvětveným řetězcem. Podobná konvence platí i pro další obecné pojmy.

Je nutné si uvědomit, že pokud se určité sloučeniny popsané Vzorcem 1, vyskytují v opticky aktivních nebo racemických formách v důsledku přítomnosti asymetrických uhlíkových atomů, vynález ve své podstatě zahrnuje všechny takové opticky aktivní nebo racemické formy, které mají tu vlastnost, že jsou substrátem pro mutantní enzymy podle vynálezu.

Syntéza opticky aktivních forem může být prováděna pomocí standardních postupů organické chemie v současnosti dobře známých, jako například prostřednictvím syntézy z opticky aktivních výchozích materiálů nebo rozdělením jednotlivých racemických forem. Obdobně mohou být vlastnosti substrátů vzhledem k mutantním enzymům stanoveny pomocí standardních laboratorních technik.

Bodové mutace budou značeny následovně: přirozeně se vyskytující aminokyselina (použití jednopísmenné nomenklatury), pozice, nová aminokyselina. Například označení "D253K" znamená, že na pozici 253 byla asparagová kyselina (D) nahrazena lysinem (K). Mnohočetné mutace v jedné molekule enzymu budou znázorněny v hranatých závorkách.

V této patentové přihlášce zahrnuje termín CPB:

- i) maturované, pro nebo prepro formy enzymu s nebo bez peptidové značky ("tag", například c-myc);
 - ii) jakoukoliv karboxypeptidázu, která je specifická pro peptidové substráty s C koncem tvořeným Lys nebo Arg;
- pankreatické nebo plazmatické CPB enzymy (ve výhodném provedení pankreatické enzymy);

jestliže není řečeno jinak nebo jestliže není tato skutečnost zřejmá z kontextu.

Jako mutantní CPB podle vynálezu označujeme mutanty jakýchkoliv výše zmíněných CPB, které mají vhodné vlastnosti požadované podle vynálezu. Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o následující mutanty pankreatické HCPB: D253K, D253R a ve zvláště výhodném provedení [G251N, D253R]; jsou rovněž zvažovány odpovídající mutace v jiných CPB. Mutantní CPB podle vynálezu mohou rovněž obsahovat další "konzervativní" mutace (inzerce, substituce a/nebo delece), které podstatně nepozměňují vlastnosti klíčové mutace. Pro účely tohoto dokumentu je za konzervativní aminokyselinovou substituci považována substituce, u níž je pravděpodobnost výskytu v přírodě více než desetinásobná oproti pravděpodobnosti výskytu substituce, ke které dochází náhodně (tak jak je definováno pomocí numerických metod popsaných v Dayhoff a další, Atlas of Protein Sequence and Structure, 1971, strany 95 až 96 a obrázky 9 a 10).

PCB jsou zmíněny v následujících pracích: Folk, J. E. v The Enzymes, Svazek III, Academic Press (1971), strana 57; Coll M a další, EMBO Journal 10, 1 až 9, 1991; Eaton, D. L. a další, J. Biol. Chem. 266, 21833 až 21838, 1991; Yamamoto, K. a další, J. Biol. Chem. 267, 2575 až 2581, 1992; Patent Spojených Států US 5364934 (Genetech) a; Mezinárodní patentová přihláška WO 95/14096 (Eli Lilly).

Sloučeniny podle vynálezu mohou tvořit soli s různými organickými a anorganickými kyselinami a bázemi. Tyto soli jsou rovněž předmětem vynálezu. Mezi takové soli patří amonné soli, soli alkalických kovů jako například sodné nebo draselné soli, soli kovů alkalických zemin jako například vápennaté nebo hořečnaté soli, soli s organickými zásadami; například dicyklohexylamoniové soli, N-methyl-D-glukamin, soli s aminokyselinami jako například

s argininem nebo lysinem a podobně. Mohou být rovněž připraveny soli s organickými nebo anorganickými kyselinami; například s HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, s kyselinou methansulfonovou, toluensulfonovou, maleinovou, fumarovou a kafrosulfonovou. Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o netoxické, fyziologicky přijatelné soli, ale ostatní soli jsou rovněž užitečné; například při izolaci nebo čištění produktů.

Zmíněné soli mohou být vytvořeny prostřednictvím konvenčních postupů jako například pomocí reakce produktu ve formě volné kyseliny nebo volné báze s jedním nebo více ekvivalenty vhodné báze nebo kyseliny v rozpouštědle nebo v médiu, ve kterém je tato sůl nerozpustná nebo v rozpouštědle (jako například ve vodě), které je následně odstraněno odpařením ve vakuu nebo mrazovým sušením nebo výměnou kationtů existující soli za jiné kationty na vhodném ionexu. Sloučeniny podle vynálezu mohou být využity ve formě kompozic jako například tablet, kapslí nebo léčebných nápojů pro orální podávání, čípků pro administraci do rekta, sterilních roztoků nebo suspenzí pro parenterální nebo intramuskulární administraci a podobně.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být do organismu pacientů (zvířat nebo lidí) administrovány při potřebě takové léčby v dávkách, při kterých bude z farmakologického hlediska dosaženo optimální účinnosti. Ačkoliv dávky se budou u jednotlivých pacientů lišit v závislosti na podstatě a závažnosti onemocnění, věze pacienta, jeho stravovacím režimu, existenci současné léčby jinými léky a jiných faktorech, odborníci zjistí, že celková denní dávka se obvykle bude pohybovat v rozmezí od 1 do 4000 mg na jednoho pacienta. Celkové denní množství může být administrováno v jedné nebo ve více dávkách. Ve výhodném provedení vynálezu se celková denní dávka bude pohybovat v rozmezí od 100 do 4000 mg na jednoho pacienta; ve

výhodnějším provedení pak v rozmezí od 500 do 3000 mg na jednoho pacienta.

Nejúčinnější způsob administrace a režim dávkování konjugátů a neaktivních prekurzorů účinné látky podle vynálezu při léčbě rakoviny závisí na řadě faktorů jako například na závažnosti onemocnění, zdraví pacienta a jeho reakci na léčbu a na úsudku ošetřujícího lékaře. Dávkování konjugátů a neaktivních prekurzorů by tudíž mělo být pro jednotlivé pacienty vyzkoušeno. Je nicméně pravděpodobné, že účinné množství konjugátu se bude pohybovat v rozmezí od 20 do přibližně 200 mg/m². Účinné množství neaktivního prekurzoru bude záviset na příslušné použité účinné látce a na toxicitě rodičovské účinné látky. Jelikož neaktivní prekurzor účinné látky je méně toxický než rodičovská účinná látka, jako výchozí bod by mohla sloužit MTD rodičovské aktivní látky (jestliže je známá). U neaktivních prekurzorů odvozených od mustard-fenolu (bis(2-chlorethyl)hydroxyfenylaminu), u kterých nejsou k dispozici klinická data pro rodičovskou aktivní látku, je terapeuticky účinné rozmezí méně jisté a toto rozmezí bude potřeba definovat prostřednictvím standardních toxikologických studií na zvířatech a studií u pacientů, při nichž jsou pacientům podávány neaktivní prekurzory ve zvyšujících se množstvích (studie se začíná podáváním malých dávek). Terapeuticky účinné množství se nicméně obvykle pohybuje v rozmezí 500 až 2000 mg/m².

Je-li třeba, aby bylo umožněno podávání léku ve více denních dávkách, mohou být zmíněné terapeutiky účinná množství přirozeně rozdělena do více jednotlivých dávek. Velikost dávky se bude u jednotlivých pacientů lišit v závislosti na podstatě a závažnosti onemocnění, věze pacienta, jeho stravovacím režimu a dalších faktorech.

Jak je zmíněno níže, tyto kombinace mohou být obvykle formulovány do formy farmaceutických kompozic.

Přibližně 1 až 100 mg sloučeniny nebo směsi sloučenin popsaných Vzorcem 1 nebo její fyziologicky přijatelné soli je smícháno s fyziologicky přijatelným vehikulem, nosičem, excipientem, pojivem, konzervačním prostředkem, stabilizátorem, příchutí atd. Tak je vytvořena forma dávkování léku, kterou vyžaduje přijatá farmaceutická praxe. V těchto kompozicích nebo přípravcích je množství aktivní látky takové, že je umožněno podání vhodné dávky aktivní látky v naznačeném rozmezí.

Příkladem adjuvans, která mohou být inkorporována do tablet, kapslí a podobně jsou: pojivo jako například tragant, arabská guma, kukuřičný škrob nebo želatina; excipient jako například mikrokrystalická celulóza; rozvolňovadlo jako například kukuřičný škrob, předželatinizovaný škrob, kyselina alginová a podobně; lubrikant jako například stearát hořečnatý; sladidlo jako například sacharóza, laktóza nebo sacharin; příchutí jako například pepermint, libavková silice (wintergreen oil) nebo třešňová silice. Jestliže se léky podávají ve formě kapslí, tyto kapsle mohou obsahovat, mimo látek zmíněných výše, nějaký kapalný nosič jako například olej. Jako obal mohou být použity nejrůznější jiné materiály a tyto materiály mohou být použity i k jiné modifikaci fyzické formy, ve které je lék podáván. Tablety mohou být například obaleny šelakem, cukrem nebo oběma současně. Syrup nebo léčivý nápoj mohou obsahovat aktivní sloučeninu, sacharózu jako sladidlo, methyl nebo propyl parabeny (estery kyseliny p-hydroxybenzoové) jako konzervační činidla, barviva a příchutě jako například višňovou nebo pomerančovou příchutí.

Sterilní kompozice určené k podávání ve formě injekcí mohou být formulovány podle konvenční farmaceutické praxe tak, že se aktivní látka rozpustí nebo rozsuspenduje v

nějakém vehikulu, jako například ve vodě pro podávání ve formě injekcí, v nějakém přirozeně se vyskytujícím rostlinném oleji jako například sezamovém oleji, kokosovém oleji, arašídovém oleji, bavlníkovém oleji atd. nebo v nějakém syntetickém mastném vehikulu jako například v ethylesteru kyseliny olejové a podobně. Je-li to žádoucí, mohou být rovněž začleněny pufrы, konzervační přípravky, antioxidanty a podobně.

Vynález dále popisuje systém, použitelný v postupu sloužícím k regulaci růstu neoplastických buněk v organismu hostitele. Zmíněný postup zahrnuje administraci účinného množství první složky do organismu hostitele, po níž následuje latentní perioda umožňující, aby mohla být tato první složka odstraněna z krevního oběhu, a následnou administraci účinného množství druhé složky. Ve výhodném provedení vynálezu jsou složky administrovány intravenózně.

Vynález dále popisuje postup sloužícího k regulaci růstu neoplastických buněk v organismu hostitele. Zmíněný postup zahrnuje administraci účinného množství první složky do organismu hostitele (jak je zmíněno výše), po níž následuje latentní perioda umožňující, aby mohla být tato první složka odstraněna z krevního oběhu, a následnou administraci účinného množství druhé složky, jak je definována výše.

Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici, která se skládá z účinného množství první složky sloužící k lokalizaci nádoru, jak je zde definována, a farmaceuticky přijatelného nosiče nebo rozpouštědla. Ve výhodném provedení vynálezu je kompozice vhodná pro intravenózní administraci. Ve výhodném provedení vynálezu je první složka dodávána ve formě suché pevné látky, která je před použitím rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle.

Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici, která se skládá z účinného množství druhé složky mající protinádorovou aktivitu, jak je zde definována, a farmaceuticky přijatelného nosiče nebo rozpouštědla. Ve výhodném provedení vynálezu je tato kompozice vhodná pro intravenózní administraci. Ve výhodném provedení vynálezu je druhá složka dodávána ve formě suché pevné látky, která je před použitím rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle.

Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici, obsahující první složku, jak je definována výše.

Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici, obsahující druhou složku, jak je definována výše.

Ve výhodném provedení vynálezu jsou farmaceutické kompozice sterilní (pro intravenózní administraci).

Další stránka vynálezu se týká první složky, jak je definována výše.

Vynález rovněž popisuje farmaceutickou kompozici obsahující mutovaný enzym, jak je definován výše.

Další stránka vynálezu popisuje plazmid pQR162. Plazmid pQR162 byl 16. srpna 1994 uložen jako referenční vzorek NCIMB 40678 v NCIMB Limited, 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY, Scotland, UK v souladu s Budapešťskou smlouvou.

E. coli MSD 1646 nesoucí pCG330 (rovněž známý jako pICI1698) byly 23. listopadu 1994 uloženy v souladu s Budapešťskou dohodou v National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St Machar Drive, Aberdeen, Scotland, Spojené Království AB2 1RY: referenční číslo je NCIMB 40694. NCIMB 40694 je další stránkou vynálezu.

Protilátka A5B7 byla uložena (jako referenční vzorek byl použit hybridom produkující tuto protilátku) v souladu s Budapešťskou smlouvou 14. července 1993 v ECACC, PHLS

Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP40JG, UK. Výhodnější je použití humanizované protilátky A5B7 ve formě F(ab')₂.

Další protilátky použitelné k ADEPT byly popsány v následujících pracích. Protilátka BW431/26 byla popsána v Haisma H.J. a další, , Cancer Immunol. Immunother., 34: 343 až 348 (1992). Protilátky L6, 96.5. a 1F5 byly popsány v evropském patentu 302 473. Protilátka 16.88 byla popsána v Mezinárodní patentové přihlášce WO90/07929. Protilátka B72.3 byla popsána v Evropském patentu č. 392 745. Protilátka CEM231 byla popsána v Evropském patentu č. 382 411. Protilátky HMFG-1 a HMFG-11 (Unipath Ltd; Basingstoke, Hants, Spojené Království) reagují s molekulou glykoproteinu podobnou mucinu (mucin-like glycoprotein molecule) přítomnou na membránách globulí mléčného tuku a mohou být použity k nasměrování na nádory prsu a vaječníků. Protilátka SM3 (Chemicon International Ltd., London, Spojené Království) reaguje s vnitřním proteinem mucinu (core protein) a může být použita k nasměrování na nádory prsu a vaječníků. Protilátky 85A12 (Unipath Ltd., Basingstoke, Hants, Spojené Království) a ZCEA1 (Pierce Chemical Company, Chester, Spojené Království) reagují s nádorovým antigenem CEA. Protilátka PR4D1 (Dako Ltd., High Wycombe, Spojené Království) reaguje s antigenem epitheliálních membrán. Protilátka C242 je dostupná z CANAG Diagnostics, Gothenberg, Sweden. Čtenář může rovněž využít Tabulku 3 na straně 208 v Mezinárodní patentové přihlášce WO 95/13095 (Wellcome), která obsahuje data o různých protilátkách.

Obecně lze říct, že protilátky používané k ADEPT jsou špatně internalizovány prostřednictvím nádorových buněk, které jsou těmito protilátkami rozpoznávány. Tato skutečnost umožňuje, aby zacílený enzym aktivující neaktivní prekurzor účinné látky zůstal na povrchu buněk a



mohli tudíž v místě nádoru vytvářet z cirkulujícího neaktivního prekursoru účinnou látku. Internalizace protilátky může být stanovována pomocí známých postupů, například postupy popsány v Jafrezou a další, Cancer Research 52: 1352, 1992 a v Press a další, Cancer Research 48: 2249, 1988.

Dalším využitím vynálezu je možnost použít první a druhé složky při diagnózách in vitro. Příslušný antigen může být například detekován tak, že vystavíme diagnostikovaný vzorek působení první složky podle vynálezu, která obsahuje část odpovědnou za zacílení, jakou je například protilátka schopná vázat příslušný antigen. Poté může být nenavázaná první složka odstraněna, například promytím, a množství navázané první složky může být stanoveno využitím její schopnosti katalyzovat přeměnu druhé složky sestávající se z neaktivního prekursoru účinné látky. Přeměna neaktivního prekursoru může být kvantifikována pomocí jakékoliv vhodné metody jako například HPLC. Čtenář nechť se obrátí na A Practical Guide to ELISA od D. M. Kemeny, Pergamon Press, 1991.

Vynález dále popisuje fragment $F(ab')_2$ rekombinantní myší protilátky A5B7. Tento fragment obsahuje tři disulfidické vazby mezi těžkými řetězci v pantové oblasti.

Vynález dále popisuje fragment $F(ab')_2$ rekombinantní myší protilátky A5B7. Sekvence tohoto fragmentu je popsána v SEQ ID NO: 25 (sekvence těžkého řetězce) a 26 (sekvence lehkého řetězce). Sutter a další, Gene 133, 223 až 230, 1992 tvrdí, že proto, aby bylo při produkci protilátek rekombinantními metodami dosaženo dobré tvorby dimerů, je nezbytné zavést do pantové oblasti protilátky další cystein. Fragmenty produkované rekombinantními technikami se liší od materiálu získaného proteolytickým štěpením v tom, že neobsahují kontaminující intaktní molekuly protilátek. Materiál produkovaný rekombinantními technikami

může mít rovněž vyšší vazebnou afinitu k antigenu CEA, jak je možné stanovit pomocí zařízení Pharmacia Biacore™.

Další stránka vynálezu se týká postupu sloužícího k přípravě první složky, jak je zde definována, spojením:

části zodpovědné za nasměrování, která je schopná vázat se na antigen asociovaný s nádorem a

enzymu schopného přeměny neaktivního prekursoru účinné látky na antineoplasticky účinnou látku, přičemž tento enzym je mutovaná forma enzymu hostitele. Mutovaný enzym a část zodpovědná za nasměrování mohou být spojeny pomocí konvenčních metod jako například použitím heterobifunkčních činidel. Uvažuje se rovněž o fúzi genů.

Mutovaný enzym a část zodpovědná za nasměrování mohou být připraveny pomocí v současnosti dobře známých technik exprese proteinů. U některých expresivních systémů je nutná transformace hostitelské buňky vektorem; takovými, v současnosti dobře známými systémy, jsou například *E. coli*, kvasinky a hostitelské savčí buňky (viz. *Methods in Enzymology* 185, Academic Press 1990). Jsou rovněž zvažovány i jiné expresivní systémy, jako například transgenní savci (ne lidé). V těchto expresivních systémech je požadovaný gen, který je ve výhodném provedení vyštěpen z vektoru, ale který je vybaven savčím promotorem řídícím sekreci exprimovaného proteinu do mléka živočicha, zaveden do pronukleu savčí zygoty (obvykle pomocí mikroinjekce do jednoho ze dvou jader (obvykle samčího jádra) nacházejících se v pronukleu) a poté implantován do organismu náhradní matky. Část zvířat zplozených náhradní matkou bude nést a exprimovat cizorodý gen, který se integroval do chromozomu. Integrovaný gen je obvykle předán další generaci při konvenční reprodukci a je tudíž umožněn růst chovu. Ve výhodném provedení vynálezu je požadovaný protein jednoduše

odvozenými od ES buněk a gametami odvozenými od buněk blastocysty. Polovina gamet odvozených od ES buněk bude nést modifikovaný gen. Mláďata jsou testována (například pomocí metody Southern blot) za účelem identifikace jedinců nesoucích modifikovaný gen (přibližně 50% potomstva). Takto vybraní jedinci budou heterozygoti a mohou být tedy kříženi s jiným heterozygotem a z jejich potomstva mohou být následně vyselektováni homozygotní jedinci (přibližně 25% populace). Transgenní zvířata nesoucí knock-out gen mohou být křížena s transgenními zvířaty získanými pomocí známých technik jakými jsou například mikroinjekce DNA do pronukleů, fúze sféroplastů (Jakobovits a další, Nature 362: 255 až 258, 1993) nebo transfekce ES buněk zprostředkovaná lipidy (Lamb a další, Nature Genetics 5: 22 až 29, 1993). Výsledkem tohoto křížení jsou transgenní zvířata s knock-outovaným endogenním genem, který je nahrazen cizorodým genem.

ES buňky nesoucí cíleně "roztržený" gen mohou být dále modifikovány pomocí transformace prostřednictvím sekvence cílového genu, která obsahuje specifické změny. Tato sekvence je ve výhodném provedení zaklonována do vektoru a před vlastní transformací je tento vektor linearizován. Po homologní rekombinaci je pozměněný gen začleněn do genomu. Tyto embryonální kmenové buňky mohou být následně použity k vytvoření transgenních živočichů postupem popsaným výše.

V tomto kontextu označuje termín "hostitelská buňka" jakoukoliv prokaryotickou nebo eukaryotickou buňku vhodnou pro expresi proteinů. Takovými buňkami jsou například bakterie, kvasinky, rostlinné buňky a savčí (ne lidské) zygoty, oocyty, blastocysty, embryonální kmenové buňky a jakékoliv jiné buňky vhodné k transgenním experimentům. Je-li to z kontextu možné, pak termín "hostitelská buňka" zahrnuje rovněž transgenní rostliny nebo savce (ne lidi),

kteří se vyvinuli z transformovaných savčích (ne lidských) zygot, oocytů, blastocyst, embryonálních kmenových buněk a jakýchkoliv jiných buněk vhodných k transgenním experimentům.

Další stránka vynálezu popisuje polynukleotidovou sekvenci vybranou z polynukleotidové sekvence kódující:

jakoukoliv první složku, jak je definována výše; a

jakýkoliv mutovaný enzym, jak je definován výše.

Vynález se dále týká vektoru obsahujícího polynukleotid, jak je definován výše.

Vynález se dále týká buňky obsahující polynukleotid, jak je definován výše.

Příklady provedení vynálezu

Nejprve budou stručně popsány jednotlivé obrázky.

Obrázek 1 znázorňuje přípravu plazmidu pQR177. Symbol A označuje gen pro pre-RNázu, symbol B gen pro pre-RNázu K66E, v kroku 1 byla provedena RCPCR (rekombinantní kruhová PCR), v kroku 2 štěpení pomocí enzymu EcoRI, izolace malého fragmentu, ligace do plazmidu pKK223.3 a zjištěna orientace plazmidu pomocí štěpení enzymem PstI

Obrázek 2 znázorňuje purifikaci bovinní ribonukleázy. Čistota rekombinantní RNázy byla stanovena na 16% polyakrylamidovém gelu s 0,1% SDS barveném stříbrem. Dráhy A a G odpovídají komerčně dostupné RNáze ($M_r = 13700$). V drahách C až E jsou kladně nabitě proteiny získané izokratickou elucí z periplazmatického extraktu z bakteriálních kultur *Escherichia coli* (pQR163) indukovaných rozdílnými koncentracemi IPTG (0,5, 2 a 0 mM IPTG). Dráha F odpovídá drahám C až E, ale jako bakteriální kultura byly použity buňky *Escherichia coli* (pKK223.3) (kontrola). Dráha

B, purifikovaná rekombinantní RNáza po ionexové chromatografii.

Obrázek 3 znázorňuje PCR strategii vedoucí k vytvoření plazmidu pATF4. Primery 3 až 6 jsou použity v PCR reakci, při níž (a) jsou inkorporovány bovinní signální sekvence spolu s kódující sekvencí pro hexapeptid na 5' konci genu lidské pankreatické ribonukleázy a (b) kódující sekvence pro alespoň sedm aminokyselin enzymu HP-RNázy spolu s terminačním kodónem. Primery 5 a 6 rovněž obsahují restrikční místa pro EcoRI. Symbol A označuje gen pro pre-RNázu, symbol B gen pro pre-RNázu R4A:K6A. V kroku 1 byla provedena PCR. Jako templát byl použita sekvence pro lidskou pankreatickou maturovanou RNázu vzniklá PCR reakcí z lidské genomové DNA. Dále bylo provedeno štěpení enzymem EcoRI. Vzniklý fragment byl nalogován do plazmidu pUC18. V krocích 2 a 4 bylo provedeno štěpení enzymem EcoRI a následná ligace do plazmidu pKK223.3. V kroku 3 byla provedena cílená mutageneze pomocí RCPCR. Na pozici 4 a 6 genu pro HP-RNázu byly zavedeny kodóny pro alanin.

Obrázek 4 znázorňuje stanovení čistoty exprimované lidské pankreatické RNázy R4A:K6A pomocí PAGE. Dráhy A a F, 2 μ g RNázy A; dráhy B a C, rozdílná množství kladně nabitých proteinů získaných izokratickou elucí z periplazmatického prostoru buněk *E. coli* nesoucích plazmid pATF4; dráhy D a E, 1 μ g a 500 ng purifikované HP-RNázy.

Obrázek 5 znázorňuje tvorbu pATFZ44 metodou rekombinantní kruhové PCR

Obrázek 6 znázorňuje srovnání toxicity neaktivního prekurzoru účinné látky a toxicity odpovídající účinné látky na buňkách LoVo. Cytotoxicita byla vyhodnocována pomocí barvení SRB. Křivka A platí pro neaktivní prekurzor účinné látky a křivka B pak odpovídající fenolickou účinnou

látku. Na ose x je koncentrace látek v μM a na ose y procento přeživších buněk.

Obrázek 7 znázorňuje schéma syntézy neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od uracilu

Obrázek 8 znázorňuje oligonukleotidové primery použité:

- I) v RCPCR pro vložení mutace K66E do genu pro RNázu, tučná písmena vyznačují mutovanou pozici
- II) pro izolaci genu HP-RNázy a konstrukci chimerického genu exprimovaného v E.coli
- III) v RCPCR pro vložení mutace R4A:K6A do genu pro RNázu, tučná písmena vyznačují mutovanou pozici

Obrázek 9 znázorňuje schéma syntézy analogu neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od uracilu

Obrázek 10 znázorňuje schéma syntézy analogu neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od cytidinu

Obrázek 11 znázorňuje chemické vzorce, jako R1 může být I)uracil, II)cytosin

Obrázek 12 je schématickým diagramem komplexu aktivního místa ribonukleázy A se substrátem. Písmena B, R a P označují vazebná (pod)místa pro bázi (B), ribózu (R) a fosfát (P). Místo B_1 je specifické pro pyrimidinové nukleotidy a místo B_2 "upřednostňuje" purinové nukleotidy. 3' - pyrimidinové mononukleotidy se vážou do $B_1R_1P_1$. 5' - purinové mononukleotidy se vážou do místa $B_2R_2P_1$. 3' - AMP se váže do místa $B_2R_2P_2$. Fosfátová skupina uvolněná hydrolýzou fosfodiesterové vazby působením enzymu se váže do místa P_1 . Aminokyselinové zbytky, které se účastní zmíněných vazeb v jednotlivých místech jsou naznačeny.

Obrázek 13 je schématickým diagramem neaktivního prekursoru účinné látky v aktivním místě mutantního enzymu s převrácenou polaritou, kde:

* reprezentuje aminokyselinový zbytek s převrácenou polaritou (Lys 66 v nativní ribonukleáze) a;

X je kladně nabitá skupina (připojená prostřednictvím aminokyselinového zbytku s převrácenou polaritou

Obrázek 14 znázorňuje štěpení neaktivního prekursoru účinné látky činností mutantního enzymu. Symbol A vyznačuje neaktivní prekursor účinné látky, symbol B pak vlastní toxin.

Obrázek 15 demonstruje mechanismus činnosti nativní lidské RNázy. Sloučenina 1 je ester pyrimidin nukleosid 3' fosfátu, sloučenina 2 je 2',3'-cyklickým pyrimidin nukleosid fosfátem a sloučenina 3 je pyrimidin nukleosid 3' fosfát.

Obrázek 16 znázorňuje strukturu substrátů CpA a C>p RNázy

Obrázek 17 znázorňuje schéma syntézy neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od cytosinu podle publikace Christensen and Broom (1972), J. Org. Chem. 37, 3398-3401.

Obrázek 18 ilustruje klonování lidské pankreatické karboxypeptidázy B (HCPB)

Obrázek 19 ilustruje sekvenování pankreatické HCPB. Všech 6 klonů mělo identickou sekvenci a v aktivním místě místě aspartát, který je řadí mezi karboxypeptidázy B (místo I) a vložený kodón TGC mění sekvenci z GSSIG NA GSSCIG (místo II)

Obrázek 20 znázorňuje vektor pICI1266

Obrázek 21 znázorňuje klonování genu do expresivního vektoru pICI1266

Obrázek 22 ilustruje cytotoxicitu neaktivního prekurzoru účinné látky a odpovídající účinné látky v lidských kolorektálních nádorových buňkách LoVo. Křivka A odpovídá prekurzoru účinné látky založenému na kyselině glutamové, křivka B pak odpovídá vlastní účinné látce fenol-mustard. Na ose x je koncentrace látek v μM a na ose y procento přeživších buněk.

Obrázek 23 je seznamem složek růstového média

Obrázek 24 je diagramem reprezentujícím klíčové interakce mezi aminokyselinami nativní ribonukleázy a fragmentem ribonukleové kyseliny. Pozitivně nabitý Lys 66 v pozici P_0 je zobrazen při iontové interakci se záporně nabitou fosfodiesterovou vazbou, zatímco aminokyselinové zbytky v pozici P_1 jsou důležité pro katalytický proces.

Obrázek 25 znázorňuje interakci mezi mustard-neaktivním prekurzorem účinné látky a mutantní RNázou. Aby bylo zabráněno přeměně působením nativní RNázy, je klíčová aminokyselina na pozici 66 změněna na záporně nabitou kyselinu glutamovou. Tato Glu-66 se účastní iontové interakce s kladně nabitým zbytkem "X" nacházejícím se v neaktivním prekurzoru účinné látky a uskutečňuje tudíž interakci s převrácenou polaritou. Přepokládáme, že další mutace v pozicích R_2 a B_2 by mohly vést k silnější interakci s neaktivním prekurzorem účinné látky.

Obrázek 26 znázorňuje dvě možnosti použitelné jako kladně nabitě skupiny v pozici 5' ribózy, které by měly vliv na interakci s Glu-66 na pozici P_0 .

Obrázky 27 až 33 znázorňují postupy chemické syntézy.

Použité zkratky

Ac	acetyl
ADEPT	léčba využívající enzymu cíleného prostřednictvím protilátek, jehož substrátem je neaktivní forma účinné látky (antibody directed enzyme prodrug therapy)
BOC	terc-butoxykarbonyl
BP-RNáza	bovinní pankreatická ribonukleáza
DCCI	1, 3-dicyklohexylkarbodiimid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	N, N-dimethyl-formamid
	DMSO dimethylsulfoxid
Et	ethyl
EDCI	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl-karbodiimid
HCPB	lidská CPB (human CPB)
HOBT	1-hydroxybenzotriazol
HP-RNáza	lidská pankreatická ribonukleáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran

Referenční příklad 1

Příprava rekombinantní maturované boviní pankreatické ribonukleázy

Rekombinantní boviní pankreatická ribonukleáza byla připravena z kódující sekvence pro prekurzor boviní pankreatické ribonukleázy (BP-RNáza) způsobem popsaným v Tarragona-Fiol a další, Gene 118, 239 až 245, 1992. Protein byl exprimován z dvojcistronního expresivního fragmentu zaklonovaného v pQR163 v E. coli a exprese byla řízena promotorem tac. Plazmid obsahující dvojcistronní fragment byl označen pQR162 (NCIMB 40678).

Referenční příklad 2:

Příprava lidské pankreatické ribonukleázy Arg4Ala, Lys6Ala

Kódující sekvence genu lidské pankreatické ribonukleázy (HP-RNáza) byla získána z genomové DNA extrahované z lidských lícních epitheliálních buněk použitím techniky PCR způsobem popsáným v v Tarragona-Fiol a další, Protein and Peptide Letters 1, 76 až 83, 1994. Co se týká přípravy HP-RNázy, je popsána exprese geneticky modifikované HP-RNázy v E. coli. Proto, aby byl rekombinantní lidský pankreatický enzym po expresi směřován do periplazmatického prostoru E. coli, byla k 5' konci lidského genu připojena signální sekvence bovinní pankreatické RNázy. Počáteční pokusy exprimovat rekombinantní enzym nebyly úspěšné. Proto byly, za účelem umožnění exprese v E. coli, použity techniky místně specifické mutageneze, s jejichž pomocí byl pozměněn gen pro HP-RNázu. Výsledný, metodami genového inženýrství pozměněný enzym, vykazuje podobné kinetické charakteristiky jako homologní bovinní enzym.

(a) Klonování maturované kódující sekvence RNázy Arg4Ala, Lys6Ala

Štěpení restrikcčními enzymy, defosforylace, ligace, transformace a minipreparace plazmidové DNA byly prováděny způsoby popsány v Maniatis a další, 1982, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, Laboratory, Cold Spring Harbour, New York. Oligonukleotidy byly syntetizovány pomocí syntetizéru DNA Cyclone™.

Maturovaná sekvence genu HP-RNázy byla získána z genomové DNA extrahované z lidských lícních epitheliálních buněk použitím techniky PCR. Stručně řečeno, epitheliální buňky byly získány energickým protřepáváním 10 ml 0,9% fyziologického roztoku v ústech po dobu 20 sekund. Suspenze lícních epitheliálních buněk (1,5 ml) byla zcentrifugována

a peleta byla rozsuspendována ve 100 μ l 10 mM NaCl a 10 mM EDTA. Po druhé centrifugaci byla buněčná peleta rozsuspendována v 75 μ l 20 mM NaOH a inkubována při 100°C po dobu 30 minut. Buněčný odpad byl odstraněn centrifugací a supernatant byl skladován při -20°C. Pro PCR inkubace byly jako templát standardně používány alikvoty 2 až 3 μ l. Pro PCR inkubaci byly použity dva primery (SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 6; viz. Obrázek 8, primery 1 a 2) komplementární k 5' a k 3' koncům maturované sekvence HP-RNázy (5 pmol jednotlivého primeru/inkubace). Inkubační směs pro PCR dále obsahovala: lidskou genomovou DNA, 0,2 mM dNTP, 1x pufr Stratagene™ (10x pufr má složení - 200 mM Tris-HCl (pH 8,2), 100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂, 1% Triton™ X-100 a 100 μ g/ml BSA bez přítomnosti nukleázy) a 2,5 jednotek polymerázy pfu (Stratagene). PCR reakce byla prováděna ve 30 cyklech. Každý cyklus sestával z denaturace při 92°C po dobu 30 sekund, spojování denaturovaných vláken DNA při 55°C po dobu 30 sekund a extenze při 75°C po dobu 1 minuty. Výsledné produkty PCR reakce byly analyzovány a separovány elektroforézou na agarovém gelu. Požadované fragmenty DNA byly vyříznuty z agarózového gelu a DNA byla extrahována za použití centrifugačních jednotek (Spin-X™, Costar). Proto, aby byl kompletní rekombinantní enzym po expresi směrován do periplazmatického prostoru buněk Escherichia coli JM107, byla za použití technik PCR k 5' konci lidského genu připojena signální sekvence bovinní pankreatické RNázy a ke 3' konci byla připojena spolu s terminačním kodónem rovněž kódující sekvence pro posledních sedm aminokyselin HP-RNázy. Následně byla připravena reakce PCR, kde reakční směs obsahovala jako templát maturovanou sekvenci genu HP-RNázy připravenou pomocí PCR, která postrádá kódující sekvenci pro posledních sedm aminokyselin, sadu vzájemně se překrývajících primerů (SEQ ID NO: 7 až 10; viz. primery 3 až 6 na Obrázku 8) v rozdílných koncentracích (0,1, 0,5 a 50 pmol od vnitřního

ke vnějššímu primeru) 0,2 mM nukleotidy, 1x pufr Stratagene (viz. výše) a 2,5 jednotek polymerázy pfu (Stratagene). Reakce byla prováděna za stejných podmínek jak jsou popsány výše. Produkty PCR byly zpracovány postupem popsaným výše a požadovaný fragment byl vyříznut a extrahován z agarózového gelu. Tento fragment byl rozštěpen pomocí EcoRI a zaligován do předem rozštěpeného a defosforylovaného plazmidu pUC18, aby bylo možné provést sekvenování dvojvláknové DNA dideoxy metodou. Fúzní gen byl poté zaligován do expresivního vektoru pKK223.3; viz. Příklad 1. Bovinní signální sekvence tvořená sekvencí DNA kódující hexapeptid byla připojena na 5' konec otevřeného čtecího rámce. Této skutečnosti je využito k rozrušení sekundární struktury mRNA, která se vytvoří při iniciaci transkripce promotoru. Indukce, exprese a purifikace rekombinantního enzymu byla prováděna postupem popsaným výše. Analýza proteinů periplazmatického prostoru získaných tímto postupem ukázala, že v periplazmatickém prostoru se nevyskytuje žádný produkt, který by vykazoval aktivitu rekombinantní RNázy.

Skutečnost, že v těchto experimentech nedošlo k expresi lidského enzymu byla neočekávaná, protože boviní signální sekvence již byla s úspěchem použita k namíření translokace rekombinantního boviního enzymu do periplazmatického prostoru. Srovnání N-koncových sekvencí nativního lidského a boviního enzymu odhalilo rozdíly na pozicích 4 a 6, na nichž jsou alaniny přítomné v boviním enzymu nahrazeny argininem a lysinem v jeho lidském protějšku. Je známo, že přítomnost kladně nabitých aminokyselin někde blízko počátku maturované sekvence může fungovat jako stop signál, který zabrání další translokaci. Aby bylo možné překonat tento problém byla vyvinuta strategie, která vedla k náhradě lysinu a argininu na pozicích 4 a 6 v lidském enzymu alaninovými zbytky. K vytvoření rekombinantního klonu pATF3, který nese požadované substituce (viz. Obrázek 3), byla tudíž použita

technika RCPCR (primery použité k zavedení požadovaných mutací jsou označeny SEQ ID NO: 11 až 14; viz. primery E až H na Obrázku 8). Aby bylo možné potvrdit začlenění kódujících sekvencí pro alanin na pozicích 4 a 6, byl jako templát při sekvenování dvojvláknové DNA použit takto upravený chimérický plazmid. Výsledkem restriktivního štěpení a ligace do pKK223.3 byl vznik chimérického expresivního vektoru pATF4 (Obrázek 3), který byl použit k expresi.

(b) Expese a purifikace rekombinantní RNázy Arg4Ala, Lys6Ala z *E. coli*

Výsledkem transformace buněk *Escherichia coli* plazmiem pATF4 a následná indukce pomocí IPTG byla expese geneticky upraveného lidského enzymu, který je izolován z periplazmatického prostoru s využitím protokolů popsanych v předchozím textu používaných k produkci homologního bovinního enzymu. Geneticky upravená rekombinantní RNáza byla ze směsi přítomné v periplazmatickém prostoru izolována a vyčištěna do homogenity (viz. Obrázek 4). Bylo provedeno sekvenování N-konce rekombinantního enzymu, které potvrdilo, že bovinní signální sekvence byla odštěpena správně. Tato skutečnost rovněž potvrdila, že došlo k záměně alaninových zbytků za Arg-4 a Lys-6.

Za použití substrátů CpA a C>p (obrázek 16) byla provedena charakterizace kinetických parametrů. Kinetické parametry K_m , k_{cat} a k_{cat}/K_m byly srovnány s hodnotami získanými pro komerčně dostupnou a rekombinantní bovinní pankreatickou RNázu při stejných podmínkách měření (viz. Tabulky). Získaná data naznačují, že kinetické vlastnosti geneticky modifikované RNázy se podstatně neliší od kinetických vlastností jejího homologního bovinního protějšku.

Kinetické parametry různých enzymů při použití CpA jako substrátu při pH 7,0

	kcat/Km ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)
Rekomb. HP-RNáza R4A:K6A	1700 (480)
Rekomb. BP-RNáza	2800 (370)
BP-RNáza	2300 (600)

Kinetické parametry různých enzymů při použití C>p jako substrátu při pH 7,0

	kcat/Km ($\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$)
Rekomb. HP-RNáza R4A:K6A	4,2 (0,8)
Rekomb. BP-RNáza	3,9 (0,9)
BP-RNáza	2,3 (0,5)

Referenční příklad 3

Syntéza a izolace konjugátu myši A5B7-bovinní pankreatická ribonukleáza

Jednou z protilátek schopných vazby s některým antigenem asociovaných s nádorem je myši monoklonální protilátka A5B7. Protilátka A5B7 se váže na lidský karcinoembryonální antigen (CEA-carcinoembryonic antigen) a je zvláště vhodná k nasměrování konjugátu na kolorektální karcinom. A5B7 je možné získat od DAKO Ltd., 16 Manor Courtyard, Hughenden Avenue, High Wycombe, Bucks HP13 5RE, England, Spojené Království. Fragmenty protilátky mohou být připraveny z intaktní protilátky IgG pomocí konvenčních postupů. Například fragmenty $F(ab')_2$ mohou být připraveny postupem popsaným v Mariani, M. a další, Molecular Immunology 28, 69 až 77, 1991. Obecně lze říci, že konjugáty protilátka (nebo fragment protilátky)-enzym by

měly být alespoň divalentní, což znamená, že by měly být schopny vázat se alespoň ke dvěma antigenům asociovaným s nádorem (které mohou být totožné nebo rozdílné). Molekuly protilátky mohou být humanizovány pomocí známých postupů jako například "vkládáním CDR úseků (CDR grafting)" popsaným v EP 2394000 nebo připojením celých variabilních oblastí k lidským konstantním oblastem, které je popsáno v US 4816567. Humanizované protilátky mohou být užitečné ke snížení imunogenity dané protilátky (nebo fragmentu protilátky). Humanizovaná verze protilátky A5B7 byla popsána v PCT WO 92/01059.

Hybridomy produkující monoklonální protilátku A5B7 byly uloženy v European Collection of Animal Cell Cultures, Division of Biologics, PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Port Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Spojené Království. Hybridomy byly uloženy 14. července 1993 pod referenčním číslem No. 93071411. Protilátka A5B7 může být z uložených hybridomů získána pomocí standardních technik v současnosti dobře známých, jak jsou například popsány v Fenge C., Fraune E., a Schuegerl K., v "Production of Biologicals from Animal Cells in Culture" (Spier R. E., Griffiths J. R. a Meignier B., eds), Butterworth-Heinemann, 1991, 262 až 265; a Anderson B. L. a Gruenberg M. L. v "Comercial Production of Monoclonal Antibodies" (Seaver S., ed.), Marcel Dekker, 1987, 175 až 195. Buňky mohou čas od času vyžadovat "překlonování" prováděné limitním zředěním, aby byla udržena vysoká hladina produkce protilátek.

Linkerem použitým při derivatizaci myší A5B7 byl SATA™ (ester N-hydroxysukciimidu s kyselinou S-acetylthioglykolovou), Sigma (kód výrobku A9043).

Linkerem použitým při derivatizaci bovinní pankreatické ribonukleázy (BP-RNáza) byl SMPB (ester

01.10.97

N-hydroxysukciimidu s kyselinou 4-(p-maleinimidofenyl) butanovou), Sigma (kat. č. M6139).

SATA (Sigma) byl rozpuštěn v DMSO (Fisons) na výslednou koncentraci 10 mg/ml. K roztoku 50 mg A5B7 o koncentraci 5,4 mg/ml v pufru tvořeném 100 mM fosforečnanem/100 mM NaCl/1 mM EDTA, pH 7,2 (pufr A) bylo přidáno 309 μ g (30,9 μ l) roztoku SATA (což odpovídá čtyřnásobnému molárnímu nadbytku oproti A5B7). Směs byla zamíchána a ponechána po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Za účelem odstranění nadbytku reakčních činidel byl výsledný roztok při pokojové teplotě aplikován na kolonu Sephadexu™ G25 (Pharmacia) (210 ml, 2,6 x 38 cm). Výsledná koncentrace derivatizované A5B7 po průchodu kolonou byla 2,09 mg/ml (celkový objem 23,5 ml). A5B7 derivatizovaná SATA byla smíchána s 1,0 ml 10% v/v 500 mM hydroxylaminu HCl/500 mM fosforečnanu sodného/30 mM EDTA, pH 8,0 za účelem deacetylce derivatizované A5B7. Tato reakce probíhala po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Koncentrace proteinu byla stanovena měřením absorpance v UV oblasti při 280 nm při předpokládaném koeficientu $e=1,4$ (nebo stanovením koncentrace proteinů podle Bradfordové). Množství navázaného linkeru bylo určeno stanovením -SH skupin podle Ellmanse a byla zjištěna přítomnost 1,2 linkeru/mol A5B7.

BP-RNáza (Sigma) byla rozsuspendována v 6,0 ml 100 mM fosforečnanu sodného/100 mM NaCl, pH 7,2 (pufr B) na výslednou koncentraci 8,33 mg/ml.

SMPB (Sigma) byl rozpuštěn v DMSO (Fisons) na výslednou koncentraci 10 mg/ml. Roztok 50 mg BP-RNázy byl smíchán s 6500 mg (650 ml) roztoku SMPB (což odpovídá pětinašobnému molárnímu nadbytku oproti BP-RNáze) a směs byla ponechána po dobu 120 minut při pokojové teplotě. Nadbytek reakčních činidel byl odstraněn pomocí gelové chromatografie (Sephadexu™ G25, 210 ml, 2,6 x 30 cm).

Koncentrace derivatizovaného proteinu byla stanovena měřením absorbance v UV oblasti při 280 nm při předpokládaném koeficientu $e=0,6$. Množství navázaného linkeru bylo stanoveno "reverzním" Ellmansovým stanovením, kdy bylo k BP-RNáze derivatizované SMPB přidáno známé množství 2-merkptoethanolu a měřeno bylo množství nezreagovaných -SH skupin.

Konjugační reakce byla provedena smícháním stejných váhových množství deacetylované derivatizované A5B7 a derivatizované BP-RNázy, zředěním směsi v deionizované vodě na výslednou koncentraci 1,0 mg/ml a mícháním pod proudem dusíku. Reakce probíhala po dobu 20 hodin při pokojové teplotě a byla ukončena přidávkem 1 mg/ml glycinu.

Surový konjugát byl dialyzován proti 50 mM fosfátu, pH 8,0 (pufr C) a získaný roztok byl nanesen na kolonu Q Sepharózy™ (Pharmacia) (30 ml 1,6 x 15 cm) předem ekvilibrované v pufru C. Za účelem odstranění nadbytku A5B7 a BP-RNázy byla kolona promyta pufr C a následně eluce konjugátu bylo dosaženo promytím kolony 0,5 M NaCl o průtoku 1 ml/min.

Čistota výsledného konjugátu byla stanovena pomocí SDS-PAGE a celkové množství konjugátu bylo stanoveno na 5,75 mg, přičemž pomocí laserové densitometrie bylo ukázáno, že zmíněné množství se skládá z 88,4% konjugátu a 11,6% volné derivatizované A5B7.

Referenční příklad 4

Syntéza a izolace konjugátu myší A5B7 F(ab')₂-bovinní pankreatická ribonukleáza

Linkerem použitým při derivatizaci A5B7 byl SATA™ (ester N-hydroxysukciimidu s kyselinou S-acetylthioglykolovou), Sigma (kód výrobku A9043).

01.10.97

Linkerem použitým při derivatizaci bovinní pankreatické ribonukleázy (BP-RNáza) byl SMPB (ester N-hydroxysukciimidu s kyselinou 4-(p-maleinimidofenyl)-butanovou), Sigma (kód výrobku M6139).

SATA (Sigma) byl rozpuštěn v DMSO (Fisons) na výslednou koncentraci 10 mg/ml. K roztoku 18,20 mg fragmentu $F(ab')_2$ o koncentraci 2,14 mg/ml v pufru tvořeném 100 mM fosforečnanem/100 mM NaCl/1 mM EDTA, pH 7,2 (pufr A) bylo přidáno 167 μ g (16,7 μ l) roztoku SATA (což odpovídá čtyřnásobnému molárnímu nadbytku oproti A5B7 $F(ab')_2$). Směs byla zamíchána a ponechána po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Výsledný roztok byl s použitím membrány Amicon YM10™ (s "cut-off" MW= 100000) zakonzentrován na celkový objem 2 ml (9 mg/ml) a nadbytek reakčních činidel byl odstraněn chromatografií na koloně Sephadexu™ G25 (Pharmacia) (50 ml, 1,6 x 16 cm) při pokojové teplotě. Výsledná koncentrace derivatizovaného A5B7 $F(ab')_2$ po průchodu kolonou byla 1,04 mg/ml (celkový objem 10 ml). A5B7 $F(ab')_2$ derivatizovaný SATA byla smíchána s 1,0 ml 10% v/v pufru obsahujícího 500mM hydroxylamin HCl/500mM fosforečnan sodný/30 mM EDTA pH 8,0 za účelem deacetylace derivatizovaného A5B7 $F(ab')_2$. Tato reakce probíhala po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Koncentrace proteinu byla stanovována měřením absorbance v UV oblasti při 280 nm při předpokládaném koeficientu $e=1,4$ (nebo stanovením koncentrace proteinů podle Bradfordové). Množství navázaného linkeru bylo určeno stanovením -SH skupin podle Ellmanse a byla zjištěna přítomnost 1,2 linkeru/mol $F(ab')_2$.

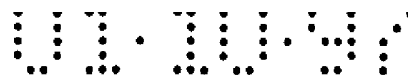
BP-RNáza (Sigma) byla rozsuspendována ve 2,0 ml 100 mM fosforečnanu sodného/100 mM NaCl, pH 7,2 (pufr B) na výslednou koncentraci 7,5 mg/ml.

SMPB (Sigma) byl rozpuštěn v DMSO (Fisons) na výslednou koncentraci 10 mg/ml. Roztok 15 mg BP-RNázy byl

smíchán s 1949 mg (1,95 ml) roztoku SMPB (což odpovídá pětinasobnému molárnímu nadbytku oproti BP-RNáze) a směs byla ponechána po dobu 120 minut při pokojové teplotě. Nadbytek reakčních činidel byl odstraněn pomocí gelové chromatografie (Sephadex™ G25, 50 ml, 1,6 x 16 cm). Koncentrace derivatizovaného proteinu byla stanovována měřením absorbance v UV oblasti při 280 nm při předpokládaném koeficientu $e=0,6$. Množství navázaného linkeru bylo stanoveno "reverzním" Ellmansovým stanovením, kdy bylo k BP-RNáze derivatizované SMPB přidáno známé množství 2-merkптоethanolu a měřeno bylo množství nezreagovaných -SH skupin.

Konjugační reakce byla provedena smícháním stejných váhových množství deacetylovaného derivatizovaného A5B7 F(ab')₂ a derivatizované BP-RNázy, zředěním směsi v deionizované vodě na výslednou koncentraci 1,0 mg/ml a mícháním pod proudem dusíku. Reakce probíhala po dobu 20 hodin při pokojové teplotě a byla ukončena přidávkem 1 mg/ml glycinu. Surový konjugát byl dialyzován proti 50 mM fosfátu, pH 8,0 (pufr C) a 5 ml (6,5 mg) získaného roztoku bylo nanášeno na kolonu Mono Q™ (HR5/5) (Pharmacia) předem ekvilibrovanou v pufru C. Za účelem odstranění nadbytku A5B7 F(ab')₂ byla kolona promyta pufr C. Následná eluce konjugátu a zbylé BP-RNázy probíhala při použití gradientu soli (0 až 1,0 M gradient o celkovém objemu 20-ti násobku objemu kolony) při průtoku 1 ml/min. Odstranění konjugátu od zbylého enzymu bylo dosaženo aplikací spojených frakcí obsahujících konjugát na kolonu S200™ GPC (Pharmacia) (60 ml, 1,6 x 30 cm) a promýváním v PBS o průtoku 1 ml/min.

Čistota výsledného konjugátu byla stanovena pomocí SDS-PAGE a celkové množství konjugátu bylo stanoveno na 0,70 mg, přičemž pomocí laserové densitometrie bylo ukázáno, že zmíněné množství se skládá z 95,5% konjugátu a 4,5% volného derivatizovaného A5B7 F(ab')₂.



Myší A5B7 F(ab'), byl připraven postupem popsáním v Referenčním příkladu 5 nebo s využitím následujícího postupu:

Protilátka A5B7, popsaná v Referenčním příkladu 3, (780 ml o koncentraci 5,4 mg/ml) byla ke štěpení upravena diafiltrací proti 7 objemům pufru o složení 0,1 M fosforečnan sodný, 3 mM EDTA (pH 6,4) za použití aparatury Amicon™ CH2 vybavené kolonkou se spirálově vinutou 130 kDa membránou. Získaný materiál (měřením absorbance při 280 nm bylo množství odhadnuto na 3682 mg) byl přefiltrován přes mikrobiální filtr 0,22 μm a uschován při 4°C až do doby použití. Suspenze krystalického papainu (9 ml o koncentraci 10 mg/ml; Boehringer Mannheim, kód výrobku 1080140) byla smíchána s pufrem o složení 0,1 M fosforečnan sodný, 3 mM EDTA (pH 6,4) obsahujícím 100 mM L-cystein a ponechána po dobu 30 minut při 37°C. Přebytek cysteinu byl odstraněn použitím vylučovací chromatografie (Pharmacia G25M™, průměr kolony 2,6 cm, délka kolony 30 cm, celkový objem přibližně 160 ml). Eluce byla prováděna pufrem o složení 0,1 M fosforečnan sodný, 3 mM EDTA (pH 6,4) při průtoku 3 ml/min. V jímáných frakcích (1 minuta) byla monitorována OD při 280nm a byl v nich rovněž prováděn jednoduchý DTNB spot test, aby bylo zajištěna nepřítomnost volného cysteinu před vlastním spojením jednotlivých frakcí redukováného papainu. Koncentrace redukováného papainu ve spojených frakcích byla stanovena (měřením OD280, předpokládaném e=2,5) na 1,65 mg/ml v objemu 2,8 ml. Celkové množství proteinu bylo tedy 54 mg. Štěpení bylo prováděno při 37°C při poměru redukováný papain ku A5B7 odpovídajícímu 1/60 w/w. Byl použit všechen dostupný papain a 665 ml protilátky (před počátkem štěpení přehřáté na 37°C) o koncentraci proteinu odhadnuté na 4,9 mg/ml. Reakce byla ukončena po 20 hodinách přidávkem 100 mM N-ethylmaleimidu v 50% ethanolu o objemu 0,1-násobku celkového reakčního objemu. F(ab'), byly od Fc a stop nerozštěpených protilátek odstraněny za použití

kolony Protein A Sepharose FF™ (Pharmacia) (400 ml, rozměry 5 cm x 20 cm) ekvilibrované pufrém o složení 25 mM fosforečnan sodný a 150 mM chlorid sodný (pH 7,33) až do doby, kdy pH a vodivost odpovídaly hodnotám ekvilibračního pufru (19,7 mS při 15°C). Reakční směs (po skončení štěpení papainem) byla zředěna v poměru 1:1 ekvilibračním pufrém a rozdělena na dvě části (660 ml a 840 ml) a každá z těchto částí byla aplikována na kolonu Protein A při průtoku 6,5 ml/min (lineární rychlost průtoku 0,33 ml/cm²/min). Celkem bylo sebráno 10 frakcí. Nasycená kolona byla promývána ekvilibračním pufrém až do chvíle, kdy hodnota absorbance při 280 nm dosáhla základní linie. První promytí bylo provedeno 50 mM octanem sodným (pH 4,5), dále pak byl jako eluční pufr použit 50 mM octan sodný (pH 4,0), následovala eluce 50 mM kyselinou citrónovou (pH 3,5) a poslední promytí bylo provedeno 50 mM kyselinou citrónovou (pH 2,8). Během promývání byly v jímáných frakcích měřeny hodnoty OD₂₈₀ a spojené frakce byly poté do 30 minut neutralizovány za použití roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (0,4 M). Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Pharmacia Excel™ gel, barveno Coomassie). F(ab')₂ byly eluovány pufrém o pH 4,0 a nerozštěpená A5B7 byla eluována při promývání pufru o nejnižším pH. Spojené frakce obsahující F(ab')₂ byly diafiltrací převedeny do pufru o složení 100 mM fosforečnan sodný, 100 mM chlorid sodný, 1 mM EDTA (pH 7,2) (Amicon™ CH2 membrána 30kDa, 7 násobný objem) a výsledkem bylo celkové množství 845 mg F(ab')₂ (2 mg/ml).

Referenční příklad 5

Příprava rekombinantního myšího A5B7 F(ab')₂ v myelomech.

Tento příklad popisuje přípravu cDNA z hybridomů A5B7, izolaci příslušných fragmentů Fd a L řetězců pomocí PCR, stanovení kompletní sekvence DNA u těchto fragmentů, následnou koexpresi v myelomech za účelem produkce



rekombinantních fragmentů $F(ab')_2$, pěstování myelomů a purifikaci rekombinantního proteinu $F(ab')_2$.

V literatuře je popsáno několik postupů sloužících k produkci geneticky upravených protilátek v myelomech; například Neuberger a další, *Nature* 312, 604 až 608, 1984; Williams a Neuberger, *Gene* 43, 319 až 324, 1986; Wright a Shin, *Methods* 2, 125 až 135, 1991; Traunecker, *Trends in Biotechnology* 9, 109 až 113, 1991 a Bebbington a další, *Bio/technology* 10, 169 až 175, 1992. V tomto příkladu je v podstatě používám postup popsáný v práci Bebbington a další, kde je jako selekční marker použita glutamin syntetáza.

a) Příprava mRNA z hybridomů

Existuje několik postupů sloužících k izolaci polyadenylované (polyA+) mRNA z eukaryotických buněk (Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, Kapitola 8, strana 3 - dále je tento manuál označován jako Maniatis). Jedna z těchto metod je založena využití kitu firmy Pharmacia a její podstatou je lýza relativně malého počtu buněk (10^7 nebo méně) a následné navázání polyA+ mRNA na kolonu oligodT. Nežádoucí buněčné komponenty jsou, před vlastní elucí mRNA prováděné při zvýšené teplotě pomocí roztoku o vysoké koncentraci solí, odstraněny promytím kolony puftrem o nízké koncentraci solí.

mRNA byla získána z 10^7 hybridomů A5B7 za použití kitu pro izolaci mRNA Quickprep™ (Pharmacia Biotechnology Ltd.). Koncentrace mRNA byla odhadnuta proměřením vzorku při 300 až 220 nm na spektrofotometru Uvikon 930 (Kontron™ Instruments) a použitím faktoru $40 \mu\text{g/ml/jednotka OD}$ při 260 nm. mRNA byla skladována po precipitaci ethanolem ve $2,5 \mu\text{g}$ alikvotech.



b) syntéza cDNA

Metoda použitá pro syntézu cDNA vycházela z postupu popsaného Gublerem a Hofmanem, který spočívá v reverzní transkripci mRNA s navázanými primery, po níž následuje působení RNázou H, které poskytne primery potřebné k následné syntéze druhého řetězce DNA prováděné polymerázou I. Další metody syntézy cDNA jsou popsány v Maniatis (Kapitola 8).

K 5 μg vzorku mRNA byly přidány oligodT primery (směs 12-ti až 18-ti merů, Pharmacia Biotechnology Ltd., 0,5 μg) v 10 μl roztoku obsahujícím 2,5 jednotek placentárního inhibitoru RNAzy (Life Technologies Ltd.) doplněného na výsledný objem vodou bez přítomnosti RNAzy. Tato směs byla inkubována při 70°C a následně ochlazená na ledu. Poté byla zahájena syntéza prvního řetězce cDNA přidáním 4 μl 5x pufru H-RT (250 mM Tris, pH 8,3, 200 mM KCl, 30 mM MgCl₂, a 0,5 mg/ml BSA), 2 μl 0,1 M DTT (dithiothreitol), 1 μl směsi dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP o koncentracích 20 mM), 4 μl reverzní transkriptázy Superscript™ (Life Technologies Ltd.) a celá směs byla inkubována při 42°C po dobu 1 hodiny. Za účelem syntézy druhého řetězce bylo ke směsi přidáno 1,5 μl směsi dNTP (stejně složení jako je uvedeno výše), 92,5 μl vody bez přítomnosti RNAzy, 30 μl 5x reakčního pufru (125 mM Tris, pH 7,5, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄ a 0,5mg/ml β -NAD), 1 μl T4 DNA ligázy (10 jednotek, Life Technologies Ltd.), 4 μl DNA polymerázy I (40 jednotek, Life Technologies Ltd.) a 1 μl RNAzy H (2,7 jednotek, Life Technologies Ltd.) a inkubace pokračovala při 16°C další 2 hodiny. Aby bylo zajištěno, že koncovým produktem bude cDNA s tupými konci, byla reakce po přidání 2 μl T4 DNA polymerázy (10 jednotek, Life Technologies Ltd.) ponechána probíhat při 16°C dalších 5 minut. Aktivita enzymů byla poté zainhibována inkubací při 70°C po dobu 10 minut.

c) Izolace částí genů kódujících protilátku pomocí PCR

Při izolaci fragmentů Fd a řetězců L protilátky A5B7 pomocí PCR byla jako templát použita cDNA. Fragment Fd byl ukončen ihned za sekvencí pantové oblasti (C-koncový threonin) a tento fragment bude dále nazýván Fd proteolytického typu. Termínem proteolytický Fd rozumíme v tomto příkladu skutečnost, že rekombinantní Fd je ekvivalentní fragmentu Fd připravenému proteolytickým štěpením postupem popsaným v Referenčním příkladu 4.

Jako templát je vhodný materiál získaný z reakce, při níž byl syntetizován první řetězec DNA nebo materiál získaný z reakce, při níž byl dosyntetizován druhý řetězec. Materiál může být použit přímo z ukončené reakce nebo může být zředěn (až 1 díl materiálu na 100 dílů vody) v redestilované vodě. K produkci fragmentů Fd a řetězců L byly použity oligonukleotidy (SEQ ID NOs: 17 až 24). Pro každý fragment protilátky kódoval oligonukleotid vymezející 5' konec (SEQ ID NO: 17 pro fragment Fd a SEQ ID NO: 18 pro fragment L) restriční místa (HindIII pro Fd a EcoRI pro L), konvenční Kozákovu sekvenci (GCCGCCACC), která maximalizuje iniciaci translace, a část přirozeně se vyskytující myší signální sekvence. Oligonukleotid vymezející 3' konec fragmentu Fd proteolytického typu (SEQ ID NO: 19) byl komplementární ke 3' konci kódujícímu pantovou oblast protilátky, kódoval mutace, které zaváděly dva tandemové terminační kodóny translace (TAG a TAA) v místě hned za pantem, a za touto sekvencí obsahoval restriční místo pro EcoRI. 3' konec řetězce L byl vymezen oligonukleotidem (SEQ ID NO: 20) komplementárním ke konci kódující oblasti, který do sekvence zaváděl další terminační kodón translace (TAA) a restriční místo pro EcoRI. Navíc k zavedení neaktivních mutací do každého řetězce DNA, které vedly k odstranění restričních míst BamHI z domény CH1 fragmentu Fd a domény VL řetězce L aniž



by došlo ke změně v kódované aminokyselinové sekvenci, byly pro každý fragment použity dvojice částečně se překrývající a komplementárních oligonukleotidů (SEQ ID NO: 21 a 22 pro fragment Fd a SEQ ID NO: 23 a 24 pro řetězec L). Každý z oligonukleotidů vymežujících 5' a 3' konce fragmentů byl použit v kombinaci s odpovídajícím oligonukleotidem sloužícím k zavedení neaktivní mutace a výsledkem pak je produkce 2 mutovaných fragmentů každého řetězce protilátky. Po purifikaci byly oba fragmenty smíchány v ekvivalentních množstvích a použity jako templáty pro druhou PCR reakci při níž byly použity odpovídající oligonukleotidy vymežující 3' a 5' koncovou oblast. Výsledkem těchto reakcí byly fragment Fd a fragment řetězce L o odpovídající velikosti, ale bez restričních míst BamHI uvnitř sekvence.

Obvykle bylo do 100 μ l reakční směsi obsahující 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 0,1% želatinu, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP, 1 μ M každého z odpovídající dvojice oligonukleotidů a 2,5 jednotek Taq DNA polymerázy (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus) přidáno 5 μ l cDNA. Reakční směs byla převrstvena 100 μ l minerálního oleje a inkubována 1,5 minut při 94°C, 1 minutu při 50 nebo 55°C a 2,0 minuty při 72°C celkem v 25 cyklech a navíc pak byla ještě inkubována 10 minut při 72°C. Byla rovněž prováděna kontrolní reakce bez DNA.

PCR reakce byly analyzovány elektroforézou 5 μ l vzorku z každé reakce na 0,8% agarózovém gelu (Sigma Chemical Company Ltd.) s následným barvením roztokem ethidium bromidu o koncentraci 1 μ g/ml (BDH Laboratory Supplies) a vizualizací DNA pomocí UV transiluminátoru. Ve všech PCR reakcích, ve kterých byla přítomna cDNA A5B7, byly patrné pásy odpovídající velikosti, což naznačuje úspěšnou amplifikaci fragmentů Fd a L řetězců. Nepřítomnost

pásky DNA v kontrolní reakci znamenala, že použitá reakční činidla neobsahovala kontaminující DNA.

Produkt každé PCR reakce byl purifikován za použití mikrokoncentrátoru Centricon 100™ (Amicon Ltd.). Každá reakční směs byla vložena do koncentrátoru a přídatkem redestilované vody byl v každé centrifugační jednotce upraven objem na 2 ml. Centrifugační jednotky byly poté centrifugovány při 500xg (stolní centrifuga Sorval RT6000B™ s rotorem H1000B) po dobu 5 minut a proteklé frakce byly odstraněny. "Zadržovaný" roztok byl opět doplněn redestilovanou vodou na výsledný objem 2 ml a centrifugační jednotka byla znovu centrifugována. Celý proces byl opakován ještě jednou. Výsledkem této procedury bylo odstranění nadbytku oligonukleotidů a složek pufru od amplifikované DNA. Takto purifikované molekuly DNA byly přímo použity v následujících PCR reakcích. Odpovídající dvojice fragmentů byly smíchány v ekvivalentních množstvích a jejich alikvoty byly použity při druhých PCR reakcích s příslušnými 3' a 5' oligonukleotidy.

d) Klonování fragmentů vytvořených pomocí PCR do plazmidu pBluescript™

Produkty druhé PCR reakce vykazovaly pásy o velikosti přibližně 775bp a 730bp, což odpovídá řetězcům Fd (775bp) a L (730bp). Tyto produkty byly rovněž purifikovány za použití mikrokoncentrátoru Centricon 100™ postupem zmíněným výše. Každý DNA produkt byl následně precipitován v 1,5 ml roztoku obsahujícím 50 μ l 3 M octanu sodného, 450 μ l destilované vody a 1 ml absolutního ethanolu. Roztok byl nejméně 10 minut inkubován na ledu a poté centrifugován po dobu 10 minut při 11600xg (MSE MicroCentaur™). Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta v 1 ml 70% ethanolu (v/v v destilované vodě) a následovala centrifugace po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla vysušena ve vakuu. Každá peleta DNA byla rozsuspendována v

destilované vodě. Produkt Fd připravený pomocí PCR reakce byl poté rozštěpen restričními enzymy EcoRI a HindIII v reakční směsi o celkovém objemu 200 μ l obsahující 20 mM Tris-acetát, pH 7,9, 10 mM octan hořečnatý, 50 mM octan draselný, 1 mM dithiothreitol (DTT) a 25 jednotek jak HindIII tak EcoRI (Promega Corporation). Řetězec L připravený pomocí PCR reakce byl rozštěpen restričním enzymem EcoRI v reakční směsi o celkovém objemu 30 μ l obsahující 90 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM chlorid hořečnatý, 50 mM chlorid sodný a 10 jednotek EcoRI. Restriční reakce byly inkubovány 1 hodinu při 37°C.

Rozštěpené fragmenty byly poté purifikovány pomocí elektroforézy na 0,75% agarózovém gelu SeaPlaque™ GTG (FMC BioProducts Ltd.) a pásy odpovídající velikosti byly následně z gelu vyříznuty. Vyříznuté agarózové kousky byly rozpuštěny pomocí inkubace po dobu 2 minut při 65°C, získaný roztok byl destilovanou vodou zředěn na konečný objem 450 μ l a bylo k němu přidáno 50 μ l 3 M octanu sodného. Tento roztok byl extrahován použitím stejného objemu kapalného fenolu ekvilibrovaného Trisovým pufrům pH 7,6 (Fisons Scientific Equipment) a vodná a fenolová fáze byly odděleny centrifugací po dobu 2 minut při 11600xg (MSE MicroCentaur™). Získaná vodná fáze byla znovu extrahována směsí fenol:chloroform (50:50, v:v), a poté pouze chloroformem. Po precipitaci ethanolem (postupem popsáným výše) byla každá purifikovaná peleta rozsuspendována v 10 μ l destilované vody a 1 μ l tohoto vzorku byl podroben elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu za účelem odhadu množství a kvality.

K počátečnímu klonování cDNA řetězců Fd a L byl použit plazmid pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems). Tento fágmidový vektor má unikátní klonovací místa EcoRI a HindIII, gen nesoucí rezistenci vůči ampicilinu a počátky replikace ColEI a f1 sloužící k izolaci jak jednovláknové

tak dvojvláknové DNA. 5 μ g DNA vektoru pBluescript™ KS bylo kompletně rozštěpeno pomocí 30 jednotek EcoRI (Promega Corporation) v reakční směsi o celkovém objemu 100 μ l obsahující 90 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM chlorid hořečnatý, 50 mM chlorid sodný nebo pomocí EcoRI a HindIII v reakční směsi o celkovém objemu 100 μ l obsahující 20 mM Tris-acetát, pH 7,9, 10 mM octan hořečnatý, 50 mM octan draselný, 1 mM dithiothreitol (DTT) a 25 jednotek jak HindIII tak EcoRI (Promega Corporation) při 37°C po dobu 1 hodiny. K plazmidu rozštěpenému restrikcí enzymem EcoRI byly za účelem odstranění fosfátových skupin na 5' koncích přidány 2 μ l alkalické fosfatázy ze střev telat (CIAP, 2 jednotky, Boehringer Mannheim) a inkubace pokračovala při teplotě 37°C dalších 30 minut. Fosfatázová aktivita byla zainhibována inkubací směsi při 70°C po dobu 10 minut. Plazmid rozštěpený dvojicí enzymů EcoRI-HindIII byl z agarózového gelu SeaPlaque GTG purifikován postupem popsaným výše.

25 až 50 ng rozštěpených řetězců Fd a L připravených PCR reakcí bylo ligováno s 50 ng plazmidu pBluescript štěpeného EcoRI-HindIII (řetězec Fd) nebo vystaveného působení EcoRI/CIAP (řetězec L) v ligační směsi o celkovém objemu 10 μ l obsahující 30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP a 1,5 jednotky T4 DNA ligázy (Promega Corporation) při 16°C po dobu 2,5 hodiny. K transformaci 20 μ l kompetentních buněk E. coli DH5 α (Life Technologies Ltd.) byl z každé ligační reakce použit alikvot 1 μ l a transformace byla provedena podle protokolu dodávaného spolu s buňkami. Transformované buňky byly vysety na L-agar obsahující ampicilin v koncentraci 100 μ g/ml, 1 mM IPTG a 0,2% X-gal a plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. Klony obsahující zaklonované inzerty byly rozpoznány na základě toho, že ve výše zmíněném médiu

vytvářejí bílé kolonie, zatímco buňky nesoucí rodičovský plazmid bez inzertu vytvářejí modré kolonie.

e) Sekvenční analýza klonů cDNA

Klony, identifikované na základě tvorby bílých kolonií, které by mohly obsahovat řetězce Fd a L, byly posbírány z agarových ploten a použity k přípravě DNA ve velkém měřítku. Jednotlivými klony bylo v 500 ml Erlemeyerových baňkách inokulováno 200 ml LB média (L-broth) obsahujícího 100 μ g/ml ampicilinu. Tyto kultury byly za stálého třepání inkubovány při 37°C přes noc. Poté byly vyrostlé buňky z každé kultury centrifugovány při 4°C po dobu 10 minut při 5000xg v centrifuze Sorvall RC5C s rotorem GS3. Buněčné pelety byly rozsuspendovány v 20 ml pufru TE a znovu centrifugovány při 4°C po dobu 10 minut při 2000xg v centrifuze Sorvall RC5C s rotorem SS-34 v centrifugačních zkumavkách se zúženým hrdlem se závitem (oak-ridge tube). Každá takto promytá buněčná peleta byla rozsuspendována ve 3 ml roztoku 25% sacharózy, 50 mM Tris, pH 8,0 (o teplotě 0°C) a ponechána na ledu. K této suspenzi byl přidán čerstvě připravený lysozym (1,0 ml 0,5 mM roztoku, pH 8,5), obsah byl promíchán několikanásobným převrácením a inkubace pokračovala dalších 5 minut. K tomuto roztoku byl přidán roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (1,0 ml 0,5 mM roztoku, pH 8,5) a obsah byl mírně zamíchán. Nakonec bylo přidáno 5,0 ml ledově vychlazeného roztoku Tritonu XTM (0,1% Triton X-100, 62,5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0), obsah byl mírně zamíchán a inkubován na ledu dalších 10 minut. Zbytky buněk byly poté odstraněny centrifugací při 4°C po dobu 30 minut při 39000xg v centrifuze Sorvall RC5C s rotorem SS-34. Supernatant obsahující plazmidovou DNA byl přidán k 16 g chloridu cesného (Boehringer Mannheim) a 150 μ l roztoku ethidium bromidu (10 mg/ml) a přidavkem pufru TE byl objem doplněn na 18,5 ml. Tento roztok byl přenesen do

polypropylénových centrifugačních zkumavek se zúženým hrdlem bez závitů (crimp top tubes) o objemu 18,5 ml (Sorvall Instruments). Zkumavky byly uzavřeny a centrifugovány při 18°C po dobu 16 hodin při 180000xg v centrifuze OTD65B s rotorem Sorvall TV865B (titanový, vertikální).

Po skončení centrifugace byla ve vytvořeném hustotním gradientu CsCl/EtBr plazmidová DNA viditelná jako zřetelný oranžový proužek. Plazmidová DNA byla z gradientu odstraněna propíchnutím stěny centrifugační zkumavky injekční jehlou. Vzorek získaný z gradientu byl rozpuštěn ve 3 až 4 násobném množství pufru TE a DNA byla precipitována přidávkem stejného objemového množství izopropanolu a inkubována 10 minut na ledu. Precipitovaná DNA byla centrifugována při 4°C při 17000xg v centrifuze Sorvall RC5C s rotorem SS-34 a supernatant po centrifugaci byl odstraněn. Získaná peleta byla promyta 70% ethanolom (v/v) a znovu centrifugována po dobu 5 minut. Peleta byla vysušena ve vakuu, rozsuspendována v 1,8 ml pufru TE a 200 μ l 3M octanu sodného a pomocí odpovídajícího objemu fenolu extrahována centrifugací po dobu 2 minut při 17000xg, aby došlo k oddělení fází. Vodná fáze byla znovu extrahována stejným objemem chloroformu a po této extrakci následovala precipitace DNA přidáním stejného objemu ethanolu vymraženého na -20°C a inkubací po dobu 10 minut na ledu. Purifikovaná DNA byla centrifugována postupem popsáným výše, promyta 70% ethanolom a vysušena ve vakuu. Vysušená peleta byla rozsuspendována v 500 μ l redestilované vody a koncentrace DNA byla odhadnuta proměřením zředěného vzorku na UV spektrofotometru při vlnových délkách od 300 do 220 nm za použití koeficientu extinkce 50 μ g/ml/OD260. K purifikaci plazmidové DNA je rovněž možné použít množství kitů nesoucích ochrannou známku, například Qiagen™ (Hybaid Ltd.).

Takto purifikovaná DNA byla následně použita pro sekvenční analýzu. Dvojvláknová DNA může být použita pro sekvenční analýzu prováděnou metodou podle Sangera, při níž jsou k ukončení syntézy řetězce DNA použity dideoxynukleotidy (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, strana 5463, 1977). Při této sekvenční analýze mohou být použity sekvenační kity nesoucích ochrannou známku, jako například kit Sequenase™ dodávaný firmou United States Biochemical Company a používaný v souladu s dodávaným návodem.

K sekvenční analýze DNA byly použity alikvoty (2 až 4 μg) plazmidové DNA nesoucí klony cDNA řetězců Fd a L. Na počátku byl každý alikvot denaturován inkubací s 0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA při pokojové teplotě v celkovém objemu 100 μl po dobu 10 minut. Denaturovaná DNA byla poté precipitována přidávkem 10 μl 3 M octanu sodného (pH 5,0) a 275 μl ethanolu a inkubována na ledu po dobu 10 minut. Precipitovaná DNA byla regenerována postupem popsáním výše pro plazmidovou DNA. K denaturované DNA byly následně pro sekvenaci připojeny primery inkubací této DNA s 0,5 pmoly každého z odpovídajících primerů v 10 μl reakčního pufru Sequenase™ (40 mM Tris, pH 7,5, 25 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl) obsahujícího 10% dimethyl sulfoxid (DMSO) při 65°C po dobu 2 minut a následným pozvolným ochlazováním až na teplotu nižší než 30°C. Takto připravené templáty byly následně použity pro sekvenační reakce prováděné podle dodávaných protokolů. Směsi sloužící ke značení DNA a terminační směsi obsahovaly 10% DMSO.

Sekvenační reakce byly vyhodnocovány pomocí autoradiografie následující po elektroforéze s vysokým rozlišením prováděné na denaturujícím gelu o složení 6% polyakrylamid:8 M močovina (Sanger a Coulson, FEBS lett. 87, strana 107, 1978).

Kompletní sekvence klonované cDNA řetězců Fd a L jsou uvedeny níže (SEQ ID NO: 25 pro řetězec Fd proteolytického

typu a SEQ ID NO: 26 pro řetězec L). Plazmid obsahující fragment Fd proteolytického typu byl označen pAF1 a plazmid obsahující řetězec L byl označen pAF3. V každém fragmentu byla rovněž potvrzena přítomnost neaktivní mutace použité k odstranění restrikčního místa BamHI. Získané sekvence DNA naznačují, že tato protilátka je protilátkou izotypu IgG1k, jak vyplývá ze srovnání získané sekvence s publikovanými daty sekvencí DNA konstantních oblastí (Kabat, E. A., Wu, T. T., Bilofsky, H., Reid-Milner, M., Perry, H., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1987, Fourth Edition, Public Health Service N. I. H., Washington DC).

f) klonování do vektorů určených k expresi v myelomech

K vytvoření vektorů schopných koexprese řetězců Fd a L v myelomech byl použit systém GS-Systems™ (Celltech Biologics) (WO 87/04462, WO 89/01036, WO 86/05807 a WO 89/10404).

Tato procedura vyžaduje klonování řetězce Fd do oblasti HindIII-EcoRI vektoru pEE6 (tento vektor je odvozen od pEE6.hCMV - Stephen a Cockett, Nucleic Acid Research 17, 7110, 1989 - a restrikční místo HindIII nacházející se proti směru transkripce od promotoru hCMV v něm bylo přeměněno na restrikční místo BglII) a klonování řetězce L do místa EcoRI ve vektoru pEE12 (tento vektor je podobný vektoru pSH2.GS popsanému v Bebbington a další, Bio/Technology 10, 169 až 175, 1992. Množství restrikčních míst původně přítomných v pSV2.GS bylo v tomto vektoru odstraněno místně specifickou mutagenezí a byla vytvořena multi-linker oblast s množstvím unikátních restrikčních míst). Následně byla expresivní kazeta BglII-BamHI vektoru pEE6 s fragmentem Fd vložena do oblasti BamHI vektoru pEE12. Jinou možností je vložení expresivní kazety BglII-SalI obsahující fragment Fd do oblasti BamHI-SalI plazmidu pEE12 obsahujícího řetězec L.

Aby bylo možné vytvořit jednotlivé vektory (pEE6 s Fd proteolytického typu a pEE12 s řetězcem L), byly plazmidy pAF1 a pEE6 rozštěpeny restriktivními enzymy EcoRI a HindIII a plazmidy pAF3 a pEE12 byly rozštěpeny restriktivním enzymem EcoRI postupem popsaným výše. Příslušné vektory a fragmenty inzertů z každé restriktivní reakce byly následně izolovány z agarózy Seaplaque™ GTG, zaligovány dohromady a použity k transformaci kompetentních buněk DH5α s využitím postupů popsaných výše. Transformované buňky byly vysety na plotny s L-agarem obsahujícím ampicilin o koncentraci 100 μg/ml. Screening kolonií vyrostlých z transformovaných buněk byl proveden pomocí PCR. Kolonie byly přeneseny do 200 μl destilované vody a vortexovány. Suspendované buňky byly na 1 minutu ohřáty na 100°C a zcentrifugovány po dobu 2 minut při 11600xg. Supernatant byl použit k PCR reakci. Jako primery v každé PCR reakci byl použit oligonukleotid komplementární k sekvenci uvnitř promotoru CMV (SEQ ID NO: 27) spolu s oligonukleotidem komplementárním ke 3' konci buď řetězce Fd (SEQ ID NO: 19) nebo řetězce L (SEQ ID NO: 20). Jenom klony s genem kódujícím fragment protilátky vloženým po směru transkripce od promotoru CMV v orientaci vhodné k expresi budou při PCR tvořit specifické produkty o velikosti přibližně 2,0 kbp. PCR reakce byly prováděny v celkovém objemu 20 μl a jednotlivá reakční směs obsahovala 20 pmolů každého z oligonukleotidů (SEQ ID NO: 27 a buď SEQ ID NO: 19 nebo SEQ ID NO: 20), 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 0,1% želatinu, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP a 0,5 jednotky Taq DNA polymerázy (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus). Každá reakční směs byla převrstvena 20 μl minerálního oleje a inkubována 1,5 minut při 94°C, 1 minutu při 50°C a 2,0 minuty při 72°C celkem v 25 cyklech a navíc pak byla ještě inkubována 10 minut při 72°C. Byly rovněž prováděny kontrolní reakce s klony nesoucími jen rodičovský plazmid a kontrolní reakce bez DNA. PCR reakce byly analyzovány

elektroforézou na agarózovém gelu a potenciálně použitelné klony byly identifikovány podle přítomnosti produktu PCR o velikosti 2,0 kbp. Tyto klony byly použity k přípravě plazmidové DNA ve velkém měřítku, byly charakterizovány štěpením restrikními enzymy EcoRI-HindIII nebo EcoRI a sekvence inzertu byla ověřena sekvenční analýzou DNA s využitím postupů popsaných výše. Izolované vektory byly pojmenovány pAF4 (Fd proteolytického typu v plazmidu pEE6) a pAF6 (řetězec L v plazmidu pEE12).

Za účelem vytvoření koexpresního vektoru bylo 5 až 7,5 μg plazmidu pAF4 štěpeno pomocí 30 jednotek jak BglII (Pharmacia) tak BamHI (New England Biolabs) v roztoku obsahujícím 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM chlorid hořečnatý, 150 mM chlorid sodný a 1 mM DTT při 37°C po dobu 1 hodiny. Rozštěpení plazmidu bylo potvrzeno elektroforézou na agarózovém gelu. V roztoku o složení popsaném výše bylo při 37°C po dobu 1 hodiny štěpeno působením 25 jednotek BamHI (New England Biolabs) 5 μg plazmidu pAF6 obsahujícího řetězec L. Získaná DNA byla poté defosforylována přidávkem 2 jednotek CIAP a po 40-ti minutové inkubaci při 37°C následovala extrakce pomocí 10 μl resinu Strataclean™ (Stratagene Ltd.). Fragment expresivní kazety s inzertem Fd a vektor pAF6 (delší řetězec) získaný restrikním štěpením popsaným výše byly následně purifikovány z agaróзовého gelu SeaPlaque™ GTG, použity k ligační reakci a tato ligační reakce byla použita k transformaci kompetentních buněk DH5 α postupy popsanými výše.

g) Identifikace koexpresních vektorů

Sto kolonií vyrostlých po výše zmíněné transformaci bylo přeneseno na nitrocelulóзовé kruhové membrány o průměru 9 cm (Schleicher a Schull). Na jednotlivou membránu, položenou na L-agarovou plotnu s ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, bylo přeneseno 50 kolonií v duplikátu (celkem dvě sady membrán po dvou). Třetí sada

ploten (bez membrán) byla označena proužky a tvoří vlastně zásobní plotny. Po inkubaci přes noc při 37°C byly nitrocelulóзовые filtry odstraněny a dále zpracovány postupem podle Grunsteina a Hognessa (Maniatis, Kapitola 1, strana 102) sloužícím k lýze bakteriálních buněk in situ. Filtry byly pokládány na papíry 3MM (Whatman) nasycené různými činidly - 10%-ním SDS po dobu 2 minut, 3 M NaOH, 1M NaCl po dobu 5 minut a 1 M Tris, pH 6,8 po dobu 2 x 2 minuty. Filtry obsahující lyzované buňky byly přeneseny na papíry 3MM navlhčené 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný) a DNA byla k filtrům imobilizována vystavením působení UV světla v přístroji Spektrolinker™ XL 1500 (Spectronics Corporation) s intenzitou nastavenou na "optional crosslink" (120000 μ Joulů). Před aplikací sondy (viz níže) byly filtry vysušeny na vzduchu. Zásobní plotny byly skladovány při 4°C až do dalšího použití.

K vytvoření specifických hybridizačních sond k identifikaci klonů nesoucích řetězce Fd a L byly použity oligonukleotidy specifické pro řetězce Fd a L (SEQ ID NO: 22 a 24). Hybridizační sonda může být připravena ze syntetického oligonukleotidu přidáním radioaktivní fosfátové skupiny na 5' konec; toho je dosaženo použitím γ^{32} P ATP a využitím aktivity T4 polynukleotid kinázy. 20 pmolů oligonukleotidu bylo k reakční směsi o celkovém objemu 20 μ l obsahující 100 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM Spermidin, 20 mM DTT, 7,5 μ M ATP, 0,5 μ M γ^{32} P ATP a 2,5 jednotek T4 polynukleotid kinázy (Pharmacia Biotechnology Ltd.). Reakční směs byla inkubována 30 minut při 37°C a dále pak 10 minut při 70°C před použitím hybridizační sondy. Postupy použitelné k produkci hybridizačních sond z oligonukleotidů jsou popsány v Maniatis (Kapitola 11). 10 μ l alikvot radioaktivně značeného oligonukleotidu byl přidán do 10 ml 6x SSC (1 M NaCl, 0,1 M citrát sodný), 0,1% SDS (dodecylsírán sodný) a

0,25% Marvel™ (odtučněné sušené mléko) a tento roztok byl poté použit při hybridizaci sondy.

Zpracované filtry obsahující vyselektované klony (viz výše) byly pre-hybridizovány v 90 ml 6x SSC, 0,1% SDS, 0,25% Marvel™ při 65°C po dobu 3 hodin v hybridizační peci Techne HB-1 za použití rotujících skleněných trubic. Každá sada filtrů (dva filtry se stejným "vzorkem kolonií") byla poté hybridizována v 10 ml roztoku s hybridizační sondou (jeden filtr se sondou VH a druhý filtr - duplikát - se sondou VL) přes noc při 65°C ve stejném přístroji. Po inkubaci byly každá sada filtrů promývána ve 100 ml 6xSSC, 0,1% SDS při 65°C po dobu 15 minut, 100 ml 3xSSC, 0,1% SDS při 65°C po dobu 30 minut a 100 ml 1xSSC, 0,1% SDS při 65°C po dobu 30 minut ve stejném přístroji. Promyté filtry byly vysušeny na vzduchu a byly použity k autoradiografii na Hyperfilm™ (Amersham International) prováděné v kazetě s vloženým wolframovým kontrastním filtrem "tungstate intensifying screen" při teplotě -70°C. Po vyvolání filmu v automatickém zařízení Kodak byly klony potenciálně schopné exprimovat F(ab')₂ identifikovány na základě hybridizace s oběma sondami. Četnost klonů hybridizujících s oběma sondami specifickými jak pro řetězec Fd tak pro řetězec L byla velmi nízká (přibližně 2%).

Klony, které by mohly obsahovat koexpresivní plazmid byly posbírány ze zásobních ploten a použity k přípravě plazmidové DNA ve velkém měřítku. K určení orientace každé z expresivních kazet byla použita restriční analýza enzymy EcoRI a HindIII. Byly identifikovány pouze klony s tandemovým uspořádáním expresivních kazet Fd a L (ne s konvergentním uspořádáním). Tento koexpresivní vektor byl označen jako pAF8 (Fd proteolytického typu a řetězec L v plazmidu pEE12).

h) transfekce myelomů

K zavedení DNA do eukaryotických buněk existuje několik postupů (Bebbington, C., Methods, svazek 2, strany 136 až 145, 1991). Nedávno se stala rutinně používanou metodou elektroporace, která nahradila postup využívající koprecipitaci DNA s fosforečnanem vápennatým. Pro tento účel jsou vhodnými hostitelskými buňkami myelomy NS0 (Methods in Enzymology, 73B, strany 3 až 46, 1981, ECACC katalogové číslo 85110503), jelikož neobsahují žádné endogenně sekretované proteiny protilátek. Předpokládá se, že část kolonií pěstovaných po transfekci koexpresivním plazmidem obsahujícím řetězce Fd a L v médiu bez přítomnosti glutaminu, bude exprimovat funkční fragmenty protilátky A5B7.

Před vlastní transfekcí bylo 40 μg plazmidové DNA pAF8 linearizováno štěpením 200 jednotkami enzymu SalI (New England Biolabs) v reakční směsi o celkovém objemu 400 μl obsahující 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM chlorid hořečnatý, 150 mM chlorid sodný, 1 mM DTT a 100 $\mu\text{g/ml}$ acetylovaného BSA při 37°C po dobu 1,75 hodin. Po skončení štěpení byla DNA precipitována ethanolem a rozsuspendována v 50 μl destilované vody.

Buňky NS0 byly napěstovány v kultivačních lahvích pro tkáňové kultury (160 cm^2 , Nunc nebo Costar) do stavu konfluence. Každá kultivační láhev obsahovala 50 ml neselekčního růstového média (Eaglovo médium upravené podle Dulbecca, Life Technologies, Ltd., spolu s 10% fetálním telecím sérem získaným z akreditovaného zdroje) a kultivace probíhala při 37°C v atmosféře obsahující 5% CO_2 . Před transfekcí byly buňky NS0 rozsuspendovány poklepáním kultivační lahve o ruku nebo desku stolu a přeneseny do kónických centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml (Falcon). Ze suspenze byl odebrán vzorek (40 μl) tento byl použit k odhadu koncentrace buněk za použití počítače buněk Coulter

nastaveného počítání částic o velikosti 10 až 20 μm . Buňky byly centrifugovány při 500xg po dobu 5 minut (stolní centrifuga Sorval RT6000C), promyty 45 ml vychlazeného fyziologického roztoku pufrovaného fosforečnanem (PBS) a znovu centrifugovány. Promyté buňky byly rozsuspendovány ve vychlazeném roztoku PBS na výslednou koncentraci $1,3 \times 10^7$ buněk na ml a uchovány na ledu. V elektroporační kyvetě se vzdáleností elektrod 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories Ltd.) bylo smícháno 50 μl vzorku plazmidové DNA rozštěpené SalI s 800 μl (10^7) buněk NS0 (vzorek nesmí obsahovat bubliny) a kyveta byla inkubována na ledu po dobu 5 minut. Poté byla kyveta osušena použitím tkaniny a umístěna do elektroporačního zařízení Gene Pulser™ (Bio-Rad Laboratories Ltd.) a na kyvetu byly aplikovány dva posobě jdoucí pulsy o napětí 1500V při 3 $\mu\text{Faradech}$ jak je doporučeno výrobcem. Poté byly elektroporační kyvety znovu umístěny na 5 minut na led a jejich obsah byl následně smíchán s 30 ml předehřátého neselekčního média. Přibližně 20 ml této buněčné suspenze bylo rozděleno na čtyři plotny pro kultivaci tkáňových kultur s 96 jamkami s plochým dnem (Nunc) v objemu 50 μl na jednu jamku. Zbýlých 10 ml suspenze bylo zředěno 30 ml neselekčního média a umístěno do pěti 96-jamkových ploten. Zbýlá zředěná suspenze byla ještě dále zředěna neselekčním médiem (10 ml do 40 ml) a umístěna do dalších pěti 96-jamkových ploten. Buňky byly přes noc inkubovány při 37°C v atmosféře obsahující 5% CO_2 . Do každé jamky na 96-ti jamkových plotnách bylo přidáno selekční médium neobsahující glutamin (150 μl , Bebbington a další, Bio/Technology 10, 169 až 175, 1992) a plotny byly vráceny do inkubátoru kde docházelo k pozvolnému vyčerpání glutaminu z média. Kultivace byla ukončena, jakmile byly kolonie pozorovatelné pouhým okem.

i) Růst buněčných linií

Z 96-ti jamkových ploten byly vybrány kolonie z těch jamek, ve kterých byla přítomna pouze jedna kolonie. Buňky byly pipetováním rozsuspendovány a 100 μ l této suspenze bylo přeneseno do jednotlivých jamek na 24 jamkové plotně a do každé jamky byl přidán 1 ml selekčního média. Dalších 100 μ l selekčního média bylo přidáno do každé jamky na 96-ti jamkových plotnách, ze které byly odebrány kolonie, čímž byl vytvořen záložní zdroj buněčných linií. 24 jamkové plotny byly inkubovány při 37°C v 5% CO₂ do stavu přibližně 50% konfluence. V tomto stádiu bylo odebráno asi 100 μ l supernatantu a v tomto supernatantu byla testem ELISA (viz. níže) testována vazebná aktivita namířená proti CEA. Buněčné linie vykazující tuto vazebnou aktivitu byly dále množeny přenesením 1 ml rozsuspendovaných buněk do lahví pro tkáňové kultury o obsahu 25 cm². Do každé lahve byl následně přidán 1 ml selekčního média a láhve byly inkubovány v šikmé poloze, aby došlo k zakoncentrování buněk u dna láhve. Po několika dnech inkubace byly do každé láhve přidány 3 ml selekčního média a láhve byly dále inkubovány v horizontální poloze až do doby, kdy bylo dosaženo 50% až 75% konfluence. V tomto stádiu bylo selekční médium odstraněno a buňky byly opatrně promyty 5 ml selekčního média, které bylo ihned odstraněno a nahrazeno dalšími 5 ml selekčního média. Kultivační lahve byly na dalších 24 hodin vráceny do inkubátoru. Poté byly buňky posbírány poklepáním kultivační láhve a buněčná hustota byla spočítána buď pomocí počítadla Coulter s limity detekce v rozmezí 10 až 20 μ m nebo použitím hemocytometru po obarvení roztoku trypanovou modří (Life Technologies) a spočítáním životaschopných (neobarvených) buněk pod mikroskopem. Buňky byly zcentrifugovány (přibližně 300xg po dobu 5 minut) a supernatant byl odstraněn a uschován při 4°C k použití k analýze exprese

fragmentů protilátky (viz. níže). Buněčná peleta byla rozsuspendována v 50% dialyzovaného fetálního telecího média, 40% DMEM bez glutaminu a 10% DMSO na výslednou koncentraci 1 až 2×10^6 buněk na ml. Následně byly buňky v 1 ml alikvotech přeneseny do kryozkumavek se šrubovacím víčkem (Nunc), zmrazeny přes noc při -70°C a poté přemístěny do kapalného dusíku k dlouhodobému uskladnění.

Analýza metodou Western blot

Analýza metodou Western blot byla provedena způsobem popsaným níže.

Alikvoty (15 μl) z každého vzorku supernatantu byly smíchány se stejným množstvím vzorkového pufru (62,5 mM Tris, pH 6,8, 1% SDS, 10% sacharóza a 0,05% bromfenolová modř) s nebo bez redukčního činidla (50 mM DTT). Před vlastní elektroforézou na gradientu akryamidového gelu s gradientem 8 až 18% (gel Excel™, Pharmacia Biotechnology Products) prováděnou podle návodu poskytovaného výrobcem na přístroji Multiphor™ II (LKB Produkter AB) byly vzorky inkubovány po dobu 15 minut při 100°C . Po elektroforéze byly za použití přístroje Novablot™ (Produkter AB) postupem popsaným výrobcem přeneseny separované proteiny na membránu Hybond C-Super™ (Amersham International). Po přebílení byla membrána vysušena na vzduchu.

Přítomnost fragmentů protilátky byla detekována pomocí protilátky namířené proti myším $\text{F}(\text{ab}')_2$, konjugované s peroxidázou (ICN Biomedicals, produkt číslo 67-430-1). Přestože tato primární protilátka byla připravena proti myším $\text{F}(\text{ab}')_2$, bylo ukázáno, že se tato protilátka váže hlavně na řetězec L typu kappa. Přítomnost fragmentů myší protilátky A5B7 byla vizualizována pomocí detekčního systému ECL (Amersham International) postupem podle výrobce.

Bylo prokázáno, že přibližně 90% materiálu přítomného v buněčném supernatantu je tvořeno proteiny $F(ab')_2$.

k) Analýza metodou ELISA

Standardní postupy pro ELISA stanovení jsou popsány v "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", eds. Burdon, R.H. a van Kippenberg, P.H., svazek 15, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Tijssen, P., 1985, Elsevier Science Publishers B.V.. Jiným zdrojem informací je "Antibodies - A Laboratory Manual" Harlow, E. a Lane, D.P., 1988, publikované v Cold Spring Harbor Laboratory.

K detekci přítomnosti materiálu s vazebnou aktivitou proti CEA byl použit buněčný supernatant (viz. výše) a detekce byla provedena postupem popsaným níže:

1) stanovení anti-CEA protilátek metodou ELISA

1. Připraví se potahovací pufr (1 kapsle pufru uhličitan-hydrogenuhličitan - Sigma C-3041 - ve 100 ml redestilované vody).
2. Na každou použitou 96-ti jamkovou destičku se přidá k 10 ml potahovacího pufru 5 μ l zásobního roztoku CEA (0,2 mg/ml, Dako).
3. Do každé jamky na mikrotitrační destičce Nunc "Maxisorp[™]" se napipetuje 100 μ l zředěného CEA.
4. Inkubuje se při 4°C přes noc (nebo 2 hodiny při pokojové teplotě).
5. Destičky se promyjí celkem čtyřikrát po dobu 5 minut roztokem PBS + 0,01% azidem sodným (PBSA).
6. Destičky se zablokují (po vyklepání promývacího roztoku) pomocí 150 μ l 1% BSA (Sigma A-7888) v PBSA

na jednu jamku. Inkubují se dvě hodiny při pokojové teplotě.

7. Destičky se promyjí celkem čtyřikrát po dobu 5 minut roztokem PBSA.
8. Nanesou se vzorky (supernatanty z buněčné kultury) a vhodné standardy (proteolytickým štěpením připravené $F(ab')_2$, ve dvojnásobných ředěních). Vzorky se zředí růstovým médiem (nebo PBS). Jako slepé vzorky se mohou použít PBSA + 1% BSA a rozpouštědlo.
9. Inkubuje se přes noc při 4°C.
10. Destičky se promyjí celkem šestkrát po dobu 5 minut roztokem PBSA + 0,5% Tween 20.
11. Připraví se roztok sekundární protilátky (namířená proti myším IgG $F(ab')_2$, kozí protilátka konjugovaná s peroxidázou - ICN 67-430-1 - o objemu 20 μ l ve 40 ml PBSA + 1% BSA + 0,5% Tween 20) a do každé jamky se přidá 100 μ l.
12. Inkubuje se 2 hodiny při pokojové teplotě.
13. Destičky se promyjí celkem šestkrát po dobu 5 minut roztokem PBSA + 0,5% Tween 20.
14. Připraví se vyvíjecí roztok rozpuštěním jedné kasle pufru Fosforečnan-Citrát-Peroxoboritan (Sigma P-4922) ve 100 ml redestilované vody. Do 100 ml pufru přidejte 30 mg o-fenyldiamin dihydrochloridu (OPD, SigmaP-8287). Do každé jamky se nanese 100 μ l.
15. Inkubuje se 15 minut při pokojové teplotě ve tmě.
16. Reakce se zastaví přidávkem 50 μ l 2 M kyseliny sírové do každé jamky.
17. Na čtečce destiček se odečte OD při vlnové délce 490 nm.

m) Výpočet specifické rychlosti produkce protilátek (SPR)

Množství vazebné aktivity namířené proti CEA v každém vzorku bylo stanovano za použití programového balíku Softmax. Toto číslo bylo použito k získání přibližné hodnoty popisující množství fragmentů A5B7 F(ab')₂ přítomných v buněčném supernatantu, přičemž byla vzata do úvahy data získaná analýzou pomocí metody Western blot, která naznačují, že většina řetězců L protilátky (>90%) je přítomna ve formě F(ab')₂. Takto získaná hodnota byla použita k výpočtu specifické rychlosti produkce vyjádřené v jednotkách $\mu\text{g}/10^6$ buněk/24 hodin. Specifická rychlost produkce byla použita k roztrídění buněčných linií podle produktivity. Hodnoty SPR se pro nejlepší izolované buněčné linie se obvykle pohybovaly v rozmezí 4 μg až 10 $\mu\text{g}/10^6$ buněk/24 hodin.

Purifikace rekombinantního A5B7 F(ab')₂

Rekombinantní materiál A5B7 F(ab')₂ byl ze supernatantu získaném po centrifugaci suspenze myelomů v selekčním médiu purifikován za použití kolony s náplní 500 mg r-Proteinu A, která je například vyráběna firmou NyGene.

Kolona byla nejprve promyta citrátovým pufrem o koncentraci 100 mM kyseliny citrónové, pH 2,8, a poté ekvilibrována v pufru o složení 150 mM chlorid sodný, 10 mM fosforečnan sodný, pH 7,4, až do chvíle, kdy pH roztoku jímáného po průchodu kolonou odpovídalo pH ekvilibračního pufru. Oba pufry byly před použitím přefiltrovány přes filtr Millipore o velikosti pórů 0,45 μm .

Médium získané odstraněním myelomů (1,8 litru) obsahující rekombinantní A5B7 F(ab')₂ bylo před použitím rovněž přefiltrováno a zředěno ekvilibračním pufrem v poměru 1:1. Takto zředěné médium bylo následně nanášeno na kolonu obsahující Protein A a byl jímán veškerý nezachycený

materiál. Jakmile byla kolona naplněna, byla tato kolona promývána ekvilibračním pufrům až do chvíle, kdy se hodnota absorbance měřená při 280 nm vrátila základní hladinu.

Poté byl jako eluční pufr použit rovněž přefiltrovaný 100 mM octan sodný, pH 4,0. Tento eluční pufr byl jímán po 45 ml frakcích. Jakmile se absorbance měřená při 280 nm opět vrátila na základní hodnotu byl k promývání kolony použit pufr o složení 100 mM kyselina citrónová, pH 2,8.

V jednotlivých jímáných frakcích byla měřena optická hustota při 280 nm a u frakcí s vysokou absorbancí bylo pH upraveno na hodnotu 7,0 a tyto frakce byly analyzovány na SDS-PAGE.

Frakce obsahující rekombinantní A5B7 F(ab')₂ byly spojeny. Tento objem byl zakoncentrován (membrána Amicon YM10™) a dialyzován proti pufru o složení 150 mM chlorid sodný, 10 mM fosforečnan sodný a 3 mM EDTA, pH 7,4 a uskladněn při 4°C. Celkově bylo získáno 73 mg F(ab')₂ o čistotě >90%, jak bylo potvrzeno SDS-PAGE v neredukujících podmínkách.

Supernatant získaný po centrifugaci myelomů použitý k výše zmíněné purifikaci byl získán postupem popsaným v Bebbington a další, Bio/Technology 10, 169 až 175, 1992. Média GS (kat. č. 51435) a doplněk (kat. č. 58672) je možné získat u JRH Biosciences (JRH Biosciences Europe, Hophurst Lane, Crawley Down, W. Sussex, U. K., RH10 4FF). Po skončení růstu buněk byl supernatant přefiltrován přes 0,45 μm filtr za účelem odstranění větších částic, a do doby purifikace skladován při 4°C, což obvykle netrvalo déle než 24 hodin.

Referenční příklad 6

Syntéza analogu prekursoru účinné látky odvozené od uracilu (viz. schéma na Obrázku 9)

Sloučenina 7 (5 mg) byla rozpuštěna v 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové (0,1 N) a výsledkem byl požadovaný konečný produkt (sloučenina 9). Po 0,5 hodině při 25°C ve tmě byl roztok umístěn na led a alikvoty byly zředěny puřem a testovány s mutantní RNázou.

Sloučenina (7) byla z uridinu připravena následovně:

2', 3'-O-Methoxyethylidenuridin (sloučenina 1)

Uridin (5 g), monohydrát p-toluensulfonové kyseliny (1 g) a trimethylorthoacetát byly společně míchány při 20°C po dobu 16 hodin. pH reakční směsi bylo pomocí methanolátu sodného upraveno na lehce zásaditou hodnotu a reakční směs byla následně zakoncentrována do formy gumovitého zbytku. Požadovaný produkt byl purifikován chromatografií na sloupci silikagelu (Merck 9385) za použití směsi chloroform/methanol jako elučního roztoku nejprve v poměru 96:4 (objemově) a poté v poměru 92:8.

NMR (DMSO-d₆); (δ) 11,38 (s, 1H); 7,75 (d, 1H); 5,95 (d) a 5,80 (d, total 1H); 5,62 (d, 1H); 4,70-5,10 (m, 3H); 4,18 (q) a 4,04 (q, total 1H); 3,60 (m, 2H); 3,15 (s) a 3,28 (s, total 3H); 1,57 (s) a 1,49 (s, total 3H).

5'-Azido-5'-deoxy-2', 3'-O-Methoxy-ethylidenuridin (sloučenina 2)

K roztoku 2', 3'-O-Methoxyethylidenuridinu (7,0 g, 23,3 mmol) v bezvodém pyridinu (80 ml) byl při 0°C přidán methylsulfonyl chlorid (1,9 ml, 24 mmol). Po 16-ti hodinovém míchání při 4°C bylo rozpouštědlo odpařeno ve vakuové odparce a zbytek rozpuštěný v chloroformu byl promyt vodou. Vrstva organického činidla byla oddělena,

vysušena a zakoncentrována, čímž byl získán surový methansulfonát.

Surový reakční produkt byl rozpuštěn v bezvodém dimethyformamidu (100 ml) a byl přidán azid sodný (3,25 g, 50 mmol). Směs byla míchána po dobu 7 hodin při 85°C a poté bylo rozpouštědlo odpařeno ve vakuové odparce a zbytek byl rozpuštěn v chloroformu a promyt roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Chloroformový extrakt byl oddělen, vysušen pomocí bezvodého síranu sodného a zakoncentrován. Vzniklým produktem byla 5'-azido sloučenina. Surový azidový meziprodukt byl použit jako výchozí materiál při dalším kroku.

3'-O(a 2'-O)-Acetyl-5'-azido-5'-deoxyuridin (sloučenina 3)

Surový azid (sloučenina 2, výše) byl rozpuštěn v kyselině octové (70%) (100 ml) a po 15 minutách bylo rozpouštědlo odstraněno evaporací při sníženém tlaku. Zbytek byl opakovaně rozpouštěn v absolutním ethanolu a koncentrován, aby byly odstraněny poslední stopy kyseliny octové. Výsledkem tohoto postupu byl surový vzorek požadovaného produktu skládající se z polohových izomerů 2' a 3'.

NMR při poměru 2'acetoxy ke 3'acetoxy 2:1 v DMSO_{d6}: (δ) 11,40 (s, 1H); 7,70 (d, 1H); 5,60 až 5,95 (m, 3H); 5,22 (t, 0,33H); 5,03 (dd, 0,66H); 4,41 (q, 0,66H); 4,24 (q, 0,33H); 4,14 (q, 0,66H); 3,94 (m, 0,33H); 3,62 (m, 2H); 2,08 (s, 0,66H); 2,06 (s, 0,33H).

3'-O(a 2'-O)-Acetyl -5'-azido -5'-deoxy-2'-O (a 3'-O)-tetrahydropyranyluridin

Surový acetát z předchozí reakce byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (80 ml). Do reakční nádoby byly přidány dihydropyran (6 ml) spolu s monohdrátem kyseliny

p-toluensulfonové (500 mg). Reakční směs byla míchána 3 hodiny při 25°C a po této době bylo použitím TCL zjištěno, že všechny výchozí materiál byl spotřebován. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem, promyta roztokem hydrogenuhličitanu sodného a organická fáze byla před odpařením při sníženém tlaku zbavena vody. Surový produkt (směs polohových izomerů 2' a 3') byl purifikován chromatografií na sloupci silikagelu za použití směsi chloroform/methanol jako elučního roztoku nejprve v poměru 97:3 (objemově) a poté v poměru 95:5.

5'-amino-5'-deoxy-2'-O(a 3'-O)-tetrahydropyranyluridin (sloučenina 4)

Azidový meziprodukt z předchozí reakce byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (100 ml) a následně byl k roztoku přidán trifenylfosfan (6,5 g, 25 mmol) a voda (0,45 ml). Po 16 hodinách míchání při 25°C byl ke směsi přidán koncentrovaný amoniak a reakce probíhala dalších 24 hodin. Reakční směs byla vysušena (odstranění rozpouštědla) a purifikována chromatografií na sloupci silikagelu za použití směsi chloroform/methanol jako elučního roztoku nejprve v poměru 9:1 (objemově) a poté v poměru 1:1. Výsledkem byl požadovaný produkt skládající se z polohových izomerů 2' a 3'.

5'-(N-benzyloxykarbonylglycyl)amino-5'-deoxy-2'-O(a 3'-O)-tetrahydropyranyluridin (sloučenina 5)

K roztoku 5'-amino-5'-deoxy-2'-O(a 3'-O)-tetrahydropyranyluridinu (3g) v bezvodém tetrahydrofuranu byl přidán ester p-nitrofenyl N-benzyloxykarbonylglycinu (1,3 g, 9,2 mmol). Po 16 hodinách míchání při 25°C byla reakční směs zakonzentrována do formy gumovitého zbytku a purifikována chromatografií na sloupci silikagelu za použití směsi chloroform/methanol (96:4) jako elučního

roztoku. Požadovaný produkt byl získán jako směs stereoizomerů (3,6 g, 75% výtěžek).

NMR v DMSO-d₆: (δ) 11,36 (s, 1H); 8,02 (b, 1H); 7,70 (dvě d, 1H); 7,32 (m, 6H); 5,90 (d) a 5,70 (d, total 1H); 5,64 (d, 1H); 5,444 (d) a 5,20 (d, total 1H); 5,02 (s, 2H); 4,75 (m, 1H); 3,20-4,25 (m, 9H); 1,35-1,80 (m, 6H).

Hmotnostní spektrum (FAB), m/e 519 (M+ H+). C₂₄H₃₀N₄O₉ odpovídá M+, 518.

3'-O(a 2'-O)-fosforamiditový derivát výše zmíněného produktu

K roztoku produktu (1,9 g, 3,67 mmol) připraveného předchozí reakcí a diizopropylethylaminu (1,5 ml) v bezvodém dichlormethanu (30 ml) byl přidán chlorid N, N-diizopropylmethylamidu kyseliny fosfonové. Reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin při teplotě 25°C a poté byla zředěna chloroformem a promyta vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Chloroformový extrakt byl oddělen, zbaven vody a zakoncentrován do formy gumovitého zbytku. Surová směs byla purifikována na chromatografickém sloupci za použití následujících roztoků jako elučních činidel (nejprve chloroform/triethylamin 98:2, následně chloroform/triethylamin/methanol 96:2:2) a výsledkem byl požadovaný meziprodukt obsahující fosfor (1,9 g).

Úplně chráněný meziprodukt obsahující fosfátovou skupinu (sloučenina 6)

K roztoku fosforamiditu (1,9 g, 2,4 mmol) z výše zmíněné reakce a 4-dipropylaminofenolu (0,7g, 3,6 mmol) v bezvodém acetonitrilu (40 ml) byl přidán tetrazol (0,5 g, 7,2 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 16 hodin při teplotě 25°C ve tmě a poté byl přidán terciální butylhydroperoxid (70%, 0,4 ml). Po 15 minutách byla reakční směs zakoncentrována, rozpuštěna v chloroformu a a promyta vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného.

Chloroformová vrstva byla oddělena, zbavena vody a zakoncentrována do formy gumovitého zbytku. Tento surový produkt byl purifikován chromatografií na sloupci oxidu křemičitého za použití octanu ethylnatého a následně směsí octan ethylnatý/methanol (93:7, objemově). Odpařením vhodných frakcí byl získán produkt (1,5 g), který je směsí polohových izomerů 2' a 3'.

NMR v DMSO_{d6}: (δ) 11,43(s, 1H); 8,10(b, 1H); 7,75(m, 1H); 7,45(M, 1H); 7,35(s, 5H); 7,00(m, 2H); 6,60(m, 2H); 5,90(m, 1H); 5,69(m, 1H); 5,17(m) a 4,97(m, total 1H); 5,02(s, 2H); 4,69(bs) a 4,57(bs, total 1H); 4,53(m) a 4,23(m, total 1H); 4,08(m, 1H); 3,15 až 3,85(m, 13H); 1,35-1,75(m, 10H); 0,88(t, 6H).

Hmotnostní spektrum (FAB), m/e 787 (M+) a 788 (M++H), C₃₇H₅₀N₅O₁₂P odpovídá M+, 787.

Analog prekursoru účinné látky chráněný skupinou THP (sloučenina 7)

Plně chráněný meziproduct z předchozí reakce (1 mmol) byl rozpuštěn v směsi ethanol (20 ml)/cyklohexen (10 ml) a poté k němu bylo přidáno 20% paladia na aktivním uhlí. Směs byla 1 hodinu vařena pod zpětným chladičem a před zakoncentrováním při sníženém tlaku byla zfiltrována. Vzniklý gumovitý zbytek byl purifikován chromatografií na sloupci oxidu křemičitého za použití směsi chloroform/methanol (9:1) jako elučního činidla. Výsledkem pak byl derivát s volnou glycylovou skupinou.

Sloučenina s fosfátovou skupinou chráněnou methylem (1 mmol) z předchozí reakce byla následně rozpuštěna v terciálním butylaminu (30 ml). Reakční směs byla 16 hodin vařena pod zpětným chladičem a před chromatografií na sloupci oxidu křemičitého za použití směsi chloroform/methanol (9:1) jako prvního elučního činidla a

směsi chloroform/methanol (7:3) jako druhého elučního činidla byla zakoncentrována. Výsledkem byl požadovaný analog neaktivního prekursoru účinné látky chráněný skupinou THP, který je směsí polohových izomerů 2' a 3'.

Oddělení polohových izomerů 2' a 3' pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie

Separace byla provedena pomocí HPLC na koloně Partisil ODS-2 izokratickou elucí směsí 60:40 methanol/mravenčan amonný (0,1 M). Odpovídající frakce byly spojeny a lyofilizovány a výsledkem byl požadovaný meziprodukt připojený ke 3' uhlíku (7); viz. struktura na Obrázku 9.

NMR v DMSO_{d6}: (δ) 8,85(s, 1H); 8,25(s, 1H); 7,75(d, 1H); 6,95(d, 2H); 6,5(d, 2H); 5,85(d, 1H); 5,6(d, 1H); 4,5(m, 2H); 4,3(m, 1H); 4,07(m, 1H); 3,2-3,6(m, 6H); 3,1(m, 4H); 1,2-1,6(m, 10H); 0,8(m, 6H).

Referenční příklad 7

Syntéza analogu neaktivního prekursoru účinné látky odvozená od cytidinu (viz. schéma, Obrázek 10)

Analog neaktivního prekursoru účinné látky odvozený od cytidinu (sloučenina 13) byl připraven obdobně jako sloučeniny odvozené od uridinu popsané v Referenčním příkladu 6. Syntéza se řídila postupem popsaným v Referenčním příkladu 6, ale Sloučenina 7 (Obrázek 9) byla nahrazena Sloučeninou 12 (Obrázek 10).

Standardní zpracování: Zakoncentrování reakční směsi ve vakuové odparce, rozpuštění zbytku v chloroformu, promytí roztoku vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, odstranění vody pomocí Na₂SO₄, filtrace a zakoncentrování. Blesková purifikace chromatografií na sloupci za použití udané směsi rozpouštědel.

Sloučenina 12 byla připravena následovně (viz. schéma na Obrázku 10).

N^4 -benzoyl-2', 3'-O-methoxyethylidencytidin (sloučenina 1) byl připraven podle Green, D. P. L., Ravindranathan, T., Reese, C. B. a Saffhill, R., Tetrahedron 26, 1031, 1970. N^4 -benzoyl-5'-O-methansulfonyl-2',3'-O-methoxyethylidencytidin (sloučenina 2) byl připraven následovně.

Do roztoku N^4 -benzoyl-2', 3'-O-methoxyethylidencytidinu (9,85 g, 25,0 mmol) v pyridinu (100 ml) byl při 0°C za stálého míchání přidán methylsulfonylchlorid (1,9 ml, 25 mmol). Po 16 hodinách míchání při 25°C byla reakční směs zpracována zakoncentrováním ve vakuové odparce, rozpuštěním v chloroformu a promytím organické fáze vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Vrstva chloroformu byla oddělena, zbavena vody pomocí síranu sodného a zakoncentrována, čímž byl připraven výsledný produkt.

3'-O-acetyl-5'-azido- N^4 -benzoyl-5'-deoxycytidin (směs s izomerem 2'-O-acetyl) (sloučenina 3) byl připraven následovně.

Surový methansulfonát (sloučenina 2) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (100 ml). K reakční směsi byl přidán azid sodný (3,25 g, 50 mM) a směs byla míchána 7 hodin při 80°C. Reakční směs byla zpracována zakoncentrováním rozpouštědla, rozpuštěním v chloroformu a promytím chloroformového extraktu vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Zbytek získaný po odpaření chloroformu zbaveného vody byl rozpuštěn ve 120 ml 70% HOAc. Po 15 minutách bylo rozpouštědlo odstaněno odpařením ve vakuové odparce a surový produkt byl purifikován na chromatografickém sloupci (95:5 CHCl₃/MeOH, poté 98:2 CHCl₃/MeOH). Výtěžek požadovaného produktu byl 6g.

3'-O-acetyl-5'-azido-N⁴-benzoyl-2'-O-tetrahydropyranyl-5'-deoxycytidin (směs s izomerem 3'-O-tetrahydropyranyl) (sloučenina 4) byl připraven následovně.

Sloučenina (6 g) z předchozího příkladu byla rozpuštěna v methylen chloridu (100 ml) a dihydropyranu (4 ml). Po přidání 0,5 g monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové byla směs míchána 16 hodin při 25°C. Surový produkt byl získán zpracováním podle postupu popsaného výše a požadovaný produkt byl získán purifikací surového produktu na chromatografickém sloupci za použití 98:2 CHCl₃/MeOH jako eluční směsi.

5'-azido-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranylcytidin (směs s izomerem 3'-O-tetrahydropyranyl) (sloučenina 5) byl připraven následovně.

Acetát (sloučenina 4, 9,0 g, obsahující nečistoty) byl rozpuštěn v methanolu (60 ml) a byl k němu přidán methoxid sodný (3,5 g). Po 1 hodině míchání při 25°C byla reakční směs zakoncentrována a purifikována na chromatografickém sloupci. Výtěžek 3,7 g.

Poznámka: V tomto stádiu je možné pomocí chromatografie provést separaci izomerů 2' a 3' (stejně jako ve většině následujících kroků).

5'-azido-N⁴-benzyloxykarbonyl-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranylcytidin (směs s izomerem 3'-O-tetrahydropyranyl) (sloučenina 6) byl připraven následovně.

Sloučenina cytidinu (sloučenina 5, 3,7 g) byla rozpuštěna v bezvodém pyridinu (80 ml) a bylo k ní přidáno katalytické množství dimethylaminopyridinu (DMAP) 2 ml Z-Cl. Po 16 hodinách míchání při 25°C byla reakční směs zpracována a produkt byl purifikován chromatografií na

sloupci oxidu křemičitého s použitím (CHCl₃/MeOH, 95:5) jako eluční směsi. Bylo získáno 2,3 g produktu.

5'- (N⁴-benzyloxykarbonyl) amino-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranlylcytidin (směs s izomerem 3'-O-tetrahydropyranyl) (sloučenina 7) byl připraven následovně.

Azid (sloučenina 6, 3,06 g) v THF (30 ml) byl míchán s trifenylofosfanem (1,7 g) 24 hodin při 50°C. Ke směsi byla přidána voda (5 ml) a míchání pokračovalo při 50°C další hodinu. Výsledkem zakoncentrování reakční směsi a purifikace chromatografií na sloupci oxidu křemičitého s použitím (CHCl₃/MeOH, 9:1, poté 1:1 a nakonec 100% MeOH) jako eluční směsi bylo 0,9 g produktu.

N⁴-benzyloxykarbonyl-5'- (N-benzyloxykarbonyl)glycyl) amino-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranylcytidin (směs s izomerem 3'-O-tetrahydropyranyl) (sloučenina 8) byl připraven následovně.

Amin (sloučenina 7, 0,9 g) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (30 ml) a ke směsi byl přidán p-nitrofenyl-N-karbobenzyloxy-glycinát (700 mg). Po 16 hodinách míchání při 25°C byla reakční směs zakoncentrována a surový produkt byl purifikována chromatografií na sloupci oxidu křemičitého s použitím (CHCl₃/MeOH, nejprve v poměru 97:3, poté v poměru 95:5) jako eluční směsi. Byl získán 1 g požadovaného materiálu.

N⁴-benzyloxykarbonyl-5'- (N-benzyloxykarbonyl)glycyl) amino-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranylcytidyl-3'- (N, N-diizopropylmethyl) fosfonamidát (směs s izomerem 3') (sloučenina 9) byl připraven následovně.

Alkohol (sloučenina 8, 1 g) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (30 ml) a ke směsi byl přidán $\text{EtN}(\text{iPr})_2$ (1,7 ml) a následně pak $\text{Cl-P}(\text{OMe})\text{N}(\text{iPr})_2$ (34 ml). Reakční směs byla zpracována a purifikována chromatografií na sloupci oxidu křemičitého s použitím ($\text{CHCl}_3/\text{Et}_3\text{N}$, v poměru 98:2, a poté $\text{CHCl}_3/\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$ v poměru 97:2:1) jako elučních směsí. Bylo získáno 1,1 g požadovaného materiálu.

(Methyl)(4-N, N-dipropylamonifenyl) [N^+ -benzyloxykarbonyl-5'- (N-benzyloxykarbonyl-glycyl)- amino-5'-deoxy-2'-O-tetrahydropyranylcytidyl-3'] fosfát (směs s izomerem 3') (sloučenina 10) byl připraven následovně.

Fosfonamidát (sloučenina 9, 1,1 g) byl rozpuštěn v bezvodém acetonitrilu (30 ml) a ke směsi byl přidán 4-N, N-dipropylaminofenol (200 mg) a následně pak tetrazol (420 mg). Po 16 hodinách míchání při 25°C byl k reakční směsi přidán 70% t-butylhydroperoxid (0,3 ml). Po 15 minutách byla reakční směs zpracována a surový produkt byl purifikován chromatografií na sloupci oxidu křemičitého s použitím (nejprve EtOAc a následně EtOAc/MeOH 97:3) jako eluční směsi. Bylo získáno 0,85 g produktu.

(Methyl)(4-N, N-dipropylamonifenyl) (5'-deoxy-glycylaminocytidyl-3') fosfát (směs s izomerem 3') (sloučenina 11) byl připraven následovně.

Sloučenina chráněná bis-karbobenzyloxylovou skupinou (sloučenina 10, 0,85 g) byla rozpuštěna v ethanolu (30 ml) a cyklohexenu (15 ml). K reakční směsi bylo přidáno Pd-C (400 mg) a směs byla vařena za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Po filtraci byl roztok zakoncentrován a vzniklá látka ve formě gumy byla purifikována chromatografií na sloupci oxidu křemičitého s použitím ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, v poměru 95:5, a poté $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ v

poměru 5:1 a nakonec 100% MeOH) jako elučních směsí. Bylo získáno 100 mg produktu.

(4-N, N-dipropylamonifenyl) (5'-deoxy-glycylamino-2'-O-tetrahydropyranylcytidyl-3') hydrogenfosfát (sloučenina 12) byl připraven následovně.

Fosfát (sloučenina 11, 100 mg) byl rozpuštěn v t-butylaminu (25 ml) a vařen za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu 8 hodin. Po zakoncentrování byl produkt purifikován pomocí HPLC (kolona s reverzní fází Magnum 20, eluční činidlo MeOH/0,1 M mravenčan amonný v poměru 60:40).

NMR (DMSO-d₆): (δ) 9,1 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 7,6 (d, 1H); 7,2 (m, 3H); 6,95 (d, 2H); 6,45 (d, 2H); 5,8 (d, 1H); 5,72 (d, 1H); 4,71 (m, 1H); 4,45 (m, 1H); 4,22 (m, 1H); 4,1 (m, 1H); 3,8 (t, 1H); 3,7-3,15 (m, 2H); 3,51 (s 2H); 3,35-3,5 (m, 1H); 3,0 (m, 4H); 1,8-1,2 (m, 10H); 0,8 (m, 6H).

Hmotnostní spektrum FABMS [MH+] 639

Referenční příklad 8

Lokalizace konjugátu A5B7 F(ab')₂-BP-RNáza na xenogenní štěpy nádorů tvořených LoVo buňkami

Konjugát myší A5B7 F(ab')₂-BP-RNáza připravený způsobem popsaným v Referenčním příkladu 4, byl označen volným radionuklidem ¹²⁵I za použití činidla IODOGEN™ (Pierce and Warriner (UK) Ltd., Chester England) postupem podle výrobce. Po označení radioaktivním jodem si konjugát uchoval >50% imunoreaktivitu, což bylo in vitro potvrzeno vazbou na nádorové buňky LoVo při použití postupu popsaného v Lindo a další, J. Immunol. Meth. 72, 77 až 89, 1984. Přibližně 10 μg konjugátu obsahujícího 10 μCi ¹²⁵I bylo intravenózně injikováno do bezthymových nahých myší (nu/nu:Alpk [outbredně křížených]) nesoucích xenogenní štěpy nádorů tvořené LoVo buňkami (7 dní předem bylo myším

subkutánně injikováno 1×10^7 rakovinných buněk LoVo). Po injikaci konjugátu byly v různých časových intervalech po injikaci vždycky usmrceny 3 myši a těmto myším byly odebrány nádor, vzorek krve a množství dalších tkání. Tyto odebrané vzorky byly zváženy a jejich radioaktivita změřena na čítači gama pulzů. Distribuce konjugátu v nádoru a tkáních je znázorněna níže.

Lokalizace konjugátu A5B7 F(ab')₂-BP-RNáza v nádoru a různých tkáních

Tkáň	4 hodiny	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
Nádor	2,54	3,27	1,00	0,66	0,41
Krev	6,83	1,06	0,25	0,12	0,06
Játra	1,81	0,62	0,12	0,07	0,06
Ledviny	2,76	0,55	0,23	0,18	0,11
Plíce	2,85	0,28	0,15	0,09	0,08

Jednotky = % injikovaná dávka/ g tkáně; výsledky jsou průměrné hodnoty ze 3 myší

Získané výsledky zřetelně ukazují, že konjugát A5B7 F(ab')₂-BP-RNáza je specificky lokalizován na xenogenní štěpy LoVo buněk: Od 24 hodiny po aplikaci konjugátu bylo v nádoru více konjugátu/ g tkáně než ve kterékoliv jiné tkáni včetně krve. Množství konjugátu v nádoru bylo podobné množství naměřenému s konjugátem A5B7 F(ab')₂-GPG2 (Blakey a další, Br. J. Cancer 69, Dodatek XXI, strana 14, 1994). Bylo prokázáno, že toto množství konjugátu CPG2 použité v kombinaci s mustard-neaktivním prekurzorem účinné látky vede k regresí nádorů a zpomalení jejich růstu v modelech využívajících xenogenní štěpy LoVo buněk (Blakey a další, Br. J. Cancer 69, Dodatek XXI, strana 14, 1994; Blakey a

01.10.97

další, Proceedings of the American Association for Cancer Research 35, strana 507, 1994).

Referenční příklad 9

Syntéza kyseliny Hippuryl-L-Glutamové

Dibenzyl ester kyseliny hippuryl-L-glutamové (sloučenina 3) (2,06 g, 4,2 mmol) a 30% Pd/uhlík (50% vlhkost) (0,77 g) v THF byly míchány po dobu 1,5 hodiny ve vodíkové atmosféře. Směs byla zfiltrována přes Celite™ a filtrát byl odpařen do sucha. Rozetřením s diethyl etherem vznikl požadovaný konečný produkt ve formě bílé krystalické pevné látky o hmotnosti 1,02 g (78%). Teplota tání 169 až 171°C. 20D = -2,5°.

NMR DMSO d6: 12,3, 2H (široký); 8,7, 1H (t); 8,2, 1H (t); 7,2, 2H (m); 7,5, 3H (m); 4,3, 1H (m); 3,9, 2H (m); 2,3, 2H (t); 1,9, 2H (m).

Výchozí materiál sloučenina 3 se připraví následujícím způsobem. K roztoku kyseliny hippurové (0,90 g, 5x10⁻³ mol) a dibenzyl esteru kyseliny L-glutamové (2,50 g, 5x10⁻³ mol) v 35 ml DMF se přidá 1-hydroxybenzotriazol (0,73g, 5,5x10⁻³ mol), triethylamin (1,4 ml, 9,7x10⁻³ mol) a 1(3-dimethyl-aminopropyl) -3-ethylkarbodiimid hydrochlorid (1,05 g, 5,5x10⁻³ mol). Reakční směs se míchá přes noc za pokojové teploty, nalije se do 400 ml vody a extrahuje se dvakrát 100 ml ethyl acetátu. Spojené extrakty se promyjí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou, 2N HCl a vodou. Organická fáze se vysuší inkubací nad MgSO₄ a nechá se odpařit za vzniku požadovaného výchozího materiálu ve formě žlutého oleje.

Výtěžek činí 2,06g (84%); NMR DMSO d6 8,7 1H (t); 8,4 1H (d); 7,9 2H (m); 7,5 3H (m); 7,35 1OH (m); 5,15 2H (s); 5,05 2H (s); 4,4 1H (m); 3,9 2H (t); 2,0 4H (m)

Referenční příklad 10

Syntéza kyseliny hippuryl -L-asparagové

Dibenzyl ester hippuryl-L-asparagové kyseliny (1,28g, $2,7 \times 10^{-3}$ mol) se míchá ve vodíkové atmosféře po dobu 3 hodin v THF spolu s katalyzátorem tvořeným 0,51 g 30% Pd/uhlík (50% vlhkost). Reakční směs se přefiltruje přes Celite™ a filtrát se nechá do sucha odpařit. Rozmělněním v diethyletheru se připraví téměř čistě bílá krystalická látka. Výtěžek činí 0,62g (78%) látky s bodem tání 200 až 202°C a následujícími vlastnostmi 20D = + 7,9°; NMR DMSO d6 12,5 2H (široký); 8,7 1H (t); 8,2 1H (d); 7,7 2H (m); 7,5 3H (m); 4,6 1H (m); 3,9, 2H (d); 2,7 2H (m)

Výchozí materiál se připraví následujícím způsobem. K roztoku 0,90 g (5×10^{-3} mol) hippurové kyseliny a 2,31 g (5×10^{-3} mol) dibenzyl esteru kyseliny L-asparagové v 35 ml DMF se přidá 0,73 g ($5,5 \times 10^{-3}$ mol) 1-hydroxybenzotriazolu, 1,4 ml ($9,7 \times 10^{-3}$ mol) triethylaminu a 1,05 g ($5,5 \times 10^{-3}$ mol) hydrochloridu 1-(3-dimethyl-aminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu. Reakční směs se míchá 4 hodiny za pokojové teploty, pak se nalije do 450 ml vody a dvakrát se extrahuje 100 ml ethyl acetátu. Extrakt se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou, 2N HCl a vodou. Organická fáze se vysuší nad MgSO₄ a nechá se do sucha odpařit za vzniku požadovaného výchozího materiálu pro další postup ve formě žlutého oleje. Výtěžek činí 1,90 g (80%) látky s následujícími vlastnostmi NMR DMSO d6 8,7 1H (t); 8,45 1H, (d); 7,9 2H (m); 7,5 3H (m); 7,3 10H (m); 5,15 2H (s); 5,05 2H (s); 4,8 1H (m); 3,9 2H(m); 2,9 2H (m)

Referenční příklad 11:

Enzymatická aktivita rekombinantního HCPB při konverzi Hipp-Arg

Byla testována schopnost purifikovaného lidského CPB připraveného tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 20, konvertovat hippuryl-L-arginin (Hipp-Arg) na hippurovou kyselinu. Tento test byl vyhodnocován spektrofotometricky.

Konstanty K_m a k_{cat} pro nativní HCPB se stanoví měřením počáteční rychlosti konverze Hipp-Arg na hippurovou kyselinu při vlnové délce 254 nm a v rozsahu koncentrací Hipp-Arg 0,75 až 0,125 mM a při koncentraci enzymu CPB 1 $\mu\text{g/ml}$. Měření se provádí při teplotě 37°C v 0,25mM Tris-HCl pufru (pH 7,5). Celá reakční směs (1 ml) byla umístěna v kyvetě s optickou drahou 1 cm. Měření bylo prováděno pomocí spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2. Hodnoty K_m a V_{max} byly spočítány pomocí programu ENZFITTER™ (Biosoft™, Perkin Elmer). k_{cat} se spočítá z V_{max} vydělením koncentrací enzymu v reakční směsi.

Výsledky konverze Hipp-Arg lidským CPB byly:

$$K_m = 0,18 \text{ mM}$$

$$k_{cat} = 65 \text{ s}^{-1}$$

Uvedené výsledky ukazují, že rekombinantní HCPB je enzymaticky aktivní a je schopna štěpit amidovou vazbu v Hipp-Arg za uvolnění hippurové kyseliny.

Referenční příklad 12:

Syntéza naktivního prekurzoru účinné látky založeného na arginin-mustard sloučenině (viz obrázek 27)

(2S), 2-(3-{4-[bis-(2-chloroethyl)-amino]-fenoxykarbonyl}-propionyl-amino)-5-guanidino-pentanová kyselina (sloučenina 5c, obrázek 27)

Roztok 275 mg (0,44 mmol) benzyl esteru (2S), 2-(3-{4-[bis-(2-chloroethyl)-amino]-fenoxykarbonyl}-propionyl-amino)-5-(2-nitro)-guanidino-pentanové kyseliny (sloučenina 4c, obrázek 27) v 8 ml směsi ethyl acetát/MeOH (1:1, objemově) obsahující 10 % Pd/C (200 mg) se

hydrogenuje v Paarově přístroji při tlaku 0,5512 MPa (80 psi) po dobu 6 hodin. Po přefiltrování se organická fáze nechá odpařit. Výsledný olej se nechá rekrystalizovat pomocí CH_2Cl_2 s diethyleterem za vzniku 180 mg požadované sloučeniny 5c ve formě bílé pevné látky. Výtěžek činí 84 % látky s vlastnostmi

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): 1,55 až 1,7 (m. 3H); 1,8 až 1,9 (m. 1H); 2,6 až 2,7 (m. 2H); 2,75 až 2,85 (m. 1H); 2,9 až 2,95 (m. 1H); 3,1 až 3,2 (m. 2H); 3,6 až 3,7 (m. 4H); 3,7 až 3,8 (m. 4H); 4,3 (dd. 1H); 6,75 (dd. 2H); 6,95 (dd. 2H).

Ms (ESI): 512 až 514 (MNa)+

Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4\text{Cl}_2 \cdot 1,5 \text{ H}_2\text{O}$)

Vypočteno C: 47,91 H: 6,43 N: 13,97

Nalezeno C: 47,7 H: 6,21 N: 14,26

Výchozí sloučenina 4c se připraví následujícím způsobem. K 664 mg (1 mmol) roztoku benzyl esteru (2S),2-amino-5-(2-nitro)-guanidino-pentanové kyseliny (sloučenina 2c) v 10 ml CHCl_3 se přidá 120 mg (2 mmol) dihydrofuran-2,5-dionu (sloučenina 1). Poté se po kapkách přidá 202 mg (2 mmol) triethylaminu a celá reakční směs se 2 hodiny míchá za pokojové teploty.

Poté se nechá odpařit rozpouštědlo a surový zbytek se rozpustí ve vodě. Pomocí 2N HCl se pH nastaví na hodnotu 2,5. Poté se pomocí ethyl acetátu extrahuje vodní fáze a organická fáze se promyje slanou vodou, vysuší nad MgSO_4 a nechá se odpařit za vzniku benzyl esteru (2S),2-(3-karboxypropionylamino)-5-(2-nitro)-guanidino-pentanové kyseliny (sloučeniny 3c). Výsledná pevná látka se rozetře diethyletherem a přefiltruje. Výtěžek činí 280 mg (68 %).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): 1,52 až 1,68 (m. 2H); 1,7 až 1,8 (m. 1H); 1,85 až 1,95 (m. 1H); 2,45 až 2,7 (m. 4H); 3,15 až 3,3 (m. 2H); 4,5 (m. 1 H); 5,15 (dd. 2H); 7,25 až 7,4 (m. 5H)

Ms (ESI): 432 [MNa]⁺

K suspenzi 204 mg sloučeniny 3c (0,5 mmol) v 5 ml CHCl₃, se přidá 135 mg 4-(bis(2-chloroethyl)amino)-fenol (sloučenina 6, 0,5 mmol), 19 mg EDCI (0,5mmol) a DMAP (18 mg: 0,75 mmol). Reakční směs 6 hodin míchá za pokojové teploty a poté se odpaří rozpouštědlo. Zbytek se rozdělí mezi ethyl acetát a vodu a vodní fáze se 2N HCl okyselí na pH = 3. Po extrakci ethyl acetátem se organická fáze promyje solným roztokem, vysuší nad MgSO₄ a nechá se odpařit. Zbytek se přečistí "flash" chromatografií. Jako eluční činidlo se použije směs CH₂Cl₂/MeOH (95:5 objemově). Výsledkem je 281 mg požadované výchozí látky 4c ve formě bílé pěny, výtěžek činí 90 %.

Vlastnosti sloučeniny 4c: 1 HNMR (CD₃OD): 1,55 až 1,7 (m, 2H); 1,7 až 1,8 (m, 1 H); 1,85 až 1,95 (m, 1H); 2,55 až 2,75 (m, 2H); 2,8 až 2,9 (m, 2H); 3,15 až 3,25 (m, 2H); 3,6 až 3,7 (m, 4H); 3,7 až 3,8 (m, 4H); 4,5 (dd, 1 H); 5,15 (dd, 2H); 6,7 (d, 2H); 6,95 (d, 2H); 7,32 (m, 5H)

Ms (ESI): 647 až 649 [MNa]⁺

Referenční příklad 13

Syntéza mono-{4-[N,N-bis (2-chloroethyl) amino]-fenyl} esteru kyseliny jantarové (nebo rovněž "intermediátu")

K suspenzi 225mg (2,25 mmol) anhydridu kyseliny jantarové v 10 ml CHCl₃, se za stálého míchání přidá 203mg (0,75 mmol) 4-[N,N-bis-(2-chloroethyl)-amino]fenol (sloučeniny 6, obrázek 27) a poté 75 mg triethylaminu (0,75 mmol). Reakční směs se míchá přes noc poté se nechá rozpouštědlo odpařit.

Surový zbytek se rozpustí ve směsi rozpouštědel EtOAc/Et₂O/H₂O a za stálého míchání se nastaví pH na 3. Organická fáze se promyje vodou a solným roztokem a poté se vysuší nad MgSO₄ a nechá se odpařit. Výsledná olejovitá

01.10.97

kapalina se překrytalizuje ze systému Et₂O/hexan. Výsledná bílá pevná látka se přefiltruje a vysuší se ve vakuu za vzniku 210 mg (83% výtěžek) požadovaného konečného produktu. Bod tání činí 98 až 100°C.

Ms (ESI): 356 až 358 [MNa]⁺

¹H NMR (CDCl₃): 2,8 (dd, 2H); 2,9 (dd, 2H); 3,65 (dd, 4H); 3,75 (dd, 4H); 6,65 (d, 2H); 7,0 (d, 2H)

Anal. (C₁₄H₁₇Cl₂O₄N 0,2 H₂O)

Vypočteno % C: 49,78 H: 5,19 N: 4,15

Nalezeno % C: 49,9 H: 5,3 N: 4,2

Referenční příklad 14

Klonování lidské pankreatické karboxypeptidázy B (HCPB)

Byly použity standardní molekulárně biologické techniky jako například štěpení restrikčními enzymy, ligace, kinasové reakce defosforylace, polymerázová řetězová reakce (PCR), transformace bakterií, gelová elektroforéza, příprava pufrů a DNA syntéza, purifikace a izolace v takovém uspořádání, jaké bylo popsáno v Maniatis a další. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual: druhé vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York nebo byly použity techniky a způsoby doporučené výrobcí konkrétních produktů. Nejčastěji byly enzymy zakoupeny u firmy New England BioLabs, nicméně mohou být použity i jiní dodavatelé a ekvivalentní postupy. Oligonukleotidy byly nasyntetizovány pomocí DNA syntetizéru Applied Biosystems 380A z 5' dimethoxytritylovou skupinou chráněných nučleosid-2- kvanoethyl-N,N'- diisopropyl-fosfoamidů a chráněných nukleosidů navázaných na skleněnou podporu s kontrolovanou velikostí pórů v 0,2 μmolárním měřítku. Při této syntéze bylo postupováno podle protokolů dodaných firmou Applied Biosystems Inc.

Kódující sekvence pro-proteinu lidskou pankreatickou karboxypeptidázou B byla získána z lidské pankreatické cDNA knihovny ve vektoru λ gt10 (Clontech, Lidská pankreatická 3' STRETCH cDNA, HL 1163a) pomocí PCR. Poté byla klonována do plazmidu pBluescriptTM II KS+ (Stratagene).

Typicky se smíchá alikvot cDNA knihovny (5 μ l při titru $> 10^8$ pfu/ml) se 100 pmolárním množstvím dvou oligonukleotidových primerů BPT1 a BPB 1, (podle Sekvence id. č.: 46 a Sekvence id.č.: 47), s deoxynukleotidtrifosfáty do celkové koncentrace 200 μ M, reakčním pufrům pro Taq polymerázu a 2,5 U Taq polymerázy do celkového objemu 100 μ l. Reakční směs se zahřeje na 94°C na 10 minut ještě před přidáním Taq polymerázy. Inkubační podmínky pro PCR reakci jsou následující: 30 cyklů 94°C na 1,5 minuty, 50°C na 2 minuty a 72°C na 2 minuty. Po těchto třiceti cyklech se ještě reakční směs 9,9 minut inkubuje při 72°C.

Oligonukleotidové primery byly navrženy tak, aby primer BPT1 (Sekvence id. č.: 46) umístěný mezi začátkem sekvence pre-proteinu a začátkem sekvence pro-proteinu, umožňoval extenzi genu ve směru 5' \rightarrow 3' a primer BPB1 (Sekvence id. č.: 47) umožňoval PCR extensigenu v opačném směru, viz obrázek 18. Primery BPT1 a BPB I byly rovněž navrženy tak, že zavádějí do nově vzniklé DNA unikátní restrikční místa pro enzymy SacI a XhoI.

Elektroforézou na agarózovém gelu byl analyzován alikvot PCR produktu, přičemž byla zjišťována správná velikost DNA (1250 bp). Výsledný produkt obsahoval převážně DNA o správné velikosti. Zbylý produkt reakce byl přečištěn a zbaven přebytečných reagentů pomocí mikrokonzentrátoru CentriconTM 100 (Amicon). Poté se provede DNA izolace pomocí precipitace ethanolem a acetátem sodným, centrifugací precipitátu, vakuovým sušením a resuspenzí v destilované vodě. Izolovaná DNA se poté podrobí

restrikčnímu štěpení enzymy SacI a XhoI. Elektroforetický proužek o správné velikosti (přibližně 1250 bp) se vyřízne, přečistí a izoluje pomocí systému glass-milk (Geneclean™, Stratec Scientific, nebo jiného podobného produktu).

Dvouvláknová DNA z vektoru pBluescript™ II KS+ (Stratagene) se štěpí restrikčním enzymem SacI a produkt se defosforyluje střevní telecí alkalickou fosfatázou, čímž se odstraní 5'koncové fosforylové skupiny a redukuje se transformační pozadí vzniklé re-ligací. DNA produkt se zbaví zbytků po enzymatické reakci pomocí systému glass-milk a poté se restrikčně štěpí enzymem XhoI. DNA o správné velikosti (přibližně 2850 bp) se přečistí pomocí elektroforézy na agarovém gelu, vyříznutím správného proužku a použitím systému glass-milk (Geneclean™, Stratec Scientific, nebo jiného podobného produktu).

Pomocí elektroforézy na agarovém gelu se zkontroluje čistota a odhadne koncentrace alikvotů purifikované a restrikčně štěpené DNA porovnáním se známými standardy. Tyto odhady se použijí při přípravě ligační směsi pro klonování genu HCPB do vektoru, přičemž se použije molární poměr vektoru ku inzertu přibližně 1 ku 2,5 (1pBluescript™II KS+ ku 2,5 HCPB PCR produkt). Výsledná koncentrace DNA v reakční směsi je přibližně 2,5 ng/μl v přítomnosti T4 DNA ligázy a 1 mM ATP a enzymového pufru.

Po této ligační reakci se směs DNA použije k transformaci E.coli kmene DH5α (Gibco-BRL, kompetentní buňky s maximálním výěžkem). Alikvoty se vysejí na plotny s L-agarovým živným médiem obsahujícím 100μg/ml ampicillinu jakožto selekčního činidla. Plotny se inkubují přes noc při teplotě 37 °C. Kolonie obsahující plazmidy s požadovaným inzertem se identifikují hybridizací.

Bylo odebráno přibližně 200 kolonií a vyseto na dvojité sterilní nitrocelulózové filtry (Schleicher a

Schull). Tyto filtry byly ještě předtím navlhčeny na plotnách s L-agarem obsahujícím 100 µg/ml ampicillinu jakožto selekčního činidla pro vektor. Plotny se inkubují přes noc při teplotě 37°C. Jeden z filtrů se uschová při teplotě 4°C jakožto zdroj živých buněk pro tvorbu kolonií, zatímco druhý filtr je denaturován a DNA z jednotlivých kolonií fixována na nitrocelulózový filtr. Nitrocelulózový filtr se vyjme z agarové plotny a je postupně inkubován na filtračních papírech Whatman™ nasycených:

1. 10% SDS, 2 minuty
2. 0,5M NaOH, 1,5M NaCl, 7 minut
3. 0,5M NaOH. 1,5M NaCl, 4 minuty
4. 0,5M NaOH. 1,5M NaCl, 2 minuty
5. 0,5M Tris pH7,4, 1,5M NaCl, 2 minuty
6. 2xSSC (standard saline citrate, standardní fyziologický roztok pufrovaný citrátem), 2 minuty

Membrána se poté umístí na filtrační papír Whatman™ nasycený 10xSSC a denaturovaná DNA se kovalentně naváže na nitro-celulózu pomocí ultrafialového záření (pomocí přístroje Uv crosslinker XL-1500 Spectrolinker™). Filtry se nechají vyschnout za pokojové teploty a poté se pre-hybridizují při teplotě 60°C po dobu jedné hodiny v roztoku 6xSSC za mírného míchání (například hybridizér Techne HB-1D). Pre-hybridizace na filtru zablokuje nespecifická vazebná místa pro DNA.

Kolonie obsahující požadovaný DNA inzert byly identifikovány pomocí hybridizace se sondou DNA značenou radionuklidem ³²P. Tato sonda byla připravena z PCR produktu genu HCPB z pankreatické c DNA knihovny (viz výše).

Přibližně 50ng DNA bylo označeno 50 μ Ci ³²P-dCTP (~3000Ci/mmol) pomocí T7 DNA polymerázy v celkovém objemu 50 μ l (souprava Pharmacia T7 Quickprime).

Reakce probíhala 15 minut při teplotě 37°C. Značená sonda se poté zahřeje na teplotu 95°C na 2 minuty, čímž se denaturuje dvouvláknová DNA. Poté se okamžitě přidá k 10 ml 6xSSC o teplotě 60°C. Tímto roztokem se zamění pre-hybridizační roztok na membránách. Inkubace za stálého mírného míchání pokračuje přibližně další 3 hodiny při teplotě 60°C. Po skončení hybridizace se vylije hybridizační roztok a filtry se dvakrát promyjí v 6xSSC (pokaždé 15 minut). Filtry se poté osuší pomocí filtračního papíru a zabalí do potravinářské fólie (SaranTM wrap nebo podobné). Hybridizace je vizualizována pomocí vhodného rentgenového filmu (na příklad Kodak XomatTM-AR5). Film je exponován přes noc za pokojové teploty. Kolonie obsahující požadovaný inzert jsou ty, které dávají na filmu nejtmařejší skvrny. V tomto případě přibližně 15 % kolonií vykazovalo pozitivní signál. Z nich bylo vybráno 12 kolonií pro další výběr. Tyto kolonie byly odebrány ze záložního filtru a vysety a udržovány na plotnách s L-agarem s obsahem 100 μ g/ml ampicillinu. Pro další pokusy byly tyto kolonie pěstovány v L-vývaru s přísadkou ampicillinu o stejné koncentraci.

Vybrané izoláty byly pomocí PCR zkontrolovány, jestli obsahují inzert o správné velikosti. Při této kontrole byly použity primery BPT1 a BPB1, (Sekvence id. č. 46 a Sekvence id. č. 47), a rovněž interní primery BPT2 (Sekvence id. č. 48) a BPB 1. BPT2 je navržen tak, aby hybridizoval s koncem sekvence pro-proteinu před počátkem zralého (mature) genu. Zároveň zavádí do PCR produktu restrikční místo pro XbaI.

Vybrané izoláty se odeberou z kultivačních médií, suspendují v 200 μ l destilované vody a zahřejí na 10 minut na teplotu 100°C v uzavřené mikrozkuhavce (EppendorfTM).

Poté se suspenze centrifuguje 10 minut v mikrocentrifuze, čímž se odstraní zbytky buněk. 1 μ l supernatantu se použije jako templát pro PCR skrining. V typickém provedení se 1 μ l supernatantu smísí s s 20 pmol oligonukleotidových primerů BPT1 a BPB1, nebo BPT2 a BPB 1, dNTP do celkové koncentrace 200 μ M, reakčním pufrem pro Taq polymerázu a 0.5 U Taq polymerázy. Celkový objem reakční směsi je 20 μ l. PCR byla provedena v 25 cyklech, z nichž každý zahrnoval 1,5 minutovou inkubaci při 94°C, 2 minutovou při 50°C a 2 minutovou při 72°C. Po těchto cyklech byla reakční směs ještě zahřáta na 72°C na 9,9 minuty.

Elektroforézou na agarózovém gelu byly v PCR produktech vyhledávány proužky DNA o správné velikosti (přibližně 1250 bp pro primery BPT1 a BPB1 a přibližně 900 bp pro primery BPT2 a BPB1, viz obrázek 18). Deset z dvanácti klonů poskytlo PCR produkty o správné velikosti. Šest z těchto produktů bylo vybráno pro produkci plazmidové DNA. Plazmidová DNA byla přečištěna pomocí soupravy Quiagen Maxi™ ze 100ml kultury, pěstované přes noc při teplotě 37°C v L-vývaru s přidávkem 100 μ g/ml ampicillinu. Plazmidová DNA byla poté sekvenována v oblasti PCR produktu pomocí sekvenační soupravy USB Sequenase™, která obsahuje DNA polymerázu bakteriofága T7. Každý z klonů byl sekvenován za pomoci 8 různých primerů, označených 676, 336, 337, 679, 677, 1280, 1279 a 1281 (Sekvence id. č. 48 až 55). Umístění primerů vzhledem k sekvenci HCPB je znázorněno na obrázek 19, přičemž primery 336, 1279, 676, 1280, 677 a 1281 jsou "dopředné" a primery 337 a 679 "zpětné".

Pět z těchto šesti klonů mělo identickou sekvenci (Sekvence id. č. 56) sestávající z 1263 bp mezi a včetně restrikčních míst SacI a XhoI. Tato sekvence byla použita pro další experimenty. Translace DNA do příslušného polypeptidu je znázorněna v Sekvence id. č. 57, přičemž číslování začíná počátkem maturovaného proteinu.

Aminokyselina označená -95 je počáteční aminokyselinou pravděpodobného pro-enzymu. V klonovaném PCR produktu je obsažena pouze část vedoucí sekreční sekvence (pre-sekvence).

Při srovnání s ostatními sekvencemi pro-proteinů savčích karboxypeptidáz typů A a B vykazuje získaná sekvence zbytek kyseliny asparagové v pozici 253, což přiřazuje tuto sekvenci mezi karboxypeptidázy skupiny B (viz aminokyseliny číslované 255, Catusus L. a další Biochem J., 287, 299 až 303, 1992). Nicméně cysteinový zbytek na pozici 135 v klonované cloned sekvenci není obsažen v publikovaných sekvencích lidské pankreatické karboxypeptidázy B, viz Yamamoto a další, Journal Biological Chemistry, 267, strana 2575 až 2581, 1992, kde vykazuje mezeru v sekvenci po aminokyselinovém zbytku č.244 ve srovnání s jinými savčími aminokyselinovými sekvencemi pro pankreatickou karboxypeptidázu B. Na obrázku 19 jsou rovněž znázorněny přibližné pozice zbytků kyseliny asparagové v aktivním místě enzymu a cysteinový zbytek na pozici 135 maturovaného enzymu.

Jeden z klonů byl 23. listopadu 1995 uložen u Národní sbírky průmyslových a mořských bakterií, 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Skotsko) pod registračním číslem NCIMB 40694. Plazmid z tohoto klonu je označován pICI1698.

Referenční příklad 15:

Exprese aktivního HCPB-(His)₆-c-Myc v E. coli

Gen pro aktivní (mature) protein byl z plazmidu pICI1698 převeden do plazmidového vektoru, který umožnil kontrolovanou sekreci proteinu do periplazmatického prostoru. Tento sekreční vektor vhodný pro kontrolovanou expresi v bakteriálním hostiteli MSD522 byl označen pICI266, byl uložen u Národní sbírky průmyslových a

mořských bakterií, 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Skotsko) a bylo mu uděleno registrační číslo NCIMB 40589.

Na obrázku 20 je znázorněna mapa plazmidu pICI266. Plazmid obsahuje geny pro rezistenci k tetracyklinu a jeho indukci (geny TetA a TetR), operátor AraB, promotorovou sekvenci pro expresi vloženého genu a gen AraC pro kontrolu exprese. Promotorová sekvence je následovaná vedoucí translační sekvencí, která usměrňuje neásledující polypeptid do periplazmy. Místo pro klonování genu obsahuje několik unikátních restričních míst, po kterých následuje sekvence terminátoru transkripce z fága T4. Na obrázku 21 je znázorněna sekvence DNA a vlastnosti této oblasti důležité pro klonování.

Pro klonování aktivní sekvence HCPB do vektoru pICI266 byla nejprve připravena pomocí PCR DNA pro HCPB. Přitom byly provedeny rovněž některé záměny v používaných kodónech na počátku genu pro aktivní HCPB, tak aby obsahoval kodóny vhodné pro E.coli. K C-konci enzymu byla rovněž připojena značka známá jako (His)₆-c-myc, která slouží ke snadné detekci a purifikaci výsledného produktu. Tato značka sestává z 6 histidinových zbytků, tripeptidu EPE a peptidu o sekvenci (EQKLISEEDL) z c-myc, který je rozpoznáván protilátkou 9E10 (viz Evan a další Mol. Cell. Biol. 5, 129 až 136, 1985). Tuto protilátku dodávají Cambridge Research Biochemicals a další výrobci protilátek. Nazávěr se na C-konec připojí asparagin. 6 histidinový zbytek umožňuje purifikaci exprimovaného proteinu na koloně s chelatovaným kovovým iontem (například Ni-NTA agaróza, Qiagen). PCR primery jsou rovněž využity pro vložení unikátních restričních míst 5' konec (FspI) a 3' konec (EcoRI) genu. Tím se zjednoduší vložení PCR produktu do expresivního vektoru. Sekvence těchto primerů (FSPTS1 a 6HIS9E10R1BS1) jsou uvedeny pod názvem Sekvence id. č. 58 a 59.

Pro přípravu modifikovaného genu pro klonování do pICI266 byla použita PCR. Tato reakce sestávala z 100 pmol primerů FSPTS 1 a 6HIS9E10R1BS1, přibližně 5 ng DNA z plazmidu pIC11698, mixu dNTP o celkové koncentraci 200 μ M, reakčního pufru pro Taq polymerázu a 2,5U Taq polymerázy v celkovém objemu 100 μ l. Směs se zahřeje na 94°C na 10 minut a pak se teprve přidá Taq polymeráza. Inkubační teploty pro PCR byly následující 1,5 minuty 94°C, 2 minuty 50°C a 2 minuty 72°C. Tento cyklus byl opakován 30. Na závěr byla reakční směs zahřáta na 9,9 minuty na teplotu 72°C. Alikvot PCR produktu byl analyzován elektroforézou na agarózovém gelu. Byla hledána DNA o správné velikosti (přibližně 1000 bp). Alikvot obsahoval převážně DNA o správné velikosti. Zbylý produkt reakce byl přečištěn a zbaven přebytečných reagensů pomocí mikrokoncentrátoru Centricon™ 100 (Amicon). Poté se provede DNA izolace pomocí precipitace ethanolem a acetátem sodným, centrifugací precipitátu, vakuovým sušením a resuspenzí v destilované vodě. Izolovaná DNA se poté podrobí restriktivnímu štěpení enzymy FspI a EcoRI. Elektroforetický proužek o správné velikosti (přibližně 1000 bp) se vyřízne, přečistí a izoluje pomocí systému glass-milk (Geneclean™, Stratec Scientific, nebo jiného podobného produktu).

Dvouvláknová DNA z plazmidu pICI266 připravená pomocí standardních technik (například pomocí kitů firmy Qiagen), se restriktivně štěpí enzymem KpnI. Je třeba velmi dbát na úplné rozštěpení. Po skončení reakce byl enzym inaktivován zahřátím na 65°C po dobu 10 minut a následovným ochlazením na ledu. 3' přesah byl poté enzymaticky odštěpen přidávkem T4 DNA polymerázy podle doporučení výrobce (New England BioLabs), t.j. v přítomnosti mixu dNTP při teplotě 16°C po 15 minutách. Enzym byl opět tepelně inaktivován

zahřátím na 70°C na 15 minut. Výsledná DNA byla zbavena zbytků reakční směsi pomocí systému glass-milk.

Alikvot byl použit pro odhad výtěžku elektroforézou na agarózovém gelu a zbytek byl štěpen restriktivním enzymem EcoRI. Opět byla věnována zvýšená pozornost úplnému proběhnutí reakce. DNA o správné velikosti (přibližně 5600 bp) byla purifikována z agarózového gelu pomocí systému glass-milk Geneclean™ (Strattec Scientific, nebo jiného podobného produktu). Ze vzorků naštěpené a purifikované DNA byly odebrány alikvoty, které byly použity pro odhadnutí koncentrace pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a porovnáním se známými standardy. Tento odhad byl použit při přípravě ligační směsi pro ligaci a klonování genu HCPB do vektoru, přičemž molární poměr mezi vektorem a inzertem byl 1:2,5 (1 pICI266 ku 2,5 HCPB PCR produktu). Výsledná koncentrace pro ligaci byla přibližně 2,5 ng/μl DNA v přítomnosti T4 DNA ligázy, 1mM ATP a enzymového pufru a za podmínek vhodných pro ligaci DNA s tupým koncem (FspI do místa KpnI zarovnaného T4 DNA polymerázou).

Po této ligační reakci se směs DNA použije k transformaci E.coli kmene DH5α (Gibco-BRL, kompetentní buňky s maximálním výěžkem). Alikvoty se vysejí na plotny s L-agarovým živným médiem obsahujícím 10 μg/ml tetracyklinu jako selekčního činidla. Plotny se inkubují přes noc při teplotě 37 °C. Kolonie obsahující plazmidy s požadovaným inzertem se identifikují hybridizací.

Bylo odebráno přibližně 350 kolonií a vyseto na dvojité sterilní nitrocelulózkové filtry (Schleicher a Schull). Tyto filtry byly ještě předtím navlhčeny na plotnách s L-agarem obsahujícím 10 μg/ml tetracyklinu jako selekčního činidla pro vektor. Plotny se inkubují přes noc při teplotě 37°C. Jeden z filtrů se uschová při teplotě 4°C jakožto zdroj živých buněk pro tvorbu kolonií, zatímco druhý filtr je denaturován a DNA z jednotlivých kolonií

fixována na nitrocelulózový filtr. Nitrocelulózový filtr se vyjme z agarové plotny a je postupně inkubován na filtračních papírech Whatman™ nasycených:

1. 10% SDS, 2 minuty
2. 0,5M NaOH, 1,5M NaCl, 7 minut
3. 0,5M NaOH. 1,5M NaCl, 4 minuty
4. 0,5M NaOH. 1,5M NaCl, 2 minuty
5. 0,5M Tris pH 7,4, 1,5M NaCl, 2 minuty
6. 2xSSC, 2 minuty

Membrána se poté umístí na filtrační papír Whatman™ nasycený 10xSSC a denaturovaná DNA se kovalentně naváže na nitro-celulózu pomocí ultrafialového záření (pomocí přístroje Uv crosslinker XL-1500 Spectrolinker™). Filtry se nechají vyschnout za pokojové teploty a poté se pre-hybridizují při teplotě 60°C po dobu jedné hodiny v roztoku 6xSSC za mírného míchání (například v hybridizéru Techne HB-1D). Pre-hybridizace na filtru zablokuje nespecifická vazebná místa pro DNA.

Kolonie obsahující požadovaný DNA inzert byly identifikovány pomocí hybridizace se sondou DNA značenou radionuklidem ³²P. Tato sonda byla připravena z PCR produktu genu HCPB z pankreatické cDNA knihovny (viz výše). Přibližně 50ng DNA bylo označeno 50μCi ³²P-dCTP (~3000Ci/mmol) pomocí T7 DNA polymerázy v celkovém objemu 50 μl (souprava Pharmacia T7 Quickprime). Reakce probíhala 15 minut při teplotě 37°C. Značená sonda se poté zahřeje na teplotu 95°C na 2 minuty, čímž se denaturuje dvouvláknová DNA. Poté se okamžitě přidá k 10 ml 6xSSC o teplotě 60°C a tento roztok se zamění za pre-hybridizační roztok na membránách.

Inkubace za stálého mírného míchání pokračuje přibližně další 3 hodiny při teplotě 60°C. Po skončení hybridizace se vylije hybridizační roztok a filtry se dvakrát promyjí v 6xSSC (pokaždé 15 minut). Filtry se poté osuší pomocí filtračního papíru a zabalí do potravinářské fólie (Saran™ wrap nebo podobné). Hybridizace je vizualizována pomocí vhodného rentgenového filmu (na příklad Kodak Xomat™-AR5). Film je exponován přes noc za pokojové teploty. Kolonie obsahující požadovaný inzert jsou ty, které dávají na filmu nejtmařejší skvrny. V tomto případě přibližně 50 % kolonií vykazovalo pozitivní signál. Z nich bylo vybráno 12 kolonií pro další výběr. Tyto kolonie byly odebrány ze záložního filtru a vysety a udržovány na plotnách s L-agarem k obsahem 10 µg/ml tetracyklinu. Pro další pokusy byly tyto kolonie pěstovány v L-vývaru k přidavkem tetracyklinu stejné koncentraci.

Vybrané izoláty byly pomocí PCR zkontrolovány, jestli obsahují inzert o správné velikosti. Při této kontrole byly použity primery FSPTS1 a 6HIS9E10R1BS1, (Sekvence id. č. 58 a 59), a rovněž interní primery BPB2 (Sekvence id. č. 51) a FSPT1. Primer BPB2 je navržen tak, aby hybridizoval v úseku zralého (mature) genu za vzniku přibližně 430 bp dlouhého fragmentu.

Vybrané kolonie se odeberou z kultivačních médií, suspendují v 200 µl destilované vody a vaří se 10 minut při teplotě 100°C v uzavřené mikrozkuhavce (Eppendorf™). Poté se suspenze centrifuguje 10 minut v mikrocentrifuze, čímž se odstraní zbytky buněk. 1 µl supernatantu se použije jako templát pro PCR skrínig. V typickém provedení se 1 µl supernatantu smísí s 20 pmol oligonukleotidových primerů FSPT1 a 6HIS9E10R1BS1, nebo FSPT1 a BPB 2, směsí dNTP do celkové koncetrace 200 µM, reakčním pufrem pro Taq polymerázu a 0,5 U Taq polymerázy. Celkový objem reakční směsi je 20 µl. PCR byla provedena v 25 cyklech, z nichž

každý zahrnoval 1,5 minutovou inkubaci při 94°C, 2 minutovou při 50°C a 2 minutovou při 72°C. Po těchto cyklech byla reakční směs ještě zahřáta na 72°C na 9,9 minuty.

Elektroforézou na agarózovém gelu byly v PCR produktech vyhledávány proužky DNA o správné velikosti (přibližně 1000 bp pro primery FSPT1 a 6HIS9E10R1BS1 a přibližně 430 bp pro primery FSPT1 a BPB 2, viz obrázek 18). Všechna dvanáct klonů poskytlo PCR produkty o správné velikosti. Šest z těchto klonů bylo vybráno pro produkci plazmidové DNA. Plazmidová DNA byla přečištěna pomocí soupravy Quiagen Maxi™ ze 100ml kultury, pěstované přes noc při teplotě 37°C v L-vývaru s přidávkem 10µg/ml tetracyklinu. Plazmidová DNA byla poté sekvenována v oblasti PCR produktu pomocí sekvenační soupravy USB Sequenase™, která obsahuje DNA polymerázu bakteriofága T7. Alternativně byly fragmenty DNA sekvenovány pomocí automatického sekvenátoru pomocí vybavení ABI. Každý z klonů byl sekvenován za pomoci několika různých primerů. Tři z těchto primerů (1504, 1590 a 1731) byly použity ke kontrole spojovacích oblastí mezi expresivním vektorem a vloženým genem (Sekvence id. č. 60, 61 a 62). Tyto primery rovněž poskytly data o počátku a konci vloženého inzertu. Další primery (679, 677, 1802 a 1280, Sekvence id. č. 51, 52 a 53) byly použity pro potvrzení zbytku sekvence vloženého genu. Tento plazmid obsahující modifikovaný gen pro aktivní (mature) HCBP byl označen jako pICI1712. Potvrzená sekvence klonovaného genu s vyznačenou translací od počátku PelB až k značce (His)6-c-myc je znázorněna v Sekvence id. č. 64, přičemž číslování DNA začíná prvním kodónem PelB a číslování aminokyselin začíná první aminokyselinou aktivního HCBP.

Kontrolované exprese modifikovaného HCPB bylo dosaženo transformací kompetentních kmenů E.coli plazmidem

pIC11712 v přítomnosti chloridu vápenatého. Mezi těmito kmeny byly i takové, které nejsou schopny využívat jako jediný zdroj uhlíku arabinózu. Tyto kmeny mají chromozómovou delecí v místě operonu Ara.

Výhodným kmenem je kmen MSD213 (kmen MC 1000 podle Casadabana a dalších, Journal Molecular Biology, v138,179 až 208, 1980), který má genotyp F-Ara Δ (Ara-Leu) Δ LacX74 GalV GalK StrR. Jiný výhodný kmen MSDS2S (nebo kmen MC1061) má genotyp AraD139 Δ (Ara Leu)7697 Δ Lac74 GalU HsdR RpsL. Kmeny E.coli vhodné pro kontrolovanou expresi genů z promotoru AraB v plazmidu pIC1266 s podobným genotypem mohou být získány z Genové banky E.coli, Biologické oddělení Yalesské univerzity, CT, USA. Selektce transformantů probíhala na L-agarovém živném médiu s obsahem 10 μ g/ml tetracyklinu při teplotě 37°C přes noc. Jednotlivé kolonie byly vypíchnuty z ploten a rozetřeny a udržovány na stejném médiu. Vlastní kultivace pak probíhala v živném vývaru s obsahem 10 μ g/ml tetracyklinu.

Všechny expresivní kmeny transformované plazmidem pIC11712 byly oštrřovány stejným způsobem a testovány na expresi klonovaného genu pro HCPB.

1. Jednotlivé kolonie se použijí k inokulaci 10 ml živného vývaru (L-broth) s obsahem 10 μ g/ml tetracyklinu 25 ml kultivační nadobě Universal. Za stálého třepání se kultury inkubují přes noc při teplotě 37°C.
2. 75 ml živného vývaru s obsahem 10 μ g/ml tetracyklinu se předehřeje na 37°C v 250 ml kónické baňce a inokuluje se 0,75 ml (objemově 1%) přes noc pěstovanou kulturou. Inkubace pokračuje při teplotě 37°C za stálého třepání. Růst bakterií se sleduje pomocí absorbance při vlnové délce 540nm. Indukci

01.10.97

exprese klonovaného proteinu je třeba provést během exponenciálního růstu kultury, to znamená při hodnotách O.D.₅₄₀ v rozmezí 0,4 a 0,6. Kultury dosáhnou těchto hodnot obecně po 90 až 150 minutách po inokulaci.

3. Poté co buňky dosáhnou požadované hustoty, kultura se nechá ochladit na přibližně 30°C třicetiminutovým stáním za pokojové teploty. Poté se přidá arabinóza do konečné koncentrace 1 % (w/v) a pokračuje se v inkubaci při teplotě 30°C za stálého třepání po dobu 4 až 6 hodin.
4. Po této inkubaci se změří konečná optická hustota a buňky se zcentrifugují. Měření optické hustoty slouží pro výpočet objemu vzorkového pufru pro proteinovou elektroforézu na akrylamidovém gelu (Laemmlí) nutného pro resuspendování buněčné pelety. Pro O.D. nižší než 1 se použije 10 μ l pufru na každých 0,1 O.D., pro hustoty vyšší než 1 se použije objem 15 μ l na každých 0,1 O.D. Vzorkový pufur podle Laemmlího obsahuje 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 2% β -merkaptoethanol, 10% glycerol a 0,1 % Bromfenolovou modř.
5. Vzorky se resuspendují a denaturují 10 minutovým povařením při 100°C a poté se zcentrifugují, čímž se oddělí viskózní buněčné zbytky od supernatantu.

Vzorky obyčejně o objemu 20 μ l supernatantu se nanesou na 17% SDS akrylamidové gely kde se elektroforeticky separují proteiny. Většinou se stejné vzorky nanášejí na dva gely, takže jeden lze použít k detekci všech proteinů barvením Coomassie modří nebo podobným barvivem a druhý se použije k detekci specifických produktů pomocí Western blotové analýzy.

Proteiny z elektroforetického gelu se pro provedení Western-blotu převedou na nylonovou membránu (Problot™).

například od Applied Biosystems) pomocí polosuchého blotovacího zařízení (Bio-rad nebo podobného). Před a během provádění blotu se membrána stále udržuje vlhká. Po přenosu proteinů na membránu se tato blokuje 5% roztokem odtučněného mléka (Marvel™ nebo podobného) ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS). Blokování probíhá 5 hodin za pokojové teploty a za stálého jemného míchání. Membrána se poté 3 krát promyje za pokojové teploty za stálého jemného míchání. Každé promývání trvá 5 minut a používá se k němu PBS s obsahem 0,05 % Tweenu 20.

Promyté membrány se inkubují s roztokem primární myší monoklonální protilátky 9E 10 proti c-myc peptidu (viz výše) ve vhodném zředění (typicky 1:10.000 pro ascity nebo 1:40 pro supernatanty z hybridomů) v PBS s obsahem 0,05 % Tweenu 20 a 0,5 % nízkotučného mléka. Inkubace s protilátkou probíhá přes noc za pokojové teploty a za stálého jemného míchání. Poté se membrána za pokojové teploty a za stálého jemného míchání 3 krát 5 minut promyje v PBS s obsahem 0,05 % Tweenu 20. Promyté membrány se inkubují s roztokem sekundární anti-myší (obvykle kozí) protilátky značené křenovou peroxidázou (například A4416, Sigma) ve vhodném zředění (typicky 1:10.000) v PBS s obsahem 0,05 % Tweenu 20 a 0,5 % nízkotučného mléka. Inkubace s protilátkou probíhá alespoň 3 hodiny za pokojové teploty a za stálého jemného míchání. Poté se opět membrána za pokojové teploty a za stálého jemného míchání 3 krát alespoň 10 minut promyje v PBS s obsahem 0,05 % Tweenu 20. Po promytí se membrána dále zpracovává technikou Amersham ECL™ pro detekci Western blotů a výsledek je zobrazen pomocí filmu Amersham Hyperfilm™ ECL. První expozice je zpravidla 30 sekund a další se upraví tak, aby na výsledném obrázku byly jasně patrné proužky exprimovaných proteinů. Může být rovněž použit jiný podobný systém se srovnatelnou citlivostí pro detekci proteinů na membránách.

Dobrá exprese klonovaného značeného HCPB v plazmidu pICI266 (pICI1712) byla prokázána v E.coli kmenů MSD213 a MSD525 barvením Coomassie modří. Tyto kmeny vykazovaly nový proteinový proužek o velikosti přibližně 35 kDa vzhledem ke kmeni se samotným vektorem (pICI266). Proužek o shodné velikosti dával rovněž silný signál ve Western blotu detekujícím peptidovou značku c-myc.

Referenční příklad 16:

Exprese aktivního HCPB v E. coli

Způsob klonování a exprese aktivního HCPB v E.coli je velmi podobný způsobu popsanému v referenčním příkladu 15. Opět se použije plazmid pICI266 jako klonovací vektor, nicméně, v tomto případě se jako výchozí materiál pro PCR amplifikaci genu aktivního HCPB použije plazmid pICI1712, obsahující značený gen v expresivním vektoru. Dva oligonukleotidy označené 2264 a 2265 (Sekvence id. č.: 65 a 66) se použijí v PCR reakci místo primerů FSPTS1 a 6HIS9E10R1BS1. Reakční podmínky jsou podobné jako v referenčním příkladu 15, pouze se použije DNA z plazmidu pICI1712 místo pICI1698.

První oligonukleotidový primer 2264 byl navržen tak, že hybridizuje s plazmidem pICI1712 a zároveň do něj zavádí restriční místo pro enzym NcoI ve vedoucí sekvenci PelB a dále pokračuje v počátku vloženého genu HCPB (DNA báze 36 až 66 včetně v Sekvenci id. č.: 64). Druhý primer, označený 2265 byl navržen tak, že hybridizuje s koncem genu pro aktivní HCPB před začátkem sekvence pro značku (His)₆-c-myc (je komplementární k DNA bazím 965 až 987 včetně v Sekvenci id. č.: 64) a zároveň zavádí na konec genu kodóny pro terminaci translace (komplementární k TAA TAA) a restriční místo pro enzym EcoRI (GAATTC). Tento oligonukleotid hybridizuje zpět do genu tak, aby PCR poskytovala sekvenci genu pro aktivní HCPB.

Alikvot PCR produktu byl testován na přítomnost DNA o správné velikosti size (přibližně 970 bp) elektroforézou na agarózovém gelu. Vzorek obsahoval převážně DNA o správné velikosti. Zbytek PCR produktu byl zbaven konaminantů z reakční směsi a přečištěn způsobem obdobným referenčnímu příkladu 15. Izolovaná DNA byla restriktivně štěpena enzymy NcoI a EcoRI. DNA o správné velikosti (přibližně 940 bp) byla purifikována podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Dvouvláknová DNA z plazmidu pICI266, připravená podobným způsobem jako referenčním příkladu 15, byla restriktivně štěpena enzymy NcoI a EcoRI a to velmi pečlivě, tak aby štěpení proběhlo úplně. DNA o správné velikosti (přibližně 5600 bp) byla purifikována podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Alikvoty obou štěpených a purifikovaných vzorků DNA byly pomocí elektroforézy na agarózovém gelu otestovány na svoji čistotu a byla odhadnuta jejich koncentrace porovnáním se známými standardy. Tento odhad byl použit při přípravě ligační směsi pro klonování genu HCPB do plazmidu pICI266 podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Po ligační reakci byla směs DNA použita k transformaci E.coli kmene DH5 α . Jednotlivé kolonie byly vypíchnuty párátkem a otestovány hybridizací a podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Šest z těchto klonů bylo vybráno pro přípravu plazmidové DNA. Tyto klony byly poté sekvenovány v oblasti PCR produktu způsobem podobným referenčnímu příkladu 15. Klony byly sekvenovány pomocí šesti různých oligonukleotidových primerů označených 1504, 1802, 679, 1280, 677 a 1731 (Sekvence id. č.: 60, 63, 51, 53, 52 a 62). Ze sekvenačních výsledků byl vybrán klon obsahující

plazmid s požadovaným genem pro aktivní HCPB. Tento klon byl označen pICI1736.

Potvrzená sekvence klonovaného genu s vyznačenou sekvencí aminokyselin začínající sekvencí PelB až po sekvenci restriční místa pro EcoRI je popsána v Sekvence id. č.: 67, přičemž číslování DNA začíná na prvním kodónem PelB a aminokyselinová sekvence je číslována od počátku aktivního HCPB.

Kontrolované exprese aktivního HCPB bylo dosaženo transformací kompetentních kmenů E.coli plazmidem pICI1736 v přítomnosti chloridu vápenatého podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Všechny transformované expresivní kmeny obsahující pICI 1736 byly testovány způsobem podobným referenčnímu příkladu 15 na expresi klonovaného genu pro HCPB.

Nicméně v tomto případě nemohla být použita myší monoklonální protilátka se specifitou k c-myc, protože aktivní HCPB nemá na C-konci peptidovou značku. Proto byla jako primární protilátka použita králičí protilátka proti hovězí karboxypeptidáze A (Biogenesis), která reaguje s purifikovanou lidskou pankreatickou karboxypeptidázou B. Jako sekundární protilátka byla použita kozí-anti-králičí IgG značená křenovou peroxidázou (Sigma A9169 nebo podobná).

Expese klonovaného aktivního HCPB v plazmidu pICI266 (pICI1736) byla demonstrována v E.coli kmenů MSD2 13 a MSDS2S v proteinových gelech barvených Coomassie modří. V těchto gelech byl patrný nový proteinový proužek o velikosti přibližně 34 kDa vzhledem ke klonům se samotným vektorem pICI266.

Proužek o shodné velikosti dával rovněž silný signál ve Western blotu detekujícím hovězí karboxypeptidázu A.

Referenční příklad 17: Expresse aktivního (maturovaného) HCPB buňkami COS

Gen kódující preHCPB byl vytvořen pomocí PCR z plazmidu pIC11698 (viz referenční příklad 14). Reakční směs pro PCR obsahovala jako templát plazmid pIC11689 (10 μ g) a 100 pmol každého z primerů Sekvence id. č.: 34 a 35 ve 100 μ l pufru obsahujícím 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,125mM každého z nukleotidtrifosfátů a 2,5 U Taq DNA polymerázy (Amplitaq, Perkin-Elmer Cetus). Reakční směs byla převsrtvena minerálním olejem (100 μ l). Reakce probíhala za těchto teplot: 94°C na 1 minutu, 53°C na 1 minutu a 72°C na 2,5 minuty. Tyto teploty se opakovaly v celkem 25 cyklech. Na závěr byla celá reakční směs ještě 10 minut inkubována při 72°C.

PCR produkt o velikosti 985bp byl izolován elektroforézou na 1 % agarózovém gelu (agaróza typu I. Sigma A-6013), proužek vyříznut a DNA přečištěna pomocí soupravy GeneClean™ (GeneClean II kit, Stratech Scientific Ltd. nebo Bio 101 Inc.). Souprava GeneClean kit obsahuje 1) 6M iodid sodný, 2) koncentrovaný roztok chloridu sodného, Tris a EDTA pro přípravu promývacích roztoků chlorid sodný/ethanol/voda, 3) Glassmilk™ - 1,5 ml lahvička obsahující 1,25 ml suspenze speciální silikátové matrice ve vodě. Tato technika purifikace DNA je založena na způsobu Vogelsteina a Gillespie, publikovaném v Proceedings National Academy Sciences USA (1979) Vol 76, 615. Popřípadě může být použit libovolný jiný způsob popsáný v "Molecular Cloning - a laboratory manual", Sambrook, Fritsch a Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Stručný popis techniky GeneClean: K jednomu dílu agaru vyříznutému z gelu se přidají tři díly roztoku iodidu sodného ze soupravy. Agaróza se roztaví zahřátím směsi na 55°C (10 minut). Pak se přidá silikátová matrice Glassmilk™ (5-10 μ l). Směs se dobře promíchá a nechá se 10 minut stát za pokojové teploty. Matrice glassmilk se stočí a 3 krát

promyje 500 μ l promývacího pufru NEW WASH ze soupravy. Promývací pufr se odstraní a matrice Glassmilk se nechá oschnout na vzduchu. DNA se uvolní inkubací vysušené matrice Glassmilk s 5 až 10 μ l vody při teplotě 55°C po dobu 5 až 10 minut. Centrifugací se získá vodný supernatant s obsahem eluované DNA. Tento eluční krok se může opakovat a supernatanty se mohou spojit.

Gen preHCPB se 1 hodinu štěpí restričními enzymy EcoRI a HindIII při teplotě 37°C v 100 μ reakční směsi, která obsahuje 100mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 0,025% Triton X-100 a 25U každého z enzymů HindIII a EcoRI (New England Biolabs). Štěpený fragment se přečistí elektroforézou na agarózovém gelu a na matrici GeneClean tak, jak bylo popsáno výše pro neštěpený fragment a poté se klonuje do plazmidu pBluescript™ (Stratagene Cloning Systems).

DNA z plazmidu pBluescript™ KS+ (5 μ g) se úplně naštěpí restričními enzymy EcoRI a HindIII (25 U každého) ve 100 μ l reakční směsi tak, jak bylo popsáno výše. K naštěpenému plazmidu se přidá telecí střevní alkalická fosfatáza (1 μ l, New England Biolabs, 10 U/ μ l) čímž se odstraní 5' fosfátové konce. Reakční směs se inkubuje při teplotě 37°C dalších 30 minut. Fosfatáza byla inaktivována 10 minutovým zahřátím na 70°C. Plazmid naštěpený restričními enzymy EcoRI-HindIII se purifikuje z agarózového gel tak, jak bylo popsáno výše. 50 ng genu preHCPB naštěpeného restričními enzymy EcoRI-HindIII se liguje s výše uvedeným plazmidem v 20 μ l reakční směsi obsahující 30mM Tris-HCl (pH7,8), 10mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA a 400 U T4 DNA ligázy (New England Biolabs. Inc). Reakce probíhá 4 hodiny při teplotě 25°C. Vzorky reakční směsi o velikosti 1 μ l se použijí k transformaci 20 μ l kompetentních E. coli kmene DH5 α (kompetentních buněk s maximální účinností transformace,



Life Technologies Ltd.) za použití protokolu dodaného výrobcem. Transformované buňky se vysejí na plotny s L-agarem obohaceným 100 µg/ml ampicilinu.

Klony potencinálně produkující preHCPB se identifikují pomocí PCR. Každý z klonů je použit pro PCR tak, jak bylo popsáno výše pro přípravu genu preHCPB s výjimkou toho, že mix s buňkami se inkubuje 5 minut při teplotě 94°C (horký start) ještě před vlastními 25 cykly PCR a místo primerů Sekvence id. č.:34 a 35 se použijí primery podle Sekvence id. č.: 36 a 37. Z reakční směsi se odebere vzorek (10 µl) a analyzuje se elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Klony obsahující gen preHCPB se snadno identifikují díky přítomnosti 1.2kb dlouhého PCR produktu. Klony dávající jasný 1.2 kb dlouhý signál se použijí pro přípravu plazmidové DNA ve velkém měřítku. Sekvence inzertu se ověří sekvenční analýzou. Výsledný plazmid obsahující gen preHCPB v plazmidu pBluescript™ byl pojmenován pMF15.

GS-System™ (Celltech Biologics) byl použit pro přípravu vektorů schopných exprese genu pro HCPB v eukaryotických buňkách (viz WO 87/04462, WO 89/01036, WO 86/05807 a WO 89/10404). Tato technika zahrnuje klonování gen preHCPB do HindIII-EcoRI oblasti vektoru pEEL2. Tento vektor je podobný vektoru pSV2.GS popsanému Bebbingtonem a dalšími (1992), Bio/Technology 10, 169 až 175, přičemž u něj byly cílenou mutagenezí odstraněny některá cílová místa, přítomná v původním vektoru pSV2.GS. Tím bylo dosaženo toho, že místa v polylinkeru jsou unikátní.

Expresivní vektor byl zkostruován tak, že byly plazmidy pEEL2 a pMF15 štěpeny restrikními enzymy EcoRI a HindIII tak, jak bylo popsáno výše. Příslušný vektor (z plazmidu pEEL2) respektive inzert (z plazmidu pMF15) z každého štěpení se izoluje elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Obě DNA se spojí ligací a použijí se pro transformaci kompetentních buněk DH5α. Transformované buňky se přenesou

na plotny s L-agarem s přidavkem 100 μ g/ml ampicillinu. Pomocí PCR se kolonie otestují tak, jak bylo popsáno výše. Jako primerů se použije Sekvence id. č.: 38, která hybridizuje s oblastí v CMV promotoru a Sekvence id. č.: 39, která hybridizuje s oblastí v genu HCPB. Klony produkující 1,365kb dlouhý PCR produkt se použijí pro přípravu plazmidové DNA ve velkém měřítku. Sekvence inzertu byla potvrzena sekvenováním. Plazmid obsahující sekvenci preHCPB v původním plazmidu pEE12 byl pojmenován pMF48.

Jiný eukaryotický expresivní plazmid pEE12 obsahující prepro sekvence genu preproHCPB byl připraven výše popsaným způsobem. V počáteční PCR byly použity primery podle Sekvence id. č.: 40 a 41. Tato reakce slouží k izolaci sekvence prepro z plazmidu pMF18 (viz referenční příklad 19). V tomto případě byla PCR zahájena horkým startem, t.j. inkubací směsi bez Taq DNA polymerázy po dobu 3 minut při teplotě 94°C. Poté byly přidány 2,5 U Taq DNA polymerázy a PCR pokračovala dalšími 25 cykly tak, jak bylo popsáno výše. 360 bp dlouhý fragment byl naklonován do plazmidu pBluescript za vzniku plazmidu pMF66 a následně do plazmidu pEE12 (testováno pomocí PCR s primery podle Sekvencí id. č. 40 a 41) za vzniku plazmidu pMF67.

Pro expresi preHCPB a preproHCPB v eukaryotických buňkách byly vektory obsahující tyto geny transfikovány do COS-7 buněk. COS buňky jsou buňky z buněčných linií z ledvin kočkodana zeleného (African green monkey) CV-1, transformované d virem SV40 s defektním pořátkem replikace. Tyto buňky jsou v hojně míře využívány pro krátkodobou přechodnou expresi různých proteinů pro svoji schopnost replikovat cirkulární plazmid obsahující počátek replikace viru SV40 a dosáhnout přitom vysokého počtu kopií plazmidu. Existují dvě hlavní dostupné linie: COS-1 a COS-7. Zaklady transfekce buněk COS jsou popsány v práci Bebbinoton v Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1991) 2,

strana 141. Pro expresi genů HCPB byly plazmidové vektory pMF48 a pMF67 (4 μg každého) použity k transfekci COS-7 buněk (2×10^5) na šesti jamkové kultivační plotně v 2 ml média DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přidavkem 10% tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (FCS) způsobem známým jako lipofekce - transport polynukleotidů zprostředkovaný kationickými lipidy - [viz Felgner a další, Methods: A Companion to Methods in Enzymology (1993) 5, strana 67 až 73). Buňky byly 20 hodin inkubovány při teplotě 37°C v inkubátoru v atmosféře CO_2 . Směs plazmidové DNA v 200 μl bez-serového média OPTI-MEM (Reduced Serum Medium: GibcoBRL kat. č. 31985) se opatrně smíchala s 12 μl činidla LIPOFECTIN (GibcoBRL kat. č. 18292-011). Poté nasledovala 15 minutová inkubace za pokojové teploty. Pak byly buňky promyty 2 ml bez-sérového média OPTI-MEM. Nakonec se ke směsi DNA/LIPOFECTIN přidá bez-sérové medium (600 μl , OPTI-MEM) a výsledná směs se navrství na buňky, které se 6 hodin inkubují při teplotě 37°C v inkubátoru v atmosféře CO_2 . Médium obsahující DNA se nahradí normálním médiem DMEM obsahujícím 10% FCS a buňky se inkubují tak, jak bylo popsáno výše po dobu 72 hodin. 250 μl supernatantů z buněčných kultur se testuje na HCPB aktivitu proti Hipp-Arg (5 hodinový test) tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 11. Supernatanty buněk COS, které byly transformovány pouze činidlem LIPOFECTIN bez plazmidové DNA hydrolyzovaly 1.2 % substrátu, zatímco supernatanty buněk COS, které byly transformovány směsí plazmidů exprimujících preHCPB a preproHCPB hydrolyzovaly 61 % substrátu Hipp-Arg. COS buňky, transfikované pouze plazmidem obsahujícím preHCPB hydrolyzovaly Hipp-Arg stejnou měrou jako COS buňky ošetřené pouze činidlem LIPOFECTIN.

Činidlo LIPOFECTIN je 1:1 (w/w) lipozómový přípravek obsahující kationický lipid N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)-propyl]-n.n.n-trimethylamonium chlorid (DOTMA) a dioleoyl fosfatidylethanolamin (DOPE) v membránově

filtrované vodě. Tento přípravek spontánně váže DNA za vzniku komplexu lipid-DNA, viz Felgner a další v Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 7431.

Referenční příklad 18: Exprese proteinu proHCPB v E. coli

Způsob klonování a exprese pro-HCPB v E.coli je velmi podbný způsobu popsanému v referenčním příkladu 13. Opět byl použit plazmid pICI266 jakožto klonovací vektor, jako výchozí materiál pro PCR amplifikaci genu pro-HCPB byl použit plazmid pICI1698 (tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 14). Místo primerů FSPTS1 a 6HIS9E1OR1BS1 byly použity primery označené jako 2310 a 2265 (Sekvence id. č.: 68 a 66). PCR reakce probíhala za podobných podmínek jako v referenčním příkladu 15.

Primer 2310 byl navržen tak, aby hybridizoval s plazmidem pICI1698, a aby zároveň zavedl do PCR produktu restriční místo pro restriční enzym NcoI. Primer hybridizuje od počátku vedoucí sekvence PelB (DNA báze 51 až 66 včetně v Sekvenci id. č.: 64) po začátek vloženého genu pro-HCPB (DNA báze 40 až 57 včetně v Sekvenci id. č.: 56).

Druhý primer 2265 byl navržen tak, aby hybridizoval s koncem genu pro maturovaný HCPB před počátkem sekvence peptidové značky (His)6-c-myc tag (je komplementární s bázemi DNA 965 až 987 včetně v Sekvenci id. č.: 64). Tento primer zároveň zavedl do PCR produktu kodón komplementární ke kodónu pro terminaci translace (komplementární k TAA TAA) na konec genu. Za tento kodón je vloženo restriční místo pro enzym EcoRI (GAATTC) a báze pro vyplnění.

Tento oligonukleotid slouží jako primer směrem zpátky směrem do genu tak aby produktem PCR byla sekvence pro-HCPB.

Elektroforézou na agarózovém gélu byl analyzován alikvot PCR produktu, přičemž byla zjišťována správná

velikost DNA (1240 bp). Výsledný produkt obsahoval převážně DNA o správné velikosti. Zbylý produkt reakce byl přečištěn a zbaven přebytečných reagensů podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Izolovaná DNA byla štěpena restrikčními enzymy NcoI a EcoRI. DNA o správné velikosti (přibližně 1210 bp) byla poté purifikovaná podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Dvouvláknová DNA plazmidu pICI266 byla připravena způsobem podobným jako v referenčním příkladu 15. Poté byla restrikčně štěpena enzymy NcoI a EcoRI, přičemž byl kladen důraz na úplné dokončení reakce. DNA o správné velikosti (přibližně 5600 bp) byla purifikována podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Pomocí elektroforézy na agarovém gelu byla zkontrolována čistota a odhadnuta koncentrace DNA v alikvotech purifikované a restrikčně štěpené DNA porovnáním se známými standardy. Tyto odhady byly použity při přípravě ligační směsi pro klonování genu pro-HCPB do vektoru pICI26 podobným způsobem jako v referenčním příkladu příkladu 15.

Po této ligační reakci se směs DNA použije k transformaci E.coli kmene DH5 α . Kolonie obsahující plazmidy s požadovaným inzertem se identifikují hybridizací podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Čtyři pozitivně hybridizující izoláty byly podrobeny PCR detekci inzertu o správné velikosti. Při této detekci byly použity primery 2310 a 2265, (Sekvence id. č.: 68 a 66), a rovněž pár interních primerů 1279 (Sekvence id. č.: 54) a 679 (Sekvence id. č.: 51) podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Pomocí elektroforézy na agarózovém gelu byly v PCR produktech vyhledána o DNA správné velikosti (přibližně 1200 bazí pro primery 2310 a 2265, a přibližně 580 bp pro primery 1279 a 679). Všechny testované klony obsahovaly DNA o správné velikosti.

Plazmidová DNA byla poté připravena ze všech čtyř klonů. Tato DNA byla poté sekvenována v oblasti PCR produktu a podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Klony byly sekvenovány pomocí šesti různých oligonukleotidových primerů označených 1504, 1802, 679, 1281, 1590 a 1592 (Sekvence id. č.: 60, 63, 51, 55, 69 a 70). Na základě výsledků sekvenace byl vybrán plazmid obsahující požadovanou sekvenci genu pro-HCPB was selected. Tento plazmid byl označen pICI1738.

Sekvence id. č.: 71 znázorňuje potvrzenou sekvenci klonovaného genu pro-HCPB v plazmidu pICI1738, s vyznačenou amino kyselinovou sekvencí od počátku sekvence PelB až po restriční místo EcoRI. Číslování DNA začíná prvním kodómem peptidu PelB. Číslování a peptidu začíná od maturovaného HCPB.

Po transformaci kompetitivních buněk E.coli za přítomnosti chloridu vápenatého plazmidem pICI1738 bylo dosaženo kontrolované exprese proteinu pro-HCPB, viz referenční příklad 15. Všechny klony transformované plazmidem pICI1738 byly ošetřovány a restovány na expresi klonovaného genu HCPB podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Nicméně v tomto případě nebylo ve Western blotu možno použít monoklonální protilátku 9E10 specifickou proti peptidu c-myc vzhledem k tomu, že protein pro-HCPB nemá C-koncovou značku. Proto byla jako primární protilátka použita králičí protilátka proti hovězí karboxypeptidáze A (Biogenesis), která reaguje s purifikovanou lidskou pankreatickou karboxypeptidázou B. Jako sekundární protilátka byla použita kozí-anti-králičí IgG značená křenuvou peroxidázou (Sigma A9169 nebo podobná).

Expese klonovaného proteinu pro-HCPB v plazmidu pICI266 (pICI1738) byla demonstrována v E.coli kmenů MSD2 13 a MSDS2S v proteinových gelech barvených Coomassie modří. V těchto gelech byl patrný nový proteinový proužek o

velikosti přibližně 40 kDa vzhledem ke klonům se samotným vektorem pICI266 a vzhledem ke klonům s produkujícím značený HCPB (viz referenční příklad 15). Proužek o shodné velikosti dával rovněž silný signál ve Western blotu detekujícím hovězí karboxypeptidázu A.

Referenční příklad 19: Exprese proHCPB buňkami COS

Gen kódující preproHCPB byl vytvořen pomocí PCR tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 17, přičemž jako templát byl použit plazmid pICI1689 a jako primery oligonukleotidy podle Sekvence id. č. 34 a 40. Vzniklý produkt měl velikost 1270 bp.

Gen byl poté štěpen restrikčními enzymy EcoRI a HindIII a klonován nejprve do plazmidu pBluescript KS+ (za vzniku plazmidu pMF18) a pak do plazmidu pEE12 v buňkách DH5 α (za vzniku plazmidu pMF49) tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 17.

Plazmidem pEE12d byly poté transfikovány buňky COS-7 pomocí činidla LIPOFECTION tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 17. 250 μ l buněčného supernatantu bylo poté 5 hodin testováno na aktivitu enzymu HCPB přičemž jako substrát byl použit Hipp-Arg tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 11. Poté následovala 1 hodinová aktivace trypsinem (700 μ g/ml) v 30mM Tris-HCl (pH7,6), 150 mM NaCl při teplotě 4°C. Za těchto podmínek došlo k úplné hydrolýze substrátu Hipp-Arg zatímco supernatant buněk COS ošetřených pouze činidlem LIPOFECTION bez plazmidové DNA po aktivaci trypsinem dokázal hydrolyzovat pouze 30 % substrátu Hipp-Arg.

Referenční příklad 20:

Purifikace nativního HCPB

Pro počáteční purifikaci nativního a různých mutantních enzymů byly navrženy dva způsoby. Nejdříve bude popsán výhodnější z nich.

Suspenze rekombinantních buněk E.coli obsahujících rekombinantní enzym byly vyjmuty z mrazáku -70°C a nachaly se roztát. Buňky byly zváženy a resuspendovány v přidavku pufru A (200mM Tris (hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (TRIS-HCl), 20% sacharóza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), pH 8,0) do objemu rovného původní hmotnosti buněk.

Buněčná suspenze byla poté 20 minut inkubována za pokojové teploty za občasného jemného míchání. Poté byl přidán stejný objem destilované vody a suspenze byla důkladně promíchána. Pak se suspenze opět 20 minut inkubuje za pokojové teploty a za občasného jemného míchání. Výsledný buněčný lyzát způsobený osmotickým šokem se zbaví nerozpustných částic 90 minutovou centrifugací při $98000 \times g$ a při teplotě 4°C . Poté se dekantuje supernatant a přidá se k němu deoxyribonukleáza 1 do výsledné koncentrace 0,1 mg/ml a reakční směs se inkubuje za pokojové teploty za stálého třepání dokud viskozita směsi nepoklesne natolik, že může být nanesena na sepharózovou afinitní kolonu s inhibítorem karboxypeptidázy (CNBr aktivovaná sepharóza). Kolona se připraví podle instrukcí dodaných s CNBr aktivovanou Sepharózou 4B od firmy Pharmacia a s inhibítorem karboxypeptidázy z bramborových hlíz (c-0279, Sigma). pH supernatantu bylo upraveno na pH 8,0 a poté byl ihned nanesen na kolonu předvrstvenou 10mM TRIS-HCl, 500mM chloridem sodným, pH 8,0. Pak byla kolona promývána elučním pufrům (100mM uhličitan sodný, 500mM chlorid sodný, pH 11,4) dokud absorbance průchozího pufru nepoklesla zpět na hodnotu před nanesením vzorku. Eluované

01.10.97

frakce byly zmraženy na -20°C a mezitím byly pomocí Western blotu s myší monoklonální protilátkou 9E10 proti c-myc identifikovány ty, které obsahují rekombinantní karboxypeptidázu. Jako konjugátu bylo použito koňské-anti-myší protilátky s křenovou peroxidázou (a-9044, Sigma), který poskytuje barevnou reakci po přidavku 4-chloro-naftolu a peroxidu vodíku.

Frakce obsahující rekombinantní karboxypeptidázu B byly spojeny, zakoncentrovány a jejich pH nastaveno na 7,5. Poté byly rychle zamraženy na -20°C a za této teploty skladovány. Je-li potřeba lze ještě provést další purifikaci za použití známých metod jako jsou například chromatografie na iontoměniči a gelová permeační chromatografie.

Druhým možným postupem je celková lýza buňky E.coli jako protiklad k osmotickému šoku použitému ve výhodném způsobu.

Rekombinantní buňky E.coli obsahující rekombinantní enzym byly resuspenovány v lyzogenním pufru (50mM TRIS-HCl, 15% sacharóza, pH 8,0). K lytické směsi se přidá lysozyme do koncentrace 1 mg/ml zároveň s 80 μl 25% roztoku lithium dodecylsulfátu (LDS) na 25 ml suspenze. Pak se suspenze inkubuje 30 minut na ledu za občasného třepání. Pak se přidá deoxyribonukleáza 1 až do koncentrace 1 mg/ml a suspenze se opět inkubuje na ledu po dobu 30 minut za občasného zatřepání.

Poté se suspenzerozdělí do 200 ml množství a sonikuje se do úplného rozbití buněk deseti 30 sekundovými dávkami s 30 sekundovými intervaly mezi těmito dávkami. Sonikované suspenze se 90 minut centrifugují při 98,000 x g při teplotě 4°C a poté se supernatant dekantuje a jeho pH nastaví na 8,0. Takto upravený supernatant se nanese na

afinitní kolonu. předvrstvenou 10 mM TRIS-HCl, 500mM chloridem sodným, pH 8,0.

Pak se kolona promývá elučním pufrem (100mM uhličitan sodný, 500mM chlorid sodný, pH 11,4) dokud absorbance průchozího pufru nepoklesne zpět na hodnotu před nenesením vzorku. Eluované frakce se zmrazí na -20°C a mezitím se pomocí Western blotu s myší monoklonální protilátkou 9E10 proti c-myc identifikují ty, které obsahují rekombinantní karboxypeptidázu. Jako konjugátu se použije koňské-anti-myší protilátky s křenovou peroxidázou (a-9044, Sigma), který poskytuje barevnou reakci po přidavku 4-chloro-naftolu a peroxidu vodíku.

Frakce obsahující rekombinantní karboxypeptidázu B se spojí, zakoncentrují a jejich pH nastaví na 7,5. Poté se rychle zamrazí na -20°C a za této teploty se skladují. Je-li potřeba lze ještě provést další purifikaci za použití známých metod jako jsou například chromatografie na iontoměničích a gelová permeační chromatografie.

Vzorky spojeného materiálu získaného oběma způsoby purifikace byly analyzovány SDS-PAGE a přenosem na nitrocelulózu membránu barvenou Coomassie modří. V obou vzorcích byly nalezeny proužky s molekulovou velikostí odpovídající rekombinantní karboxypeptidáze B. Tyto proužky byly sekvenovány automatickým proteinovým sekvenátorem za použití Edmanovy degradační techniky a poskytly pozitivní výsledky pro konkrétní purifikované rekombinantní karboxypeptidázy B.

Referenční příklad 21:

Expresí fúzního proteinu myší ASB7 F(ab')₂-HCPB buňkami COS
Tento příklad popisuje přípravu cDNA z hybridoma ASB7, izolaci specifických Fd a fragmentů lehkých řetězců pomocí PCR, určení úplné DNA sekvence těchto fragmentů a následnou

přípravu fúzního genu Fd-HCPB fúzní a ko-expresivního vektoru schopného produkovat jak lehký řetězec tak protein Fd-HCPB v eukaryotických buňkách, expresi fúzního proteinu F(ab')₂-HCPB buňkami COS po ko-transfekci s preprosekvencí HCPB.

Opakuje se postup z referenčního příkladu 5 až do kroku (e).

f) Příprava DNA sekvence pro fúzní Fd-HCPB

Gen kódující C-koncovou oblast sekvence Fd od místa NcoI v Sekvenci id. č.: 25 (od pozice 497) byl pomocí PCR spojen se sekvencí pro HCPB. V průběhu této PCR byla do genu vložena DNA pro oktapeptidový linker se sekvencí VPEVSSVF. Templátem pro PCR s horkým startem (viz referenční příklad 17) byl plazmid pAF1 (popsaný v referenčním příkladu 5). Jako primery byly použity oligonukleotidy podle Sekvencí id. č.: 42 a 43. Výsledný produkt má délku 338 bp. Podobně i plazmid pICI1698 sloužil jako templát pro PCR s oligonukleotidy podle Sekvencí id. č.: 44 a 34 za vzniku a 998 bp dlouhého produktu. Oba produkty byly izolovány elektroforézou na agarózovém gelu a systémem Geneclean™ tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 17 a poté byly použity (0,2ng každého v 50 µl celkového objemu) jako templáty pro další PCR reakci s horkým startem s 10 cykly po 1 minutové inkubaci při teplotě 94°C, 4 minutové při 63°C a 2 minutové při 94°C. Poté bylo přidáno 100 pM hraničních oligonukleotidů podle Sekvencí id. č.: 42 a 34 do 50 µl pufru s 2,5 U enzymu Amplitaq. Po tříminutové inkubaci při 94°C byla směs podrobena reakci s 25 cykly: 1,5 minuty při 94°C, 2 minuty při 55°C a 2 minuty při 72°C. Posledním krokem reakce byla 10 minutová inkubace při 72 °C. Produktem reakce byla DNA ve formě proužku o velikosti 1336 bp, který byl izolován tak, jak bylo již výše popsáno. Poté byla DNA rozštěpena pomocí enzymů EcoRI a HindIII a klonována do plazmidu pBluescript™ v buňkách DH5α za

vzniku plazmidu pMF35. Jednotlivé klony byly testovány pomocí PCR s oligonukleotidy podle Sekvencí id. č.: 36 a 37. Pro přípravu úplné sekvence fžního proteinu Fd-HCPB bylo naštěpeno 10 μ g plazmidů pAF1 a pMF35 restričními enzymy NcoI a EcoRI. Štepení probíhalo 2 hodiny ve 100 μ l pufru obsahujícího 50mM octan draselný, 20mM octan-TRIS (pH 7,9), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 40 U EcoRI a 20 U NcoI. Vektorový fragment z plazmidu pAF1 (3,4 kb) byl izolován a defosforylován pomocí střevní alkalické fosfatázy, viz referenční příklad 17 a poté byl naligován do přečištěného 1,2 kb dlouhého fragmentu pMF35. Výsledný vektor byl naklonován do buněk DH5 α za vzniku klonu pMF39. Transformované buňky byly prohledány pomocí PCR s primery podle Sekvencí id.č.: 36 a 37 a byl nalezen 1,922 dlouhý inzert. Fragment EcoRI-HindIII z plazmidu pMF39 byl naklonován do pEE6 (derivát plazmidu pEE6.hCMV, viz Stephens a Cockett, (1989). Nucl. Acid Res. 17, strana 7110, ve kterém bylo místo pro HindIII proti směru transkripce od promotoru hCMV převedeno na místo BglII) do buněk DH5 α . Transformované buňky byly prohledány pomocí PCR s primery podle Sekvencí id.č.: 38 a 39 a byl nalezen přibližně 2.200 dlouhý inzert. Vzniklý plazmid byl pojmenován pMF43.

Ko-expresivní vektor byl připraven naštěpením 10 μ g plazmidu pMF43 restričním enzymem BglII (20 U) a SalI (40 U) ve 100 μ l pufru obsahujícího 10mM TRIS-HCl (pH 7,9), 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT a 100 μ g/ml BSA. 4348 bp dlouhý fragment byl izolován pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a přečištěn pomocí systému Geneclean™, viz výše. Podobně plazmid pAF6 (viz e) v referenčním příkladu 5) byl naštěpen restričním enzymem BamHI (40 U) a SalI (40 U). 7,8 kb dlouhý fragment vektoru byl poté izolován a ligován s BglII-SalI fragmentem z plazmidu pMF43 a naklonován do buněk DH5 α . Vzniklé kolonie byly testovány pomocí PCR s dvěma sadami primerů (viz Sekvence id.č.: 18 a

45 a Sekvence id.č.: 17 a 39). Sekvenovány byly klony vykazující PCR produkty o 360 bp respektive 1,3 kb. Klon se správnou sekvencí byl nazván pMF35- lehký řetězec/Fd-HCPB ko-expresivní vektor v buňkách DH5 α .

g) Exprese A5B7 F(ab')₂-HCPB v COS buňkách

Byl zopakován postup popsáný v Referenčním příkladu 17 použitý ke kotransfekci buněk COS-7 plazmidem kódujícím prepro sekvenci (pMF67), avšak místo plazmidu pMF48 byl použit plazmid pMF53. V supernatantu buněk COS byla stanovována aktivita HCPB postupem popsáným v Referenčních příkladech 11 a 17. V supernatantu COS buněk vystavených působení reakčního činidla LIPOFECTIN (ovšem bez plazmidové DNA) bylo hydrolyzováno 1,2% substrátu, kdežto v supernatantu COS buněk transfekovaných směsí plazmidů exprimujících lehký řetězec/Fd-HCPB a prepro sekvenci bylo hydrolyzováno 34% substrátu Hipp-Arg. COS buňky transfekované pouze plazmidem pMF53 hydrolyzovaly Hipp-Arg v množstvích pozorovaných u COS buněk vystavených působení samotného reakčního činidla LIPOFECTIN. Po analýze metodou Western blot (viz. bod h) byly na blotovací membráně viditelné pásy o velikosti přibližně 80 kDa a 160 kDa, které odpovídají Fab'-HCPB a F(ab')₂-(HCPB)₂. Buněčné supernatanty (viz. výše) byly při stanoveních CEA ELISA (viz. body i a j níže) použity k detekci přítomnosti materiálu schopného specificky vázat CEA. Tato detekce byla prováděna podle protokolu popsáného v bodě j.

h) Analýza metodou Western blot

Analýza metodou Western blot byla provedena způsobem popsáným níže.

Alikvoty (20 μ l) z každého vzorku supernatantu byly smíchány se stejným množstvím vzorkového pufru (62,5 mM Tris, pH 6,8, 1% SDS, 10% sacharóza a 0,05% bromfenolová

modř) s nebo bez redukčního činidla (50 mM DTT). Před vlastní elektroforézou na gradientu akryamidového gelu s gradientem 8 až 18% (gel Excel™ pro Pharmacia Biotechnology Products) prováděnou podle návodu poskytovatele na přístroji Multiphor™ II (LKB Produkter AB) byly vzorky inkubovány po dobu 10 minut při 65°C. Po elektroforéze byly za použití přístroje Novablot™ (Produkter AB) postupem popsaným výrobcem přeneseny separované proteiny na membránu Hybond C-Super™ (Amersham International). Po přebílení byla membrána vysušena na vzduchu.

Přítomnost fragmentů protilátky byla detekována pomocí protilátky konjugované s peroxidázou namířené proti myším F(ab')₂ (ICN Biomedicals, produkt číslo 67-430-1). Přítomnost fragmentů myší protilátky A5B7 byla vizualizována pomocí detekčního systému ECL™ (Amersham International) postupem podle výrobce.

i) Analýza metodou ELISA

Standardní postupy pro ELISA stanovení jsou popsány v "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" eds. Burdon, R.H. a van Kippenberg, P.H., svazek 15, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Tijssen, P., 1985, Elsevier Science Publishers B.V.. Jiným zdrojem informací je "Antibodies - A Laboratory Manual" Harlow, E. a Lane, D.P., 1988, publikované v Cold Spring Harbor Laboratory.

j) stanovení anti-CEA protilátek metodou ELISA

1. Připravte potahovací pufr (1 kapsle pufru uhličitan-hydrogenuhlčitan - Sigma C-3041 - ve 100 ml redestilované vody).

2. Na každou použitou 96-ti jamkovou destičku přidejte k 10 ml potahovacího pufru 5 μ l zásobního roztoku CEA (1 mg/ml, Dako).
3. Do každé jamky na mikrotitrační destičce Nunc "Maxisorp™" napipetujte 100 μ l zředěného CEA 50 ng/jamka/100 μ l.
4. Destičky inkubujte při 4°C přes noc (nebo 2 hodiny při pokojové teplotě).
5. Destičky promývejte celkem čtyřikrát po dobu 5 minut roztokem PBS + 0,01% azidem sodným (PBSA).
6. Destičky blokujte (po vyklepání promývacího roztoku) pomocí 200 μ l 1% BSA (Sigma A-7888) v PBSA obsahujícím 0,05% Tween 20 na jednu jamku. Inkubujte dvě hodiny při pokojové teplotě.
7. Destičky promývejte celkem čtyřikrát po dobu 5 minut roztokem PBSA obsahujícím 0,05% Tween 20.
8. Naneste vzorky (supernatanty z buněčné kultury) a vhodné standardy (proteolytickým štěpením připravené F(ab')₂ ve dvojnásobných ředěních). Vzorky zřeďte růstovým médiem (nebo PBS). Jako prázdné vzorky použijte PBSA + 1% BSA a rozpouštědlo.
9. Inkubujte 3 hodiny při pokojové teplotě.
10. Destičky promývejte celkem šestkrát po dobu 5 minut roztokem PBSA + 0,5% Tween 20.
11. Připravte roztok sekundární protilátky (namířená proti myším IgG F(ab')₂, kozí protilátka konjugovaná s peroxidázou - ICN 67-430-1 - o objemu 20 μ l ve 40 ml PBSA + 1% BSA + 0,5% Tween 20) a do každé jamky přidejte 100 μ l.
12. Inkubujte 1 hodinu při pokojové teplotě.

13. Destičky promývejte celkem šestkrát po dobu 5 minut roztokem PBSA + 0,5% Tween 20.
14. Připravte vyvíjecí roztok rozpuštěním jedné kasle pufry Fosforečnan-Citrát-Peroxoboritan (Sigma P-4922) ve 100 ml redestilované vody. Do 100 ml pufry přidejte 30 mg o-fenyldiamin dihydrochloridu (OPD, SigmaP-8287). Do každé jamky naneste 150 μ l.
15. Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě ve tmě.
16. Reakci zastavte přidavkem 50 μ l 2 M kyseliny sírové do každé jamky.
17. Na čtečce destiček odečítejte OD při 490 nm.

Příklad 1: Příprava bovinní pankreatické ribonukleázy Lys66Glu

(a) Vytvoření genové sekvence Rnázy obsahující substituci v kodónu 66 (Lys -> Glu) pomocí rekombinantní kruhové polymerázové řetězové reakce (RCPCR).

Plamid obsahující presekvenci kódující bovinní pankreatickou Rnazu (pQR 162: NCIMB číslo 40678 a popsanou v Tarragona-Fiol a další, Gene 118, 239 až 245, 1992) byl použit jako templát při PCR reakci. Primery pro PCR reakci byly syntetizovány v DNA syntetizéru Cyclone™ (Milligen/millipore) metodou využívající fosfotriesterů za použití kyanoethyl fosforamiditů. Primery byly navrženy takovým způsobem, aby, jsou-li použity při PCR reakci, s jejich pomocí vytvořeným produktem byly dvojitvláknové lineární molekuly DNA, které po smíchání, denaturaci a následné renaturaci vytvoří molekuly dvojitvláknové DNA s nespojitými kohézivními konci tvořenými jednovláknovou DNA (spolu s originálními molekulami zakončenými tupými konci). Tyto kohézivní konce budou spojeny a tímto budou vytvořeny rekombinantní kruhové molekuly DNA. Tyto molekuly jsou



ihned použitelné k transformaci kompetentních buněk *E. coli*.

Dvě PCR reakce byly provedeny v cyklovači Techne PHC-1 při 25 až 30 cyklech sestávajících z 1,5 minuty při 92°C, 1,5 minuty při 55°C a 6 minut při 75°C a nakonec 10 minut při 75°C, jedna za použití oligonukleotidů SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2 (viz. primery A & B na Obrázku 8) a druhá za použití oligonukleotidů SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 4 (viz. primery C & D na Obrázku 8). Reakční směs obsahovala pQR162 (10 ng) jako templát, 50 pmol/primer, 5 μ l 10x pufuru 1 (200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100 a 100 μ g/ml BSA bez přítomnosti nukleázy) a 2,5 jednotek polymerázy pfu (termostabilní polymeráza izolovaná z *Pyrococcus furiosus*, Stratagene) v celkovém objemu 50 μ l a tato reakční směs byla převrstvena stejným objemem parafínového oleje kvůli zamezení vypařování.

Produkty PCR reakce byly analyzovány na 1% agarózovém gelu. Fragменты DNA vytvořené jednotlivými PCR reakcemi (přibližně 3,1 kbp) byly z gelu vyříznuty a DNA byla od agarózy oddělena centrifugací (Spin-X™, Costar). Dva extrahované fragmenty DNA byly precipitovány ethanolem a rozsuspendovány v 20 μ l vody. Alikvoty z každého vzorku (10 μ l) byly smíchány a doplněny na celkový objem 50 μ l. Výsledné složení pufuru bylo 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM NaCl a 1 mM Na_2EDTA . Smíchané fragmenty DNA byly denaturovány při 92°C po dobu 5 minut a renaturovány po dobu 2 hodin při 55 až 57°C. Takto vytvořené rekombinantní kruhové molekuly DNA byly použity k transformaci kompetentních buněk.

Minipreparace plazmidové DNA byla prováděna podle Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) a získané plazmidové DNA byly použity jako templáty

pro sekvenční analýzu prováděnou metodou podle Sangera, při níž jsou k ukončení syntézy řetězce DNA použity dideoxynukleotidy (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, strana 5463 až 5467, 1977). Plazmid obsahující pozměněnou kódující sekvenci bez jakékoliv nepatřičné záměny v sekvenci byl označen pQR176. Fragment DNA s pozměněnou kódující sekvencí byl izolován z agarózového gelu postupem popsáným výše a zaligován do předem rozštěpeného a defosforylovaného vektoru pKK223.3 (Pharmacia Biotech: tento vektor obsahuje promotor tac regulovaný lac represorem a indukovatelný přídatkem izopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG); Brosius a Holy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6929, 1984) v pufru o celkovém objemu 20 μ l obsahujícím 20 jednotek T4 DNA ligázy a ligační pufr. Produkty ligační reakce byly použity k transformaci kompetentních buněk E. coli. Byla provedena restriční analýza plazmidů získaných z různých kolonií transformovaných rekombinantní DNA za účelem odhadu velikosti a orientace inzertů vzhledem k promotoru tac. Správný konstrukt byl pojmenován pQR177. (obrázek 1).

(b) Produkce a purifikace bovinní pankreatické ribonukleázy Lys66Glu

Strategie použitá k produkci a purifikaci rekombinantního enzymu využívala protokoly vyvinuté za účelem exprese pankreatické ribonukleázy A v E. coli (Tarragona-Fiol a další, Gene, 1992). Tento systém využívá přirozeně se vyskytující signální sekvenci bovinní pankreatické ribonukleázy k namíření produkované ribonukleázy nebo jejích geneticky upravených mutantů do periplazmatického prostoru E. coli. Oxidativní prostředí v periplazmatickém prostoru umožňuje správné "sbalení" proteinu, čímž je zajištěna exprese plně aktivní rekombinantní RNázy. Vysoká hodnota kladného náboje rekombinantních nebo geneticky upravených mutantů usnadňuje rychlou purifikaci ze směsi endogenních periplazmatických

01.10.97

proteinů. Exprese a následná purifikace mutantních proteinů trvá asi 48 hodin; měřeno od inokulace média.

Plazmid pQR177 obsahuje dvě ribozomální vazebná místa (RBS), jedno poskytované promotorem *tac* přítomným na vektoru a druhé, určené pro translaci druhého cistronu je obsaženo v kódující sekvenci prvního cistronu. mRNA produkovaná buňkami *Escherichia coli* nesoucími plazmid pQR177 po indukci IPTG je dvojcistronní a translace začíná u promotoru *tac*. První cistron kóduje peptid tvořený 6 aminokyselinami (Met-Phe-Leu-Glu-Asp-Asp). Stop kodón prvního cistronu a startovní kodón druhého cistronu se překrývají takovým způsobem, že ribozom bude pokračovat v translaci mRNA a produkovat pre-RNázu. RNáza ve formě prekurzoru je translokována do periplazmatického prostoru a sekvenování N-konce proteinu ukázalo, že signální sekvence je odštěpena ve správném místě. Oxidativní prostředí v periplazmatickém prostoru umožňuje správné "sbalení" RNázy, tak aby vytvořila nativní enzym, což je potvrzeno získáním plně aktivního enzymu.

Buňky *Escherichia coli* (pQR177) byly pěstovány po dobu 8 hodin při 28°C v 5 litrech média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 µg/ml. Když byly buňky v exponenciální fázi růstu, bylo do růstového média přidáno IPTG, aby bylo dosaženo jeho finální koncentrace 0,5 mM, a růst pokračoval za stálého třepání přes noc při 28°C. Uvolnění proteinů z periplazmatického prostoru bylo provedeno pomocí modifikovaného postupu využívajícího osmotický šok. Buňky narostlé přes noc (5 litrů) byly centrifugovány při 10°C po dobu 10 minut při 8300xg (průměrně). Buněčná peleta byla rozsuspendována v 60 ml 200 mM Tris-HCl pH 7,5 / 20% (w/v) sacharóza (bez přítomnosti RNázy) / 1 mM Na₂EDTA. Suspenze byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Osmotického šoku bylo dosaženo přidáním stejného množství sterilní vody a důkladným promícháním

suspenze. Sféroplasty byly centrifugovány při 10°C po dobu 90 minut při 100000xg (průměrně).

K získání všech kladně nabitých proteinů z periplazmatického prostoru byla použita ionexová chromatografie na katexu (S-Sepharose™ FF). Pufr A měl složení 50 mM MES, pH 6,5 a pufr B měl složení 50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,5. Rekombinantní RnÁza byla ze směsi kladně nabitých proteinů purifikována ionexovou chromatografií na katexu (Mono-S™, Pharmacia-LKB) při použití gradientu 17,5 mM NaCl/min. Zjišťování čistoty rekombinantní RnÁzy pomocí elektroforézy na SDS-polyakrylamidovém gelu a následným barvením stříbrem zřetelně prokázalo, že tato kombinace zmíněných postupů vede k purifikaci proteinu do homogenity (viz. Obrázek 2). Rnázová aktivita rekombinantního enzymu byla odhadnuta měřením hydrolýzy cytidyl-3':5'-adenosinu (CpA) a cytidin-2':3'-cyklický monofosfát (C>p) a byla naměřena stejná specifická aktivita jako u komerčně dostupných enzymů (viz. Tabulka). Koncentrace proteinu byla stanovena měřením OD při vlnové délce 278 (OD_{278nm}=0,71 odpovídá RnÁze o koncentraci 1 mg/ml). Kinetická měření byla prováděna sledováním zvýšení (hydrolýza C>p) absorbance s časem při 286 nm (Witzel a Barnard Biochem. Biophys. Res., 1962). Počáteční rychlost a hodnoty koncentrace substrátu byly použity ke stanovení parametrů K_m a k_{cat} a jejich standardních chyb pomocí výpočetních metod založených na analýze popsané v Wilkinson, Biochem. J. 80, 324 až 332, 1961. Rozdíly mezi těmito parametry získanými použitím různých ribonukleáz byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu. Rychlost hydrolýzy substrátu C>p byla měřena při pokojové teplotě v kyvetách o šířce 0,1 cm (Hellma) v celkovém objemu 250 μ l. Reakční směsi obsahovaly různé koncentrace C>p v 0,1 M (1,3-bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]propanu), pH 7,0, 50 mM NaCl ($I=0,1$) a byly startovány přidavkem enzymu (viz. Tabulka). Získaná data naznačují, že kinetické vlastnosti

jednotek každého) a zaligován do předem rozštěpeného (EcoRI a NcoI) a defosforylovaného plazmidu pICI266 (NCIMB 40589) za účelem exprese. Ligace, exprese a purifikace byly provedeny postupy popsány v Příkladu 1, ovšem s tím rozdílem, že k vyštěpení fragmentu z plazmidu pATFZ3 byly použity restriční endonukleázy EcoRI a NcoI a tento fragment byl zaligován do předem rozštěpeného (EcoRI a NcoI) a defosforylovaného plazmidu pICI266, a že indukce byla provedena pomocí 1% arabinózy (namísto IPTG). Výsledný konstrukt byl označen pATFZ44 (viz. Obrázek 5). Exprese a purifikace mutantního enzymu byla provedena postupem popsáným v Příkladu 1, ovšem s tím rozdílem, že k indukci byla namísto IPTG použita 1% arabinóza.

Příklad 3: Příprava O-[(2R,3R,4R,5R)-2-(2-aminoacetamidomethyl)-3-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-1-yl)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrofuran-3-yl] O-[4-(bis[2-chloroethyl]amino)fenoxy] hydrogenfosfátu (který je znázorněn jako konečný produkt na obrázku 7).

Sloučenina 4 (Obrázek 7; 31 mg, 0,034 mM) byla rozpuštěna v 0,01 M HCl v N, N-dimethylformamidu (DMF) a k tomuto roztoku bylo jako katalyzátor přidáno 30% paladium naadsorbované na uhlíku ve formě suspenze v dimethylformamidu. Směs byla míchána po dobu 2 hodin a 45 minut v atmosféře tvořené vodíkem. Následně po filtraci přes Celite™ byl filtrát odpařen do sucha při teplotě nižší než 30°C. Surový produkt byl rozsuspendován v bezvodém dichlormethanu a směs byla zcentrifugována. Supernatant tvořený vrstvou dichlormethanu byl odstraněn. Tento postup byl zopakován a pevný zbytek byl nakonec vysušen. Požadovaný produkt měl hmotnost 9,4 mg (sloučenina 5, Obrázek 7).

NMR data DMSO d₆, δ 3,3 (1H,m); 3,5 (3H,m); 3,62 (8H,s); 4,05 (1H,m); 4,25 (1H,m); 4,53 (1H,m); 5,62 (1H,d); 5,72 (1H,d); 6,63 (2H,d); 7,05 (2H,d); 7,63 (1H,d).

Sloučenina 4 byla připravena následovně.

2'-O-benzyl-5'-bromo-5'-deoxyuridin (sloučenina 1, Obrázek 7).

Ke směsi 2'-O-benzyluridin (Wagner a další, J. Org. Chem. 39, 24 až 30, 1974) (334 mg 1mM) karbotetrabromidu (500 mg) a DMF (4ml) při 20°C v atmosféře tvořené argonem byl přidáván po dobu více než 5 minut roztok trifenylfosfinu (340 mg) v DMF (2 ml). Směs byla míchána při 20°C po dobu 2 hodin, nalita do vody (60 ml) a dvakrát extrahována ethylesterem kyseliny octové. Spojené extrakty tvořené organickou fází byly promyty vodou, vysušeny a odpařeny do formy oleje. Tento olej byl použit ke chromatografii na 20 g oxidu křemičitého (Merck, položka 9385). Eluce 5% methanolem poskytla 2'-O-benzyl-5'-bromo-5'-deoxyuridin (160 mg, 40%).

NMR (DMSO d₆) δ 11,4 (s1H); 7,6 (d1H); 7,3 (m5H); 5,95 (d1H); 5,6 (dd1H); 4,6 (q2H); 4,0 až 4,2 (m3H); 3,6 až 3,8 (m2H).

5'-azido-2'-O-benzyl-5'-deoxyuridin (sloučenina 2, Obrázek 7)

2'-O-benzyl-5'-bromo-5'-deoxyuridin (4,3 g) byl rozpuštěn v DMF (86 ml) a k tomuto roztoku byl přidán azid sodný (7 g). Směs byla míchána a zahřívána 2 hodiny při 60°C. Po ochlazení reakční směsi a dekantaci DMF od nezreagovaného azidu sodného byl tento DMF odpařen do sucha. Zbytek byl rozpuštěn v ethylesteru kyseliny octové, promyt dvakrát vodou, vysušen a odpařen do sucha. Zbytek

01.10.97

byl použit ke chromatografii na oxidu křemičitém (Merck, položka 9385). Eluce 10% methanolem poskytla 1,5 g čistého 5'-azido-2'-O-benzyl-5'-deoxyuridinu.

NMR (DMSO d₆) δ 11,4 (s₁H); 7,6 (d₁H); 7,3 (m₅H); 5,9 (d₁H); 5,6 (d₁H); 5,4 (d₁H); 4,65 (q₂H); 3,9 až 4,2 (m₃H); 3,6 (d₂H).

2'-O-benzyl-5'-karbobenzoxyglycylamino-5'-deoxyuridin
(sloučenina 3, Obrázek 7)

Ke směsi 5'-azido-2'-O-benzyl-5'-deoxyuridinu (1,5 g), tetrahydrofuranu (25 ml) a esteru benzyloxykarbonyl glycin N-hydroxysukcinátu (1,3 g) bylo přidáno 10% paladium naadsorbované na uhlíku (50% vlhkost tvořená vodou) (1,5 g). Směs byla 4 hodiny míchána v atmosféře tvořené vodíkem. Následně po filtraci přes Celite™ byl filtrát odpařen do sucha. Zbytek byl rozpuštěn v ethylesteru kyseliny octové a promyt 5% vodným roztokem kyseliny citrónové (2x), roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x), vysušen a odpařen dosucha. Zbytek byl rozetřen s 1:1 ether/ ethylester kyseliny octové a výsledkem byla pevná látka (960 mg) (42%).

NMR (DMSO d₆) δ 11,3 (s₁H); 8,0 (t₁H); 7,6 (d₁H); 7,4 (m₁₀H); 5,9 (d₁H); 5,6 (d₁H); 5,4 (d₁H); 5,0 (s₂H); 4,6 (q, 2H); 4,0 (m₂H); 3,9 (m₁H); 3,6 (d₂H); 3,5 (m₂H).

Příprava sloučeniny 4 (viz obrázek 7)

a) Benzyloxydichlorofosfin (Scott a další, J. Org. Chem. 55, 4904 až 4911, 1990) (135 mg, 0,64 mM) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (4,0 ml), směs byla ochlazena na -20°C a k této směsi byla přidána směs diisopropylaminu (0,091 ml, 0,64 mM) a diisopropylethylaminu (0,11 ml, 0,64 mM) rozpuštěná v bezvodém dichlormethanu (2,0 ml). Roztok byl míchán 45 minut při -20°C a následně byl zahříván po dobu 30 minut na

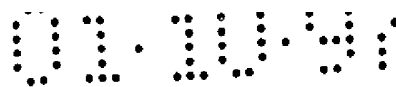
01.10.97

pokožovou teplotu a poté byl při pokojové teplotě míchán dalších 30 minut. Tento roztok byl po kapkách přidáván k roztoku

2'-O-benzyl-5'-karbobenzoxycylamino-5'-deoxyuridinu (280 mg, 0,53 mM) a diisopropylethylaminu (0,336 ml, 2,14 mM) v dichlormethanu (3,0 ml) ochlazeném na 0°C. Roztok byl míchán 10 minut při 0°C a dále pak 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakční směs byla poté zředěna dichlormethanem, vysušena a odpařena do formy oleje. Tento olej byl jako směs s toluenem azeotropicky destilován (2x) a tím připraven pro následující reakci.

b) Surový produkt z předcházející reakce byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (2,5 ml) k tomuto roztoku byl přidán roztok roztok 4-N, N-bis-(2-chlorethyl)aminofenolu (125 mg, 0,534 mM) v bezvodém dichlormethanu (3 ml). Následně byl přidán roztok 0,46 M tetrazolu v bezvodém acetonitrilu (3,2 ml) a roztok byl míchán 2 hodiny při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byl k tomuto roztoku přidán roztok 70% t-butylhydroperoxidu ve vodě (0,11 ml, 0,801 mM) a vzniklý roztok byl míchán při pokojové teplotě další hodinu. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem a promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (1x), zředěným roztokem siřičitanu sodného (1x) a nasyceným roztokem chloridu sodného (1x) a vysušena a odpařena dosucha. Surový produkt byl použit ke chromatografii na oxidu křemičitém (Merck, kat.č. 9385). Eluce 2% methanolem v dichlormethanu a následně 3,5% methanolem v dichlormethanu poskytla 118 mg čistého produktu.

NMR data. DMSO d6 (δ) směs diastereoisomerů 3,37 1H (m); 3,42 2H (d); 3,67 8H (d); 4,12 1H (m); 4,33 1H (m); 4,56 2H (m); 5,0 2H (s); 5,14 3H (m); 5,59 1H (d); 5,91 1H(d); 6,64 2H (dd); 7,05 2H (t); 7,28 15H (m); 7,45 1H (t); 7,62 1H (dd); 8,13 1H (brs); 11,35 1H (s); .



Příklad 4: Syntéza a izolace konjugátu myší A5B7 F(ab')₂ a Lys66Glu hovězí pankreatické ribonukleázy

Opakuje se zde postup popsáný v referenčním příkladu 4, ale s tím rozdílem, že hovězí pankreatická ribonukleáza je nahrazena Lys66Glu hovězí pankreatickou ribonukleázou, která je popsáná v příkladu 1.

Příklad 5: Syntéza a izolace konjugátu myší A5B7 F(ab')₂ a Arg4Ala,Lys6Ala,Lys66Glu lidské pankreatické ribonukleázy

Opakuje se postup popsáný v referenčním příkladu 4 s tím rozdílem, že hovězí pankreatická ribonukleáza je nahrazena Arg4Ala.Lys6Ala.Lys66Glu lidskou pankreatickou ribonukleázou, která je popsáná v příkladu 2.

Příklad 6: Syntéza a izolace konjugátu humanizované A5B7 F(ab')₂ a Arg4Ala,Lys6Ala,Lys66Glu lidské pankreatické ribonukleázy

Opakuje se zde postup popsáný v příkladu 5, ale s tím rozdílem, že myší A5B7 F(ab')₂ fragment je nahrazen humanizovaným A5B7 F(ab')₂ fragmentem.

Příprava humanizovaného A5B7 F(ab')₂ fragmentu probíhá stejným způsobem, jaký je popsáný v referenčním příkladu 5 od kroku f), myší sekvence pro F_d a lehký řetězec podle Sekvence id. č.: 25, respektive 26. jsou však nahrazeny humanizovanými sekvencemi podle Sekvencí id. č.: 28, respektive 29.

Humanizované fragmenty protilátek podle Sekvence id. č.: 28, respektive 29 mohou být připraveny různými způsoby včetně způsobu podle Edwardse (1987) Am. Biotech. Lab. 5. 38 až 44. Jayaraman et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4084 až 4088. Foquet and Lubbert (1992)

Biotechniques 13, 674 až 673 and Pierce (1994)
Biotechniques 16, 708.

Příklad 7: In vitro cytotoxicita neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od uracilu z příkladu 3, odpovídající účinné látky a neaktivního prekursoru účinné látky spolu s mutantním enzymem lidskou pankreatickou-RNázou (HP-RNáza) Arg4Ala,Lys6Ala,Lys66Glu.

Odlišná cytotoxicita neaktivního prekursoru účinné látky a odpovídající účinné látky k nádorovým buňkám je demonstrována následujícím způsobem. Kolorektální nádorové buňky Lo Vo jsou po dobu jedné hodiny při 37°C inkubovány s neaktivním prekurzorem účinné látky nebo s účinnou látkou při koncentračním rozsahu 5×10^{-4} až 5×10^{-8} M v 96 jamkových mikrotitračních destičkách (2500 buněk na jamku). Potom se buňky promyjí a inkubují se následující tři dny při 37°C. Pak se do jamek přidá TCA, jamky se propláchnou, čímž dojde k odstranění mrtvých buněk, a množství buněčné bílkoviny adherované k destičce se stanoví pomocí SRB barviva, jak popisuje P.Skehan et al. J. Natl. Cancer Inst. 82 1107 (1990). Účinnost daných směsí je dána jejich koncentrací, jenž je potřebná k 50% inhibici buněčného růstu (IC50).

Jsou-li Lo Vo buňky vystaveny účinné látce, IC50 je přibližně 1 μ M. Ve srovnání s tím je neaktivní prekurzor účinné látky mnohem méně cytotoxický, jeho IC50 je přibližně 30 μ M (obrázek 6). Neaktivní prekurzor účinné látky vykazuje tedy přibližně 30krát menší cytotoxicitu k nádorovým buňkám než účinná látka získaná štěpením pomocí mutantní RNázy.

Přidá-li se do zkušebních jamek, které obsahují neaktivní prekurzor účinné látky, buď volná Arg4Ala.Lys6Ala.Lys66Glu HP-RNáza (10 μ g enzym) nebo konjugát A5B7 F(ab')₂-Arg4Ala.Lys6Ala.Lys66Glu HP-RNázy (10 μ g enzym), je cytotoxicita pozorovaná v těchto jamkách

srovnatelná s cytotoxicitou, kterou vykazuje aktivní účinná látka, což ukazuje, že neaktivní prekurzor účinné látky je pomocí mutantního enzymu přeměněn na účinnější látku.

Tyto studie demonstrují schopnost konjugátu lidské mutantní RNázy přeměnit relativně neaktivní prekurzor účinné látky na účinnou cytotoxickou látku schopnou zabíjet nádorové buňky v ADEPT systému.

Příklad 8: Protinádorová aktivita neaktivního prekurzoru účinné látky a konjugátu protilátky a mutantní RNázy v myších s heteroštěpem

Protinádorová účinnost neaktivního prekurzoru účinné látky a konjugátu Arg4Ala.Lys6Ala.Lys66Glu HP-RNázy (nebo Lys66Glu hovězí pankreatické RNázy) může být demonstrována pomocí následujícího modelu. Lo Vo nádorové buňky (10^7) jsou injikovány myším, které byly zbaveny brzlíku. Když nádory dosahnou velikosti 4 až 5 mm v průměru, je myším intravenózně podán konjugát v dávkách, jejichž velikost se pohybuje mezi 10 a 100 mg/kg. Když se injikovaný konjugát dostane k nádorům a zároveň uplyne dostatečně dlouhá doba k tomu, aby byly ostatní tkáně a krevní řečiště očištěny od zbytkového konjugátu (1 až 4 dny), je myším buď intravenózně nebo intraperitoneálně podán neaktivní prekurzor účinné látky v dávce, jejíž velikost se pohybuje v rozsahu od 100 do 1000mg/kg. Ve srovnání s kontrolními ničím neléčenými nádory či nádory léčenými stejnou dávkou buď samotného konjugátu nebo samotného neaktivního prekurzoru účinné látky vede kombinace konjugátu a neaktivního prekurzoru účinné látky k podstatně pomalejšímu růstu nádorů. Tyto studie demonstrují, že konjugát Arg4Ala.Lys6Ala.Lys66Glu HP-RNázy v kombinaci s neaktivním prekurzorem účinné látky vykazuje protinádorovou aktivitu.

Příklad 9: Klinické dávkování u pacientů

Nejefektivnější způsob podávání konjugátů a neaktivních prekurzorů účinných látek popisovaných v tomto vynálezu a jejich dávkovací režim během léčby rakoviny závisí na celé řadě faktorů, kterými jsou například vážnost onemocnění, celkový zdravotní stav pacienta, jeho reakce na léčení a posudek od ošetřujícího lékaře. U jednotlivých pacientů by tedy mělo být dávkování konjugátů a prekurzorů účinných látek stanoveno podle těchto faktorů. Nicméně je pravděpodobné, že se účinná dávka konjugátu bude pohybovat v rozsahu od 20 do přibližně 200 mg/m². Účinná dávka neaktivního prekurzoru účinné látky bude záviset na konkrétní účinné látce a na toxicitě výchozí látky. Je-li známa MTD výchozí látky, může sloužit jako výchozí bod při určování účinné dávky neaktivního prekurzoru účinné látky, neboť neaktivní prekurzor účinné látky je vždy méně cytotoxický než výchozí látka. Pro neaktivní prekurzory účinných látek, které jsou založené na fenol-mustard sloučenině, kde nejsou klinické údaje o výchozí látce k dispozici, není léčebný rozsah dávek zatím přesně určen a musí být definován standardními toxikologickými studiemi na zvířatech a studiemi na pacientech, kteří budou zpočátku dostávat nízké dávky daného prekurzoru účinné látky a postupně se jim budou dávky zvyšovat. Pravděpodobně se však terapeutické dávky budou pohybovat v rozsahu od 500 do 2000 mg/m².

Příklad 10: Enzymová kinetika od uracilu odvozeného prekurzoru účinné látky z příkladu 3 (prekurzor, který je substrátem RNázy, dále zkráceně prekurzor RNázy) versus enzymová kinetika přirozené a mutantní hovězí pankreatické RNázy Lys66Glu

Pomocí spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2 byly snímány absorbance prekurzoru účinné látky a odpovídající fenol

mustard účinné látky v rozsahu vlnových délek 200 až 350 nm. Byla vybírána taková vlnová délka, při které byl mezi prekurzorem účinné látky a účinnou látkou největší rozdíl v absorbanci (tento rozdíl je způsobený rozštěpením fosfátové vazby). K tomuto maximálnímu rozdílu v absorbanci došlo při vlnové délce 256 nm. K_m a V_{max} pak byly určeny na základě měření počáteční rychlosti přeměny neaktivního prekurzoru účinné látky na účinnou látku při této vlnové délce. Koncentrace prekurzoru účinné látky se pohybovaly v rozmezí 0,2 až 2mM, koncentrace enzymu RNázy v rozmezí 5 až 80 $\mu\text{g/ml}$. Měření byla prováděna při teplotě 37°C v roztoku 0,025M Tris-HCl, který obsahoval 0,01%Brij-35 pufr (pH 7,5). Byly používány kyvety firmy Hellma se stěnami silnými 0,1 cm. Celkové množství měřeného roztoku bylo 250 μl . Hodnota K_{cat} bylo spočítána vydělením V_{max} množstvím RNázy v reakční směsi. Enzymatická aktivita obou enzymů vůči standardnímu substrátu, kterým byl cytidin 2'3'-cyklický monofosfát (C>p), byla měřena na základě změny v absorbanci při 284 nm, při použití rozsahu koncentrací substrátu (C>p) 0,5 až 6 mM a koncentrací enzymu RNázy 5 až 35 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Enzymová kinetika pro prekurzor účinné látky vhodný pro RNázu a C>p, srovnání nativní a RNázy Lys66Glu

Substrát	BP-RNáza	Lys66Glu BP-RNáza
prekurzor účinné látky (viz příklad 3)	0,37	18
C>p	3	3,0

Jednotky = $k_{cat}/K_m \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$

Z výsledků je patrné, že rychlost přeměny standardního substrátu C>p pomocí přirozené a mutantní hovězí RNázy se téměř neliší. Mutantní RNáza však mnohem

rychleji než přirozený enzym hydrolyzuje jmenovaný prekurzor účinné látky. Výsledkem mutace Lys66Glu v molekule hovězí RNázy tedy není omezení schopnosti tohoto enzymu štěpit fosfátovou vazbu, ale naopak vytvoření enzymu, jenž je schopen specificky štěpit jmenovaný prekurzor účinné látky a tedy uvolňovat aktivní účinnou látku.

Příklad 11: Enzymová kinetika od uracilu odvozeného prekurzoru účinné látky z příkladu 3 (prekurzor, který je substrátem RNázy, dále zkráceně prekurzor RNázy) versus enzymová kinetika přirozené a mutantní Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu lidské pankreatické RNázy

Měření kinetik enzymatických reakcí s přirozenou RNázou a s RNázou Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu byla prováděna obdobně jako v příkladu 10, pouze s tím rozdílem, že použitým puforem byl 0,1M 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)-methylamino]-propan (pH 7,0), 50 mM NaCl. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Enzymová kinetika pro prekurzor účinné látky vhodný pro RNázu a C>p, srovnání nativní a RNázy Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu

Substrát	HP-RNáza	Arg4Ala, Lys6Ala, Ly 66Glu HP-RNáza
prekurzor účinné látky (viz příklad 3)	0,2	3,6
C>p	1,2	1,2
Jednotky = kcat/K _m mM ⁻¹ s ⁻¹		

Z výsledků je patrné, že rychlost přeměny standardního substrátu C>p pomocí přirozené a mutantní hovězí RNázy se téměř neliší. Mutantní RNáza však mnohem rychleji než přirozený enzym hydrolyzuje jmenovaný

prekurzor účinné látky. Výsledkem mutace Lys66Glu v molekule lidské RNázy tedy není omezení schopnosti tohoto enzymu štěpit fosfátovou vazbu, ale naopak vytvoření enzymu, jenž je schopen specificky štěpit jmenovaný prekurzor účinné látky a tedy uvolňovat aktivní účinnou látku.

Příklad 12: Syntéza prekurzoru aktivní látky odvozeného od cytosinu (viz obrázek 17)

Opakuje se zde postup popsáný v příkladu 3, pouze sloučenina 4 (obrázek 7) je nahrazena sloučeninou 6 (obrázek 17). Příprava sloučeniny 6 (obrázek 17) je stejná jako příprava sloučeniny 4 (obrázek 7), ale 2'-O-benzyluridin je nahrazen N⁴-benzyloxykarbonyl-2'-O-benzylcytidinem.

Postup přípravy N⁴-benzyloxykarbonyl-2'-O-benzylcytidinu (složka 2, obrázek 17) z 2'-O-benzylcytidinu [Christensen and Broom (1972), J. Org. Chem. 37, 3398-3401] je stejný jako postup přípravy sloučeniny 6 popsáný v referenčním příkladu 7.

Příklad 13: Kinetika enzymatického působení hovězí pankreatické Lys66Glu RNázy na analogy prekurzorů aktivních látek odvozených od uridinu a cytidinu z referenčních příkladů 6, respektive 7.

Experimentální postup byl obdobný jako v příkladu 10, měření však probíhala při teplotě 25°C. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Enzymová kinetika pro analogy prekurzoru účinné látky pro RNázu a C>p, srovnání nativní a RNázy Arg4Ala, Lys6Ala, Lys66Glu

Substrát	BP-RNáza	Lys66Glu RNáza
Analog prekurzoru účinné 1 (0,2) látky pro použití s RNázou (ref. př. 6)		25 (6)
Analog prekurzoru účinné 5,05 (0,3) látky pro použití s RNázou (ref. př. 7)		109 (11)
C>P	3	3
Jednotky = kcat/Km mM ⁻¹ s ⁻¹		

Z výsledků je patrné, že rychlost přeměny standardního substrátu C>p pomocí přirozené a mutantní hovězí RNázy se téměř neliší. Mutantní RNáza však mnohem rychleji než přirozený enzym hydrolyzuje jmenované analogy prekurzorů účinných látek. Výsledkem mutace Lys66Glu v molekule hovězí RNázy tedy není omezení schopnosti tohoto enzymu štěpit fosfátovou vazbu, ale naopak vytvoření enzymu, jenž je schopen specificky štěpit jmenované analogy prekurzorů účinných látek a tedy uvolňovat aktivní účinné látky z příslušných prekurzorů.

Příklad 14 Typické farmaceutické kompozice obsahující prekurzor účinné látky podle vynálezu

A) Suché plněné kapsule obsahující 50 mg sloučeniny podle vynálezu

Složka	Množství v jedné kapsuli (mg)
Sloučenina podle vynálezu	50
Laktóza	149
Stearát hořečnatý	1
Kapsule, velikost 1	200

Sloučenina podle vynálezu se může rozetřít na prášek velikosti 60 a na tento prášek se přes plátno velikosti 60 přesype laktóza a stearát hořečnatý. Tato směs se pak 10 minut míchá a naplní se jí suché, želatinové kapsule velikosti 1.

B) Tablety

Typická tableta může obsahovat 25 mg sloučeniny podle vynálezu, předem zgelovatěný škrob (82 mg), mikrokrystalickou celulózu (82 mg) a 1 mg stearátu hořečnatého.

c) Čípky

Typické čípky pro rektální formu podání mohou obsahovat 0,8 až 1 mg sloučeniny podle vynálezu, edetát vápenato-disodný (0,25 až 0,5 mg) a 775 až 1600 mg polyethylen glykolu. Jiné čípky mohou být připraveny záměnou edetátu vápenato-disodného například za butylovaný hydroxytoluen (0,04 až 0,08 mg) a polyethylen glykolu za hydrogenovaný rostlinný olej (675 až 1400 mg) jako jsou například Suppocire L, Wecobee FS, Wecobee M, Witepsols a podobné.

D) Injekce

Typická injekční forma může obsahovat 10 mg sloučeniny podle vynálezu, 0,1 ml benzylalkoholu a 1 ml vody.

Příklad 15: Klonování a exprese D253K HCPB-(His)₆-c-Myc z E. coli

Způsob klonování a exprese D253K-HCPB v E.coli je velmi podobný tomu, který je popsán v referenčním příkladu 15. pICI266 byl opět použit jako klonovací vektor a výchozím materiálem pro PCR amplifikaci genu pro-HCPB byl plazmid pICI1698 (tak, jak je popsáno v referenčním příkladu 14). V tomto případě však byl během PCR amplifikace cílenou mutagenezí změněn kodón pro aminokyselinu v pozici 253 v

genu pro maturovaný enzym z kodónu pro kyselinu asparagovou na kodón pro lysin (GAC na AAA), změna D253K. Byly připraveny dvě reakční směsi pro PCR. Množství jednotlivých složek odpovídalo tomu, které je popsáno v referenčním příkladu 15. Primery v první reakci byly FSPTS1 (podle Sekvence Id. č.: 58) a 1398 (podle Sekvence Id. č.: 72). Primery v druhé reakci byly 6HIS9E1OR1BS1 (podle Sekvence Id. č.: 59) a 1397 (podle Sekvence Id. č.: 73). Výchozí DNA v obou reakcích byla pICI1698. Primery 1398 a 1397 (Podle Sekvence Id. č.:72 a 73) byly konstruovány tak, aby hybridizovaly podél kodónu pro aminokyselinu v pozici 253, zavedly v DNA sekvenci změnu kodónu GAC na AAA a vytvořily komplementární sekvence na koncích obou PCR produktů. Druhé dva primery, FSPTS1 a 6HIS9E1OR1BS1 (Podle Sekvence Id. č.: 58 and 59), jsou popsány v referenčním příkladu 15. Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu byly analyzovány alikvoty z těchto dvou PCR reakcí, byla detekována DNA správné velikosti (přibližně 750 a 250 bp) a odhadnuta její koncentrace. Vzorky obsahovaly převážně DNA správné velikosti.

Pro další PCR bylo použito přibližně 4ng z každého z prvních PCR produktů. Reakce probíhaly v přítomnosti dNTP, jejichž konečná koncentrace byla 200 μ M, Taq polymerázového reakčního pufru, 2U Taq polymerázy v konečném objemu 80 μ l. Před přidáním Taq enzymu byla směs po dobu 10 minut zahřívána při teplotě 94°C, PCR inkubace pak probíhala v deseti cyklech - při 94°C po dobu 1 minuty a při 63°C po dobu 4 minut. Na závěr těchto cyklů byla reakční směs doplněna do 120 μ l přidáním 120pmolů každého z primerů, FSPTS1 a 6HIS9E1OR1BS1 (Sekvence Id. č.: 58 a 59), dalšího dNTP (přibližně 100 μ M), Taq polymerázového reakčního pufru a 4 U Taq polymerázy. Před přidáním Taq enzymu byla směs po dobu 10 minut zahřívána při teplotě 94°C, PCR inkubace pak probíhala v třiceti cyklech - při 94°C po dobu 1,5 minuty, při 50°C po dobu 2 minut a při 72°C po dobu 2 minut. Na

konci reakce pak byla provedena jednorázová inkubace při 72°C po dobu 9,9 minut.

Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu byl analyzován alikvot z PCR produktu, byla detekována DNA správné velikosti (přibližně 1000 bp). Vzorky obsahovaly převážně DNA správné velikosti. Zbytek produktu z reakční směsi byl purifikován obdobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Izolovaná DNA byla štěpena restriktčními enzymy FspI a EcoRI a bendy správné velikosti (přibližně 1000bp) byly purifikovány podobným způsobem jako v příkladu 15.

pICI266 dvouvláknová DNA, připravená podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15, byla štěpena restriktčním enzymem KpnI a tupý konec byl podroben působení T4 DNA polymerázy, s důrazem na to, aby bylo zajištěno kompletní rozštěpení. Purifikovaná DNA pak byla štěpena restriktčním enzymem EcoRI. DNA správné velikosti (přibližně 5600 bp) byla purifikována podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Byla zkontrolována čistota alikvotů obou restriktčně štěpených a purifikovaných vzorků DNA a koncentrace odhadnutá pomocí elektroforézy v agarovém gelu byla porovnána se známými standardy. Na základě těchto odhadů byly podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15 připraveny ligační směsi pro klonování genu HCPB do plazmidu pICI266 vektoru.

Po ligační reakci byla DNA směs použita k transformaci E.coli kmenu DH5 α , kolonie byly sebrány a testovány hybridizací podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Za použití primerů FSP1TS1 a 6HIS9E1OR1BS1 (podle Sekvencí Id. č.:58 a 59) bylo šest pozitivně hybridizujících izolátů pomocí PCR překontrolováno na přítomnost inzertů o správné velikosti, a na hybridizaci s

interními primery FSPTS 1 (podle Sekvence Id. č.: 58) a 679 (podle Sekvence id. č.: 51) podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. PCR produkty byly analyzovány a detekována DNA správné velikosti (přibližně 1000 bp od primeru FSPTS1 k 6HIS9E1OR1BS1, a přibližně 430 bp od primeru FSPTS1 k 679) pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. DNA produkty PCR amplifikace všech klonů měly správnou velikosti.

Všech šest klonů pak bylo použito na přípravu plazmidové DNA a dva byly sekvenovány v oblasti PCR produktu podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Klony byly sekvenovány pomocí osmi samostatných oligonukleotidových primerů označených 1281, 677, 1504, 679, 1802, 1590, 1280 a 1731 (Podle Sekvence Id. č.: 55, 52, 60, 51, 63, 61, 53 a 62). Na základě výsledků sekvenace byl vybrán klon, který obsahoval plazmid s požadovanou D253K-HCPB genovou sekvencí a který je znám jako pIC11713.

Ověřená sekvence klonovaného D253K-HCPB genu v pIC11713, s vyznačenou translací aminokyselin od počátku PelB sekvence k EcoRI restričnímu místu, je označena jako Sekvence Id. č.: 74 s číslováním DNA, které začíná od 1 v prvním kodónu PelB a číslováním peptidu, které začíná od 1 v HCPB genu pro maturovaný protein.

S cílem dosáhnout kontrolované exprese D253K-HCPB byla pIC11713 plazmidová DNA transformována do expresivních kmenů E.coli vhodných pro transformaci, jenž rostly v prostředí chloridu sodného, podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. K testování exprese klonovaného D253K-HCPB genu byly všechny pIC11713 transformované expresivní kmeny zpracovány podobným způsobem jako v příkladu 15. V tomto případě byla ve Westernové analýze použita 9E10 monoklonální protilátka specifická pro C-myc

značenou část peptidu, neboť D253K-HCPB má C-terminalní (His)6-c-myc značku podobně jako v referenčním příkladu 15.

Expese klonovaného značeného D253K-HCPB v pICI266 (pICI1713) v E. coli byla prokázána pomocí gelů obarvených v Coomassie blue, z nichž byl patrný, na rozdíl od klonů obsahujících pouze vektor (pICI266) či klonů produkujících značený HCPB (referenční příklad 15), velký obsah proteinů o velikosti přibližně 35,000 Daltonů. Proteiny stejné velikosti byly detekovány i pomocí Western analýzy, jenž využívala c-myc značení peptidu.

Příklad 16: Klonování a exprese D253R HCPB-(His)6-c-Myc z E. coli

Způsob klonování a exprese D253R-HCPB v E.coli je velmi podobný tomu, který je popsán v referenčním příkladu 16. pICI266 byl opět použit jako klonovací vektor a výchozím materiálem pro PCR pro-HCPB genu byl plazmid pICI1712 (tak, jak je popsáno v referenčním příkladu 15). V tomto případě však byl během PCR amplifikace cílenou mutagenezí změněn kodón pro aminokyselinu v pozici 253 v genu pro maturovaný enzym z kodónu pro kyselinu asparagovou na kodón pro arginin (GAC na CGC), změna D253R. Byly připraveny dvě PCR směsi. Způsob jejich přípravy byl podobný tomu, jenž je popsán v referenčních příkladech 15 a 16. Primery v první reakci byly 2264 (podle Sekvence Id. č.: 65) a 2058 (podle Sekvence Id. č.: 75). Primery v druhé reakci byly 6HIS9E1OR1BS1 (podle Sekvence Id. č.: 59) a 2054 (podle Sekvence Id. č.: 76). Výchozí DNA v obou reakcích byla pICI1712.

Primery 2058 a 2054 (Podle Sekvence Id. č.:75 a 76) byly konstruovány tak, aby hybridizovaly kolem kodónu pro aminokyselinu v pozici 253, zavedly v DNA sekvenci změnu kodónu GAC na CGC a vytvořily komplementární sekvence na koncích obou PCR produktů. Druhé dva primery, 2264 a

6HIS9E1OR1BS1 (Podle Sekvence Id. č.: 65 and 59), jsou popsané v referenčním příkladu 15. Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu byly analyzovány alikvoty z těchto dvou PCR reakcí, byla detekována DNA správné velikosti (přibližně 750 a 250 bp) a odhadnuta její koncentrace. Vzorky obsahovaly převážně DNA správné velikosti. Pro další PCR reakci bylo použito přibližně 4ng z každého z prvních PCR produktů. Reakce probíhaly v přítomnosti dNTP, jejichž konečná koncentrace byla 200 μ M, Taq polymerázového reakčního pufru a 2U Taq polymerázy v konečném objemu 80 μ l. Před přidáním Taq enzymu byla směs po dobu 10 minut zahřívána při teplotě 94°C, PCR inkubace pak probíhala v deseti cyklech - při 94°C po dobu 1 minuty a při 63°C po dobu 4 minut. Na závěr těchto cyklů byla reakční směs doplněna do 120 μ l přidáním 120pmolů každého z primerů, 2264 a 6HIS9E1OR1BS1 (podle Sekvence Id. č.: 65 a 59), dalšího dNTP (přibližně 100 μ M), Taq polymerázového reakčního pufru a 4U Taq polymerázy. Před přidáním Taq enzymu byla směs po dobu 10 minut zahřívána při teplotě 94°C, PCR inkubace pak probíhala v třiceti cyklech - při 94°C po dobu 1,5 minuty, při 50°C po dobu 2 minut a při 72°C po dobu 2 minut. Na konci reakce pak byla provedena jednorázová inkubace při 72°C po dobu 9,9 minut.

Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu byl analyzován alikvot z PCR produktu a byla detekována DNA správné velikosti (přibližně 1000 bp). Vzorky obsahovaly převážně DNA správné velikosti. Zbytek produktu z reakční směsi byl purifikován obdobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Izolovaná DNA byla štěpena restričními enzymy FspI a EcoRI a bendy správné velikosti (přibližně 1000bp) byly purifikovány podobným způsobem jako v příkladu 15.

pICI266 dvouvláknová DNA, připravená podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15, byla štěpena restričními enzymy KpnI a EcoRI s důrazem na to, aby

bylo zajištěno kompletní rozštěpení. DNA správné velikosti (přibližně 5600 bp) byla purifikována podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Byla zkontrolována čistota alikvot obou restriktivně štěpených a purifikovaných vzorků DNA a koncentrace odhadnutá pomocí elektroforézy v agarovém gelu byla porovnána se známými standardy. Na základě těchto odhadů byly podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15 připraveny ligační směsi pro klonování genu HCPB do plazmidu pICI266 vektoru.

Po ligační reakci byla DNA směs použita k transformaci *E.coli* kmenu DH5 α , kolonie byly sebrány a testovány hybridizací podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15.

Tři klony pak byly použity k přípravě plazmidové DNA a byly sekvenovány v oblasti PCR produktu podobným způsobem jako v referenčním příkladu 15. Klony byly sekvenovány pomocí devíti samostatných oligonukleotidových primerů označených 1281, 677, 1504, 679, 1802, 1590, 1280, 1731 a 1592 (Podle Sekvence Id. č.: 55, 52, 60, 51, 63, 61, 53, 62a 70). Na základě výsledků sekvenace byl vybrán klon, který obsahoval plazmid s požadovanou D253R-HCPB genovou sekvencí a který je znám jako pICI1713.

Ověřená sekvence klonovaného D253R-HCPB genu v pICI1746, s vyznačenou translací aminokyselin od počátku PelB sekvence k EcoRI restriktivnímu místu, je označena jako Sekvence Id. č.: 77 s číslováním DNA, které začíná od 1 v prvním kodónu PelB a číslováním peptidu, které začíná od 1 v HCPB genu pro maturovaný protein.

S cílem dosáhnout kontrolované exprese D253R-HCPB byla pICI1746 plazmidová DNA transformována do expresivních kmenů *E.coli* vhodných pro transformaci, jenž rostly v prostředí chloridu sodného, podobným způsobem jako v

referenčním příkladu 15. K testování exprese klonovaného D253R-HCPB genu byly všechny pIC11746 transformované expresivní kmeny zpracovány podobným způsobem jako v příkladu 15. V tomto případě byla ve Western analýze použita 9E10 monoklonální protilátka specifická pro C-myc značenou část peptidu, neboť D253R-HCPB má C-terminalní (His)6-c-myc značku podobně jako v referenčním příkladu 15.

Expese klonovaného značeného D253R-HCPB v pIC1266 (pIC11746) v *E. coli* byla prokázána pomocí gelů obarvených v Coomassie blue, z nichž byl patrný, na rozdíl od klonů obsahujících pouze vektor (pIC1266) či klonů produkujících značený HCPB (referenční příklad 15), velký obsah proteinů o velikosti přibližně 35,000 Daltonů. Proteiny stejné velikosti byly detekovány i pomocí Western analýzy, jenž využívala c-myc značení peptidu.

Purifikace bylo dosaženo použitím obdobné metody jako v příkladu 17.

Příklad 17: Purifikace mutantních proteinů D253K HCPB-(His)₆-c-Myc z kultury *E. coli*

Nejprve bude popsán 20 litrový fermentační proces pro produkci analogu karboxypeptidázy B D253K v buněčné kultuře *E. coli*. *E. coli* K12 kmene MSD1924 byly transformovány plazmidem pZen1713 (pIC1 1713: viz příklad 15 výše) a výsledný kmen MSD2230 (MSD1924 pZen 1713) byl uskladněn v glycerolové mrazicí směsi při teplotě -80°C.

Buňky kmene MSD 2230 byly rozetřeny na agarové plotny obsahující 10 µg/ml L-tetracyklinu tak, aby mohly být druhého dne odebrány jednotlivé kolonie. Bakterie byly pěstovány při inkubační teplotě 37°C. Šest jednotlivých kolonií kmene MSD2230 byly odebráno z kultivační plotny s tetracyklinem a resuspendováno v 10 ml vývaru s 10 µg/ml L-tetracyklinu. 100µl této kultury bylo okamžitě naočkováno šest 250 ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 75 ml

bakteriální kultury za těchto podmínek lze typicky získat zhruba 20 g sušiny na litr média.

Buněčná hmota byla purifikována následujícím způsobem. Buněčná hmota obsahující rekombinantní E.coli s rekombinantním enzymem, D253K HCPB byla vyjmuta z mrazáku, kde byla skladována při teplotě -70°C a nechala se rozmrazit. Navážením byla stanovena hmotnost buněk na 309 gramů. Buňky byly poté resuspendovány přidavkem pufru A (obsahuje 200mM Tris (hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (TRIS-HCl), 20% sacharózu, pH 8,0) za vzniku 320 ml konečné buněčné suspenze.

Suspenze byla poté inkubována 20 minut za pokojové teploty za občasného jemného míchání. Poté byl za pokojové teploty přidán stejný objem destilované vody a důkladně promíchán se suspenzí. Buněčná suspenze se pak opět 20 minut inkubuje za pokojové teploty a občasného jemného míchání.

Osmoticky narušené buňky se poté zcentrifugují při 98000 x g (90 minut) a při teplotě 4°C . Po skončení centrifugace byl supernatant dekantací oddělen od peletovaných nerozpustných zbytků buněk. Objem čirého supernatantu činil 240 ml.

Deoxyribonukleáza 1 se rozpustí v 5 ml destilované vody, přidá se k supernatantu a reakční směs se 30 minut inkubuje za pokojové teploty a za stálého třepání aby viskozita směsi poklesla natolik, že může být nanesena na sepharózovou afinitní kolonu s inhibitorem karboxypeptidázy (CNBr aktivovaná sepharóza). Kolona se připraví podle instrukcí dodaných s CNBr aktivovanou Sepharózou™ 4B od firmy Pharmacia a s inhibitorem karboxypeptidázy z bramborových hlíz (c-0279, Sigma). Supernatant byl naředěn 1:1 puforem B (10 mM Tris-HCl, 500mM chlorid sodný, pH 8,0). pH supernatantu bylo upraveno na pH

8,0 a poté byl nanesen na kolonu předvrstvenou puforem B o teplotě 4°C. Pak byla kolona přes noc promývána elučním puforem (100mM uhličitan sodný, 500mM chlorid sodný, pH 11,4) o teplotě 4°C a při průtoku elučního pufru 05 ml/min dokud absorbance průchozího pufru nepoklesla zpět na hodnotu před nanesením vzorku.

Eluované 1ml frakce byly zmraženy na -20°C a poté byly pomocí Western blotu s myší monoklonální protilátkou 9E10 proti c-myc identifikovány ty, které obsahují rekombinantní karboxypeptidázu. Jako konjugátu bylo použito koňské-anti-myší protilátky s křenovou peroxidázou (a-9044, Sigma), který poskytuje barevnou reakci po přidavku 4-chloro-naftolu a peroxidu vodíku.

Frakce 11 až 44 obsahující rekombinantní karboxypeptidázu B byly spojeny, jejich pH nastaveno na 7,5 a poté zakoncentrovány pomocí centrifugační kolonky Millipore Ultrafree™ 20 (s prahem propustnosti 10 kDa). Poté byly rychle zamraženy na -20°C a za této teploty skladovány. Purifikací bylo získáno 4,7 mg mutované karboxypaptidázy D253K o 80% čistotě v objemu 0,95 ml.

Příklad 18: Syntéza neaktivního prekurzoru účinné látky odvozeného od aspartát fenol mustard sloučeniny (sloučenina 5a, obrázek 27) (2S),2-(3-{4-[bis-(2-chloroethyl) -amino)-fenoxykarbonyl]-propionyl-amino)-jantarová kyselina

K sytéze jsou použity podobné způsoby jako v referenčním příkladu 12. Dibenzyl ester (2S),2-(3- {4- [bis-(2-chloroethyl)- amino) -fenoxykarbonyl]-propionylamino) -jantarové kyseliny (sloučenina 4a) se 2 hodiny hydrogenuje při tlaku 0,5512 MPa (80 psi) za vzniku požadované konečného produkt, sloučeniny 5a. Výtěžek činí 86 %.

Vlastnosti sloučeniny 5a: ¹HNMR (CD₃OD): 2,65 až 2,75 (t, 2H); 2,8 až 2,9 (m. 4H); 3,7 až 3,75 (m. 4H); 3,8 až 3,85

(m, 4H): 4,75 (t, 1H): 6,7 až 6,8 (m, 2H); 7,0 až 7,1 (m, 2H).

MS (ESI): 471 až 473 (MNa)+

Anal.: (C₁₈H₂₂N₂O₇Cl₂ 1,4 H₂O)

Vypočteno: %C:45,56 H: 5,27 N: 5,90

Nalezeno: %C:45,79 H: 5,60 N: 5,91

Výchozí materiál sloučenina 4a se připraví následujícím způsobem.

Dibenzyl ester (2S),2-amino-jantarové kyseliny (sloučenina 2a) se nechá reagovat se sloučeninou 1 za vzniku dibenzyl esteru (2S),2-(3-karboxypropionyl-amino)-jantarové kyseliny (sloučeniny 3a) po rekrystalizaci z diethyl etheru/hexanu. Výtěžek činí 80% Sloučenina 3a: ¹HNMR (CDCl₃): 2,42 až 2,66 (m, 2H); 2,6 až 2,75 (m, 2H); 2,85 (dd, 2H); 3,1 (dd, 1H); 4,9 (dd, 1H); 5,05 (dd, 2H); 5,15 (s, 2H); 6,7 (d, 1 H); 7,25 až 7,5 (m, 10H).

MS (ESI): 436 [MNa]+

Anal.: (C₂₂H₂₃NO₇ 0,4H₂O):

Vypočteno: %C: 62,82 H: 5,70 N: 3,33

Nalezeno: %C: 63,2 H: 5,75 N: 2,9

Reakcí sloučeniny 3a vznikl požadovaný výchozí materiál sloučenina 4a s výtěžkem 78 %. Reakční směs byla 3 hodiny míchána za pokojové teploty a sloučenina 4a byla purifikována mžikovou chromatografií za použití diethyl etheru/hexanu (70/30 objemově) jako elučního činidla.

Sloučenina 4a; ¹HNMR (CDCl₃): 2,55 až 2,65 (m, 2H); 2,8 až 2,9 (m, 2H); 2,9 (dd, 1H); 3,1 (dd, 1H); 3,6 (dd, 4H); 3,7 (dd, 4H); 4,9 (dd, 1H); 5,05 (dd, 2H); 5,15 (s, 2H); 6,58 (d, 1H); 6,65 (d, 2H); 6,95 (d, 2H); 7,25 až 7,4 (m, 10H).

MS (ESI): 651 až 653 (MNa)+

Příklad 19: Syntéza neaktivního prekurzoru účinné látky odvozeného od glutamát fenol-mustard (sloučenina 5b; obrázek 27)

(2S),2-(3-{4-[bis-(2-chlornethyl)-amino]-fenoxykarbonyl}-propionyl-amino-pentandiová kyselina

K syntéze byly použity analogické způsoby jako v referenčním příkladu 12. Dibenzyl ester (2S),2-(3-{4-(bis-(2-chloroethyl)-amino)-fenoxykarbonyl}-propionylamino)-pentandiové kyseliny (sloučenina 4b) se 3 hodiny hydrogenuje za tlaku 0,4134 MPa (60 psi) přičemž vzniká požadovaný konečný produkt sloučenina 5b s výtěžkem 93 %.

Sloučenina 5b: ¹HNMR (CD₃OD): 1,9 až 2,0 (m, 1H); 2,1 až 2,2 (m, 1H); 2,35 až 2,45 (m, 2H); 2,55 až 2,7 (m, 2H); 2,8 až 2,9 (m, 2H); 3,65 až 3,7 (m, 4H); 3,72 až 3,8 (m, 4H); 4,4 až 4,5 (m, 1 H); 6,75 (d, 2H); 6,95 (d, 2H).

MS (ESI): 485 až 487 (MNa)+

Výchozí materiál sloučenina 4b se připraví následujícím způsobem.

Dibenzyl ester (2S),2-amino-pentandiové kyseliny (sloučenina 2b) se nechala reagovat za vzniku dibenzyl esteru (2S),2-(3-karboxypropionylamino)-pentandiové kyselina (sloučeniny 3b) s kvantitativním výtěžkem.

Sloučenina 3b: ¹HNMR (CDCl₃): 2,0 až 2,1 (m, 1H); 2,2 až 2,3 (m, 1H); 2,3 až 2,5 (m, 4H); 2,6 až 2,7 (m, 2H); 4,65 (dd, 1 H); 5,05 (s, 2H); 5,15 (s, 2H); 6,5 (d, 1 H); 7,3 až 7,4 (m, 10 H).

MS (ESI): 450 [MNa]⁺

Reakcí sloučeniny 3b vzniká požadovaný výchozí materiál sloučenina 4b s 82% výtěžkem.

Sloučenina 4b: ¹HNMR (CDCl₃): 1,95 až 2,05 (m, 1H); 2,2 až 2,3 (m, 1H); 2,3 až 2,5 (m, 2H); 2,6 (dt, 2H); 2,8 až 3,0 (m, 2H); 3,6 (dd, 4H); 3,7 (dd, 4H); 4,7 (dd, 1H); 5,1 (s, 2H); 5,2 (s, 2H); 6,3 (d, 1 H); 6,6 (d, 2H); 6,95 (d, 2H); 7,3 až 7,4 (m, 10 H).

MS (ESI): 665 až 667 (MNa)⁺

Příklad 20: Stanovení aktivity mutované lidské CPB a nativní lidské CPB proti analogům neaktivních prekurzorů účinné látky Hipp-Asp a Hipp-Glu.

Purifikované mutantní lidské karboxypeptidázy B (CPB, D253K a D253R: viz příklady 15 až 17) a nativní lidské CPB připravené podle referenčního příkladu 20, byly testovány na svoji schopnost konverze hippuryl-L-asparagové kyseliny (Hipp-Asp, viz referenční příklad 10), hippuryl-L-glutamové kyseliny (Hipp-Glu, viz referenční příklad 9) nebo hippuryl-L-argininu (Sigma Chemical Company - Kat. č. H6625) na hippurovou kyselinu. Schopnost konverze byla testována pomocí HPLC.

250 μ l reakční směsi obsahovalo 4 μ g lidské CPB (nativní nebo mutantní) a 0,5 mM Hipp-Asp nebo Hipp-Glu v 0,025 M Tris-HCl, pH 7,5. Vzorky byly 5 hodin inkubovány při teplotě 37°C. Reakce byla ukončena přidávkem 250 μ l 80 % methanolu, 20 % destilované vody, 0,2 % trifluoroctové kyseliny. Množství vzniklé kyseliny hippurové bylo stanoveno pomocí HPLC.

HPLC analýza byla provedena pomocí HPLC systému Hewlett Packard 1090 Series 11 (s diodovým polem). Vzorky

po 50 μ l byly natříknuty na kolonu Hichrom Hi-RPB (25 cm) rozděleny pomocí mobilní fáze sestávající z 40% methanolu, 60% destilované vody a 0,1 % trifluoroctové kyseliny při průtokové rychlosti 1 ml/min. Množství produktu (hippurové kyseliny) vzniklé enzymatickou reakcí bylo stanoveno podle kalibračních křivek získaných ze známých množství kyseliny hippurové (Sigma-H6375). Výsledky jsou vyjádřeny jako procento konverze substrátu na produkt za 5 hodin při teplotě 37°C a s 4 μ g enzymu, viz tabulka.

Konverze substrátů Hipp-Asp a Hipp-Glu mutantní a nativní lidskou karboxypeptidázou B (CPB)

	Hipp-Asp	Hipp-Glu	Hipp-Asg
	% převedené na kyselinu hippurovou		
Nativní CPB	0	0	100
mutantní CPB D253K	78	91	<2
mutantní CPB D253R	72	52	3

Z dat vyplývá, že vložení lysinového nebo argininového zbytku na pozici 253 v lidské CPB místo zbytku kyseliny asparagové v nativním enzymu mění substrátovou specifitu enzymu tak, že je schopen konverze Hipp-Asp nebo Hipp-Glu. Naproti tomu nativní enzym není schopen konvertovat žádnou z těchto sloučenin na kyselinu hippurovou, ale konvertuje Hipp-Arg na hippurovou kyselinu. Nejvyšší aktivitu vykazoval mutant D253K se substrátem Hipp-Glu.

Příklad 21 Stanovení K_m a k_{cat} mutantního enzymu HCPB D253K se substráty Hipp-Asp a Hipp-Glu

Purifikovaný HCPB D253K byl připraven tak, jak bylo popsáno v příkladu 17. Tento zmutovaný enzym byl testován na svoji schopnost konverze Hipp-Asp (viz referenční příklad 10) a Hipp-Glu (viz referenční příklad 9) a byly určeny hodnoty jeho K_m a k_{cat} platné pro tyto substráty. Hipp-Glu a Hipp-Asp byly naředěny v rozsahu 0,25 až 8,0 mM respektive 0,25 až 5,0 mM v 0,025 M Tris-HCl pufru o pH 7,5. V případě potřeby bylo pH vzorků nastaveno na pH 7,5 pomocí 1M NaOH.

Pak byla k těmto vzorkům přidána mutovaná HCPB D253K (4 $\mu\text{g/ml}$ pro Hipp-Asp a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pro Hipp-Glu) do celkového objemu 500 μl . Vzorky byly poté 5 hodin inkubovány při teplotě 37°C. Reakce byly ukončeny přidávkem 500 μl 80% methanolu s 0,2% triflorooctovou kyselinou. Množství hippurové kyseliny vzniklé reakcí bylo kvantifikováno pomocí HPLC, viz příklad 20.

Hodnoty konstant K_m a V_{max} byly spočítány za použití programu ENZFITTER™ (Biosoft, Perkin Elmer). Konstanta k_{cat} byla spočítána z konstanty V_{max} vydělením koncentrací enzymu v reakční směsi (molekulová hmotnost HCPB je 34 kDa). Výsledky viz tabulka.

Hodnoty K_m a k_{cat} pro konverzi Hipp-Asp a Hipp-Glu mutantní HCPB D253K

	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Hipp-Asp	2,7	0,26	0,1
Hipp-Glu	5,3	3,8	0,7

Údaje potvrzují, že nahrazením zbytku kyseliny asparagové lysinovým zbytkem na pozici 253 v lidské CPB vedou ke vzniku enzymu, schopného konvertovat jak Hipp-Asp tak i Hipp-Glu na hippurovou kyselina s rozumnou enzymovou

kinetikou. Poměr konstant k_{cat}/K_m je přibližně 7-krát vyšší se substrátem Hipp-Glu než se Hipp-Asp.

Příklad 22: Stanovení aktivity mutované HCPB a nativní HCPB proti neaktivnímu prekuzoru účinné látky odvozenému od kyseliny glutamové

Purifikovaná HCPB D253K a nativní lidská karboxypeptidáza B připravená podle příkladu 17 respektive referenčního příkladu 20 byly testovány na svoji schopnost enzymaticky odštěpit kyselinu glutamovou od neaktivního prekuzoru účinné látky založeného na kyselině glutamové (viz příklad 18). Štěpením se uvolňuje meziproduct (viz referenční příklad 13), který se sám, ne-enzymaticky rozkládá za uvolnění aktivní fenol-mustard účinné látky. Konverze neaktivního prekuzoru účinné látky odvozeného od kyseliny glutamové na tento meziproduct byla měřena pomocí HPLC.

Neaktivní prekuzor účinné látky byl naředěn v rozsahu 0,25 až 5,0 mM v pufru 0,025 M Tris-HCl o pH 7,5. V případě potřeby bylo pH vzorků upraveno na 7,5 přidavkem 1M NaOH. Mutantní HCPB D253K nebo nativní HCPB byly přidány do výsledné koncentrace 0,25 mg/ml. Vzorky byly ještě před přidavkem enzymu předeřhřáty na teplotu 37°C. Celkový reakční objem činil 250 μ l. Vzorky se 4 minuty inkubují při teplotě 37°C. Reakce byla ukončena přidavkem 250 μ l 98,8% MeCN, 0,2% TFA a vzorky dány na led. Množství vzniklého meziproductu bylo stanoveno pomocí HPLC.

HPLC byla provedena tak, jak bylo popsáno v příkladu 20 kromě toho, že jako mobilní fáze bylo použito směsi MeCN/destilovaná voda (55 ku 45 objemově) s přidavkem 0,1 % TFA. Tento eluční roztok umožní separaci neaktivního prekuzoru účinné látky (retenční čas 4,9 minuty) a meziproductu (retenční čas 8,4 minuty). Množství vzniklého meziproductu bylo stanoveno pomocí kalibračních křivek získaných ze známých množství meziproductu.

Množství vzniklého meziprojektu vzniklého z 5,0 mM a 0,2 mM roztoku neaktivního prekursoru účinné látky činností nativní a mutované formy HCPB (D253K) v opakovaných vzorcích ukazuje tabulka str. 105.

Konverze neaktivního prekursoru účinné látky na meziprojekt činností nativní a mutované formy HCPB (D253K)

Koncentrace neaktivního prekursoru účinné látky (mM)	Koncentracew intermediátu	
	Nativní HCPB	Mutantní HCPB
5,0	0,0	0,023 0,022
0,25	0,0	0,005 0,005

Hodnoty K_m , V_{max} a k_{cat} pro lidský mutovaný enzym (D253K) a příslušný neaktivní prekursor účinné látky se spočítá z množství meziprojektu vzniklého z různých koncentrací substrátu (0,25 až 3,0 mM) pomocí programu ENZFITTER™ viz příklad 21.

Výsledky pro mutantní formu HCPB D253K:

$$K_m = 1,25 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 1,17 \times 10^{-4} \text{ mM} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$k_{cat} = 0,016 \text{ sec}^{-1}$$

Údaje potvrzují, že nahrazením zbytku kyseliny asparagové lysinovým zbytkem na pozici 253 v lidské CPB vedou ke změně substrátové specifity za vzniku enzymu, schopného konvertovat neaktivní prekursor účinné látky odvozený od kyseliny glutamové na samovolně se rozkládající meziprojekt. Naproti tomu nativní forma enzymu není schopna této konverze. Vzhledem k tomu, že neaktivní prekursor účinné látky má reletivně nízkou cytotoxicitu (viz příklad 23) a meziprojekt se ne-enzymaticky rozkládá za uvolnění volné fenol-mustard účinné látky, která zabíjí tumorové buňky (viz příklad 23), ukazují výsledky mutace v aktivním

místě CPB může dát vzniknout mutantní formě lidského enzymu, která je schopná konverze relativně málo cytotoxického prekursoru účinné látky na účinnou cytotoxic látku schopnou usmrtit tumorové buňky.

Příklad 23: Cytotoxicita neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od kyseliny glutamové a účinné látky fenol-mustard v lidských buňkách LoVo z kolorektálního nádoru.

Různá cytotoxicita neaktivního prekursoru účinné látky odvozeného od kyseliny glutamové a odpovídající účinné látky s fenol mustard pro nádorové buňky byla dokázána následujícím způsobem.

Nádorové buňky LoVo z kolorektálního tumoru byly 1 hodinu inkubovány s prekurzorem účinné látky nebo s účinnou látkou o různých konečných koncentracích v rozmezí 5×10^{-4} až 5×10^{-8} M v 96-jamkových mikrotitračních deskách (2,500 buněk na jamku) při teplotě 37°C. Poté byly buňky promyty a další 3 dny inkubovány při teplotě 37°C. Poté byla do jamek přidána TCA a jamky byly promytím zbaveny mrtvých buněk. Množství buněčných proteinů adheřujících ke stěnám jamky bylo stanoveno pomocí barviva SRB tak, jak bylo popsáno v publikaci P. Skehan a další J. Natl. Cancer Inst. 82, 107 (1990). Účinnost jednotlivých sloučenin byla vyjádřena koncentrace nutnou k inhibici buněčného růstu o 50% (IC50).

Z pokusu s Lo Vo buňkami ošetřenými přímo účinnou látkou fenol-mustard vyplynula IC50 této účinné látky přibližně 1 μ M. Naproti tomu neaktivní prekurzor účinné látky založený na glutamové kyselině byl mnohem méně cytotoxický (IC50 byla přibližně 50 μ M), viz obrázek 22. Z toho vyplývá, že neaktivní prekurzor účinné látky s glutamovou kyselinou je přibližně 50-krát méně cytotoxický pro nádorové buňky než vlastní účinná látka fenol-mustard.

Když se přidá 100 μg mutantantní HCPB D253K připravené podle příkladu 17 do testovacích jamek obsahujících neaktivní prekursor účinné látky s glutamovou kyselinou, může být pozorována cytotoxicita srovnatelná s aktivní účinnou látkou. To dokazuje konverzi neaktivního prekursoru účinné látky mutovaným enzymem za vzniku mnohem silnější látky účinné. Přitom přídavek 100 μg nativní lidské CPB do každé jamky nijak významně cytotoxicitu neaktivního prekursoru účinné látky nezvyší. Tyto pokusy dokazují schopnost zmutované lidské karboxypeptidázy B D253K selektivně konvertovat poměrně neaktivní prekursor účinné látky na silnou, cytotoxicky účinnou látku schopnou usmrtit nádorové buňky.

Příklad 24: Příprava fúzního proteinu: humanizovaný fragment A5B7 F(ab')₂-D253K HCPB

Opakuje se postup popsáný v referenčním příkladu 21, ale místo sekvencí pro myší lehký řetězec A5B7 a Fd se použijí sekvence pro humanizovaný fragment A5B7 a místo sekvence pro HCPB se použije sekvence pro HCPB D253K. Fúzní protein je poté exprimován buňkami COS po kotransfekci sekvencí pro prepro-HCPB tak, jak bylo popsáno v referenčním příkladu 21.

Exprese fúzního proteinu ve velkém měřítku byla provedena tak, že do 1l buněk COS-7 byl transientně vložen plazmidový vektor s (750 μg každého z vektorů), viz referenční příklad 21. Výsledný produkt byl purifikován buď průchodem supernatantu obsahujícího fúzní protein přes imobilizovaný protein A a elucí vázaného fúzního proteinu pufrem s vysokým pH nebo průchodem supernatantu obsahujícího fúzní protein přes imobilizovaný inhibitor karboxypeptidázy a dalším pokračováním purifikace rekombinantní karboxypeptidázy podle příkladu 12. Oba způsoby mohou zahrnovat další purifikaci fúzního proteinu buď gelovou permeační chromatografií, chromatografií na

iontoměničů nebo hydrofóbní interakční chromatografií nebo jejich kombinací.

Dále se opakuje postup popsáný v referenšním příkladu 21, ale myší sekvence Fd a lehký řetězec podle Sekvencí id. č.: 25 a 26 jsou nahrazeny humanizovanými sekvencemi podle Sekvencí id. č.: 28 respektive 29. Sekvence pro nativní HCPB z referenčního příkladu 21 je nahrazena sekvencí pro karboxypeptidázu D253K [viz příklad 15, ale bez (His)₆-c-Myc značky]. Templát pro PCR z referenčního příkladu 21 (pIC11698) je nahrazen plazmidem pIC11713 (viz příklad 15).

Humanizované sekvence podle Sekvencí id. č.: 28 a 29 mohou být připraveny mnoha způsoby včetně těch popsáných v publikacích Edwards (1987) Am. Biotech. Lab. 5, 38 až 44.. Jayaraman a další (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4084 až 4088, Foguet a Lubben (1992) Biotechniques 13, 674 až 675 a Pierce (1994) Biotechniques 16, 708.

Příklad 25: Přípravu D253K HCPB fermentací v třepané nádobě

E.coli kmene MSD 213 se transformují plazmidem pIC11713 (viz příklad 15) a výsledný kmen MSD 213 pZen 1713 se uskladní v glycerolu za teploty -80°C. Alikvot buněk kmene MSD 213 pZen 1713 se rozetře na agarové plotny s L-tetracyklinem tak, aby se druhého dne po inkubaci při teplotě 37°C mohly to separovat jednotlivé kolonie. Jediná kolonie MSD 213 pZen 1713 byla odebrána z této plotny použita k naočkování 250ml Erlenmeyer baňky obsahující 75ml vývaru s L-tetracyklinem. Po inkubaci trvající 16h při teplotě 37°C na třepačce byl použit obsah baňky pro naočkování devíti 2l Erlenmeyerových baněk obsahujících 600ml vývaru s L-tetracyklinem do OD₅₅₀=0,1. Tyto baňky se poté na třepačce inkubují při teplotě 20°C dokud OD₅₅₀ nedosáhne hodnoty 0,5. V tomto okamžiku se indukuje

produkce heterologického proteinu přidavkem L-arabinózy do kultivačního média do výsledné koncentrace 0,01% w/v a v inkubaci se pokračuje při teplotě 20°C tak, jak bylo popsáno výše po dalších 42 hodin. Vyčerpané médium se oddělí od bakteriálních buněk centrifugací na centrifuze Sorvall RC-3B (7000 x g, 4°C, 30 minut) a buněčná hmota se uskladní při -70°C.

Příklad 26: Použití ADEPT v autologní transplantaci kostní dřeně

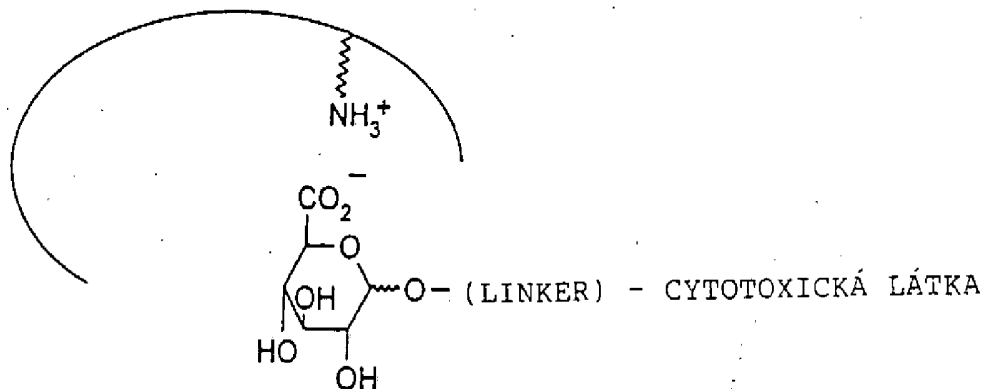
Autologní transplantace kostní dřeně zahrnuje odebrání části vlastní dřeně pacienta ještě předtím, než je mu poskytnuta intenzivní radiochemoterapie. Poté se pacientovi navrátí jeho vlastní kostní dřeň. U některých druhů nádorových onemocnění jako například u leukemií a lymfomů B- a T-buněk a karcinomů prsu, plic nebo střeva infiltrují maligní buňky dřeň a musí být zničeny ještě před vrácením dřeně pacientovi. K tomuto účelu byly používány konjugáty protilátka -toxin viz Blakey, D. C. a další, Prog. Allergie svazek 45, 50, 1988).

K tomuto účelu může být použit ADEPT, zvláště pak, jsou-li použita reaktivní alkylační činidla založená na látce mustard jakožto účinné složky. Kostní dřeň pacienta, obsahující nádorové buňky se inkubuje s vhodným konjugátem protilátka-enzym. Poté co se protilátka selektivně naváže na nádorové buňky, přebytečný konjugát se vymyje. Poté se přidá neaktivní prekurzor účinné látky a v blízkosti antigen-positivních nádorových buněk se začne tvořit účinná látka. Výsledkem je selektivní usmrcení nádorových buněk. Normální buňky kostní dřeně mohou být chráněny vhodným ředěním kostní dřeně tak, aby byla zajištěna dostatečná vzdálenost mezi místem vzniku účinné látky na nádorové buňce a zdravými buňkami kostní dřeně. Dojde tak dříve k inaktivaci účinné látky než k zasažení buněk kostní dřeně. Přídavek proteinu, který pak tvoří nukleofil pro reaktivní

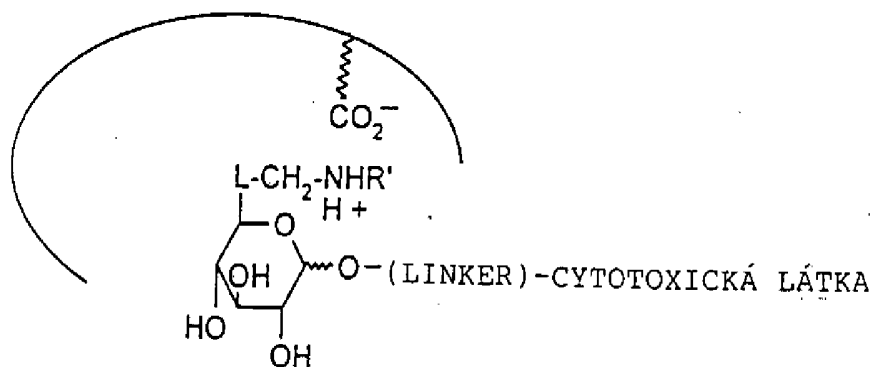
"mustard" účinnou látku, může být rovněž použit pro minimalizaci poškození normalní kostní dřeně.

Příklad 27: Použití mutované glukuronidázy pro ADEPT s opačnou polaritou

Lidská glukuronidáza dalším enzymem u kterého může být použit koncept `reverzní polarity` pro přípravu specifického lidského enzymu, schopného štěpení neaktivního prekursoru účinné látky za uvolnění aktivní účinné látky. Bosslet a další, Cancer Res. 54, 2151, 1994 popisují neaktivní prekursor účinné látky založený na adriamycin-glukuronidu jako substrátu pro nativní lidskou glukuronidázu a popisují rovněž syntézu škály alternativních prekursorů účinné látky z nichž pak vznikají příslušné účinné látky, viz Bosslet v patentové přihlášce AU - 50225/93. Endogenní nativní glukuronidáza přítomná v krvi a tkáních však může popřípadě konvertovat tyto prekursorů účinných látek za uvolnění aktivní účinné látky bez nutné přítomnosti konjugátu protilátka-glukuronidáza a tím vlastně snížit specifitu léčby. Cheng a Touster (J.B.C. 247, 2650, 1972) popisují, že v aktivním místě glukuronidázy je pozitivně nabitá aminokyselina, která reaguje s negativně nabitou karboxylovou skupinou na glukuronidovém kruhu.



Glukuronid může být buď přímo navázán na cytotoxické činidlo nebo s ním může být spojen linkerem například takovým, jaký je popsán v publikaci Bosslet a další, (Cancer Res.) 54, 2151, 1994 a Patent Au-A-50225/93). Je-li negativně nabitá karboxylová skupina glukuronidového kruhu nahrazena pozitivně nabitou skupinou R, například = L-CH₂-NH₂ nebo L-CH₂-NHR' (kde R' = C₁ až 4 alkyl a L = [CH₂]_{0 až 3} nebo jiné vhodné linkery) přestane být tento prekurzor účinné látky substrátem pro nativní glukuronidázu. A je-li kladně nabitý zbytek v aktivním místě glukuronidázy zaměněn za záporně nabitou aminokyselinu například glutamovou nebo asparagovou, pak tato mutantní glukuronidáza bude konvertovat selektivně kladně nabitý prekurzor účinné látky podobným způsobem jako analogické příklady RNázy a karboxypeptidázy B. Tím může být koncept reverzní polaroty rozšířen i na lidskou glukuronidázu a kladně nabité prekurzory účinné látky.



Seznam sekvencí

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 1:

GGTCTGCCCA TTCTCGCAGC CAACATTTTT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 2:

TGCTACCAGA GCTACTCCAC CATGAGCATC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 3:

AATGTTGCCT GCGAGAATGG GCAGACCCAAT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 4:

CTGGGAGCAC ACGGCCTGGA CATCAGCCA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 31 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 5:

CGCGCGAATT CGGGTCCAGC CTTCCCTGGG C

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 31 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 6:

GGCCGGAATT CCATCAAAGT GGACTGGCAC A

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 45 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 7:

CGCTGTTGGT CCTGGTGCTG CTGCTGGTGC GGGTCCAGCC TTCCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 45 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 8:

TGATGGCTCT GAAGTCCCTG GTCCTGTTGT CGCTGTTGGT CCTGG

01.10.97

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 46 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 9:

GCGCGAATTC ATGTTCTTGG AGGATGATTG ATGGCTCTGA AGTCCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 48 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 10:

CGCGGAATTC CTAGGTAGAG TCTTCAACAG AAGCATCAAA GTGGACTG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 11:

AAGGAATCCG CTGCCGCTAA ATTCCAGCGG CAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 12:

GGAAGGCTGG ACCCGCACCA GCAGCAGCAC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 33 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 13:

CTGGAATTTA GCGGCAGCGG ATTCCTTGCC CAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 14:

CATATGGACT CAGACAGTTC CCCAGCAGC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 15:

GTGTGAATTC CCATGGCGAA GGAATCCGCT GCCGCTAAA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 16:

GTGTGAATTC CTAGGTAGAG TCTTCAACAG AAGC

01.10.97

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 17:

ATATAAAGCT TGCCGCCACC ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 48 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 18:

ATCGAATTCTG CCGCCACCAT GGATTTTCAA GTGCAGATTT TCAGCTTC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 45 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 19:

TGAGAATTCT TACTATGTAC ATAGCAAGG CTTACAAGG CAATC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 20:

GCGCCGAATT CTTATTAACA CTCATTCCTG TTGAA

01.10.97

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 21:

GACCTGGAAC TCTGGATCTC TGTCCAGCGG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 22:

AGGTGCAC ACCGCTGGAC AGAGATCCAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 23:

TGGTACCAGC AGAAGCCAGG TTCCTCCCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 24:

GGATTTGGGG GAGGAACCTG GCTTCTGCTG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 777 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 25:

AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAG TTG TGG CTG AAC TGG ATT TTC CTT GTA	48
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val	
1 5 10	
ACA CTT TTA AAT GGT ATC CAG TGT GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA	96
Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly	
15 20 25	
GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACT	144
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr	
30 35 40	
TCT GGG TTC ACC TTC ACT GAT TAC TAC ATG AAC TGG GTC CGC CAG CCT	192
Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro	
45 50 55	
CCA GGA AAG GCA CTT GAG TGG TTG GGT TTT ATT GGA AAC AAA GCT AAT	240
Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn	
60 65 70 75	
GGT TAC ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC	288
Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile	
80 85 90	
TCC AGA GAC AAA TCC CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG	336
Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu	
95 100 105	
AGA GCT GAG GAC AGT GCC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT AGG GGG CTA	384
Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu	
110 115 120	
CGG TTC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC	432
Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser	
125 130 135	
TCA GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT	480
Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser	
140 145 150 155	

GCT GCC CAA ACT AAC TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC	528
Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly	
160 165 170	
TAT TTC CCT GAG CCA GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCT CTG TCC	576
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser	
175 180 185	
AGC GGT GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT	624
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr	
190 195 200	
CTG AGC AGC TCA GTG ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC GAG ACC	672
Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr	
205 210 215	
GTC ACC TGC AAC GTT GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG	720
Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys	
220 225 230 235	
AAA ATT GTG CCC AGG GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA TAG	768
Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr End	
240 245 250	
TAA GAA TTC	777

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 732 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 26:

GAA TTC GCC GCC ACC ATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTA ATC AGT GCT TCA GTC ATA ATG TCC AGA GGA CAA ACT GTT CTC TCC	96
Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Thr Val Leu Ser	
15 20 25	
CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG	144
Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met	
30 35 40	

01.10.97

ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA ACT TAC ATT CAC TGG TAC CAG CAG 192
 Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln
 45 50 55

AAG CCA GGT TCC TCC CCC AAA TCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG 240
 Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu
 60 65 70 75

GCT TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT 288
 Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 80 85 90

TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT 336
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 95 100 105

TAC TGC CAA CAT TGG AGT AGT AAA CCA CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC 384
 Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 110 115 120

AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC 432
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe
 125 130 135

CCA CCA TCC AGT GAG CAG TTA ACA TCT GGA GGT GCC TCA GTC GTG TGC 480
 Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys
 140 145 150 155

TTC TTG AAC AAC TTC TAC CCC AAA GAC ATC AAT GTC AAG TGG AAG ATT 528
 Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
 160 165 170

GAT GGC AGT GAA CGA CAA AAT GGC GTC CTG AAC AGT TGG ACT GAT CAG 576
 Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln
 175 180 185

GAC AGC AAA GAC AGC ACC TAC AGC ATG AGC AGC ACC CTC ACG TTG ACC 624
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr
 190 195 200

AAG GAC GAG TAT GAA CGA CAT AAC AGC TAT ACC TGT GAG GCC ACT CAC 672
 Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His
 205 210 215

AAG ACA TCA ACT TCA CCC ATT GTC AAG AGC TTC AAC AGG AAT GAG TGT 720
 Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 220 225 230 235

TAA TAA GAA TTC

End End 732

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 27:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 30 basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 27:

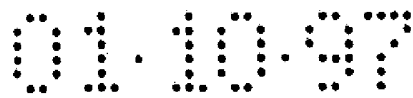
TCGCTATTAC CATGGTGAGT CGGTTTTGGC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 28:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 777 párů basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 28:

AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAG TTG TGG CTG AAC TGG ATT TTC CTT GTA	48
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val	
1 5 10	
ACA CTT TTA AAT GGT ATC CAG TGT GAG GTG CAG CTG CTG GAG TCT GGA	96
Thr Leu Leu Asn Gly Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly	
15 20 25	
GGA GGA CTG GTG CAG CCT GGA GGA TCT CTG AGA CTG TCT TGT GCA ACA	144
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr	
30 35 40	
TCT GGA TTC ACC TTC ACA GAC TAC TAC ATG AAT TGG GTG AGA CAG GCA	192
Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala	
45 50 55	
CCT GGA AAG GGA CTC GAG TGG CTG GGC TTC ATC GGA AAT AAG GCA AAT	240
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn	
60 65 70 75	
GGA TAC ACA ACA GAG TAC TCT GCA TCT GTG AAG GGA AGA TTC ACA ATT	288
Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile	
80 85 90	
TCC AGA GAC AAG AGC AAG TCC ACA CTG TAC CTG CAG ATG AAT ACA CTG	336
Ser Arg Asp Lys Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu	
95 100 105	



CAG GCA GAG GAC TCT GCA ATT TAC TAC TGT ACA AGA GAC AGA GGA CTG 384
 Gln Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu
 110 115 120

AGA TTC TAC TTC GAC TAC TGG GGA CAG GGA ACA CTG GTG ACA GTG TCT 432
 Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 125 130 135

TCT GCT AGC ACC AAG GGA CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCC CCC TGC TCC 480
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 140 145 150 155

AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC 528
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 160 165 170

TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCT CTG ACC 576
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 175 180 185

AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC 624
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 190 195 200

TCC CTC AGC AGC GTC GTG ACG GTG CCC TCC AGC AAC TTC GGC ACC CAG 672
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
 205 210 215

ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC 720
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 220 225 230 235

AAG ACA GTT GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG TGC CCA CCG TGC CCG TAA 768
 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro End
 240 245 250

TAG GAA TTC
 End

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 29:

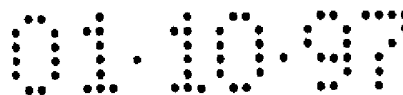
(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 732 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 29:

011097

GAA TTC GCC GCC ACC ATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTA ATC AGT GCT TCA GTC ATA ATG TCC AGA GGA CAG ACT GTA CTC ACT	96
Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Thr Val Leu Thr	
15 20 25	
CAG AGT CCA AGT AGT CTC AGT GTA AGT GTA GGT GAT AGG GTA ACT ATG	144
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met	
30 35 40	
ACT TGT AGG GCC AGT AGT AGT GTA ACT TAT ATC CAT TGG TAT CAG CAG	192
Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln	
45 50 55	
AAA CCA GGT CTC GCC CCA AAA AGT TGG ATC TAT GCC ACT AGT AAC CTC	240
Lys Pro Gly Leu Ala Pro Lys Ser Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu	
60 65 70 75	
GCC AGT GGT GTA CCA TCT AGA TTC AGT GGT AGC GGT AGT GGT ACT GAT	288
Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
80 85 90	
TAT ACT CTC ACT ATC AGT AGT CTC CAG CCA GAA GAT ATC GCC ACT TAC	336
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr	
95 100 105	
TAT TGC CAG CAT TGG AGT AGT AAA CCA CCA ACT TTC GGT CAG GGT ACT	384
Tyr Cys Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr	
110 115 120	
AAA GTA GAA GTA AAA CGT ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC	432
Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	
125 130 135	
CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC	480
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys	
140 145 150 155	
CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG	528
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val	
160 165 170	
GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG	576
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln	
175 180 185	



GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	624
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
		190					195					200				
AAA	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	672
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	
		205				210					215					
CAG	GGC	CTG	AGT	TCG	CCC	GTC	ACA	AAG	AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT	720
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
		220			225					230					235	
TAA	TAG	GAA	TTC													732
End	End															

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 30:

AAGGTCACCT GCGAAAACGG GCAGGGCAAC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 25 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

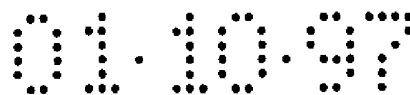
(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 31:

CTGGAAACAG ACATTCTGGA CATCT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární



(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 32:

GCCCTGCCCG TTTTCGCAGG TGACCTTTTC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 33:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 26 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 33:

TGCTACAAGA GCAACTCCAG CATGCA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 41 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 34:

CTCTAGGAAT TCTTATTAGT ACAGGTGTTT CAGGACGTAG C

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 108 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 35:

CCCAAGCTTG CCGCCACCAT GTTGGCAGTC TTGGTTCTGG TGA CTGTGGC
CCTGGCATCT GCTGCAACAG GACACAGTTA TGAGAAGTAC AACAAAGTGGG
AAACGATA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 36:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 16 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 36:

01.10.97

AACAGCTATG ACCATG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 37:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 17 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 37:

GTAAAACGAC GGCCAGT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 38:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 38:

TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 39:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 39:

CAGACTCTGC AGCAGGTCCA CAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 40 :

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 54 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 40:

CCCAAGCTTG CCGCCACCAT GTTGGCACTC TTGGTTCTGG TGACTGTGGC
CCTG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 41:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 41:

CTCATAACTG AATTCTTATT AACGAACCCG GCTATCAAA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 42:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 42:

GGATCTGCTG CCCAAGCTTA CTCCATGGTG ACCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 43:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 80 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 43:

CTTCTCATAA CTGTGFCCTG TTGCGAACAC GCTGCTCACC TCGGGCACTG
TACATATGCA AGGCTTACAA CCACAATCCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 44:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 78 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 44:
GGTTGTAAGC CTTGCATATG TACAGTGCCC GAGGTGAGCA GCGTGTTCCG
AACAGGACAC AGTTATGAGA AGTACAAC
INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 45:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 27 basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 45:
CCGTTTGATC TCGAGCTTGG TGCCTCC
INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 46:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 46:
GTTGGAGCTC TTGGTTCTGG
INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 47:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 22 basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 47:
CAAGGCCTCG AGCTTTCTCA AC
INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 48:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 21 basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 48:

GTTTGATTCT AGAGTTCGTG C

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 49:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 22 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 49:

TTGTAAAACG ACGGCCAGTG AG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 50:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 50:

GAAACAGCTA TGACCATGAT TACG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 51:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 51:

CAGACTCTGC AGCAGGTCCA CAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 52:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 52:

GGACCTGCTG CAGAGTCTG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 53:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 53:

GCCTGTGCTC AATATTGATG G

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 54:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 54:

CCGTGTTAAA GCAGAAGATA CTG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 55:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 55:

GCTACTGTGA AAGAACTTGC CTC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 56:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1263 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární



(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 56:

GAGCTCTTGG	TTCTGGTGAC	TGTGGCCCTG	GCATCTGCTC	ATCATGGTGG	TGAGCACTTT	60
GAAGGCGAGA	AGGTGTTCCG	TGTTAACGTT	GAAGATGAAA	ATCACATTAA	CATAATCCGC	120
GAGTTGGCCA	GCACGACCCA	GATTGACTTC	TGGAAGCCAG	ATTCTGTAC	ACAAATCAA	180
CCTCACAGTA	CAGTTGACTT	CCGTGTTAAA	GCAGAAGATA	CTGTCACTGT	GGAGAATGTT	240
CTAAAGCAGA	ATGAACTACA	ATACAAGGTA	CTGATAAGCA	ACCTGAGAAA	TGTGGTGGAG	300
GCTCAGTTTG	ATAGCCGGGT	TCGTGCAACA	GGACACAGTT	ATGAGAAGTA	CAACAAGTGG	360
GAAACGATAG	AGGCTTGGAC	TCAACAAGTC	GCCACTGAGA	ATCCAGCCCT	CATCTCTCGC	420
AGTGTTATCG	GAACCACATT	TGAGGGACGC	GCTATTTACC	TCCTGAAGGT	TGGCAAAGCT	480
GGACAAAATA	AGCCTGCCAT	TTTCATGGAC	TGTGGTTTCC	ATGCCAGAGA	GTGGATTCT	540
CCTGCATTCT	GCCAGTGGTT	TGTAAGAGAG	GCTGTTTCGTA	CCTATGGACG	TGAGATCCAA	600
GTGACAGAGC	TTCTCGACAA	GTTAGACTTT	TATGTCCTGC	CTGTGCTCAA	TATTGATGGC	660
TACATCTACA	CCTGGACCAA	GAGCCGATTT	TGGAGAAAAGA	CTCGCTCCAC	CCATACTGGA	720
TCTAGCTGCA	TTGGCACAGA	CCCCAACAGA	AATTTTGATG	CTGGTTGGTG	TGAAATTGGA	780
GCCTCTCGAA	ACCCCTGTGA	TGAAACTTAC	TGTGGACCTG	CCGCAGAGTC	TGAAAAGGAG	840
ACCAAGGCC	TGGCTGATTT	CATCCGCAAC	AAACTCTCTT	CCATCAAGGC	ATATCTGACA	900
ATCCACTCGT	ACTCCCAAAT	GATGATCTAC	CCTTACTCAT	ATGCTTACAA	ACTCGGTGAG	960
AACAATGCTG	AGTTGAATGC	CCTGGCTAAA	GCTACTGTGA	AAGAACTTGC	CTCACTGCAC	1020
GGCACCAAGT	ACACATATGG	CCCGGGAGCT	ACAACAATCT	ATCCTGCTGC	TGGGGGCTCT	1080
GACGACTGGG	CTTATGACCA	AGGAATCAGA	TATTCCTTCA	CCTTTGAACT	TCGAGATACA	1140
GGCAGATATG	GCTTTCTCCT	TCCAGAATCC	CAGATCCGGG	CTACCTGCGA	GGAGACCTTC	1200
CTGGCAATCA	AGTATGTTGC	CAGCTACGTC	CTGGAACACC	TGTACTAGTT	GAGAAAGCTC	1260
GAG	1263					

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 415 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYO MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 57:

Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Ser	Ala	His	His	Gly
			-105					-100						-95	
Gly	Glu	His	Phe	Glu	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Arg	Val	Asn	Val	Glu	Asp
		-90					-85					-80			
Glu	Asn	His	Ile	Asn	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Gln	Ile
	-75					-70					-65				
Asp	Phe	Trp	Lys	Pro	Asp	Ser	Val	Thr	Gln	Ile	Lys	Pro	His	Ser	Thr
-60					-55				-50					-45	
Val	Asp	Phe	Arg	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asn	Val
				-40					-35					-30	

011097

Leu Lys Gln Asn Glu Leu Gln Tyr Lys Val Leu Ile Ser Asn Leu Arg
-25 -20 -15

Asn Val Val Glu Ala Gln Phe Asp Ser Arg Val Arg Ala Thr Gly His
-10 -5 1

Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln
5 10 15 20

Gln Val Ala Thr Glu Asn Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly
25 30 35

Thr Thr Phe Glu Gly Arg Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala
40 45 50

Gly Gln Asn Lys Pro Ala Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg
55 60 65

Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val
70 75 80

Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu
85 90 95 100

Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr
105 110 115

Trp Thr Lys Ser Arg Phe Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly
120 125 130

Ser Ser Cys Ile Gly Thr Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp
135 140 145

Cys Glu Ile Gly Ala Ser Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly
150 155 160

Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile
165 170 175 180

Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr
185 190 195

Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu
200 205 210

Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu
215 220 225

Ala Ser Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr
230 235 240

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 61:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 61:

GGCTGGATTC TCAGTGGCGA CTT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 62:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 62:

ACCTCTAGGG TCCCAATTA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 63:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 63:

CAAGTCGCCA CTGAGAATCC AGC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 64:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1053 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 64:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

011097

GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 -1 5 10

AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40

GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
 Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
 45 50 55

ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
 Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
 60 65 70

TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
 Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
 75 80 85 90

ATC CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT 384
 Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro
 95 100 105

GTG CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT 432
 Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe
 110 115 120

TGG AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA 480
 Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr
 125 130 135

GAC CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT 528
 Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser
 140 145 150

CGA AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA 576
 Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu
 155 160 165 170

AAG GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC 624
 Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser
 175 180 185

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 66:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 41 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. :66

CTCTAGGAAT TCTTATTAGT ACAGGTGTTC CAGGACGTAG C

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 67:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 999 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 67:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10

GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 1 5 10

AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40

GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
 Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
 45 50 55

ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
 Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
 60 65 70

TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
 Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
 75 80 85 90

01.10.97

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
 Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
 285 290 295

GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC TAA TAA GAATTC 999
 Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr End End
 300 305 307

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 68:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 34 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 68:

CCAACCAGCC ATGGCGCATC ATGGTGGTGA GCAC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 69:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 23 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 69:

GGCTGGATTC TCAGTGGCGA CTT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 70:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 70:

GGAGAAAGCC ATATCTGCCT G

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 71:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1284 basí
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) POČET VLÁKEN: jedno
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 71:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT	48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
-117 -115 -110 -105	
GCC CAA CCA GCC ATG GCG CAT CAT GGT GGT GAG CAC TTT GAA GGC GAG	96
Ala Gln Pro Ala Met Ala His His Gly Gly Glu His Phe Glu Gly Glu	
-100 -95 -90	
AAG GTG TTC CGT GTT AAC GTT GAA GAT GAA AAT CAC ATT AAC ATA ATC	144
Lys Val Phe Arg Val Asn Val Glu Asp Glu Asn His Ile Asn Ile Ile	
-85 -80 -75 -70	
CGC GAG TTG GCC AGC ACG ACC CAG ATT GAC TTC TGG AAG CCA GAT TCT	192
Arg Glu Leu Ala Ser Thr Thr Gln Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser	
-65 -60 -55	
GTC ACA CAA ATC AAA CCT CAC AGT ACA GTT GAC TTC CGT GTT AAA GCA	240
Val Thr Gln Ile Lys Pro His Ser Thr Val Asp Phe Arg Val Lys Ala	
-50 -45 -40	
GAA GAT ACT GTC ACT GTG GAG AAT GTT CTA AAG CAG AAT GAA CTA CAA	288
Glu Asp Thr Val Thr Val Glu Asn Val Leu Lys Gln Asn Glu Leu Gln	
-35 -30 -25	
TAC AAG GTA CTG ATA AGC AAC CTG AGA AAT GTG GTG GAG GCT CAG TTT	336
Tyr Lys Val Leu Ile Ser Asn Leu Arg Asn Val Val Glu Ala Gln Phe	
-20 -15 -10	
GAT AGC CGG GTT CGT GCA ACA GGA CAC AGT TAT GAG AAG TAC AAC AAG	384
Asp Ser Arg Val Arg Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Lys	
-5 1 5 10	
TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT CCA	432
Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn Pro	
15 20 25	
GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC GCT	480
Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Ala	
30 35 40	

01.10.97

ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC ATT 528
 Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala Ile
 45 50 55

TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA TTC 576
 Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe
 60 65 70 75

TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG ATC 624
 Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile
 80 85 90

CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT GTG 672
 Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val
 95 100 105

CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT TGG 720
 Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe Trp
 110 115 120

AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA GAC 768
 Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr Asp
 125 130 135

CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT CGA 816
 Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser Arg
 140 145 150 155

AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA AAG 864
 Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys
 160 165 170

GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC ATC 912
 Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile
 175 180 185

AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC CCT 960
 Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro
 190 195 200

TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT GCC 1008
 Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala
 205 210 215

CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC AAG 1056
 Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr Lys
 220 225 230 235

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 74:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1059 basí
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) POČET VLÁKEN: jedno
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 74:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10

GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 1 5 10

AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40

GCT ATT TAC CTC CTG AAG GTT GGC AAA GCT GGA CAA AAT AAG CCT GCC 240
 Ala Ile Tyr Leu Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala
 45 50 55

ATT TTC ATG GAC TGT GGT TTC CAT GCC AGA GAG TGG ATT TCT CCT GCA 288
 Ile Phe Met Asp Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala
 60 65 70

TTC TGC CAG TGG TTT GTA AGA GAG GCT GTT CGT ACC TAT GGA CGT GAG 336
 Phe Cys Gln Trp Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu
 75 80 85 90

ATC CAA GTG ACA GAG CTT CTC GAC AAG TTA GAC TTT TAT GTC CTG CCT 384
 Ile Gln Val Thr Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro
 95 100 105

GTG CTC AAT ATT GAT GGC TAC ATC TAC ACC TGG ACC AAG AGC CGA TTT 432
 Val Leu Asn Ile Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe
 110 115 120

TGG AGA AAG ACT CGC TCC ACC CAT ACT GGA TCT AGC TGC ATT GGC ACA 480
 Trp Arg Lys Thr Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr
 125 130 135



GAC CCC AAC AGA AAT TTT GAT GCT GGT TGG TGT GAA ATT GGA GCC TCT 528
 Asp Pro Asn Arg Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser
 140 145 150

CGA AAC CCC TGT GAT GAA ACT TAC TGT GGA CCT GCC GCA GAG TCT GAA 576
 Arg Asn Pro Cys Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu
 155 160 165 170

AAG GAG ACC AAG GCC CTG GCT GAT TTC ATC CGC AAC AAA CTC TCT TCC 624
 Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser
 175 180 185

ATC AAG GCA TAT CTG ACA ATC CAC TCG TAC TCC CAA ATG ATG ATC TAC 672
 Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr
 190 195 200

CCT TAC TCA TAT GCT TAC AAA CTC GGT GAG AAC AAT GCT GAG TTG AAT 720
 Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn
 205 210 215

GCC CTG GCT AAA GCT ACT GTG AAA GAA CTT GCC TCA CTG CAC GGC ACC 768
 Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr
 220 225 230

AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
 Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
 235 240 245 250

GGC TCT AAA GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
 Gly Ser Lys Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
 255 260 265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
 Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
 270 275 280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
 Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
 285 290 295

GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC CAC CAC CAT CAC CAC CAT GAG 1008
 Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr His His His His His His Glu
 300 305 310

TTC GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAG GAC CTG AAC TAA TAA GAA 1056
 Phe Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn End End
 315 320 325 327

TTC 1059

01.10.97

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 75:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 25 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 75:

GGTCATAAGC CCAGTCGCGA GAGCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 76:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 27 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 76:

CCTGCTGCTG GGGGCTCTCG CGACTGG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 77:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1059 basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 77:

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCT 48
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10

GCC CAA CCA GCC ATG GCG GCA ACT GGT CAC TCT TAC GAG AAG TAC AAC 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn
 -5 1 5 10

AAG TGG GAA ACG ATA GAG GCT TGG ACT CAA CAA GTC GCC ACT GAG AAT 144
 Lys Trp Glu Thr Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn
 15 20 25

CCA GCC CTC ATC TCT CGC AGT GTT ATC GGA ACC ACA TTT GAG GGA CGC 192
 Pro Ala Leu Ile Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg
 30 35 40



AAG TAC ACA TAT GGC CCG GGA GCT ACA ACA ATC TAT CCT GCT GCT GGG 816
 Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ala Ala Gly
 235 240 245 250

GGC TCT CGC GAC TGG GCT TAT GAC CAA GGA ATC AGA TAT TCC TTC ACC 864
 Gly Ser Arg Asp Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr
 255 260 265

TTT GAA CTT CGA GAT ACA GGC AGA TAT GGC TTT CTC CTT CCA GAA TCC 912
 Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser
 270 275 280

CAG ATC CGG GCT ACC TGC GAG GAG ACC TTC CTG GCA ATC AAG TAT GTT 960
 Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val
 285 290 300

GCC AGC TAC GTC CTG GAA CAC CTG TAC CAC CAC CAT CAC CAC CAT GAG 1008
 Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu Tyr His His His His His His Glu
 305 310 315

TTC GAG GAG CAG AAG CTG ATC TCT GAG GAG GAC CTG AAC TAA TAA GAA 1056
 Phe Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn End End
 320 325 330 332

TTC 1059

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Dvousložkový systém pro použití v hostiteli vyznačující se tím, že

(i) první složka sestává ze specifické vazebné skupiny schopné vazby na antigen asociovaný s nádorem, která je navázána na zmutovanou formu enzymu, schopnou konverze neaktivního prekursoru účinné látky na protinádorově účinnou látku

(ii) druhou složkou je neaktivní prekursor účinné látky, který je za přítomnosti enzymu konvertován na protinádorovou účinnou látku

příčemž

zmutovaný enzym je mutantní formou hostitelského enzymu, který ve své přirozené formě rozeznává substrát na základě interakcí iontového páru a ve zmutované formě je tato polarita převrácena ("reverzní polarita");

první složka není v hostiteli v podstatě imunogenní a

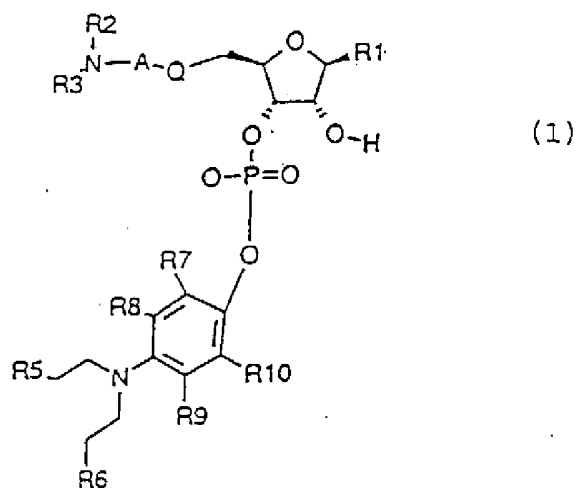
neaktivní prekursor účinné látky není v podstatě přirozenými, nemutovanými hostitelovými enzymy konvertovatelný na protinádorově účinnou látku.

2. Systém podle nároku 1 vyznačující se tím, že první složka obsahuje zmutovanou formu enzymu, který je odvozený od enzymu téhož druhu, jako je hostitel, pro jehož léčbu je kompozice určena.

3. Systém podle libovolného z nároků 1 až 2 vyznačující se tím, že specifickou vazebnou skupinou je protilátka nebo její fragment.

4. Systém podle nároku 3 vyznačující se tím, že fragmentem protilátky je $F(ab')$, fragment.

5. Systém podle libovolného z nároků 1 až 4 vyznačující se tím, že zmutovanou formou enzymu je zmutovaná ribonukleáza.
6. Systém podle libovolného z nároků 1 až 5 vyznačující se tím, že zmutovanou formou enzymu je lidská ribonukleáza s negativně nabitým aminokyselinovým zbytkem na pozici 66.
7. Systém podle nároku 6 vyznačující se tím, že negativně nabitým aminokyselinovým zbytkem na pozici 66 je Glu.
8. Systém podle libovolného z nároků 1 až 4 vyznačující se tím, že zmutovanou formou enzymu je zmutovaná glukuronidáza.
9. Druhá složka podle nároku 1, kterou je ribonukleotid derivovaný sloučeninou odvozenou od bis(2-chlor-ethyl)aminu, obecného vzorce 1



kde

Q je O nebo NH,

A je skupina obecného vzorce -X-Y- s Y navázaným na Q, kde

Y je SO₂, CO nebo jednoduchá vazba s tím, že je-li Q kyslík, pak Y není SO₂,

X je -(CH₂)_n-, kde n je 1 až 4, popřípadě substituovaný na libovolném atomu uhlíku alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, a je-li Y CO a n = 1 pak X je popřípadě substituován na uhlíku postraním řetězcem alaninu, valinu, leucinu, izoleucinu, methioninu, fenylalaninu, tryptofanu, serinu, threoninu, cysteinu, aparaginu, glutaminu, argininu nebo histidinu;

R1 je uracil nebo cytosin,

R2 a R3 jsou nezávisle na sobě vždy vodík nebo alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku,

R5 a R6 jsou nezávisle na sobě Cl, mesyl nebo tosyl;

R7, R8, R9 a R10 jsou nezávisle na sobě vždy vodík, alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxykupina s 1 až 4 atomy uhlíku, F nebo Cl

nebo jeho soli.

10. Ribonukleotid derivovaný sloučeninou odvozenou od bis(2-chlorethyl)aminu podle nároku 9 vyznačující se tím, že

Q je NH;

X je -(CH₂)_n-, kde n je 1 až 4;

Y je -C(O)-;

R1 je uracil nebo cytosin;

R2 a R3 jsou H;

R5 a R6 jsou Cl; a

R7, R8, R9 a R10 jsou H;

nebo jeho soli.

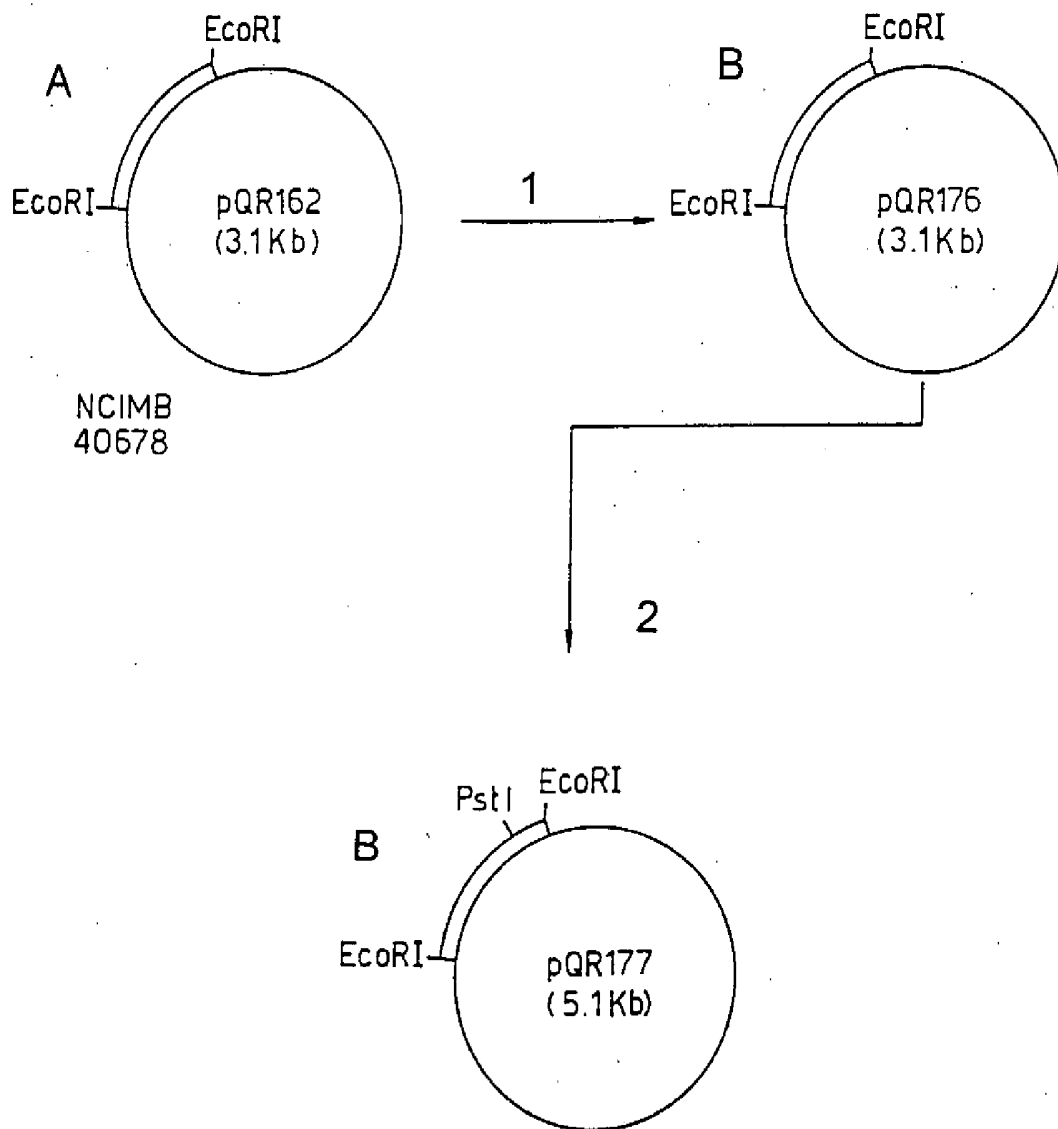
11. Druhá složka podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že jde o O-[(2R,3S,4R,5R)-2-(2-amino-acetamidomethyl)-5-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-1-yl)-4-hydroxy-2,3,4,5-tetrahydrofuran-3-yl]-O-[4-(bis[2-chlorethyl]amino) fenoxy]hydrogenfosforečnan nebo jeho sůl.
12. Farmaceutická kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje první složku podle libovolného z nároků 1 až 8.
13. Farmaceutická kompozice v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje druhou složku podle libovolného z nároků 1 nebo 9 až 11.
14. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 12 až 13 v y z n a č u j í c í s e t í m , že je sterilní.
15. První složka podle libovolného z nároků 1 až 8.
16. Mutovaná forma enzymu podle libovolného z nároků 1, 2, 5, 6, 7 nebo 8.
17. Způsob kontroly růstu nádorových buněk v hostiteli, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podání účinného množství první složky podle libovolného z nároků 1 až 8 hostiteli, čekání po dobu dostatečnou pro vymizení této složky z obecného oběhu tohoto hostitele a následného podání účinného množství druhé složky podle libovolného z nároků 1 nebo 9 až 11.
18. Plazmid pQR162 uložený pod registračním číslem NCIMB 40678.
19. Polynukleotidová sekvence v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje libovolnou první složku vybranou

podle libovolného z nároků 1 až 8 a zmutovanou formu enzymu podle libovolného z nároků 1, 2, 5, 6, 7 nebo 8.

20. Vektor v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje polynukleotid podle nároku 19.
21. Buňka v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje polynukleotid podle nároku 19.

1/27

Obr. 1

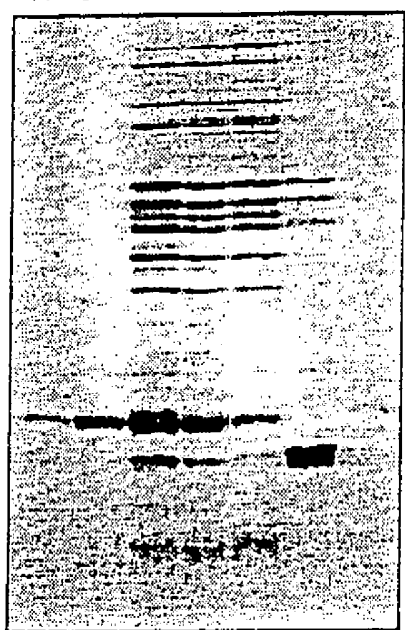


01.10.47
1952 97
1952-97

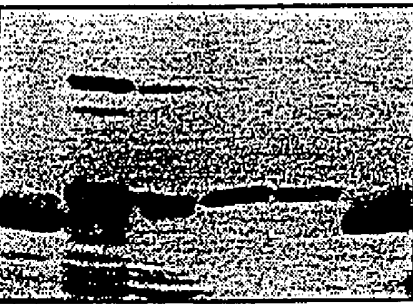
2/27

Obr. 2

A B C D E F G



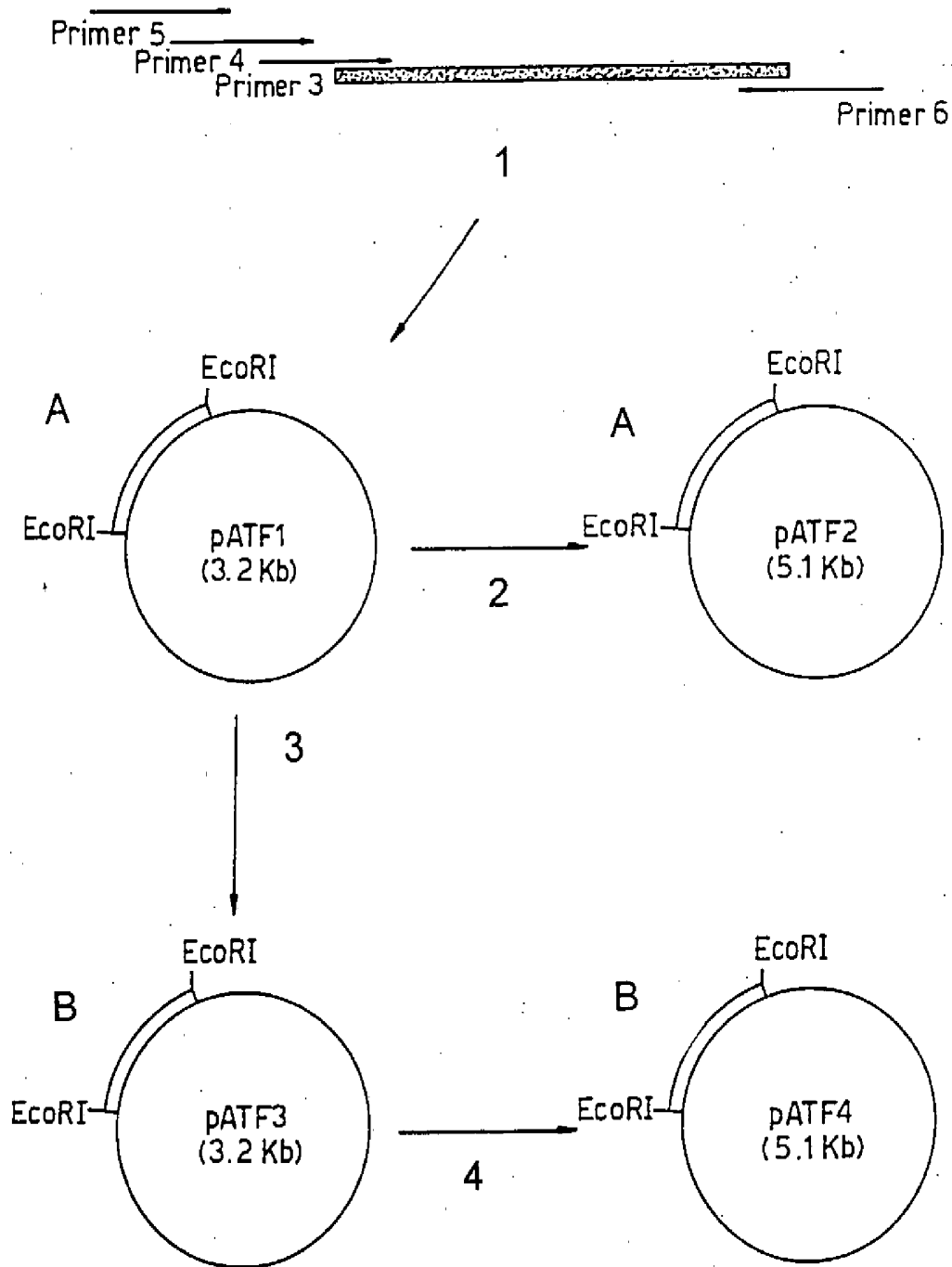
Obr. 4



A B C D E F

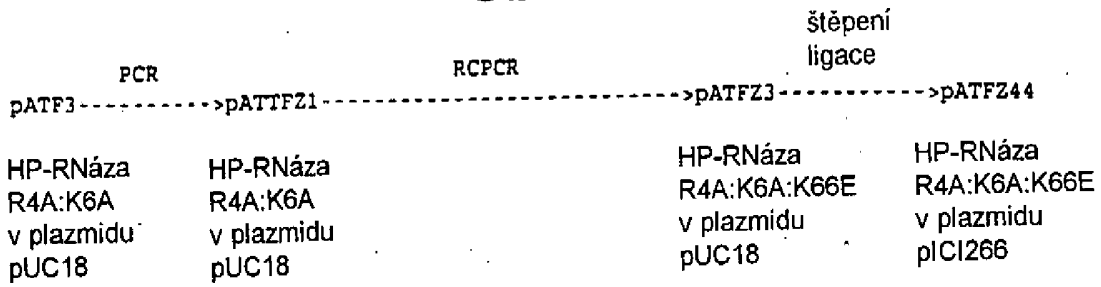
3/27

Obr. 3

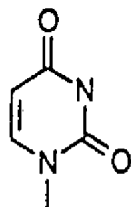
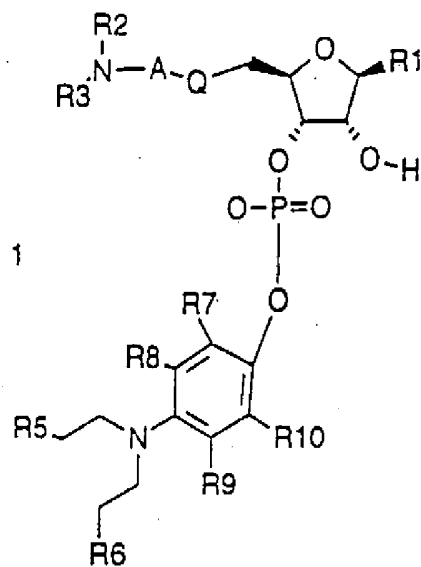


4/27

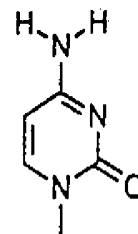
Obr. 5



Obr. 11



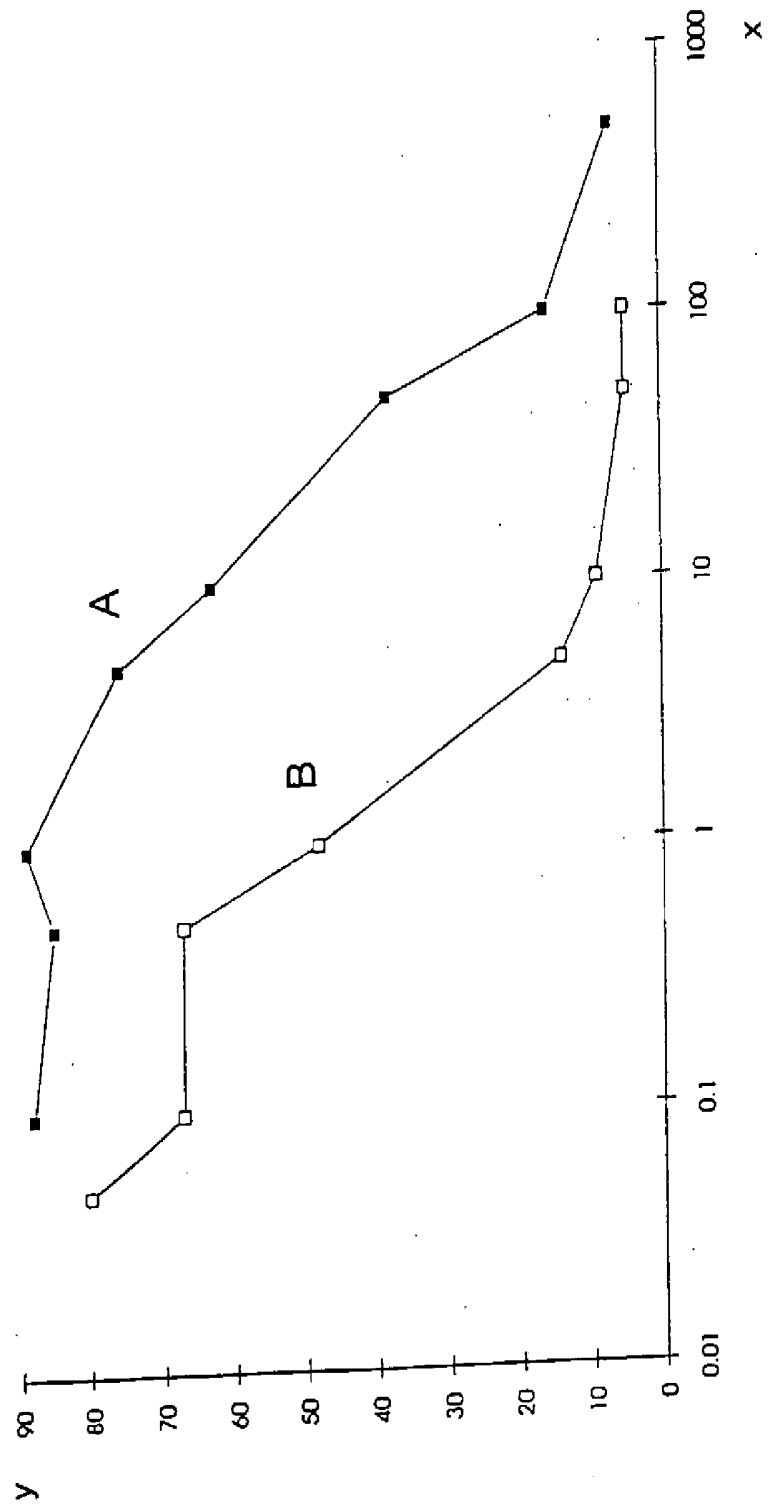
I)



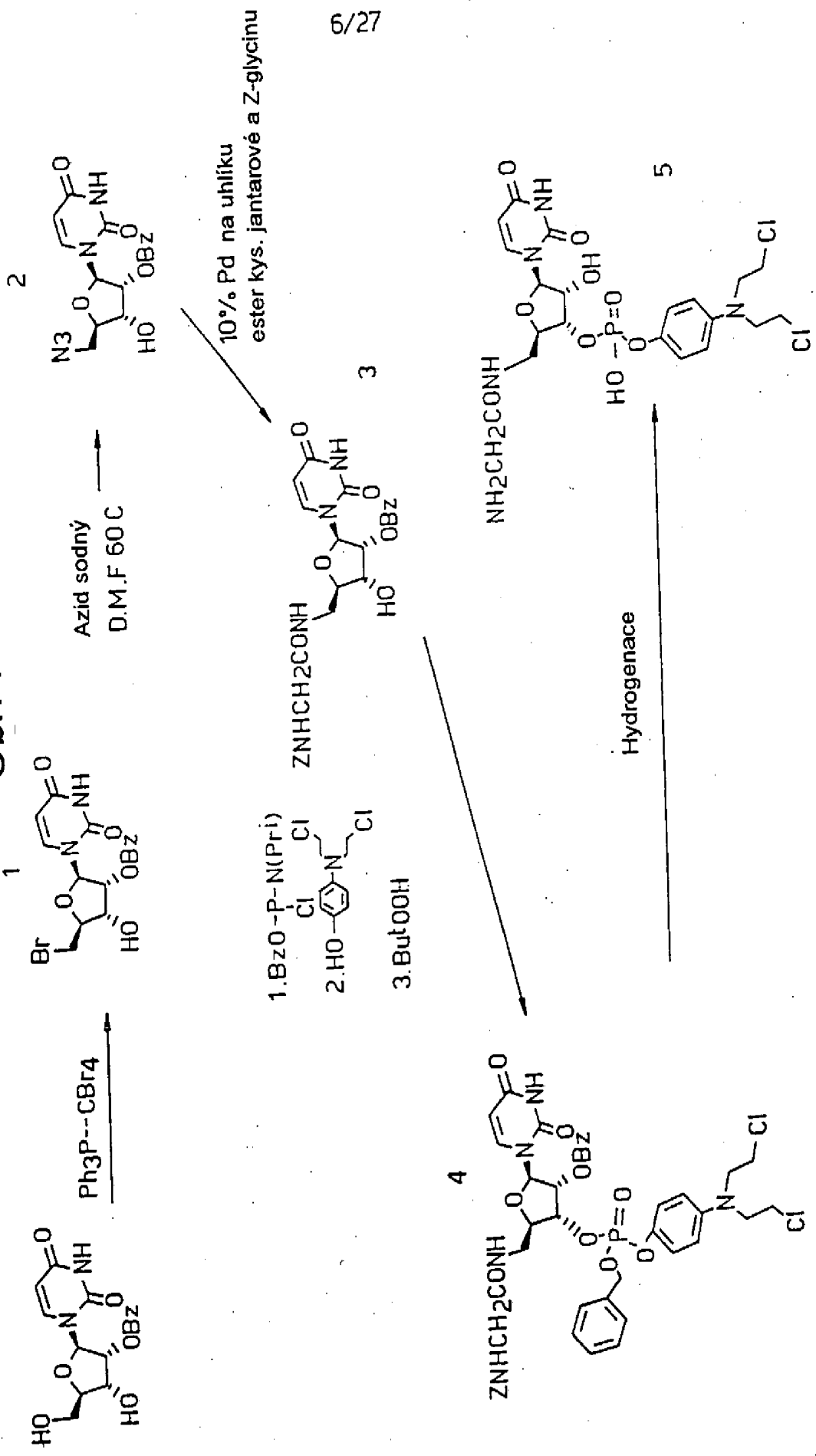
II)

5/27

Obr. 6



Obr. 7



6/27

7/27

Obr. 8

I.

Primer A: 5'-GGT CTG CCC ATT **CTC** GCA GGC AAC ATT TTT-3'
 Primer B: 5'-TGC TAC CAG AGC TAC TCC ACC ATG AGC ATC-3'
 Primer C: 5'-AAT GTT GCC TGC **GAG** AAT GGG CAG ACC AAT-3'
 Primer D: 5'-CTG GGA GCA CAC GGC CTG GAC ATC AGC CA-3'

II.

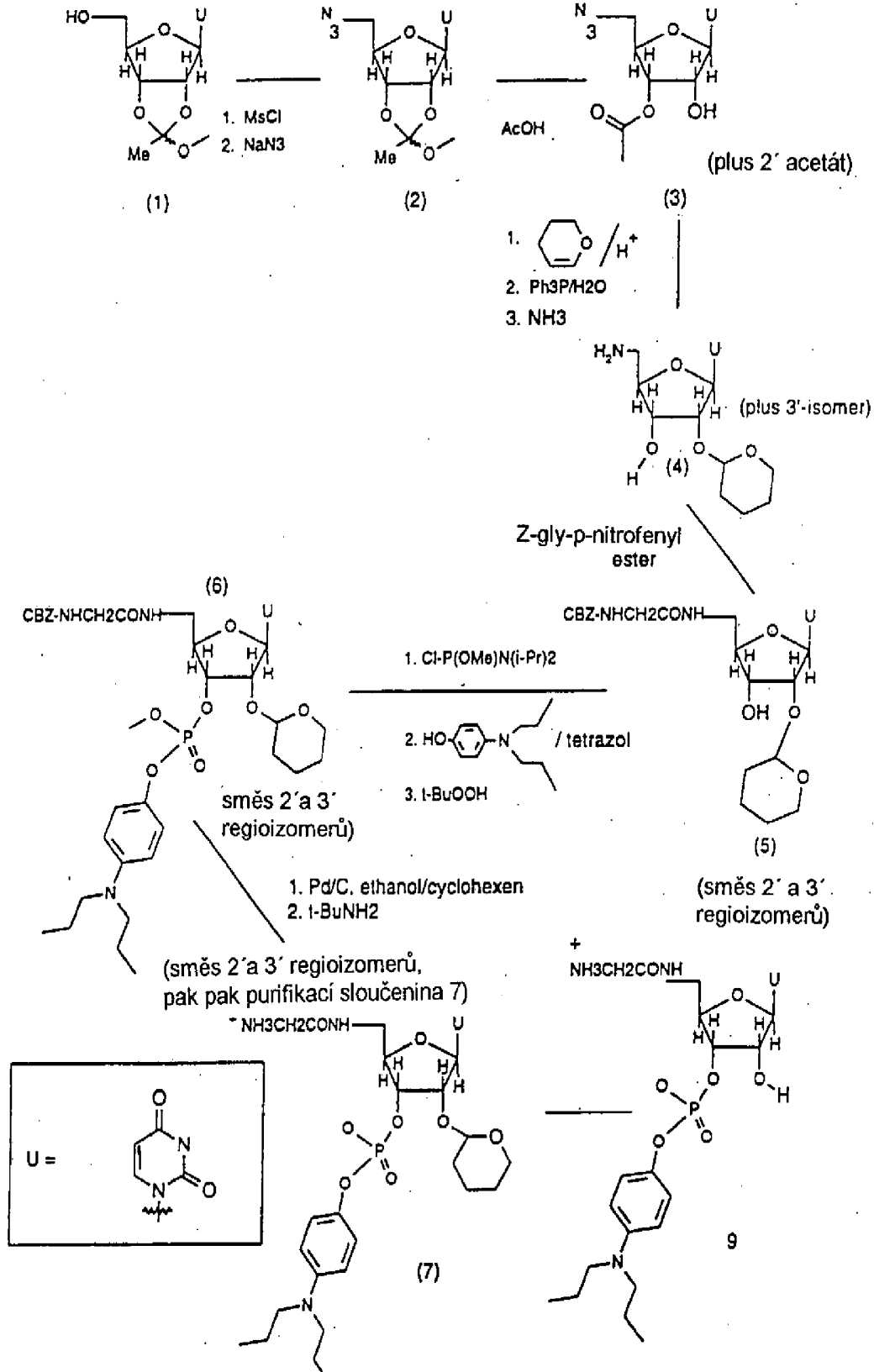
Primer 1: 5'-CGC GCG AAT TCG GGT CCA GCC TTC CCT GGG C-3'
 Primer 2: 5'-GGC CGG AAT TCC ATC AAA GTG GAC TGG CAC A-3'
 Primer 3: 5'-CGC TGT TGG TCC TGG TGC TGC TGC TGG TGC GGG TCC AGC CTT CCC-3'
 Primer 4: 5'-TGATGG CTC TGA AGT CCC TGG TCC TGT TGT CGC TGT TGG TCC TGG-3'
 Primer 5: 5'-CGC CGA ATT CAT GTT CTT GGA GGA TGA TTG ATG GCT CTG AAG TCC C-3'
 Primer 6: 5'-CGC GGA ATT CCT AGG TAG AGT CTT CAA CAG AAG CAT CAA AGT GGA CTG-3'

III.

Primer E: 5'-AAG GAA TCC **GCT** GCC **GCT** AAA TTC CAG CGG CAG-3'
 Primer F: 5'-GGA AGG CTG GAC CCG CAC CAG CAG CAG CAC-3'
 Primer G: 5'-CTG GAA TTT **AGC** GGC **AGC** GGA TTC CTT GCC CAG-3'
 Primer H: 5'-CAT ATG GAC TCA GAC AGT TCC CCC AGC AGC-3'

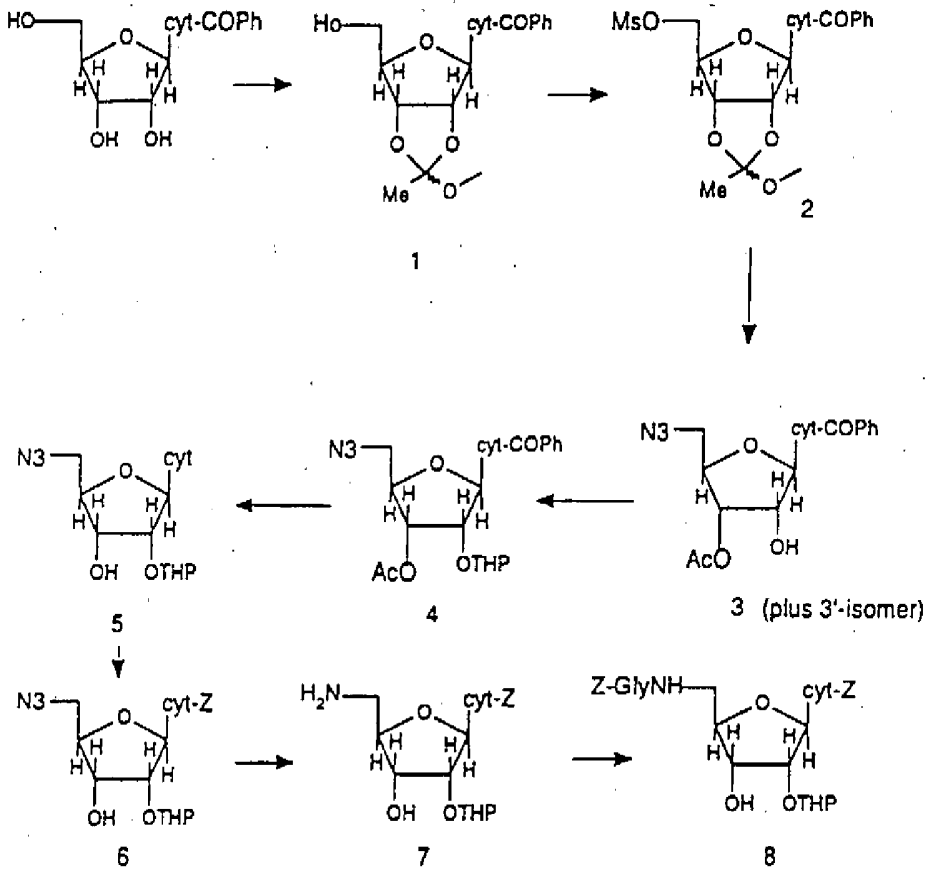
8/27

Obr. 9



9/27

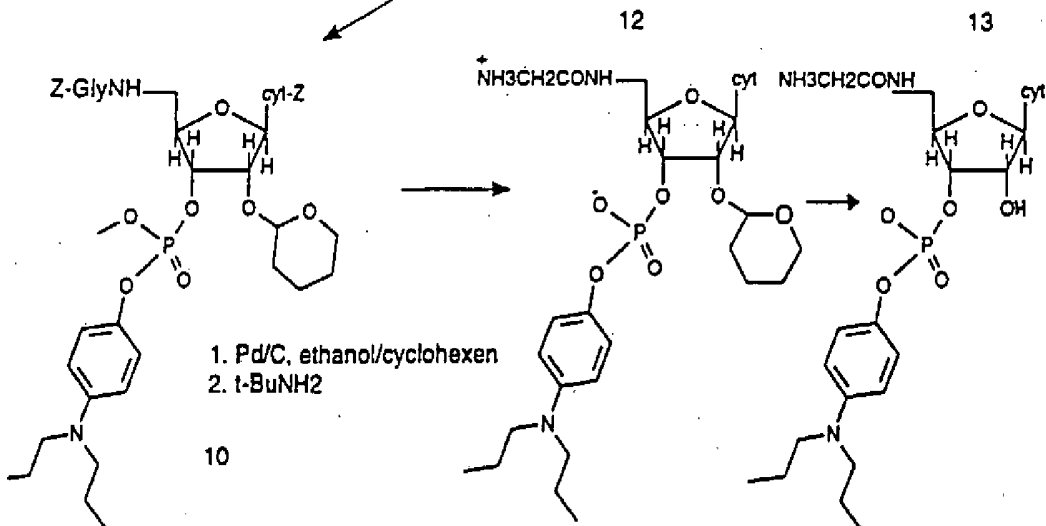
Obr. 10



1. Cl-P(OMe)N(i-Pr)₂

2. HO-C₆H₄-N(i-Pr)₂ / tetrazol

3. t-BuOOH

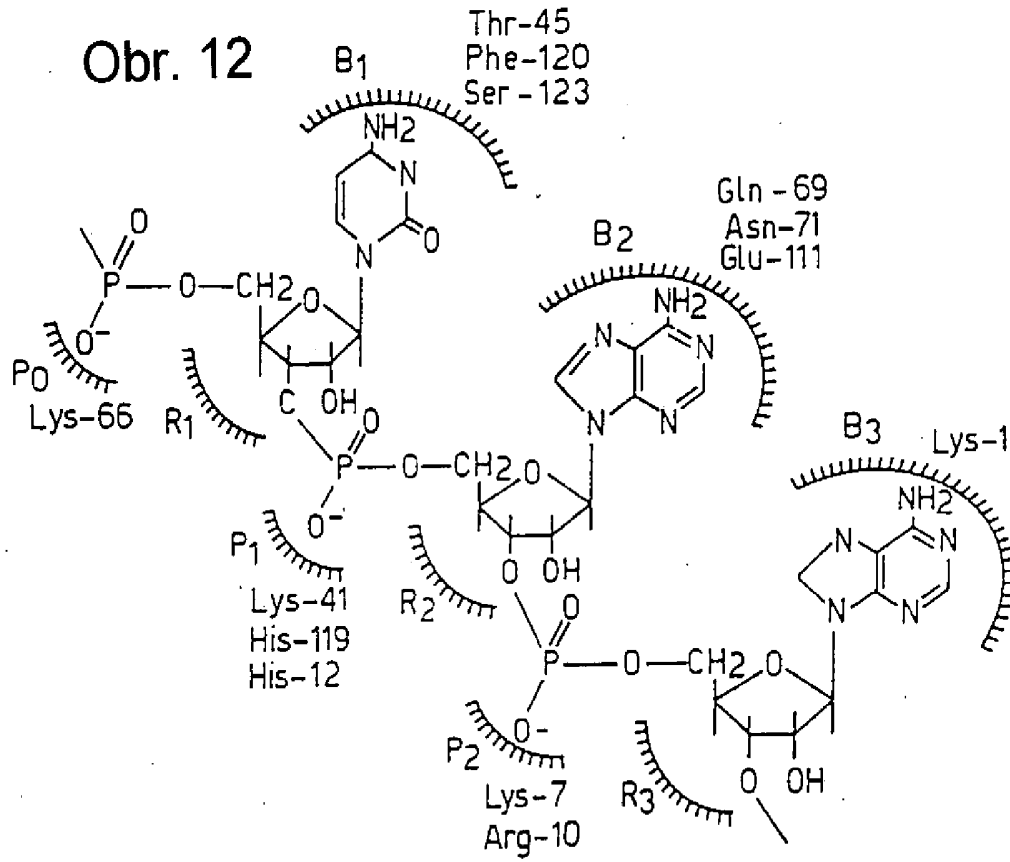


1. Pd/C, ethanol/cyclohexen
2. t-BuNH₂

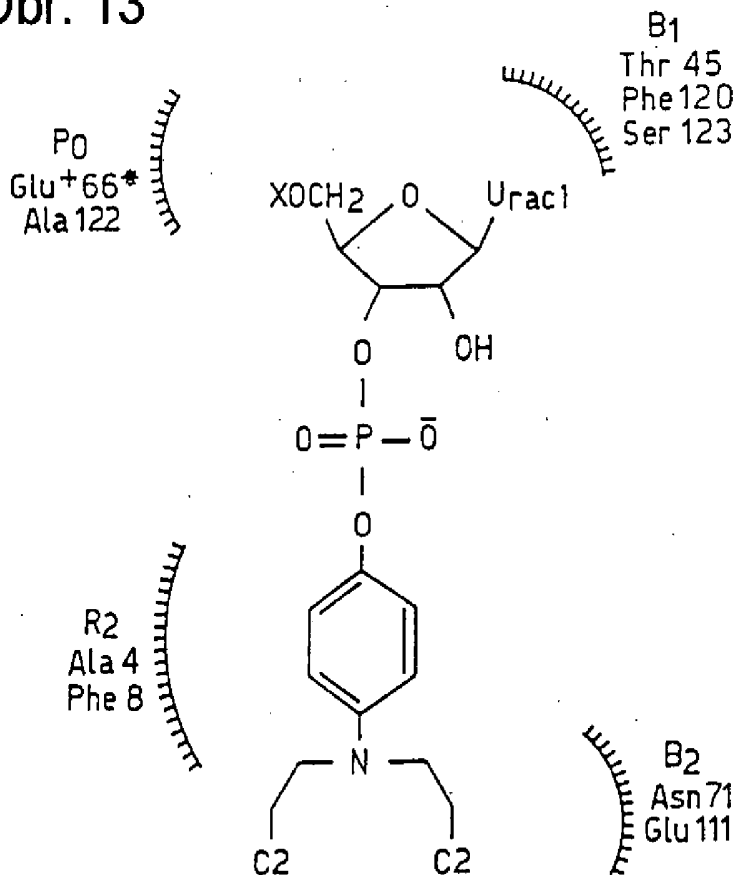
10

10/27

Obr. 12

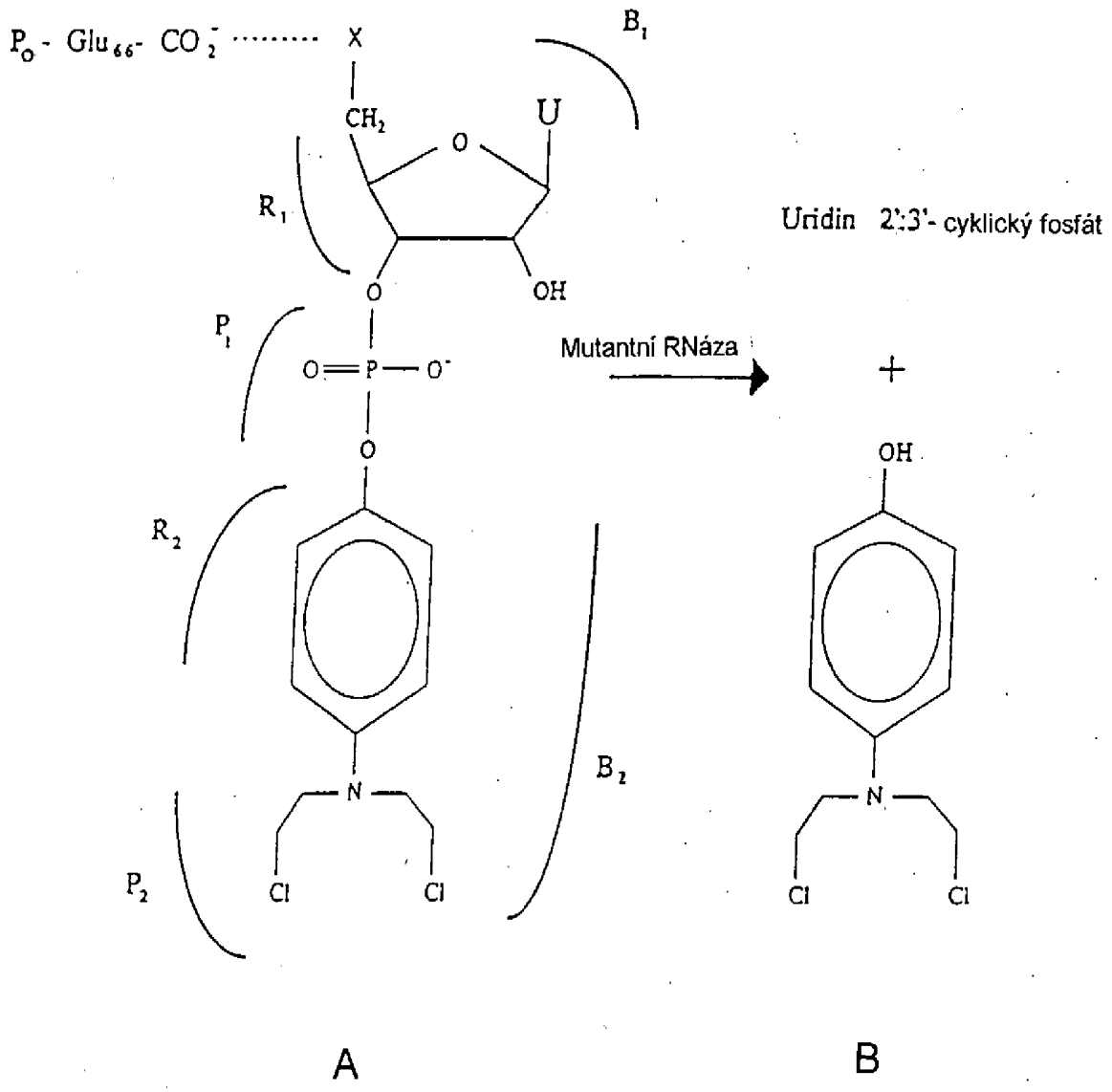


Obr. 13



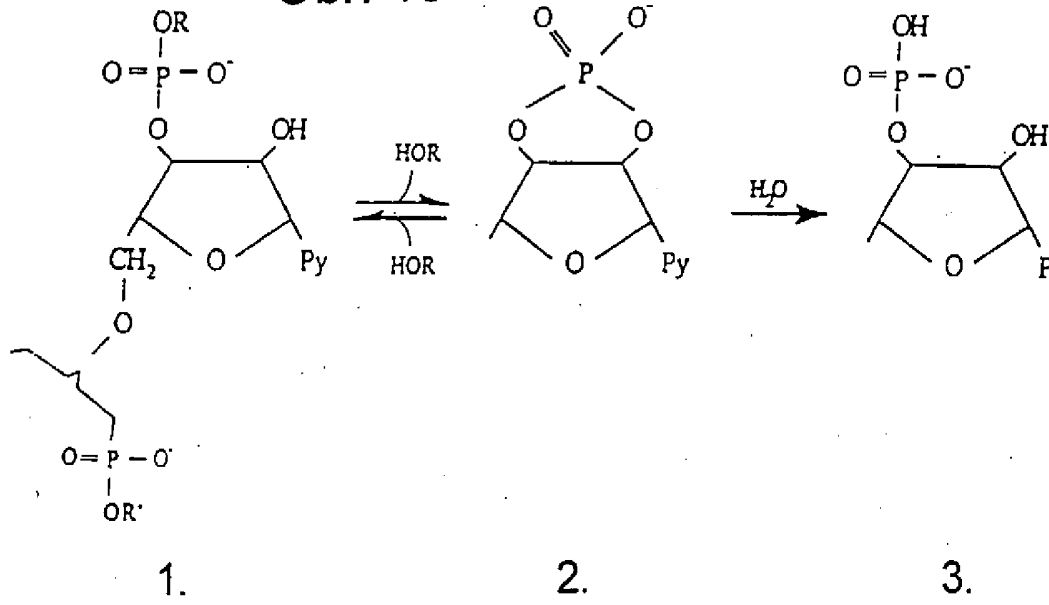
11/27

Obr. 14

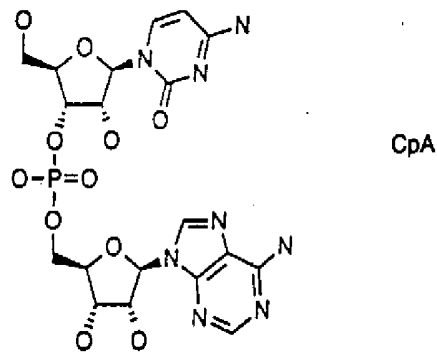


12/27

Obr. 15

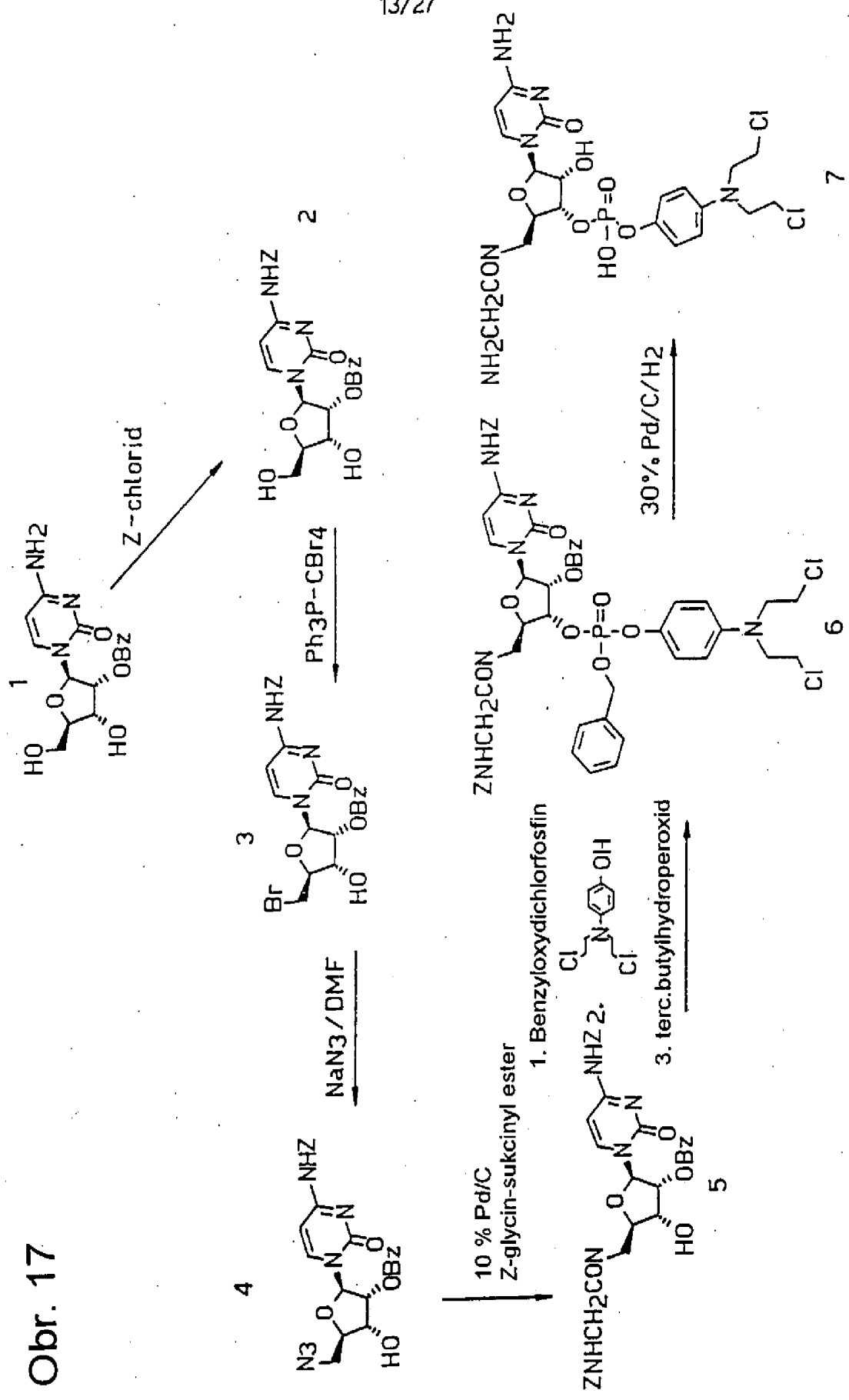


Obr. 16



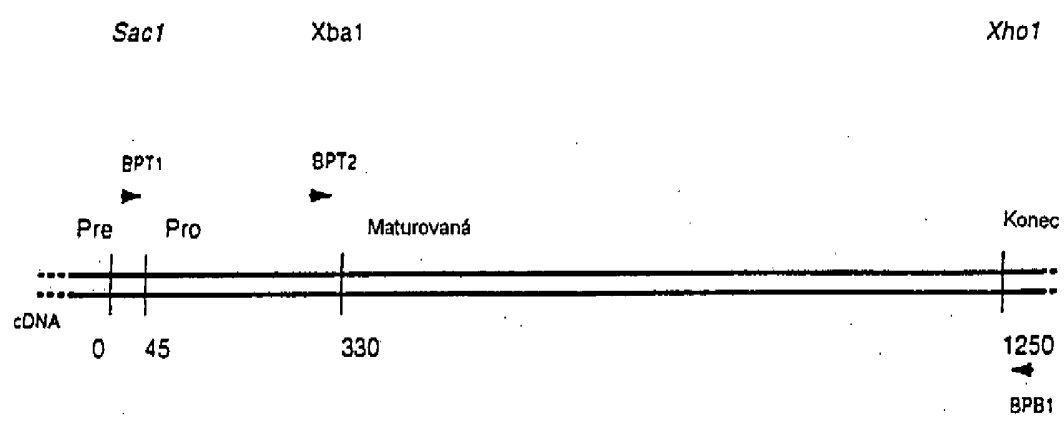
13/27

Obr. 17



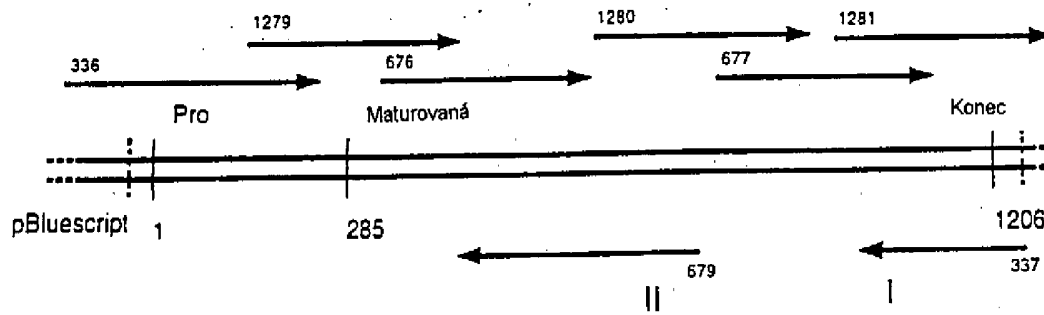
14/27

Obr. 18

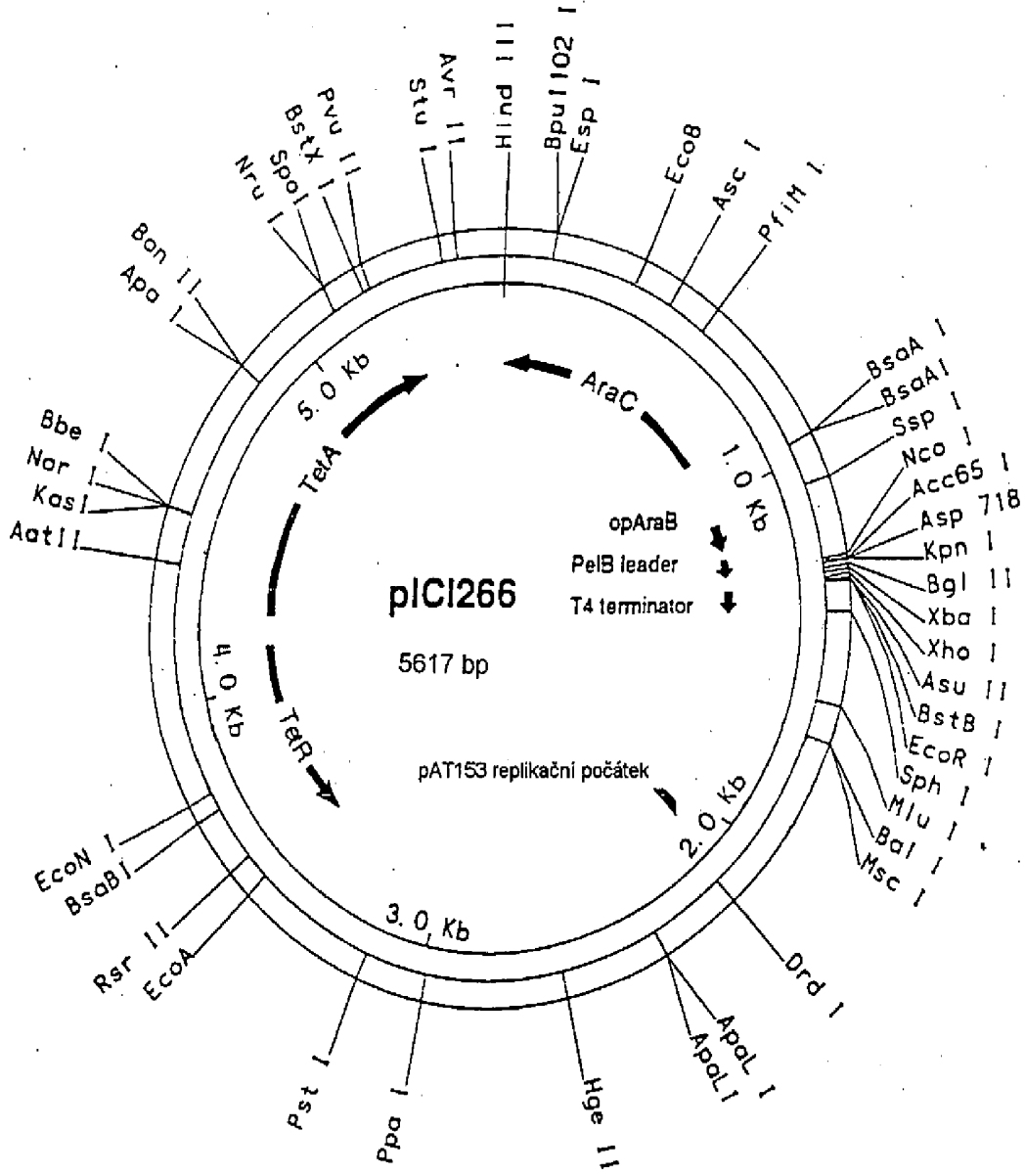


15/27

Obr. 19



Obr. 20



Obr. 21

TCACACTTTCGCAAAGCATTAGCATTTTTGTCATAGATAAGGGATCCTGCCTGACGGTTTTTGCCGGGACTCTACTGTTTCTCCAT 1170

ACCTGTTTTTCTGGATGGAGTAAGACCATGAAATACCIATTCCTACGGCAGCCGGTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCCATG 1260

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met
GCGGTACCAATAGCAGATCTAATGTCCTAGATGTTACCICGGAGTTCGAAGAATTCCTAGAGTCGACATTATTAATAATTGGGG 1350

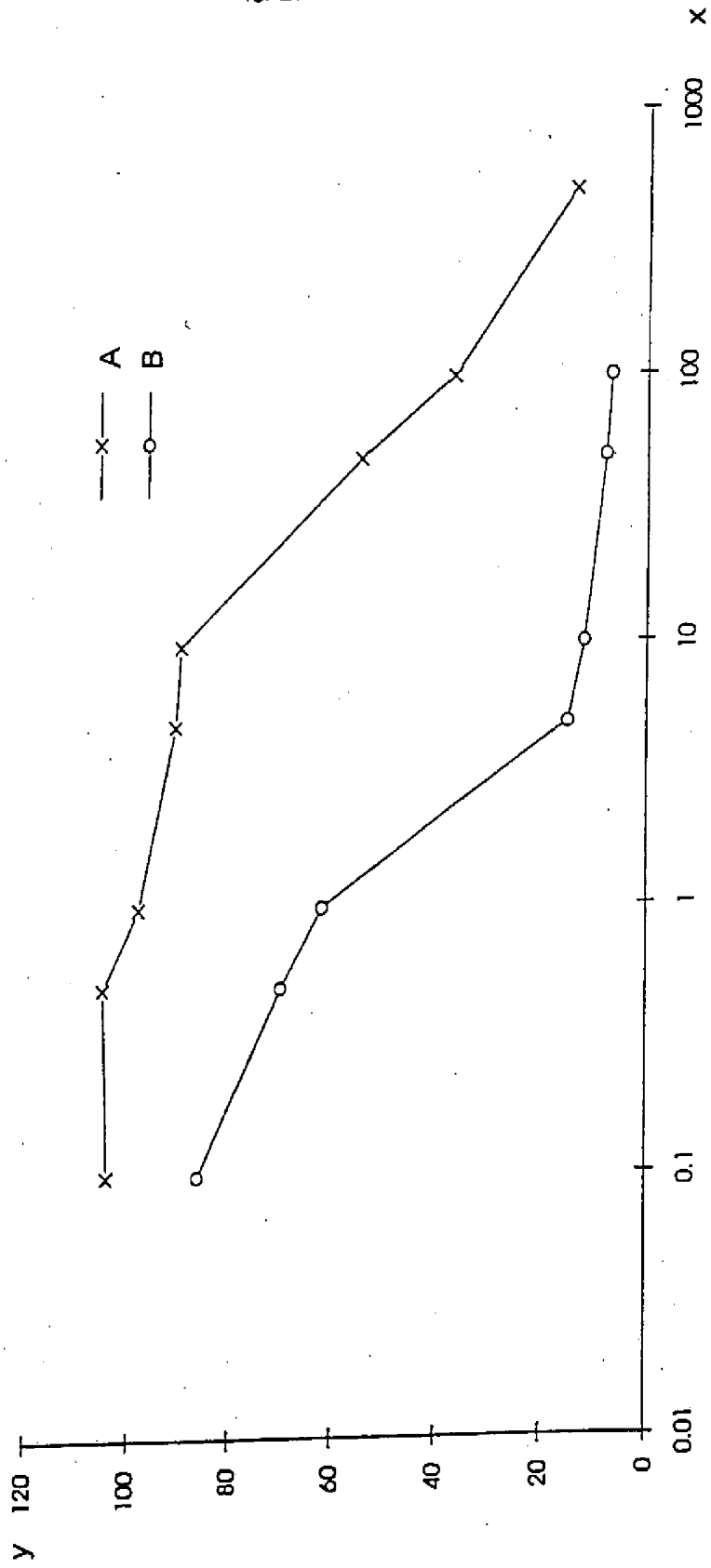
Ala Val Pro Ile Ala Asp Leu Met Ser Leu Asp Val Thr Ser Ser Ser Lys Asn Ser
ACCCTAGAGGTCCCCTTTTATTTTAAAGCATGCGGATCCGTCGGAAATACAGGAACCCGCTGGATGCCCTTCGCTGGGATGGT 1440

17/27

1952-97

18/27

Obr. 22



Kultivační média

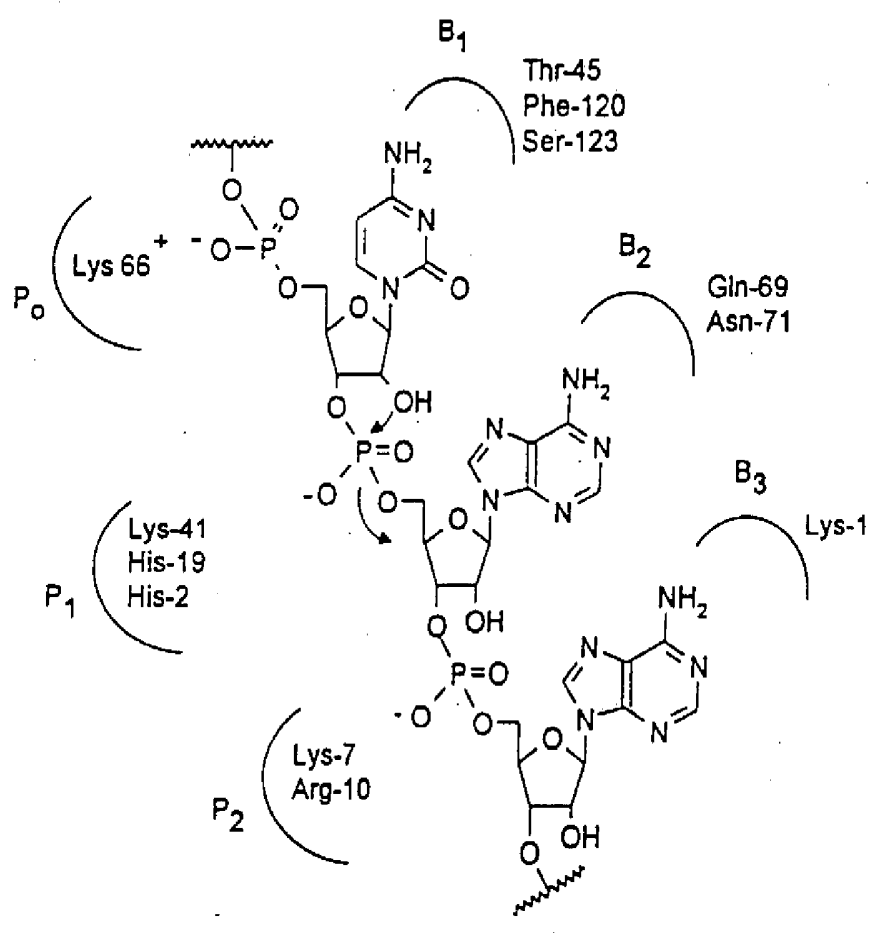
Složka	koncentrace v deionizované vodě (g/l)
dihydrogen ortofosforečnan draselný	3,0
hydrogen ortofosforečnan sodný	6,0
chlorid sodný	0,5
hydrolyzovaný kasein	2,0
síran amonný	10,0
glycerol	35,0
kvasničný extrakt	20,0
heptahydrát síranu hořečnatého	0,5
dihydrát chloridu vápenatého	0,3
thiamin	0,008
heptahydrát síranu železnatého	0,04
kyselina citronová	0,02
roztok stopových prvků (TES)*	0,5 ml/l
hydrochlorid tetracyklinu	0,01

* Roztok stopových prvků (TES)

Složka	mg v 10 ml deionizované vody
hexahydrát chloridu hlinitého	2,0
hexahydrát chloridu kobaltu	0,8
dodekahydrát síranu chromo-draselného	0,2
dihydrát chloridu mědnatého	0,2
kyselina borová	0,1
iodid draselný	2,0
monohydrát síranu hořečnatého	2,0
hexahydrát síranu nikelnatého	0,09
dihydrát molybdanu sodného	0,4
heptahydrát síranu zinečnatého	0,4

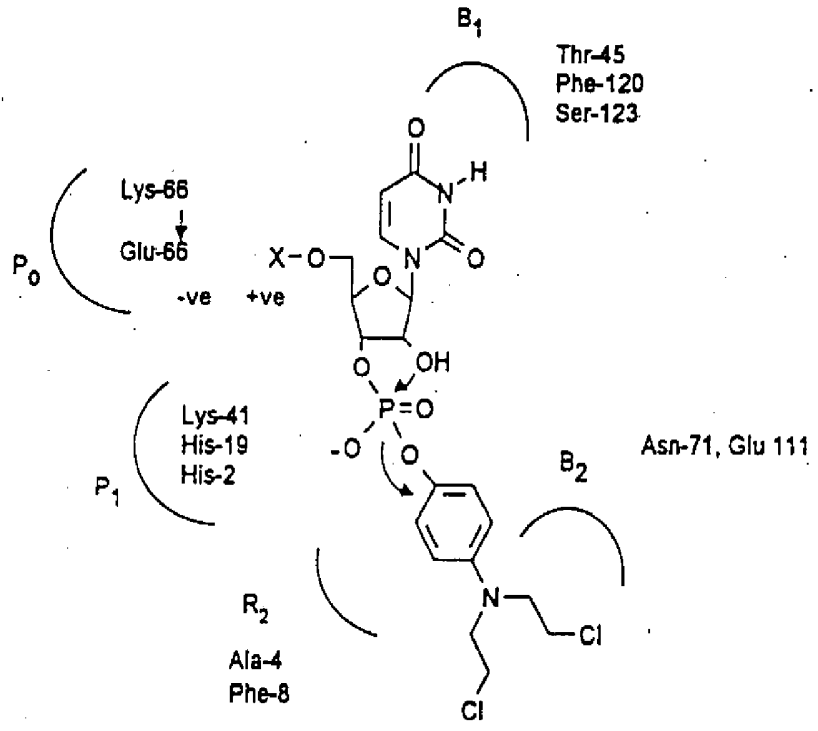
20/27

Obr. 24

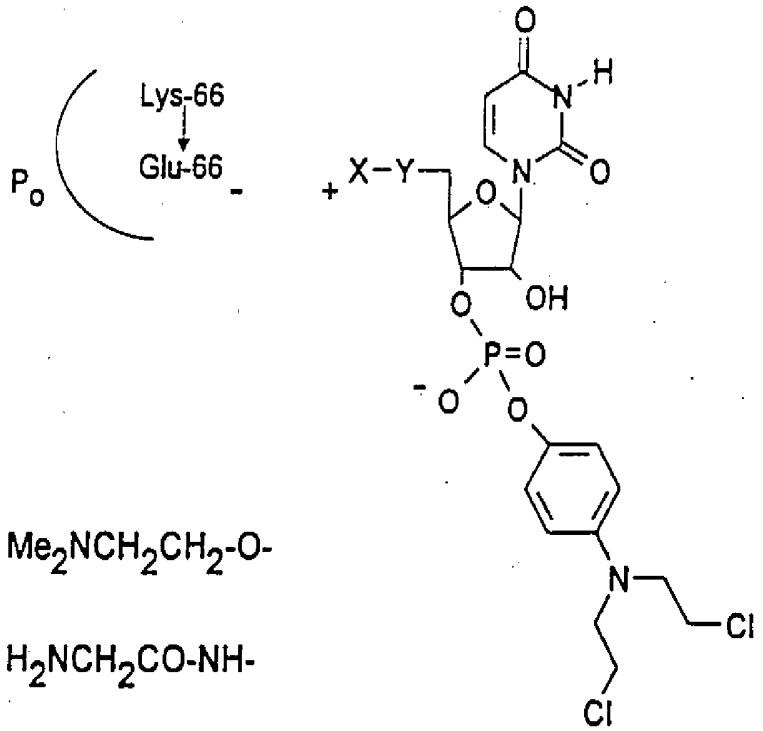


21/27

Obr. 25



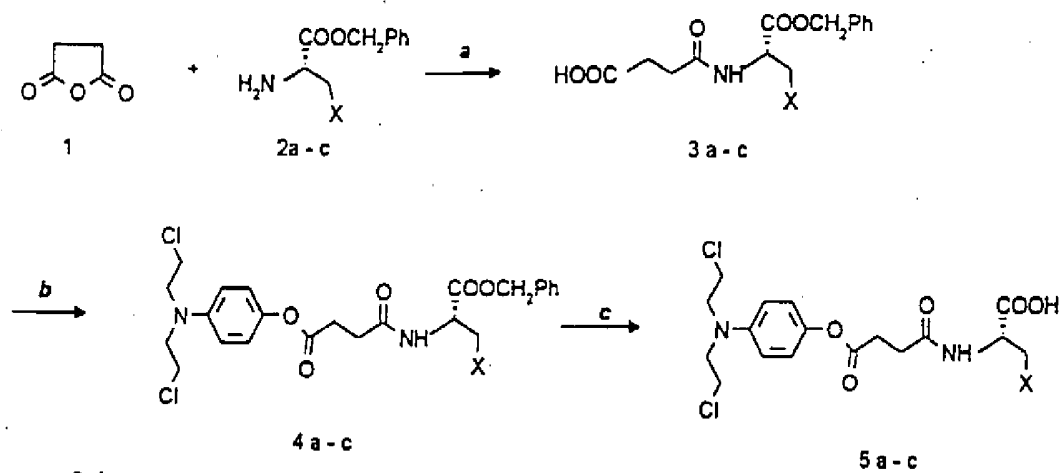
Obr. 26



X-Y = Me₂NCH₂CH₂-O-
 = H₂NCH₂CO-NH-

22/27

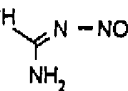
Obr. 27



pro 2-4:

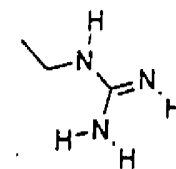
a X = COOCH₂Ph

b X = CH₂COOCH₂Ph

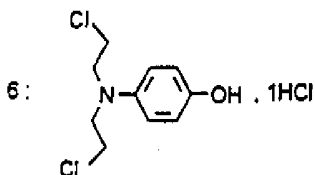
c X = (CH₂)₂NH 

pro 5a, X = COOH

pro 5b, X = CH₂COOH

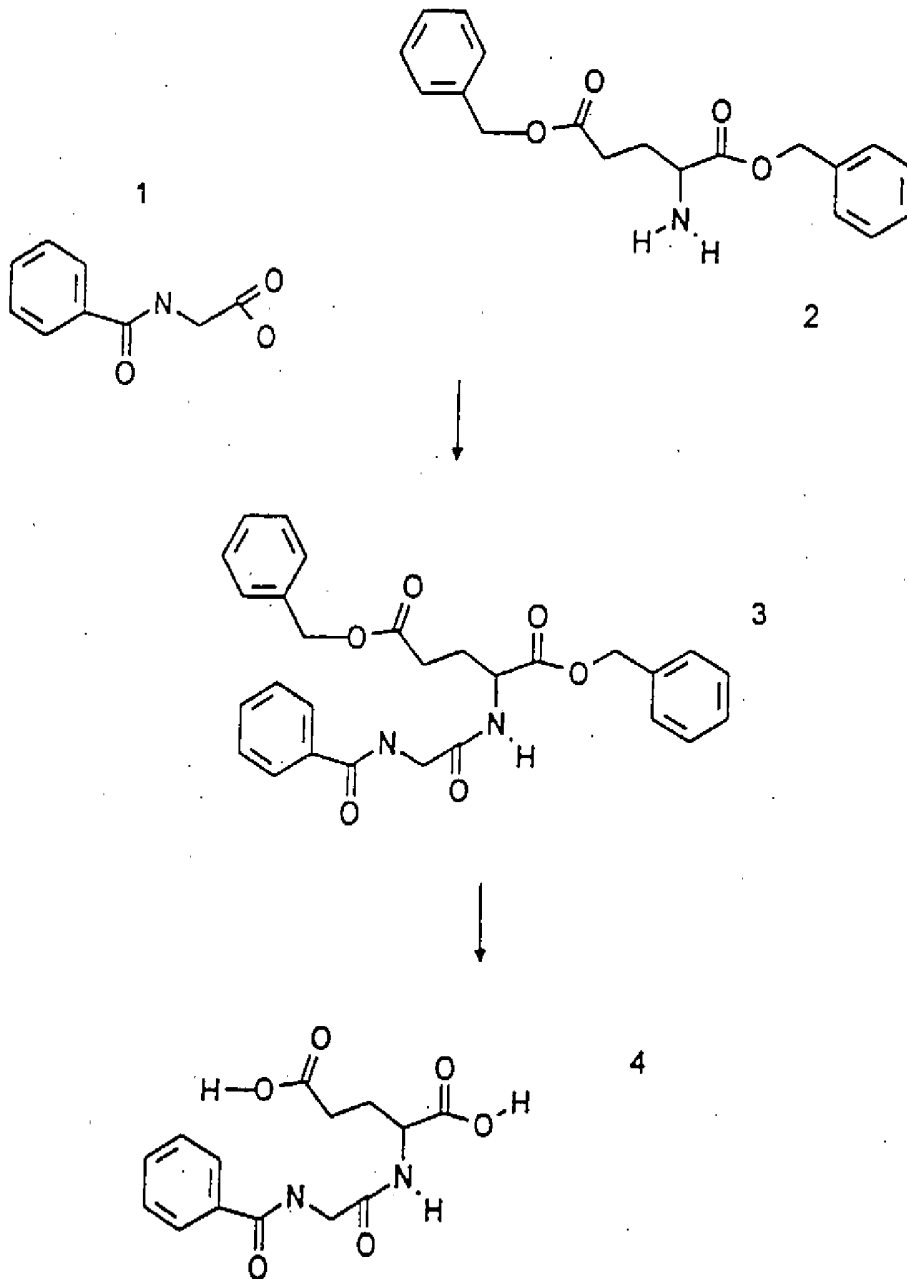
pro 5c, X = 

a) CHCl₃, Et₃N b) 6, CHCl₃, EDCI, DMAP c) Pd/C, H₂, AcOEt, MeOH



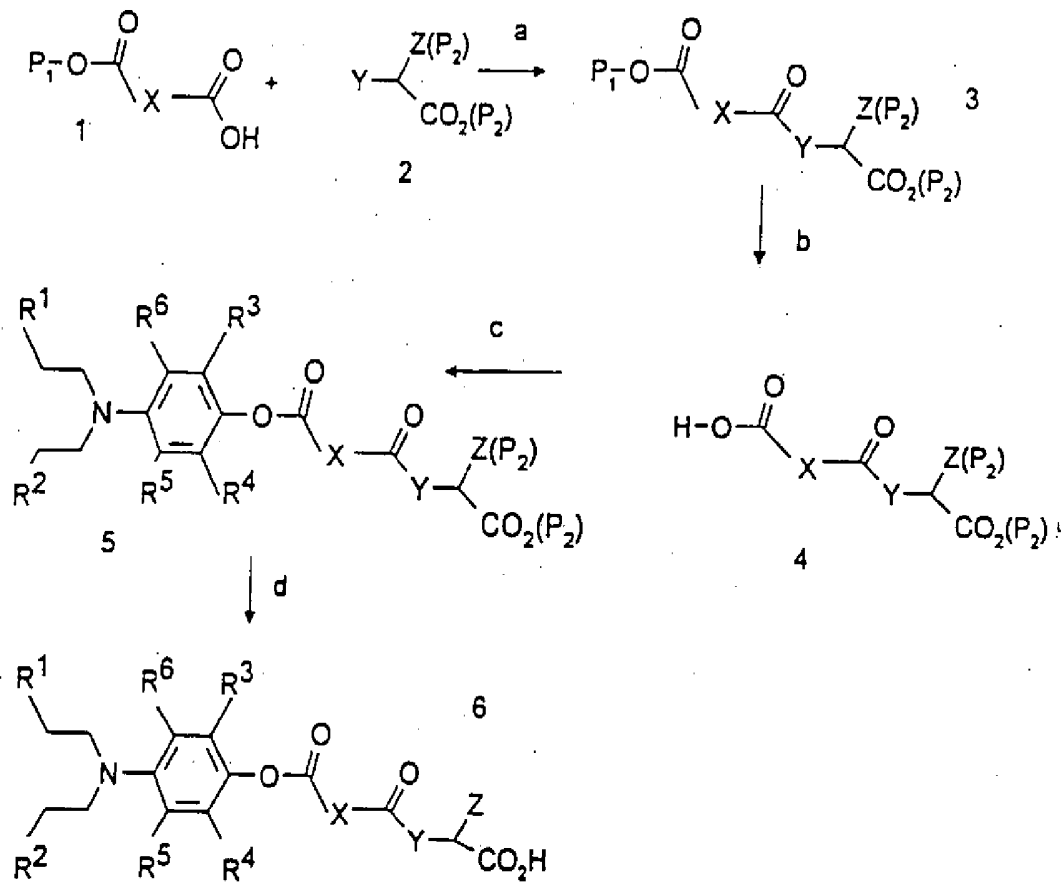
23/27

Obr. 28

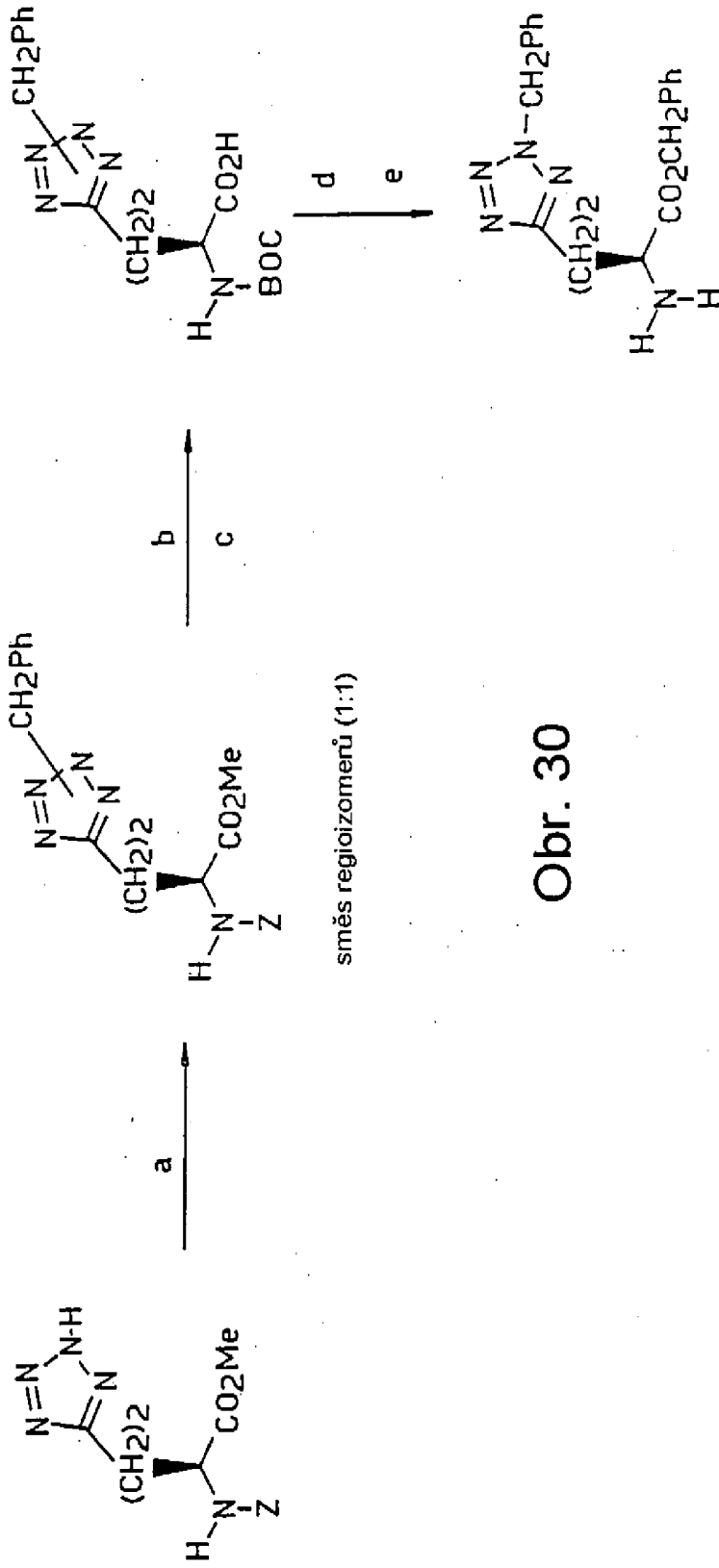


24/27

Obr. 29



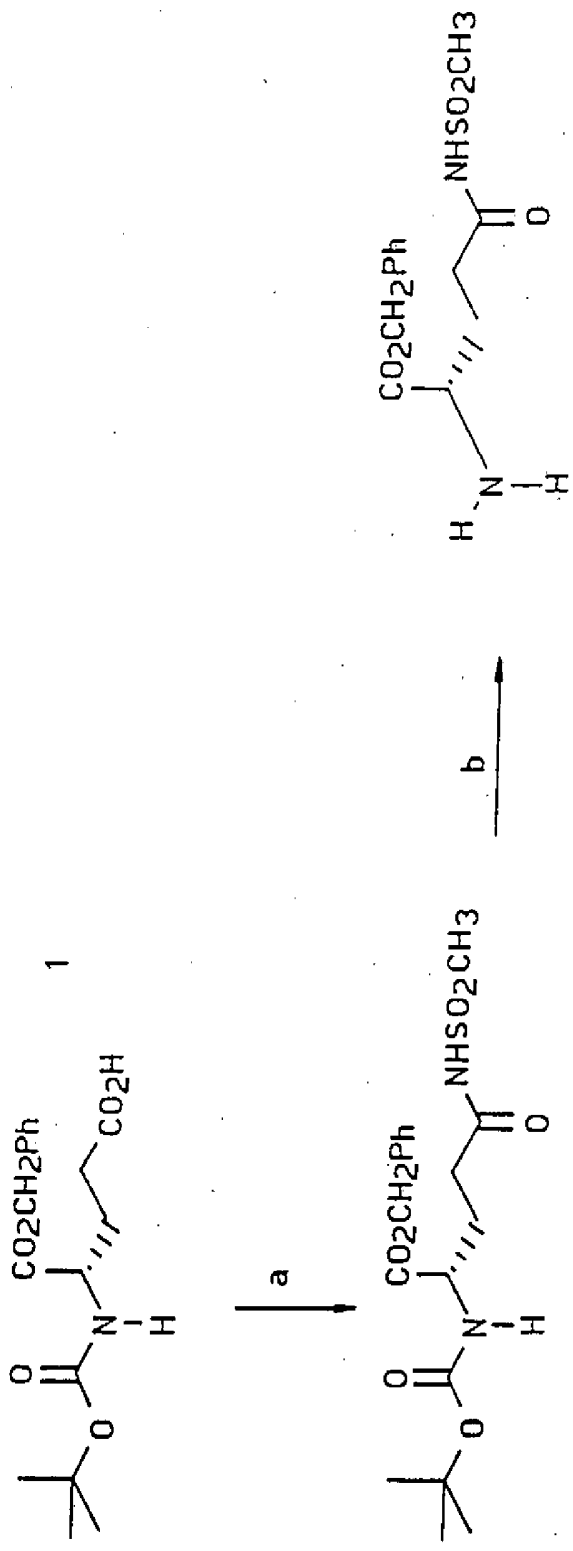
25/27



směs regioizomerů (1:1)

Obr. 30

Obr. 31

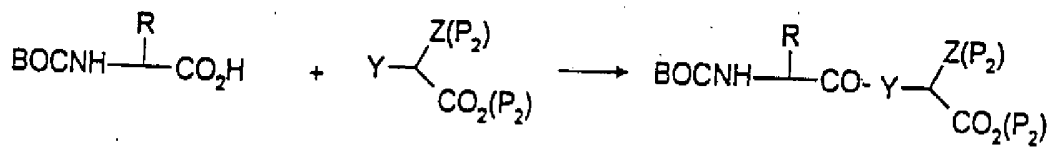


2

3

27/27

Obr. 32



Obr. 33

