

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 289 879

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: 1993 - 1589  
(22) Přihlášeno: 11.12.1992  
(30) Právo přednosti:  
13.12.1991 SE 1991/03701  
(40) Zveřejněno: 13.07.1994  
(Věstník č. 7/1994)  
(47) Uděleno: 19.02.2002  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.04.2002  
(Věstník č. 4/2002)  
(86) PCT číslo: PCT/SE92/00858  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/12143

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

C 07 K 14/00  
C 07 K 14/67  
C 12 P 21/00  
A 61 K 38/16  
A 61 P 9/14

(73) Majitel patentu:

ESPERION THERAPEUTICS INC., Ann Arbor,  
MI, US;

(72) Původce vynálezu:

Cirtori Cesare, Milano, IT;  
Franceschini Guido, Milano, IT;  
Abrahmsen Lars, Stockholm, SE;  
Holmgren Erik, Lidingo, SE;  
Lake Mats, Lidingo, SE;  
Nilsson Bjorn, Sollentuna, SE;  
Chmielewska Joanna, Stockholm, SE;  
Lind Peter, Uppsala, SE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hájkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Dimerový preparát apolipoproteinu AI-Milano,  
farmakologický prostředek, způsob výroby  
dimeru a použití**

(57) Anotace:

Řešení se týká čistých dimerů apolipoproteinu AI-Milano (Apo AI-M/Apo AI-M) a také farmakologických prostředků, které obsahují Apo AI-M/Apo AI-M. Dimer apolipoproteinu AI-M se vyrábí rekombinantně v systému Escherichia coli nebo se shromažďuje z plazmy nositelů apolipoproteinu AI-Milano. Dimery nacházejí použití při léčbě a prevenci aterosklerózy, kardiovaskulárních a kardiocirkulárních chorob a trombózy při různých klinických stavech jak v úrovni arteriální, tak venózní. Dimer může také působit jako prekurzor léčiva s monomerem.

CZ 289879 B6

## Dimerový preparát apolipoproteinů AI–Milano, farmakologický prostředek, způsob výroby dimeru a použití

### 5 Oblast techniky

Tento vynález se týká v podstatě čistého dimeru apolipoproteinů AI–Milano (Apo AI–M/Apo AI–M) a farmaceutických prostředků, které obsahují tento dimer. Vynález se také týká způsobu jeho výroby technickým postupem genového inženýrství, stejně jako jeho izolace z plazmy. Látka, stejně jako retardovaná forma Apo AI–M, se může používat pro ošetřování aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob.

### 15 Dosavadní stav techniky

Na základě epidemiologických a dlouho trvajících studií se opakovaně potvrdil jasný vzájemný vztah mezi zvýšenými hladinami cholesterolu v séru a vývojem koronárních srdečních chorob (CHD). Vymezení celkových mechanismů přenosu cholesterolu v plazmě však dovoluje zjištění selektivní funkce cirkulujících proteinů při stanovení rizika koronárních srdečních chorob.

20 Ve skutečnosti existují čtyři hlavní cirkulující lipoproteiny: chylomikromy (CM), lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Zatímco chylomikromy tvoří produkt intestinální absorpce tuku o krátké životnosti, lipoproteiny o velmi nízké hustotě a zejména lipoproteiny o nízké hustotě jsou odpovědné za přenos cholesterolu do tkání včetně například stěn tepen. Naproti tomu lipoproteiny o vysoké hustotě přímo mají za následek odstraňování cholesterolu z periferních tkání jeho zpětným přenášením do jater nebo převáděním na jiné lipoproteiny, mechanismem známým jako „reverzní transport cholesterolu“ (RCT).

30 „Ochranná“ úloha lipoproteinů o vysoké hustotě je potvrzena řadou studií (například Miller a kol., *Lancet*, 965–968 /1977/ a Whayne a kol., *Atherosclerosis* 32, 411–419 /1981/). Přitom zvýšené hladiny lipoproteinů o nízké hustotě, tím méně lipoproteinů o velmi nízké hustotě se ukazují zřetelně spojené se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem, zatímco u vysokých hladin lipoproteinů o vysoké hustotě se zdá, že prokazují kardiovaskulární ochranu. Ochranná úloha lipoproteinů o vysoké hustotě dále nachází silnou podporu ve studiích in vivo, které ukazují, že infuzelipoproteinů o vysoké hustotě u králíků mohou zabránit vývoji arteriálního poškození vyvolaného cholesterolem (Badimon a kol., *Lab. Invest.* 60, 455–461 /1989/) a/nebo vyvolávají ústup stejného poškození (Badimon a kol., *J. Clin. Invest.* 85, 1 234–1 241 /1990/).

40 Nedávný zájem o studium ochranného mechanismu nebo ochranných mechanismů lipoproteinů o vysoké hustotě se soustředil na apolipoprotein AI (Apo AI), který tvoří hlavní složku lipoproteinů o vysoké hustotě. Vysoké hladiny plazmy z Apo AI jsou spojeny se snížením rizika koronárních srdečních chorob a projevy koronárních poškození (Maciejko a kol., *N. Engl. J. Med.* 309, 385–389 /1983/, Sedlis a kol., *Circulation* 73, 978–984– /1986/).

45 Plazmatický Apo AI je jednoduchým polypeptidovým řetězcem s 243 aminokyselinami, jehož primární sekvence je známa (Brewer a kol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 623–630 /1978/). Apo AI se syntetizuje v buňce jako prekurzor s 267 aminokyselinami. Tento pre–pro–apolipoprotein je zpracován štěpením na N–konci nejprve vnitrobuněčně, kde se odštěpí 18 aminokyselin a potom v plazmě nebo lymfě, kde se aktivitou specifických proteáz odštěpí dalších 6 aminokyselin.

Za hlavní strukturní podmínku Apo AI molekuly se pokládá přítomnost opakujících se jednotek 11 nebo 22 aminokyselin za předpokladu, že existuje amfipatická spirálová stavba (Segrest a kol.,

FEBS Lett. 38, 247–253 /1974/). Tato struktura dovoluje hlavní biologické aktivity Apo AI, to znamená lipidové vázání a aktivaci cholesterolcytransferázy lecitinem (LCAT).

5 Jiná nedávno popsaná vlastnost Apo AI spočívá v jeho protivirovém účinku. Ten byl zjištěn ze studií in vitro a uplatňuje se jak proti kmenům Herpes viru (R. V. Srinivas a kol., *Virology* 1756, 48–57, /1990/), tak také proti viru lidské imunitní nedostatečnosti HIV (Owe a kol., *J. Clin. Invest.* 86, 1 142–1 150 /1990/). Tento účinek se projevuje vzájemnou reakcí mezi amfipatickými spirálovými částmi Apo AI a glykoproteiny na povrchu virů.

10 Studie in vitro ukazují, že komplexy Apo AI a lecitinu mohou napomáhat výtoku volného cholesterolu z kultivovaných arteriálních buněk hladkého svalu (Stein a kol., *Ciochem. Biophys. Acta* 380, 106–118 /1975/). Tímto mechanismem mohou lipoproteiny o vysoké hustotě také snižovat proliferaci těchto buněk (Yoshida a kol., *Exp. Mol. Pathol.* 41, 258–266 /1984/).

15 Nedávno bylo zjištěno, že infuze Apo AI nebo lipoproteinu o vysoké hustotě experimentálním zvířatům ukazuje na signifikantní biologické změny, stejně jako na snížení rozsahu a obtížnosti aterosklerotických poškození. Podle původních údajů, které publikoval Maciejko a Mao (*Arteriosclerosis* 2, 407a /1982/) a Badimon a kol. (viz obě studie citované výše) bylo zjištěno, že by se mohl signifikantně snížit rozsah aterosklerotického poškození (–45 %) a obsah cholesterol-  
20 esteru (–58,5 %) v tkáni králíka bohaté na cholesterol infuzí lipoproteinů o vysoké hustotě ( $d = 1,063$  až  $1,325$  g/ml). Autoři zmíněných publikací také zjistili, že infuze lipoproteinů o vysoké hustotě vede k 50 % regresi již vzniklých poškození.

25 Je možné také poukázat (Esper a kol., *Arteriosclerosis* 7, 523a /1987/), že infuze lipoproteinů o vysoké hustotě může zřetelně změnit složení lipoproteinů v plazmě králíků Watanabe s vrozenou hypercholesterolemií, která vede k vývoji časných stadií arteriálního poškození. Infuze lipoproteinů s vysokou hustotou mohou více než zdvojnásobit poměr mezi ochranně působícími lipoproteiny o vysoké hustotě a aterogenními lipoproteiny o nízké hustotě.

30 Schopnost lipoproteinů o vysoké hustotě zabránit arteriálním chorobám na zvířecích modelech dále podporuje pozorování, že Apo AI může vyvolat fibrinolytickou aktivitu in vitro (Saku a kol., *Thromb. Res.* 39, 1–8 /1985/). Ronneberger (*Xth Int. Congr. Pharmacol.*, str. 990, Sidney /1990/) ukazuje, že extraktivní Apo AI může zvýšit fibrinolýzu u psů Beagle a u opic *Cynomologous*. Podobná aktivita se může pozorovat in vitro na lidské plazmě. Tento autor byl schopen potvrdit  
35 snížené ukládání lipidů a sníženou tvorbu arteriálních destiček u zvířat ošetřovaných Apo AI.

Apolipoprotein AI–Milano (Apo AI–M) je první popsaná molekulární varianta lidského Apo AI (Franceschini a kol., *J. Clin. Invest.* 66, 892–900 /1980/). Tato varianta je charakterizovaná  
40 náhradou Arg 173 za Cys (Weisgraber a kol., *J. Biol. Chem.* 258, 2 508–2 513 /1983/). Mutantní apoprotein se přenáší jako autosomální dominantní znak, přičemž bylo identifikováno 8 generací nositelů (Gualandri a kol., *Am. J. Hum. Genet.* 37, 1 083–1 097 /1984/).

45 Stav nositele Apo AI–M je charakterizován zřetelným snížením hladiny HDL–cholesterol. Navzdory tomu, postižení jedinci zřejmě neprojevují jakékoli zvýšené riziko arteriální choroby. Při genealogickém vyšetření rodiny se vskutku ukazuje, že pacienti mohou být „chráněni“ před aterosklerózou.

Mechanismus možného ochranného účinku Apo AI–M u nositelů se zdá být svázán s modifikací  
50 ve struktuře mutantního apolipoproteinu, se ztrátou jedné alfa–šroubovice a zvýšeným obsazením hydrofobních zbytků (Franceschini a kol., *J. Biol. Chem.* 260, 1 632–1 635 /1985/). Ztráta těsné struktury násobných alfa–šroubovic vede ke zvýšení flexibility molekuly, která je spojena s větší připraveností na reakci s lipidy, v porovnání s normálním AI. Kromě toho komplexy apolipoproteinu s lipidem jsou citlivější k denaturaci, co naznačuje, že uvolňování lipidu se také zlepšuje v případě mutantu.

55

Terapeutické použití apolipoproteinového Apo AI-M mutantu je v současné době omezeno tím, že není k dispozici metoda, která by umožňovala výrobu uvedených apolipoproteinů v dostatečném množství a ve vhodné formě.

5 Jiný velice specifický znak Apo AI-M spočívá v jeho schopnosti tvořit sám se sebou dimery a vytvářet komplexy s Apo AI, v obou případech v důsledku přítomnosti zbytku Cys. Výsledky studií na frakcích krve, které obsahují směs apolipoproteinů, ukazují, že přítomnost dimerů a komplexů v krevním oběhu může být odpovědná za vzrůstu poločasu eliminace těchto látek u nositelů, jak nedávno popsal na klinických studiích Gregg a kol. V NATO ARW on Human  
10 Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone SG /1988/.

Apo AI-M dimery (Apo AI-M/Apo AI-M) působí jako inhibující faktor při vzájemné přeměně částic lipoproteinu o vysoké hustotě in vitro (Franceschini a kol., J. Biol. Chem. 265, 12 224-12 231 /1990/).

15 Dřívější studie směsí obsahujících dimer byly založeny na Apo AI-M odděleném z přirozené krve osob s Apo AI-M, která byla dosažitelná pouze v malých množstvích.

Obtíže při produkci Apo AI a zvláště Apo AI-M z frakcionace plazmy jsou mimořádně významné (Franceschini a kol., J. Biol. Chem. 260, 16 321-16 325 /1985/). Izolace a produkce se nemůže provádět ve velikém měřítku, protože je dostupné pouze malé množství surového materiálu. Kromě toho se vyskytuje několik rizik spojených s produkty z frakcionace plazmy, jako je například kontaminace infekčními látkami. Je podstatné, že těmto nebezpečím se dá vyhnout.

25 Byly provedeny pokusy vyrábět lidský Apo AI cestou genového inženýrství. V evropském patentovém spisu č. 0 267 703 je popsána výroba Apo AI z *Escherichia coli*. Způsob popisuje chimerické polypeptidy, kde Apo AI část je kondenzována na aminokyselinový zbytek na N-konci  $\beta$ -galaktosidázy nebo na jeden nebo větší počet domén proteinu A vázících IgG nebo na pro-sekvenci lidského Apo AI.  
30

Expresse Apo AI a Apo AI-M na kvasinkových kmenech a použití produkovaných komponent při ošetřování aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob je popsáno v patentové přihlášce podané podle Smlouvy o patentové spolupráci (PCT) WO 90/12879. Geny kódující Apo AI a Apo AI-M se určí pomocí DNA-sekvencí kódujících sekreci zjistitelnou u kvasinek a zpracováním signálů napojených proti směsu exprese genu pro hotové proteiny. Používá se modifikovaná MF-alfa-1-vedoucí sekvence, ve které posledními zbytky jsou His-Gly-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg.  
35

#### 40 Podstata vynálezu

Nyní s překvapením bylo nalezeno, že čištěný dimer Apo AI-M/Apo AI-M má prodloužený poločas životnosti v plazmě, v porovnání k monomeru Apo AI-M a dále, že má zřetelně zlepšenou fibrinolýzu, která celkově povzbuzuje schopnosti v porovnání k normálnímu Apo AI, například je schopen přímo aktivovat plazminogen (co normální Apo AI schopen není) a pozoruje se, že může být biologicky důležitý a že také dokáže působit jako prekurzor léčiva pro Apo AI-M.  
45

Tato látka také tvoří rekonstituovaný lipoprotein o vysoké hustotě (HDL) ve formě částic o rovnoměrné velikosti, které se nacházejí v částicích rekombinantního lipoproteinu o vysoké hustotě, které obsahují Apo AI-M nebo Apo AI.  
50

Tento vynález se týká v podstatě čistých dimerů apolipoproteinu AI-Milano, jež se dále označují jako Apo AI-M/Apo AI-M, s čistotou alespoň 90 %, výhodně nejméně 98 %, které byly nejprve izolovány a charakterizovány z plazmy a které se také vyrábějí způsoby založenými na genovém  
55

inženýrství. Vynález se také týká farmaceutických prostředků obsahujících Apo AI-M/Apo AI-M, popřípadě dohromady se stabilizačním činidlem, například stabilizující lipidovou sloučeninou, jako je fosfolipid a/nebo nosnou látkou.

5 Farmaceutické prostředky mohou také obsahovat přípravek snižující obsah lipidů a/nebo jinou léčivou látkou, která je již pro ošetřování aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob, jako je heparin, heparinové frakce a heparinové fragmenty nebo přípravky snižující obsah lipidů.

10 Apolipoprotein Apo AI-M se může vyrábět tím, že se

a) vyrobí apolipoprotein AI-Milano metodou genového inženýrství (rekombinantní technologii) jako vnitrobuněčný fúzní protein v *Escherichia coli*, odštěpí apolipoprotein AI-Milano působením kyseliny mravenčí a poté převede libovolný přítomný monomer na dimer  
15 nebo

b) vyrobí apolipoprotein AI-Milano metodou genového inženýrství (rekombinantní technologii), při které se apolipoprotein AI-Milano, monomer a dimer vylučují do bakteriálního kultivačního prostředí v expresním systému v *Escherichia coli* a libovolný  
20 přítomný monomer potom převede na dimer a

čistí se dimer na v podstatě čistou formu.

Podle způsobu a) se Apo AI-M vyrábí vnitrobuněčně jako fúzní protein v bakterii. Partnerem  
25 fúze je modifikovaná doména proteinu A vážící IgG a štěpicí místo pro kyselinu mravenčí je navrženo mezi partnerem fúze a Apo AI-M. Po lýze bakterie se protein získaný fúzí čistí na immobilizovaném IgG a odštěpí působením kyseliny mravenčí. přítomnost Apo AI-M a dimeru se prokáže postupy Western blot nebo SDS gelovou elektroforézou.

30 V případě 3 je ukázáno, že vyrobený Apo AI-M by se mohl vyrábět v rekombinantní *Escherichia coli* a že se tvoří dimery. Avšak použití kyseliny mravenčí vede k produktu zkrácenému o dvě aminokyseliny na jejich N-koncích. Toto zkrácení nepředpokládá změnu aktivity Apo AI-M molekuly.

35 Systém popsany pod b) je uveden v příkladě 4, ve kterém se tvoří zcela správná molekula.

Chráněný dimer se může také získat tím způsobem, že se

c) shromáždí plazma od nositelů apolipoproteinu AI-Milano, izolují HDL apolipoproteiny,  
40 oddělí dimer za použití chromatografie, například chromatografické metody Sephacryl chromatography, v několika krocích nebo

d) shromáždí plazma od nositelů apolipoproteinu AI-Milano, čistí monomer a poté převede na dimer a čistí dimer na v podstatě čistou formu.  
45

Je důležité, že dělení popsané pod c) se provádí v několika stupních a výhodně na dlouhém sloupci, například 300 cm.

Pokud je přítomen monomer, měl by se vždy převést na formu dimeru, jak je uvedeno  
50 v příkladech popsaných dále.

Tento vynález zahrnuje způsob ošetřování aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob a dále použití dimeru pro výrobu léčiva. Dimer může také působit jako prekurzor léčiva s monomerním k ošetřování aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob.

55

Toto léčivo se může používat pro léčbu aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob a k prevenci a léčbě závažných kardocirkulárních zdravotních potíží, jako je infarkt myokardu, labilní angina, akutní periferní vaskulární okluze a restenóza po koronární angioplastice.

- 5 Pokud se léčí chronické arteriální stavy, provádí se léčba jak koronárních, tak také periferních tepen, které jsou charakterizovány okluzním plátem (occlusive plaque). Dimery se používají pro infuze jako takové, s cílem vyvolat odstranění tuku z plátů nebo popřípadě ve spojitosti se zavedenými ošetřeními aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob, jako při použití heparinu, heparinových frakcí a heparinových fragmentů a/nebo léčivých látek snižujících hladiny  
10 aterogenních lipoproteinů v krevním oběhu.

Léčivo obsahující dimer se může používat k prevenci a léčbě trombózy při různých klinických stavech a dále používat při stimulaci fibrinolýzy.

- 15 Amfipatické struktury jsou přítomny ve vysokém rozsahu v dimeru Apo AI-M a u dimeru se proto předpokládá, že má protivirový účinek.

- Nyní, nejdříve při použití tohoto vynálezu je možné vyrábět dimer v podstatě v čisté formě, to znamená s obsahem větším než 90 % a výhodněji větším než 98 % a také je možné ukázat, že  
20 tento produkt má překvapivě lepší biologický účinek na biologické systémy v porovnání k Apo AI, jak dokládají příklady 7 až 10, které se uvádějí v tomto popisu dále.

#### Přehled obrázků na výkresech

25

Jsou připojeny dále uvedené obrázky:

Obr. 1 a 2 ilustrují výtěžky v závislosti na procentuální koncentraci proteinu, příklad 2b).

- 30 Obr. 3 ilustruje kinetiku tvorby Apo AI-M/Apo AI-M v průběhu 24 hodin, příklad 1 b2).

Obr. 4 ilustruje syntetický spojovník (linker), příklad 3a).

Obr. 5 ilustruje plazmid, příklad 3a).

35

Obr. 6 ilustruje Western analýzu po odštěpení fúzního proteinu, příklad 3d).

Obr. 7 ilustruje ultrafialové spektrum Apo AI-M/Apo AI-M, příklad 5.

- 40 Obr. 8 až 10 ilustrují druhou derivaci ultrafialového spektra, příklad 5.

Obr. 11 ilustruje fluorescenční spektroskopii, příklad 5.

Obr. 12 ilustruje spektrální dichroismus (CD spektroskopii), příklad 5.

45

Obr. 13 ilustruje rekonstituované lipoproteiny o vysoké hustotě (rHDL) obsahující Apo AI, Apo AI-M a Apo AI-M/Apo AI-M, příklad 6.

Příklady provedení vynálezu

## 5   Příklad 1

## Izolace dimeru z plazmy

## a)   Výroba apolipoproteinů

10

Vzorky krve se shromažďují na 1 mg/ml sodné soli kyseliny ethylendimintetraoctové od různých nositelů apolipoproteinu Apo AI-M a plazma se připraví odstředováním při nízké rychlosti za teploty 4 °C. Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL,  $d = 1,063$  až  $1,21$  g/ml) se z plazmy izolují následujícím zpracováním na rychloběžné odstředivce (R. J. Hasvel, H. A. Eder a J. H. Bragdon, The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum, *J. Clin. Invest.* **34**, 1 345–1 354 /1955/), v rychloběžné odstředivce Beckman L5-50B, která je vybavena rotorem 50.2 Ti. Po rychloběžném odstředování s frekvencí otáček 40 000 za minutu při teplotě 4 °C během 48 hodin se horní frakce obsahující lipoproteiny o vysoké hustotě zředí v poměru 1 : 1 0,15 M chloridu sodného a 0,01 % sodnou solí kyseliny ethylendiamintetraoctové v roztoku bromidu draselného (hodnota pH 7,4,  $d = 1,21$  g/ml) a opětovně se rychloběžně odstřeďuje při frekvenci otáček 40 000 za minutu při teplotě 4 °C po dobu 48 hodin. Lipoproteiny o vysoké hustotě se důkladně dialyzují proti 5 mM hydrogenuhlíčitanu amonného a 0,01 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové o hodnotě pH 7,4, lyofilizují a delipidátují působením diethyletheru a ethanolu v objemovém poměru 3 : 1. Koncentrace proteinu se stanoví buď analýzou aminokyseliny, nebo způsobem, který popsal Lowry a kol. (O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 /1951/).

15

20

25

30

## b)   Izolace Apo AI-M/Apo AI-M

K izolaci Apo AI-M/Apo AI-M se HDL apolipoproteiny z příkladu 1a) solubilizují v 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného, při hodnotě pH 7,4, s obsahem 6 M hydrochloridu guanidinu (Gdn-HCl). Apolipoproteiny se vnesou na sloupec Sephacrylu S-300 HR (o průměru 2,6 cm a délce 300 cm) ekvilibrovaný 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 4 M hydrochloridu guanidinu. Apolipoproteiny se eluují stejným pufrem při rychlosti průtoku 1,5 ml/min a frakce o objemu 10 ml se zachycují. Spojené frakce obsahující Apo AI-M/Apo AI-M se zahustí za sníženého tlaku a opět vnesou na stejný sloupec.

35

40

Frakce obsahující čistý Apo AI-M/Apo AI-M se zachycují a dialyzují proti 5mM hydrogenuhlíčitanu amonného a 0,01 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové o hodnotě pH 7,4, lyofilizují a skladují za teploty -20 °C v 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 3 M hydrochloridu guanidinu. Apo AI-M/Apo AI-M má čistotu větší než 98 %, jak bylo přezkoušeno vysokoúčinnou vylučovací chromatografií (HPSEC, high-performance size-exclusion chromatography) a SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) za neredukčních podmínek.

45

Tímto způsobem se izoluje čistý dimer Apo AI-M z plazmy z nosných látek.

50

## Příklad 2

Čištění monomeru z plazmy a jeho následující převedení na dimer

5

## a) Čištění Apo AI-M

K čištění monomeru Apo AI-M se HDL apolipoproteiny z příkladu 1a solubilizují v 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 6 M hydrochloridu guanidinu a 1 % 2-merkapt ethanolu. Po inkubaci za teploty 37 °C trvající 4 hodiny se redukovaný apo-HDL vnese na sloupec Sephacrylu S-200 (o průměru 2,6 cm a délce 150 cm), ekvilibrovaný 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 4 M hydrochloridu guanidinu a 0,1 % 2-merkapt ethanolu. Apolipoproteiny se eluují stejným pufrem při nízkém průtoku 1,0 ml/min a frakce o objemu 5 ml se zachycují. Spojené frakce odpovídající apo AI + apo AI-M se dialyzují proti 5 mM hydrogenuhličitanu amonného a 0,01 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové o hodnotě pH 7,4 a lyofilizují. Apolipoproteiny se rozpustí v 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 6 M hydrochloridu guanidinu a 1 % 2-merkapt ethanolu. Po inkubaci za teploty 25 °C po dobu 4 hodin se 2-merkapt ethanol odstraní chromatografií na Sephadexu G25 a apolipoproteiny se hned vnese na sloupec thiopropylsepharosu (o průměru 1 cm a délce 10 cm), ekvilibrovaný 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % sodné soli kyseliny dusíkovodíkové o hodnotě pH 7,4, s obsahem 4 M hydrochloridu guanidinu. Vše se recirkuluje přes noc při nízké rychlosti průtoku 0,15 ml/min a normální Apo AI se eluuje 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného a hodnotě pH 7,4, s obsahem 4 M hydrochloridu guanidinu. Apo AI-M se potom eluuje stejným pufrem, který obsahuje 4 M hydrochloridu guanidinu a 1 % 2-merkapt ethanolu. Frakce obsahující Apo AI-M se spojí, dialyzují proti 5 mM hydrogenuhličitanu amonného a 0,01 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové o hodnotě pH 7,4, lyofilizují a skladují za teploty -20 °C v 0,1 M Tris-HCl, 0,04 % sodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové a 0,01 % azidu sodného o hodnotě pH 7,4, s obsahem 3 M hydrochloridu guanidinu a 0,1 % 2-merkapt ethanolu. Preparáty Apo AI-M mají čistotu větší než 98 %, jak bylo přezkoušeno vysokoúčinnou vylučovací chromatografií, SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a isoelektrickou fokusací.

35

## b) Syntéza Apo AI-M/Apo AI-M

Roztoky Apo AI-M se dialyzují proti 25 mM Tris-HCl pufru o hodnotě pH 9,0. Redukovaný Apo AI-M se zředí na požadovanou konečnou koncentraci (3,6 až 53,6 μM) 25 mM Tris-HCl pufrem, který obsahuje 1 až 5 mM glutathionu (GSH) a nechá se preinkubovat za teploty 25 °C po dobu 5 minut. Oxidace se iniciuje přidáním 0,1 až 10,0 mM oxidovaného glutathionu (GSSG) a reakce se nechá probíhat v nepropustně uzavřené trubici za stejné teploty po dobu 24 hodin. Oxidace se sleduje SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (viz údaje uvedené výše). Po napuštění barvou a odstranění vzniklých skvrn se gely podrobí měření na laserovém mikrofotometru LKB Ultrosan XL a vypočítá se procentuální distribuce jednotlivých pásů proteinů za použití softwaru LKB 2400 Gelscan XL. Oxidační kinetika se sleduje vysokoúčinnou vylučovací chromatografií.

45

Za účelem dosažení optimální syntézy dimeru se prováděly pokusy s dostatečnou oxidací v přítomnosti glutathionu/oxidovaného glutathionu + hydrochloridu guanidinu a glutathionu/oxidovaného glutathionu + thioredoxinu (V. P. Pigiet a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7 643-7 647 /1986/).

50

Oxidace Apo AI-M se provádí v uzavřené trubici v přítomnosti proměnných koncentrací redukovaného nebo oxidovaného glutathionu (glutathionu/oxidovaného glutathionu). Výtěžky

55

dimeru při reakci závisí jak na koncentraci proteinu (obr. 1, tabulka 1), tak na koncentraci nebo poměru glutathionu/oxidovaného glutathionu (obr. 2, tabulka 1). Při zvýšení koncentrace proteinu z 8,9 na 53,6  $\mu\text{M}$  vzroste procentuální obsah Apo AI-M/Apo AI-M z 26 na 51 % (obr. 1, tabulka 1). Pokles molárního poměru glutathionu/oxidovaného glutathionu z 1 : 2 na 1 : 16 má za výsledek snížení výtěžku o 43 %. Naproti tomu zvýšení koncentrace glutathionu/oxidovaného glutathionu, s konstatním molárním poměrem glutathionu k oxidovému glutathionu, je spojeno se zvýšením tvorby Apo AI-M/Apo AI-M až na 42 % (obr. 2, tabulka 1). Jak reakční teplota, tak přítomnost látky denaturující protein (hydrochloridu guanidinu) neovlivňují stupeň tvorby Apo AI-M/Apo AI-M. Signifikantní tvorby Apo AI-M/Apo AI-M se také dosáhne při inkubaci Apo AI-M s glutathionem/oxidovaným glutathionem v přítomnosti 0,2 mM thioredoxinu (tabulka 1).

Kinetika oxidační reakce se sleduje analyticky pomocí vysokoúčinné vylučovací chromatografie. Dimerní a monomerní Apo AI-M mají charakteristické píky při době retence 10,8 a 12,7 minut. Syntéza AI-M/AI-M (2 mM glutathionu a 4 mM oxidovaného glutathionu, 8,9  $\mu\text{M}$  koncentrace AI-M) je takřka hotova za 3 hodiny a prodloužení inkubace až na dobu 24 hodin nepřináší další zvýšení tvorby AI-M/AI-M (obr. 3).

20 Tabulka 1

## Oxidace Apo AI-M

Protein $\mu\text{M}$	GSH mM	GSSG mM	Výtěžek %	Poznámka
3,6	1,0	0,1	34,8	thioredoxin 0,2 mM
8,9	1,0	2,0	9,1	
8,9	1,0	2,0	9,9	4 °C
8,9	1,0	4,0	7,2	
8,9	1,0	4,0	7,7	4 °C
8,9	1,0	8,0	6,6	
8,9	1,0	16,0	5,2	
8,9	2,0	4,0	19,6	
8,9	4,0	8,0	18,7	
8,9	5,0	10,0	23,9	
8,9	1,0	2,0	9,8	Gdn HCl 4M
17,9	2,0	4,0	23,3	
17,9	4,0	8,0	25,5	
17,9	5,0	10,0	27,5	
35,7	2,0	4,0	25,9	
35,7	4,0	8,0	27,7	
35,7	5,0	10,0	27,9	
53,6	2,0	4,0	25,4	
53,6	4,0	8,0	30,4	
53,6	5,0	10,0	36,1	

25 Reakční podmínky: Puf: Tris-HCl 25 mM, hodnota pH: 9,0

Teplota: 25 °C

Doba: 24 hodiny

## Příklad 3

## Způsob rekombinantní výroby Apo AI-M/Apo AI-M

5

## a) Konstrukce expresního vektoru pKP644

10 Replikační forma bakteriofágu M13mp18 obsahujícího komplementární cDNA kódující apolipoprotein AI-M (C. R. Sharpe a kol., *Nucleic Acids Research*, sv. 12, č. 9, str. 3 917 /1984/ a M. C. Cheung a kol., *Biochem. Biophys. Acta* 960, 73–82 /1988/) se digeruje s restričním enzymem BamHI a čistí gelovou elektroforézou na agaróze při nízké teplotě gelování (LGT). Fragment 822 bp odpovídající genu Apo AI-M se vyřízne a liguje na plazmid pUC9, předtím digerovaný s BamHI a zpracuje s telecí intestinální fosfodiesterázou.

15 Ligační směs se použije pro transformaci příslušné *Escherichia coli* JM83 a bílé kolonie se sejmu z agarových ploten, které obsahují ampicilin, X-Gal a isopropyl- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG). Plazmid-DNA se připraví a čistí na sloupcích QuiaGene (QuiaGene Inc., 9259 Eton ave., Chatsworth, California 91311, USA) podle doporučení výrobce. Derivovaný plazmid, označený jako pUC/Apo AI-M, se digeruje s Eco RI a Nco I. Alikvot digerační směsi se analyzuje  
20 elektroforézou na agaróze k potvrzení správné orientace. Jiný alikvot se použije k ligaci syntetického spojovníku „ $\Delta$ ApoAI-Eco“ (obr. 4) na konec 5' genu Apo AI-M za účelem vytvoření genu  $\Delta$ Apo AI, obsahujícího 724 bp.  $\Delta$ Apo AI-M sekvence vytváří místo Asp-Pro u N-konce kódovaného proteinu, což umožňuje štěpení působením kyseliny mravenčí. Příslušná  
25 *Escherichia coli* JM83 se transformuje ligační směsí a derivovaný plazmid (označený jako pUC/ $\Delta$ Apo AI-M) se izoluje na sloupcích QuiaGene, jako je popsáno výše.

Plazmid pUC/ $\Delta$ Apo AI-M a expresní vektor pEZZ se digerují s Eco RI a BamHI, čistí gelovou elektroforézou na agaróze při nízké teplotě gelování a 799 bp fragment pUC/ $\Delta$ ApoAI-M se váže k 2 763 bp fragmentu pEZZ. Ligační směs se použije k transformaci příslušné *Escherichia coli*  
30 ER308 a plazmid DNA se připraví jak je uvedeno výše.

Údaje o experimentálních způsobech uvádí J. Sambrook, E. F. Fritsch a T. Maniatis v *Molecular Clonings, A Laboratory Manual*, 2 vyd., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, N. Y. /1989/.

35

Derivovaný plazmid se označuje jako pKP644 (obr. 5).

b) Expese fúzního proteinu ZZ- $\Delta$ Apo AI-M

40 40 ml kultury *Escherichia coli* RV308/pKP644 udržované přes noc za teploty 30 °C v prostředí Luria Bertani (LB) s 50 mg/ml kanamycinu se naočkuje dvakrát vždy 500 ml minimálního prostředí A (*Curr. Meth. v Mol. Biol.*), za přídatku 0,2 g/l kaseinového hydrolyzátu (Casamino Acids), 1 mM síranu hořečnatého, 0,25 % glukózy a 50 mg/ml kanamycinu. Kultura se inkubuje za teploty 37 °C po dobu 24 hodin za intenzivního třepání.

45

## c) Počáteční čištění Apo AI-M

1,0 litr kultury *Escherichia coli* RV308/pKP644 obsahující popsaný plazmid se odstředí a peletové buňky se znovu suspendují ve 30 ml 1xTS (25 mM Tris-HCl, 0,2 M chloridu sodného  
50 a 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové) a 6 M hydrochloridu guanidinu a homogenizují jediným průchodem přes Fresch Press (SLM Instruments Inc.) při pracovním tlaku 687 kPa. Výsledná suspenze se podrobí inkubaci za teploty místnosti při opatrném třepání po dobu 1 hodiny a odstředí. Supernatant se poté zředí na konečnou koncentraci hydrochloridu guanidinu 1 M (to znamená šestkrát) a vnese na sloupec 15 ml Sepahrose FastFlow IgG ekvilibrovaný

1xTS. Po naplnění se sloupec promyje 1xTS o objem odpovídajícím pětinasobku objemu sloupce a poté promývá 20 mM octanu amonného o hodnotě pH 5,4, dokud hodnota pH eluátu nedosáhne hodnoty 5,4. Vázaný materiál se eluuje 25 ml 0,2 M kyseliny octové a poté se stanoví absorbance při vlnové délce 280 nm ( $A_{280}$ ). Výtěžek z 1 litru kultury odpovídá 1,9 mg, vztaženo na hodnotu  $A_{280}$ .

#### d) Štěpení fúzního proteinu

Eluát se rozdělí na alikvoty. lyofilizuje a znovu suspenduje v 75 %, 50 % a 25 % kyselině mravenčí. Roztoky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 28 hodin a poté lyofilizují, aby se odstranila kyselina mravenčí. Produkty štěpení se hodnotí za použití SDS–polyakrylamidové gelové elektroforézy a poté Western analýzy. Přibližně 5 mg z veškerého proteinu se naplní na gel k SDS–polyakrylamidové gelové elektroforéze, při gradientu 8 až 25 % za nereduktivních podmínek. Vzorky se zpracovávají dvojmo. Jeden gel se obarví barvivem Coomassie a druhý gel se použije pro Western analýzu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 6. Jeden ze štěpných produktů migruje společně s čistým přírodním Apo AI a způsobí vzestup signálu při Western analýze. Western analýzy se provádějí za použití polyklonálních protilátek konjugovaných s peroxidázou získanou z křenu selského (The Binding Site Ltd., Cambridge, Velká Británie) a vizualizují za použití standardní procedury.

Obr. 6 ukazuje analýzu výsledných proteinů po štěpení fúzního proteinu.

Plocha A: Gel pro SDS–polyakrylamidovou gelovou elektroforézou obarvený barvivem Coomassie (8–25 %). Pruh 1: 25 % kyselina mravenčí, pruh 2: 50 % kyselina mravenčí, pruh 3: 75 % kyselina mravenčí, pruh 4: čištění Apo AI (Sigma) a pruh 5: značkováč LMW (Pharmacia).

Plocha B: Western analýza duplikátu gelu. Pruh 1: čištěný přírodní Apo AI (Sigma), pruh 2: 75 % kyselina mravenčí, pruh 3: 50 % kyselina mravenčí a pruh 4: 25 % kyselina mravenčí. Přítomnost pásu při dvojnásobné molekulové hmotnosti Apo AI–M při Western analýze ukazuje, že jsou přítomny dimery Apo AI–M.

#### Příklad 4

##### Produkce Apo AI–M v bioreaktorech

Konstrukce vektorů pro přímou sekreci Apo AI–M v periplazmatickém prostoru a růstové prostředí

Kmeny a vektory: Použité kmeny *Escherichia coli* K12 jsou HB101 F, hsd S20 (rB, mB) supE44, HB101 F, hsd S2 % (rB, mB), supE44, ara14, I, galK2, lacY1, proA2, rspL20, xyl–5, mtl–1, recA13, r<sub>B</sub><sup>–</sup>, m<sub>B</sub><sup>–</sup>, mcrB<sub>(–)</sub> (Boyer a kol., *J. Mol. Biol.* **41**, 459–472 /1969/), DH5a F, F80DlacZDM15, D(lacZYA–argF)U169, recAI, endAI, gyrA,  $\Gamma$ , thi–I, hsdR17, (r<sub>K</sub><sup>–</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44, erlAI, (BRL USA), RV308 DlacX74, galOP::IS2(galOP308), strA,  $\Gamma$  (Maurer a kol., *J. Mol. Biol.* **139**, 147–161 /1980/) a BC50 xyl–7, ara–14, T4–R,  $\Gamma$ . Kmeny HB101 a DH5a se používají pro subklonování fragmentů DNA. Plazmid pUC9 (Vieira a kol., *Gene* **19**, 259–268) /1982/) se použije pro subklonování fragmentu 821 bp BamHI z komplementární DNA kopie lidského Apo AI, který byl získán od S. Sidoli (Milano, Itálie). Nukleotidová sekvence lidského Apo AI komplementární DNA se může získat z GenBank pod přírůstkovým číslem uložení X02162 (Seilhammer a kol., *DNA* **3**, 309–317 /1984/). Tento vektor je označován jako pKP575. Také fragment 856 bp Eco RI–Pst I lidského Apo AI–M DNA (cDNA kopie získaná od S. Sidoli) se subklonuje v plazmidu pUC9. Tento derivát je označován jako pKP576. Plazmidy pKP683 a pKP764 jsou deriváty plazmidu pTrc 99 (Amann a kol., *Gene* **69**, 301–315 /1988/) a derivátu pUC se signálním znakem odolnosti vůči kanamycinu (kanamycinový marker) odvozeným od transpozonu (Tn903) z pUC4–K (Vieira a kol., *Gene* **19**, 259–268 /1982/ a Oka a kol., *J. Mol.*

Biol. 147, 217 /1981/) a transkripčních terminátorů (T1T2) bakteriofágu fd z pUEX2 (Bressan a kol., Nucleic Acid. Res. 15, 10 056 /1987/).

#### Použité způsoby

5

Bakteriální kmeny se nechají růst v prostředí Luria Bertani (LB) nebo v prostředí yeast trypton (2xYT) s ampicilinem (Ap) v koncentraci 50 µg/mg nebo kanamycinem (Km) v koncentraci 70 µg/ml pro přípravu plazmidu DNA a pro expresní analýzu malého rozsahu (Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press /1989/). Tryptose blood agar base (Difco, USA), doplněný 10 50 µg/ml ampicilinu nebo 70 µg/ml kanamycinu se použije pro růst buněk na agarových plotnách. Postupuje se způsobem genového inženýrství (rekombinantními DNA technikami), podle údajů, které uvedl Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press /1989/. restriční endonukleázy a T4 DNA ligáza se dostanou od firem Boehringer Mannheim (SRN), New England Biolabs (Beverly, USA) nebo Pharmacia (Uppsala, Švédsko). Isopropyl-b-D-galaktosid (IPTG) se získá od firmy Sigma (USA). K izolaci DNA fragmentů se používá agaróza s nízkou 15 teplotou gelování a tání (NuSieve GTG, FMC Bioproducts, USA). PCR amplifikace se provádí za použití DNA tepelného cyklovače a Taq DNA polymerázy od firmy Perkin-Elmer/Cetus Instruments (Norwalk, USA). Oligonukleotidové spojovníky a primery se syntetizují na zařízení Pharmacia-LKB Gene Assembler Plus od firmy Pharmacia (Uppsala, Švédsko) za použití 20 triesteru kyseliny fosforité v pevné fázi. Stanovení nukleotidových sekvencí se provádí na systému Applied Biosystem 373A DNA za použití výbavy Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit od firmy Applied Biosystem (USA).

#### Používané DNA počítačové programy

25

Program MacIntosh PlazmidARTIST (verze 1,2) (Clontech, USA), který se používá pro znázornění plazmidových map, a GCG Segence Anlysis Software Package (Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wisconsin, USA), který se používá pro řízení DNA sekvencí na 30 digitálních počítačích VAX.

30

#### Konstrukce, exprese a sekvence Apo AI-M v bakteriích

Cílem konstrukce vektorů je získání produkčního sekrečního systému pro Apo AI-M v Escherichia coli s velmi vysokou úrovní sekrece Apo AI-M do růstového prostředí.

35

Oba oligonukleotidy se syntetizují pro fúzi Apo AI a Apo AI-M cDNA kopií na DNA fragmenty kódující bakteriální signální sekvenci. 14 bp Eco RI a Nco I fragment a 40 bp Nco I fragment pKP575 se nahradí syntetickým fragmentem 37 bp Eco RI Nco I v plazmidu označeném jako 40 pKP580. Bbs I štěpící místo tohoto syntetického DNA fragmentu poskytuje stejné místo štěpení jako Mlu I, což usnadňuje klonování různých fragmentů kódující bakteriální signální sekvenci. Plazmid pKP631 je konstruován náhradou 702 bp Nco I – Dra III fragmentu z pKP575 (Apo AI) 45 fragmentem 702 bp Nco I – Dra III z pKP576 (Apo AI-M). Z plazmidu pKP 631 se izoluje fragment 820 bp Bbs I – Hind III a zavede se do Mlu I a Hid III plazmidového vektoru, který je označen jako pKP682. Tento vektor obsahuje tac-promotor (Ptac), derivát signální sekvence ompA, dva terminátory přepisu (transkripce) a kanamycinový marker. Fragment 1501 bp Nru I – 45 Nru I se izoluje z pKP682 a zavede do podobného vektoru s tím rozdílem, že se Ptac nahradí promotorem Ptrc. Tento expresní vektor je označován jako pkP683. Plazmid pkP764 je konstruován náhradou 88 bp Dra III – Hind III z pkP683 za 14 bp syntetický DNA fragment, který obsahuje silnější terminátory translace a rozrušuje místo Dra III zavedením A na konec Dra 50 III přesahujícího 3'-konec. Transformace kmene Escherichia coli se provádí jak popsal Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press /1989/. Konstrukce plazmidu použitých pro expresi při pokusech a pro výrobu Apo AI-M se analyzují za použití restričního enzymového mapování s strukturální gen Apo AI-M se potvrdí stanovením nukleotidových sekvencí Kmeny Escherichia coli s příslušnými plazmidy použitými pro růst v bioreaktorech se 55 připravují jako je uvedeno dále. Buňky se nechají růst přes noc v prostředí Luria Bertani nebo

2xYT doplněném kanamycinem v třepané baňce za teploty 30 °C. Po odstředění se buňky suspendují v polovičním objemu skladovacího prostředí zchlazeného na hlubokou teplotu, podle údajů, které uvedl Gergen a kol. v *Nucleic Acid Res.* 7, 2 115 /1979/. Alikvoty se dispergují v láhvičkách pro skladování za mrazu o objemu 1 ml a skladují za teploty -75 °C až do použití.

5

Růstová prostředí pro růst buněk v bioreaktorech

Prostředí A: 16 g/l tryptonu (Difco, USA), 8 g/l kvasinkového extraktu (Difco, USA), 5 g/l chloridu sodného a 0,05 g/l kanamycinu.

10

Prostředí B: 2,5 g/l síranu amonného, 3 g/l dihydrogenfosforečnanu amonného, 2 g/l hydrogenfosforečnanu amonného, 0,5 g/l citrátu sodného a 5 g/l kvasinkového extraktu (Difco, USA). Po sterilizaci se prostředí doplní 10 g/l počáteční glukózy, 0,05 g/l kanamycinu, 1 g/l heptahydrátu síranu hořečnatého a 0,07 g/l hydrochloridu thiaminu a dále se přidá 1 ml/l roztoku stopových prvků a 0,65 ml/l roztoku vitaminů. Roztok stopových prvků obsahuje 27 g/l hexahydrátu chloridu železitého, 4 g/l heptahydrátu síranu zinečnatého, 7 g/l hexahydrátu chloridu kobalnatého, 7 g/l dihydrátu molybdenanu sodného, 8 g/l pentahydrátu síranu měďnatého, 2 g/l kyseliny borité, 5 g/l tetrahydrátu síranu manganatého, 11 g/l dihydrátu chloridu vápenatého a 50 ml/l kyseliny chlorovodíkové. Roztok vitaminů obsahuje 0,5 g/l pantothenátu vápenatého, 0,5 g/l cholinchloridu, 0,5 g/l kyseliny listové, 1 g/l inositolu, 0,5 g/l nikotinamidu, 0,5 g/l hydrochloridu pyridoxinu, 0,05 g/l riboflavinu a 0,5 g/l hydrochloridu thiaminu. Jako prostředek zabráňující pění se použije adecanol v množství 0,2 ml/l. Pokud je zapotřebí, během kultivace se může použít dalšího přídatku prostředku zabráňujícího pění.

15

20

25

Kultivace *Escherichia coli* RV308/pKP683 v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů

K naočkování 500 ml prostředí A se použije lyofilizovaná zásobní kultura a prekultivace se provádí ve 2-litrové Erlenmeyerově baňce opatřené míchací zarážkou, za teploty 30 °C po dobu 8 až 10 hodin. Naočkovaný objem odpovídající 10 % pracovního objemu bioreaktoru se přenese do bioreaktoru. Kultivace se provádí v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů (Belach AB, Švédsko) s pracovním objemem 2,5 litrů. Teplota se udržuje na 30 °C během růstové fáze před přivedením a potom se zvýší na 37 °C. Hodnota pH se udržuje 7,0 pomocí 25 % roztoku amoniaku. Intenzita provzdušňování (aerace) se zajišťuje v úrovni 1 vvm a tenze rozpouštěného kyslíku (D.O.T.) se udržuje 30 %, úpravou rychlosti rychloběžného míchadla. Poté co se spotřebuje počáteční množství glukózy, uvede se do chodu glukózová fermentace fed-batch, udržující systém při limitaci glukózy dávkováním 60 % roztoku glukózy. Počáteční rychlost dávkování 0,04 g/min se udržuje po dobu 3 hodin a poté se postupně zvýší na 0,4 g/min během 3 hodin. Růst Apo AI-M v supernatantu se stanovuje radioimunologickým stanovením (Apolipoprotein AI RIA 100 kit, výrobek číslo 109152-01, Kabi Pharmacia, Švédsko). Po 16 hodinách kultivace při optické hustotě 58 % se syntéza proteinu indukuje přídatkem 0,5 mM isopropyl-b-D-galaktosidu a teplota se zvýší na 37 °C. Po 4 hodinách od začátku indukovaní činí koncentrace Apo AI-M 2,3 g/l a po dalších 2 hodinách odpovídá koncentrace 2,5 g/l.

30

35

40

Kultivace BC50/pKP 764 v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů

Kultivace se provádí jak je popsáno výše s tím rozdílem, že se do prostředí v bioreaktoru nepřidá kanamycin. Po 15 hodinách, při optické hustotě 60, se vnese isopropyl-b-D-galaktosid a dojde ke zvýšení teploty. O 10 hodin později činí koncentrace Apo AI-M v supernatantu 3,7 g/l a za 22 hodiny po vyvolání indukce činí koncentrace 4,4 g/l.

45

50

Kultivace BC50/pKP764 v bioreaktoru o objemu 300 litrů

Použije se bioreaktoru o objemu 300 litrů (Chemoferm AB, Švédsko) s pracovním objemem 180 litrů. Inokulum se připraví jak je popsáno výše pro růst RV308/pKP683 v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů s tím rozdílem, že doba prekultivace v třepané baňce činí 14 hodin. Inokulum

55

se přenese do 50-litrového násadového bioreaktoru s pracovním objemem 18 litrů. Použitým prostředím v třepané baňce, stejně jako v bioreaktoru je prostředí A. Prostedí pro násadový bioreaktor se doplní 5 g/l glukózy a udržuje při teplotě 30 °C. Hodnota pH se udržuje a provzdušňování se provádí jak je popsáno výše pro růst RV308/pKP683 v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů, přičemž tenze rozpouštěného kyslíku není nikdy nižší než 30 %. Když se kultura obohatí na optickou hustotu 4, obsah násadového bioreaktoru se přenese do bioreaktoru o objemu 300 litrů. V tomto bioreaktoru je teplota, hodnota pH a provzdušňování prostředí stejné, jako je popsáno výše pro růst RV308/pKP683 v bioreaktoru o objemu 3,5 litrů. Před indukcí se tenze rozpouštěného kyslíku udržuje na hodnotě 30 % nebo výše zvyšováním rychlosti rychloběžného míchadla až na jeho maximum a poté se zvýší tlak vzduchu. Po inkubaci se tlaku vzduchu zvedne na 200 kPa, čímž se dosáhne tenze rozpouštěného kyslíku 15 až 20 %. Po 16 hodinách kultivace v bioreaktoru, pokud kultura má optickou hustotu 51, se přidá isopropyl- $\beta$ -D-galaktosid a teplota se zvýší na 37 °C.

15 Koncentrace Apo AI-M jako monomeru a dimeru činí 1,3 g/l za 5 hodin po inkubaci a během následující hodiny, kdy se bioreaktor chladí, koncentrace Apo AI-M vzroste na 1,5 g/l.

Veškerý monomer se převede na dimer a ten se čistí podle obvyklých způsobů.

20

#### Příklad 5

#### Charakterizace Apo AI-M/Apo AI-M z plazmy

25 Vyčištěný Apo AI-M/Apo AI-M z příkladu 1 poskytne jediný pás v přeplněných neredukovaných gelech při SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze. Při analytické SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze činí podle očekávání zdánlivá relativní molekulová hmotnost proteinu 56 kD. Apo AI-M/Apo AI-M ukazuje komplexní charakteristický rys isoformy, který je charakterizován přítomností alespoň 6 rozdílných proteinových pásů v rozmezí isoelektrického bodu od 5,3 do 5,6 (pI) v neredukovaných denaturovaných IEF gelech.

30 1,1 mg/ml Apo AI-M/Apo AI-M v ultrafialovém spektru projevuje typické maximum absorbance při vlnové délce 280 nm, s posunem při 290,2 nm (obr. 7). vypočtená E hodnota proteinu (1 cm, 1 %) při vlnové délce 280 nm činí 16,9. K vyhodnocení expozice tyrosinových zbytků v Apo AI-M/Apo AI-M se provede sekundární derivační analýza ultrafialového spektra, jak popsal R. Ragone a kol. v Determination of Tyrosine Exposure in Proteins by Second-derivative Spectroscopy, Biochemistry 23, 1 872-1 875 /1984/. Sekundární derivace ultrafialového spektra obvykle projevují 2 maximální hodnoty soustředěné okolo 283 a 290,5 nm a 2 maximální hodnoty soustředěné okolo 287 a 295 nm (obr. 8 až 10). Relativní stupeň expozice ( ) tyrosinu, vypočtený pro přírodní Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC (dimyristoylfosfatidylcholin), činí 0,75 a 0,49 (tabulka 2).

40

Tabulka 2

## Charakteristiky Apo AI-M/Apo AI-M proteinu

5

	Apo AI-M/Apo AI-M	Apo AI-M/Apo AI-M + DMPC
Molekulová hmotnost (kD)	56,0	
Isoelektrický bod	5,3 – 5,6 <sup>1</sup>	
UV spektroskopie:		
E (1 cm, 1 %)	16,9 <sup>2</sup>	
Expozice tyrosinu ( )	0,75 <sup>2</sup>	0,49 <sup>2</sup>
Fluorescenční spektroskopie:		
Exc vlnová délka (nm)	280	280
Em vlnová délka max (nm)	344	338
CD spektroskopie:		
-šroubovice %	52,2 <sup>3</sup> 57,8 <sup>4</sup>	66,1 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> alespoň 6 isoformem v denaturovaných IEF gelech

<sup>2</sup> vysoká hodnota ukazuje zvýšenou expozici tyrosinu

<sup>3</sup> koncentrace proteinu 0,1 mg/ml

10 <sup>4</sup> koncentrace proteinu 1,1 mg/ml

Zaznamenává se jak excitace, tak emise fluorescenčního spektra ApoAI-M/Apo AI-M v koncentraci 0,1 mg/ml. Maximum vlnové délky při excitaci tryptofanylových zbytků v Apo AI-M/Apo AI-M je při 280 nm a nemění se dalším uvedením do styku s dimyristoyl-fosfatidylcholinem. Emisní spektrum (excitace při 280 nm) ukazuje maximum při vlnové délce 344 nm (obr. 11). Uvedení do styku s dimyristoyl-fosfatidylcholinem vyvolává posun směrem k modři od tohoto maxima (338 nm), spojený s 24 % vzrůstem intenzity fluorescence při maximu (obr. 11).

20 Spektrum Apo AI-M/Apo AI-M daleké ultrafialové oblasti cirkulárního dichroismu je charakterizováno typickými minimy při 208 a 222 nm a maximem okolo 195 nm (obr. 12). Obsah -šroubovice se signifikantně zvyšuje se vzrůstem koncentrace proteinu od 0,1 do 1,1 mg/ml (obr. 12, tabulka 2). Uvedení Apo AI-M/Apo AI-M v koncentraci 0,1 mg/ml do styku s dimyristoyl-fosfatidylcholinem vyvolává další vzestup v -šroubovicové struktuře proteinu (obr. 12, tabulka 2).

25

## Způsoby charakterizace produktu

## Inkubace s fosfolipidy

30

Odvážené hmotnostní množství dimyristoyl-fosfatidylcholinu (DMPC) se rozpustí v ethanolu a roztok se odpařuje pod dusíkem. Případně zbývající rozpouštědlo se odstraňuje za sníženého tlaku po dobu 2 hodin. Disperze dimyristoyl-fosfatidylcholinu ve 20 mM fosfátového pufru o hodnotě pH 7,4 se smíchá s Apo AI-M/Apo AI-M (0,1 mg/konečný ml) při molárním poměru dimyristoyl-fosfatidylcholinu a Apo AI-M/Apo AI-M odpovídajícím 100 : 1.

35

## Spektroskopie

40 Roztoky Apo AI-M/Apo AI-M se dialyzují proti 20mM fosfátového pufru o hodnotě pH 7,4 a zředí stejným puftrem na požadovanou koncentraci proteinu.

Normální a sekundární derivace ultrafialového spektra roztoků Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI-M/Apo AI-M s dimyristoylfosfatidylcholinem se zaznamenává na spektrometrech Jasco Uvidec-610 a Perkin Elmer Lambda-2 za teploty 25 °C při použití 1-cm křemíkových kyvet. Topografické umístění tyrosinových zbytků se stanoví podle rovnice, kterou popsal Ragone a kol. (R. Ragone, G. Colonna, C. Balestrieri, L. Servillo a G. Irace, Determination of Tyrosine Exposure in Proteins by Second-derivative Spectroscopy, *Biochemistry* 23, 1 871-1 875 /1984/)

$$= (r_n - r_a) / (r_u - r_a)$$

10

ve které

znamená stupeň expozice tyrosinu k rozpouštědлу,

15  $r_n$  a  $r_u$  jsou poměry derivací píků (a/b) pro přírodní a rozvinutý (v 6 M hydrochloridu guanidinu) Apo AI-M/Apo AI-M a

$r_a$  znamená poměr druhé derivace píků roztoku obsahujícího volný tyrosin a tryptofan, které jsou smíseny ve stejném molárním poměru jako v případě Apo AI-M/Apo AI-M.

20

Vnitřní fluorescenční spektrum roztoků Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI-M/Apo AI-M s dimyristoylfosfatidylcholinem se registruje na spektrofluormetru Jasco FP-550 za teploty 25 °C. Cirkulární dichroismus (CD spektra) roztoků Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI-M/Apo AI-M s dimyristoylfosfatidylcholinem se zaznamenávají spektropolyrimetrem Jasco J500A za teploty 25 °C. Střední hodnoty eliptičnosti zbytku (THEYA) se vyjadřují ve stupních  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$  a vypočtou se z rovnice

25

$$(\text{THEYA}) = \frac{(\text{THEYA}) \times 106}{10 \times l \times c}$$

ve které

30

(THEYA) znamená pozorovanou eliptičnost, vyjádřenou ve stupních,  
106 znamená střední molekulovou hmotnost zbytku proteinu,  
l znamená délku dráhy, vyjádřenou v cm a  
c znamená koncentraci proteinů, vyjádřenou v G/ml.

35

Procento  $\alpha$ -šroubovice se vypočítá za použití rovnice

$$\% \alpha\text{-šroubovice} = \frac{(\text{THEYA})_{208 \text{ nm}} - 4 000}{33 000 - 4 000}$$

40

(N. Greenfield a G. D. Fasman, Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation, *Biochemistry* 8, 4 108-4 116 /1969/).

## Elektroforéza

Analytická isoelektrická fokusace a SDS–polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS–PAGE) se provádějí jak již bylo dříve popsáno (G. Franceschini, M. Sirtori, G. Gianfranceschi a C. R. Sirtori, Relation between the HDL Apoproteins and AI Isoproteins in Subjects with the AI–M Abnormality, *Metabolism* 30, 502–509 /1981/).

Isoelektrická fokusace se provádí v 10 % akrylamidových gelech, které obsahují 6 M močoviny a 4 % amfolinu (o hodnotě pH 4 až 6). Po celonoční fokusaci se gely fixují a obarví barvivem Coomassie Brilliant Blue R–250 ve směsi kyseliny octové a isopropylalkoholu. Isoelektrický bod (pI) libovolných neznámých pásů proteinu se vypočte vynesáním isoelektrického bodu známých proteinů (standardsy od firmy Bio–Rad a apo–HDL) proti příslušné migrační vzdálenosti.

Pro SDS–polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS–PAGE) se použije 14 % akrylamidových gelů, které obsahují 0,1 % SDS. Gely se zpracují jak je popsáno výše a molekulová hmotnost neznámých proteinů se vypočte vynesáním logaritmu molekulové hmotnosti standardních proteinů (KABI–Pharmacia) proti vzdálenosti migrace.

## Vysokoučinná vylučovací chromatografie

Analytická oddělování vysokoučinnou vylučovací chromatografií (HPSEC) se provádějí za použití kapalinového chromatografu Jasco, který je opatřen sloupcem 10  $\mu$ m TSK–G3000 SW o průměru 7,5 mm a délce 300 mm. Sloupec se při vysokoučinné vylučovací chromatografii ekvalibruje a eluuje 0,1 M fosfátovým pufrem a 0,1 M chloridem sodným o hodnotě pH 7,2, s obsahem 8 M močoviny. Proteiny se elují při rychlosti průtoku 0,5 ml/min a odčítání se provádí při vlnové délce 220 nm. Oblasti píků se integrují za použití integračního přístroje HP–3390.

## Příklad 6

Výroba částic rekonstituovaných lipoproteinů o vysoké hustotě, obsahujících Apo AI, AI–M nebo Apo AI–M/Apo AI–M

Částice rekonstituovaných lipoproteinů o vysoké hustotě (rHDL) se vyrábějí za použití technického postupu, který uvedl A. V. Nichols a kol. V *Biochim. Biophys. Acta* 750, 353–364 /1983/ a C. E. Matz a kol. v *J. Biol. Chem.* 257, 4 535–4 541 /1982/.

Rekombinantní Apo AI–M dimer (z příkladu 4) a normální Apo AI, vyčištěný z lidské plazmy, se rozpustí v 10 mM Tris–HCl, 0,15 M chloridu sodného, 0,01 % kyselině ethylendiamintetraoctové a 0,006 % azidu sodného, o hodnotě pH 8 (pufř A), s obsahem 4 M hydrochloridu guanidinu při koncentraci 6 mg/ml. Pro srovnání se disulfidová vazba v některých Apo AI–M/Apo AI–M redukuje přídávkem 20 mM DTT k pufř A a hydrochloridu guanidinu. Proteiny se dialyzují proti pufř A a ředí na obsah 5,2 mg/ml stejným pufřem.

Fosfolipidy, buď vaječný fosfatidylcholin (EPC), nebo palmitoylolelylfosfatidylcholin (POPC), se rozpustí v chloroformu, vysuší pod dusíkovou atmosférou a udržuje za sníženého tlaku přes noc. Poté se přidá cholát sodný v hmotnostním poměru cholátu a PC odpovídajícím 0,55, směs se intenzivně míchá po dobu 3 minut za teploty místnosti a potom inkubuje za teploty 4 °C po dobu 2 hodin. Potom se přidá protein v hmotnostním poměru PC k proteinu 2,17 (fosfatidylcholin) nebo 2,47 (palmitoylolelylfosfatidylcholin) a směs se míchá po dobu 3 minut za teploty místnosti a inkubuje za teploty 4 °C přes noc. Po dialýze proti pufř A po dobu 5 dnů se směs odstředuje při frekvenci otáček 11 000 za minutu po dobu 5 minut na odstředivce Beckman Microfuge a supernatant se zachytí.

55

Rekonstituovaný lipoprotein o vysoké hustotě se oddělí nenedaturující polyakrylamínovou gradientovou gelovou elektroforézou (CGE) a velikost částic se stanoví jak již dříve popsal A. V. Nichols a kol. v Meth. Enzymol., 128, 417–431 /1986/.

- 5 Všechny testované apolipoproteiny jsou po popsáných postupech takřka naprosto vždy spojeny s lipidy, jak je doloženo velmi malými piky apolipoproteinu zbaveného lipidu na gelech při nenedaturující polyakrylamínové gradientové gelové elektroforéze. Výtěžek proteinu v rekonstituovaných lipoproteinech o vysoké hustotě se kolísá od 68 do 100 % při 10 různých přípravách.
- 10 Tvary z nenedaturující polyakrylamonové gradientové gelové elektroforézy částic rekonstituovaného lipoproteinu o vysoké hustotě jsou uvedeny na obr. 13. Lipoprotein o vysoké hustotě rekonstituovaný s Apo AI a vaječným fosfatidylcholinem poskytuje hlavní pik při nenedaturující polyakrylamínové gradientové gelové elektroforéze s průměrem 9,6 nm, přičemž minoritní složky jak v oblasti větších, tak menších částic se dají také stanovit. Rekonstituovaný lipoprotein
- 15 o vysoké hustotě obsahující vaječný fosfatidylcholin a Apo AI–M/Apo AI–M sestává ze dvou hlavních složek (o průměru 8,6 a 12,9 nm) a dvou minoritních složek (o průměru 7,9 a 10,8 nm). Stejná velikost částic se dosáhne, pokud Apo AI–M/Apo AI–M se rekonstruuje s plamitoylolelyl-fosfatidylcholinem.
- 20 Všechny tři apolipoproteiny jsou takřka úplně vpraveny do stabilních komplexů lipidů a proteinu, s rozdílnými velikostmi částic rekonstituovaného lipoproteinu o vysoké hustotě, jejich distribucí a složením. Zvláště rekonstituovaný lipoprotein o vysoké hustotě připravený s rekombinantním Apo AI–M/Apo AI–M sestává ze dvou hlavních složek, přičemž větší je jedinečnou látkou ze skupiny rekonstituovaných lipoproteinů o vysoké hustotě, které obsahují Apo AI.

25 Biologické ohodnocení Apo AI–M/Apo AI–M

#### Příklad 7

30 Kinetické chování dimeru Apo AI–M ve srovnání s monomerním Apo AI u normálních příjemců

Dimery vykazují prodlouženou dobu setrvání v krevním oběhu, jak se ukazuje při dále popsáných kinetických studiích na lidech.

35 Zdraví dobrovolníci obdrželi intravenózně Apo AI–M nebo Apo AI–M/Apo AI–M, které jsou značeny <sup>125</sup>I. V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty  $\beta_{t_{1/2}}$  v plazmě (v hodinách), vypočtené podle dvou rozdílných modelů, stejně jako frakcionovaná katabolická rychlost (FCR). Obě tyto hodnoty potvrzují zřetelně snížený katabolismus dimeru ve srovnání s monomerním.

40 Velmi pomalý katabolismus Apo AI–M/Apo AI–M ukazuje, že tyto molekuly mohou poškodit konverzi lipoproteinu a mohou působit jako účinný prekurzor pro Apo AI–M. V tomto případě se při injekci Apo AI–M/Apo AI–M dá předpokládat, že dimer může zůstat v plazmě pro prodloužené časové období, což je přímo ve vzájemném vztahu s metabolismem lipoproteinu

45 a fibrinolytickým systémem.

Tabulka 3

5 Kinetické chování Apo AI-M/Apo AI-M ve srovnání s monomerem Apo AI u normálních příjemců (n = 2)

		Apo AI-M	Apo AI-M/Apo AI-M
Monoexponenciální způsob	$\beta t_{1/2}$ (h)	16,07	52,04
	MRT (h)	23,19	75,09
Biexponenciální způsob	$\beta t_{1/2}$ (h)	22,61	70,29
	MTR (h)	28,97	89,16
	FCR (h)	2,3 % za hodinu	1,1 % za hodinu

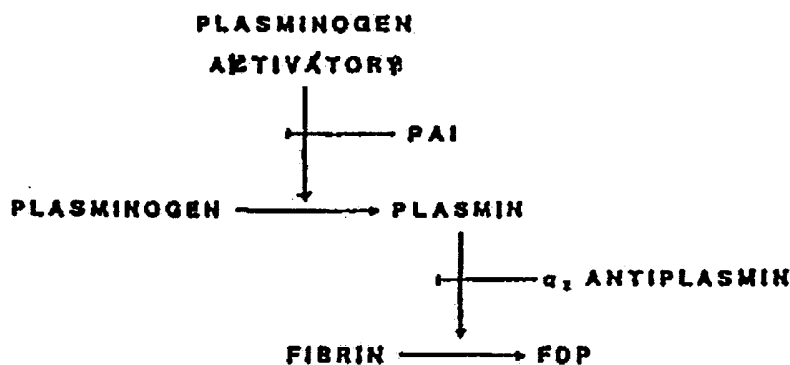
### Účinek Apo AI-M/Apo AI-M na fibrinolytický systém

10 Úvod

Fibrinolytický systém představuje hlavní obranu proti ukládání fibrinů na stěnách cév a jako takový hraje důležitou úlohu mezi mechanismy, kterými se brání trombóze.

15 Enzym odpovědný za lýzu fibrinu je plazmid. Plazmid se tvoří z inaktivovaného prekurzorového plazminogenu účinkem specifických aktivátorů (tkáňového aktivátoru plazminogenu, t-PA a urokinázy, uPA). (Zde i v následující části popisu jde o urokinázu se dvěma řetězci, pokud není uvedeno jinak). Jak aktivační proces, tak účinek plazminu se regulují specifickými inhibitory, inhibitory 1 aktivátoru plazminogenu (PAI) a  $\alpha_2$ -antiplazminem. Schéma fibrinolytického systému je toto:

20



FDP = produkt degradace fibrinu

25 Pomocí zkoušek uvedených v příkladech 7 až 9 bylo nalezeno, jak Apo AI-M dimer působí na lidský fibrinolytický systém. Jak autoaktivace plazminogenu, tak aktivace plazminogenu působením urokinázy a tkáňového aktivátoru plazminogenu se studují v přítomnosti nebo nepřítomnosti Apo AI-M/Apo AI-M. Apo AI člověka izolovaný z plazmy se použije ke kontrolnímu stanovení (produkt firmy Sigma, č. A 9284).

30

Aktivace fibrinolytického systému se měří pomocí chromogenních substrátů. Tyto substráty obsahují chromoforovou skupinu p-nitroanilinu, která může odštěpit ze substrátové molekuly působením plazminu. Volný p-nitroanilin má intenzivně žlutou barvu, která se může snadno sledovat při vlnové úměrné množství vytvořené enzymatické aktivity.

35

Veškeré výsledky měření se dosahují za použití záznamových mikrodeseček THERMOmax řízených programem SOFTmax<sup>TM</sup> verze 2,01, získaných z Molecular Devices, Medlo Park, Kalifornie, USA.

- 5 Použité šarže při těchto studiích se vyrábějí rekombinantně podle příkladu 4. Čištění zahrnuje použití iontoměniče, hydrofobní vzájemné reakce a gelové filtrační chromatografie s následující ultrafiltrací a lyofilizací, což ve všech případech jsou běžné biochemické způsoby. Všechny zkoušené šarže obsahují 90 nebo více % dimerní formy, jak je stanoveno vysokoučinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. Koncentrace se stanovuje za použití zkoušky Kabi  
10 Pharmacia apolipoprotein AI RIA 100.

Vyhodnotí se tři přípravky, A, B, a C.

#### 15 Příklad 8

Autoaktivace plazminogenu v přítomnosti Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI

- 20 Glu-plazminogen (o konečné koncentraci 94 µg/ml) se inkubuje po dobu 3 hodin za teploty 37 °C v 0,1 mol/l Tris pufru o hodnotě pH 7,6. Vznik plazminu se sleduje pomocí chromogenního substrátu S-2251 (H-D-Val-L-Leu-Lys-pNA) získaného od firmy Chromogenix AB, Mölndal, Švédsko. tento substrát se používá v konečné koncentraci 0,6 mmol/l. Plazminogeny používané při těchto zkouškách se získaly od firmy Chromogenix AB nebo od firmy IMCO Inc., Stockholm, Švédsko.

- 25 Při této zkoušce se testují šarže Apo AI-M/Apo AI-M (o konečné koncentraci 3,9 až 75 µg/ml) a množství plazminu vzniklého v jejich přítomnosti se porovnává se množstvím plazminu vytvořeného v přítomnosti Apo AI (při konečné koncentraci 125 µg/ml) a s množstvím plazminu vzniklého v nepřítomnosti jakýchkoli přísad (kontrolní stanovení) (tabulka 4).

- 30 S překvapením bylo nalezeno, že APO AI-M/Apo AI-M může zvýšit aktivaci plazminogenu v nepřítomnosti libovolných aktivátorů plazminogenu. Apo AI pocházející z plazmy žádným způsobem neovlivňuje molekulu plazminogenu.

#### 35 Tabulka 4

Spontánní vznik plazminové aktivity v plazminogenu. Účinek Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI. Plazminová aktivita se vyjadřuje jako optická hustota (OD) při vlnové délce 405 nm.

Vzorek	Konečná koncentrace Apo, µg/ml	OD 405 nm
Kontrolní stanovení	0	0,052
+ Apo AI	125	0,049
+ Apo AI-M/Apo AI-M		
A	75	0,288
B	31,3	0,325
B	15,6	0,153
B	7,8	0,104
B	3,9	0,067

Dosažená aktivita se může přičítat Apo AI-M/Apo AI-M. Avšak na základě těchto údajů se nedá vyloučit, že Apo AI-M/Apo AI-M je kontaminován nějakým proteolytickým enzymem nebo

proteolytickými enzymy, který by mohl nebo které by mohly aktivovat plazminogen. K vyloučení této možnosti se provedly experimenty.

5 Veškeré přípravky Apo AI-M/Apo AI-M použité při fibrinolytických zkouškách se testují s chromogenním substrátem S-2251 (H-D-Val-L-Lys-pNA), který je citlivý k aktivitě podobné plazminu, a substrátem S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), který je citlivý k proteázám specifickým na Arg. Substráty se získají od firmy Chromogenix AB. Konečná koncentrace Apo AI-M/Apo AI-M při zkouškách je stejná, jako koncentrace používaná pro fibrinolytických zkouškách a mohla by se měnit mezi různými šaržemi.

10

Zkouška: 25 µg/ml Apo AI-M/Apo AI-M, konečná koncentrace 60 až 70 µg/ml,  
150 µl 0,1 mol/l Tris pufru o hodnotě pH 7,8,  
50 µl 0,6 mmol/l S-2251 nebo  
50 µl 1,0 mmol/l S-2288.

15

Vzorek obsahující pouze pufr a substrát se použije jako kontrolní k nespecifické hydrolyze substrátu. Všechny vzorky se zkoušejí dvojmo.

20

Mikrotitrační deska se inkubuje za teploty 37 °C a absorbance se odečítá v hodinových intervalech.

#### Tabulka 5

25

Amidolytická aktivita dvou šarží Apo AI-M/Apo AI-M (A a B) po inkubaci za teploty 37 °C během 4 hodin (optická hustota stanovena při vlnové délce 405 nm).

	Apo AI-M/Apo AI-M	Substrát
S-2251 A	0,023	0,022
B	0,022	
S-2288 A	0,037	0,034
B	0,037	

30

Při jiné řadě experimentů se na Apo AI-M/Apo AI-M působí ireverzibilním inhibitorem serinproteázy, diisopropylfluorofosfátem (DFP, produkt firmy Sigma, č. D 0789). Konečná koncentrace Apo AI-M/Apo AI-M v 0,2 mol/l hydrogenuhličitanu draselném o hodnotě pH 7,6, jako v pufru je přibližně 75 µg/ml. Diisopropylfluorofosfát v konečné koncentraci 123 mmol/l se přidá k tomuto roztoku a po 4 hodinách se inkubovaný vzorek dialýzuje přes noc proti dvěma šaržím uhličitanového pufru.

35

Stanovení aktivity, za použití stejných podmínek jako jsou popsány výše, se provádí na Apo AI-M/Apo AI-M zpracovaném s diisopropylfluorofosfátem a na nezpracovaném Apo AI-M/Apo AI-M. Po tříhodinové inkubaci s plazmogenem a S-2251 optická hustota při vlnové délce 405 nm činí 0,209 pro vzorky obsahující Apo AI-M/Apo AI-M zpracovaný s diisopropylfluorofosfátem, 0,234 pro vzorky obsahující nezpracovaný Apo AI-M/Apo AI-M a 0,030 pro vzorky, které obsahují toliko plazminogen.

40

Z toho se může usuzovat, že pozorovaný účinek aktivující plazmogen je přímo spojen s přítomností Apo AI-M/Apo AI-M a není důsledkem nějaké případné proteolytické kontaminace.

45

## Příklad 9

Účinek Apo AI-M/Apo AI-M na aktivaci plazminogenu s plazminogenovými aktivátory, tkáňovým aktivátorem plazminogenu a urokinázou.

5

Urokináza (uPA) a tkáňový plazminogenový aktivátor (t-PA) konvergují plazminogen na plazmin proteolytickým štěpením jediné peptidové vazby Arg 560-Val 561 v molekule plazminogenu. zatímco dva řetězce urokinázy mohou aktivovat plazminogen přímo, tkáňový aktivátor plazminogenu vyžaduje přítomnost fibrinu pro svou optimální aktivaci plazminogenu. 10  
Přítomnost katalytických množství fibrinu, který dohromady s tkáňovým aktivátorem plazminogenu a plazminogenem tvoří ternární komplex, bude zvyšovat enzymatickou účinnost tkáňového aktivátoru plazminogenu přibližně 600krát.

15 Aktivace plazminogenu tkáňovým aktivátorem plazminogenu se studuje za použití komerčně dostupné soupravy Spectrolyse<sup>R</sup> (fibrin) t-PA/PAI od firmy Biopool AB, Ume, Švédsko.

Při této zkoušce se plazminogen inkubuje tkáňovým aktivátorem plazminogenu v přítomnosti chromogenního substrátu D-But-CHT-Lys-pNA a desAA fibrinogenu (monomerního fibrinu), který působí jako stimulátor aktivace. Vzniklý plazmin štěpí substrát a uvolňuje volný p-nitroanilin. 20

Apo AI-M/Apo AI-M se přidá do tohoto systému a porovná s přípravkem Apo AI od firmy Sigma. Účinek obou apolipoproteinů se testuje v systému jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti fibrinu. 25

Příklad zkušebního systému:

25 µl pufru Spectrolyse,  
30 25 µl Apo přípravku nebo pufru,  
20 µl tkáňového aktivátoru plazminogenu (konečná koncentrace 1,7 mez. jednotek/ml),  
150 µl reakčního činidla Spectrolyse PAR (směs plazminogenu a substrátu) a  
10 µl Desa fib (monomerního fibrinu) nebo  
10 µl pufru. 35

Vzorky se inkubují na mikrotitrační desce za teploty 37 °C po dobu 3 hodin.

## Tabulka 6

40

Účinek Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI na plazminogenovou aktivaci tkáňovým aktivátorem plazminogenu v přítomnosti nebo v nepřítomnosti fibrinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako optická hodnota (OD) po 3 hodinách inkubace při teplotě 37 °C při vlnové délce 405 nm.

Vzorek	Konečná konc. Apo, µg/ml	OD 405 nm + fibrin	OD 405 nm - fibrin
t-PA, kontrolní stanovení	0	0,656	0,048
+ Apo AI	54	1,050	0,066
+ Apo AI-M/Apo AI-M			
A	65	1,665	0,446
B	54	2,366	0,225

45

Signifikantní stimulace aktivity plazminogenu se pozoruje s Apo AI-M/Apo AI-M, jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti fibrinu. Apo AI stimuluje aktivaci v menším stupni v přítomnosti fibrinu. V nepřítomnosti fibrinu je stimulace Apo AI-M/Apo AI-M velmi zřetelná, v porovnání k velmi malé stimulaci způsobené Apo AI.

5

Apo AI-M/Apo AI-M má také významně potenciální účinek, pokud se plazmogen aktivuje působením urokinázy. Urokinázu použitou při těchto zkouškách představuje přípravek o vysoké molekulové hmotnosti, získaný od firmy Calbiochem.

10 Uronikáza (o konečné koncentraci 2,5 mez. jednotek/ml) se smíchá s plazminogenem (o konečné koncentraci 94 µg/ml) s chromogenním substrátem S-2251 (o konečné koncentraci 0,6 mmol/l). K tomuto vzorku se přidá Apo AI-M/Apo AI-M v konečné koncentraci 75 nebo 62 µg/ml. Reakce se provádí v 0,1 mol/l Tris pufru o hodnotě pH 7,6.

15 Podobně jako s urokinázou se pozoruje s tkáňovým aktivátorem plazminogenu silná stimulace tvorby plazminu, pokud se Apo AI-M/Apo AI-M přidá ke zkušebnímu vzorku (tabulka 7).

#### Tabulka 7

20

Účinek Apo AI-M/Apo AI-M na aktivaci plazminogenu působením urokinázy. Výsledky jsou vyjádřeny jako optická hustota (OD) po inkubaci za teploty 37 °C v trvání 4 hodin při vlnové délce 405 nm.

Vzorek	Konečná koncentrace Apo AI-M/Apo AI-M, µg/ml	OD 405 nm
uPA, kontrolní stanovení	0	0,325
+ Apo AI-M/Apo AI-M		1,263
A	75	1,868
B	62	

25

Tento potenciační účinek na fibrinolýzu také přetrvává, pokud se Apo AI-M/Apo AI-M zpracuje na farmaceutický prostředek dohromady s nosnou látkou. Jako případná nosná látka se používají liposomy, které obsahují fosfatidylcholin, PC (12 mg/ml). Koncentrace Apo AI-M/Apo AI-M (šarže C) v liposomech činí 3,6 mg/ml.

30

Aktivace plazminogenu (o konečné koncentraci 94 µg/ml) urokinázou (o konečné koncentraci 2,5 mez. jednotek/ml) se testuje v přítomnosti Apo AI-M/Apo AI-M uloženého s liposomy a porovnává s aktivací dosahovanou v přítomnosti liposomů zbavených proteinu. Vzorky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 4 hodin s S-2251 a vznik plazminu se sleduje kontinuálně.

35

#### Tabulka 8

40 Aktivace plazminogenu působení urokinázy. Účinek Apo AI-M/Apo AI-M, šarže C, na liposomy. Výsledky jsou vyjádřeny jako optická hustota (OD) při vlnové délce 405 nm.

Vzorek	OD 405 nm
uPA + plazminogen	0,221
+ liposomy zbavené proteinu, 250 µg/ml PC	0,499
+ Apo AI-M/Apo AI-M, 75 µg/ml, v liposomech, 250 µg/ml PC	1,084

Přítomnost samotných liposomů stimuluje aktivaci plazmogenu přibližně dvojnásobně. Příklad Apo AI-M/Apo AI-M k liposomům zvyšuje tento účinek čtyřnásobně, v porovnání se vzorkem obsahujícím pouze urokinázu jako aktivátor.

5

## Příklad 10

Účinek Apo AI-M/Apo AI-M na konverzi jediného řetězce urokinázy na dva řetězce urokinázy

10

Urokináza s jediným řetězcem (scuPA) je prekurzorem urokinázy se dvěma řetězci (uPA). Na rozdíl od urokinázy se dvěma řetězci má urokináza s jediným řetězcem pouze velmi nízkou amidolytickou aktivitu, vzhledem k malým syntetickým substrátům. Amidolytická aktivita činí nejvýše 0,4 % z aktivity urokinázy. Avšak urokináza s jediným řetězcem, která je přesto proenzymem, má schopnost aktivovat plazminogen na plazmin. Ve směsích plazminogenu a urokinázy s jediným řetězcem byl navržen sled 3 reakcí, které mají za následek aktivaci plazminogenu na plazmin:

15

- 1) scuPA + plazminogen  $\longrightarrow$  scuPA + plazmin
- 20 2) plazmin + scuPA  $\longrightarrow$  plazmin + uPA
- 3) uPA + plazminogen  $\longrightarrow$  uPA + plazmin

Původci tohoto vynálezu studovali sled reakcí vedoucích ke konverzi urokinázy s jediným řetězcem na urokinázu se dvěma v přítomnosti plazminogenu. Aktivita urokinázy se stanovuje pomocí chromogenního substrátu specifického pro urokinázu S-2444 (pyro-Glu-Gly-Arg-pNA, Chromogenix AB). Šarže Apo AI-M/Apo AI-M a Apo AI se předají do systému a množství vytvořené urokinázy se dvěma řetězci se porovná s aktivitou dosaženou u vzorku bez přídavku apolipoproteinu. Urokináza s jediným řetězcem použitá při těchto zkouškách je rekombinantním produktem získaným od firmy Grünenthal GmbH, Aachen, SRN (obchodní partie č. 0088808).

30

- 25  $\mu$ l Apo nebo pufru,
- 75  $\mu$ l 0,05 mol/l Tris o hodnotě pH 7,6, který obsahuje 0,1 mol/l chloridu sodného a 0,02 % Tween 80,
- 25  $\mu$ l scuPA, o konečné koncentraci 454 pmol/l,
- 35 50  $\mu$ l S-2444, o konečné koncentraci 1 mmol/l a
- 25  $\mu$ l plazmogenu, o konečné koncentraci 52,1 nmol/l.

Vzorky se inkubují za teploty 37 °C po dobu 90 minut. Vzárust optické hustoty, který je měřítkem jakosti tvorby urokinázy se dvěma řetězci, se zaznamenává kontinuálně během posledních 30 minut inkubace.

40

Tabulka 9

Účinek Apo AI-M/Apo AI-M na konverzi urokinázy s jedním řetězcem na urokinázu se dvěma řetězci. Výsledky jsou vyjádřeny jako mOD/min při vlnové délce 405 nm.

Vzorek	Konečná koncentrace Apo, µg/ml	mOD/min
scuPA	0	0,073
+ plazminogen	0	13,2
+ Apo AI	62	11,8
+ Apo AI-M/Apo AI-M		
B	62	20,0
A	75	24,0

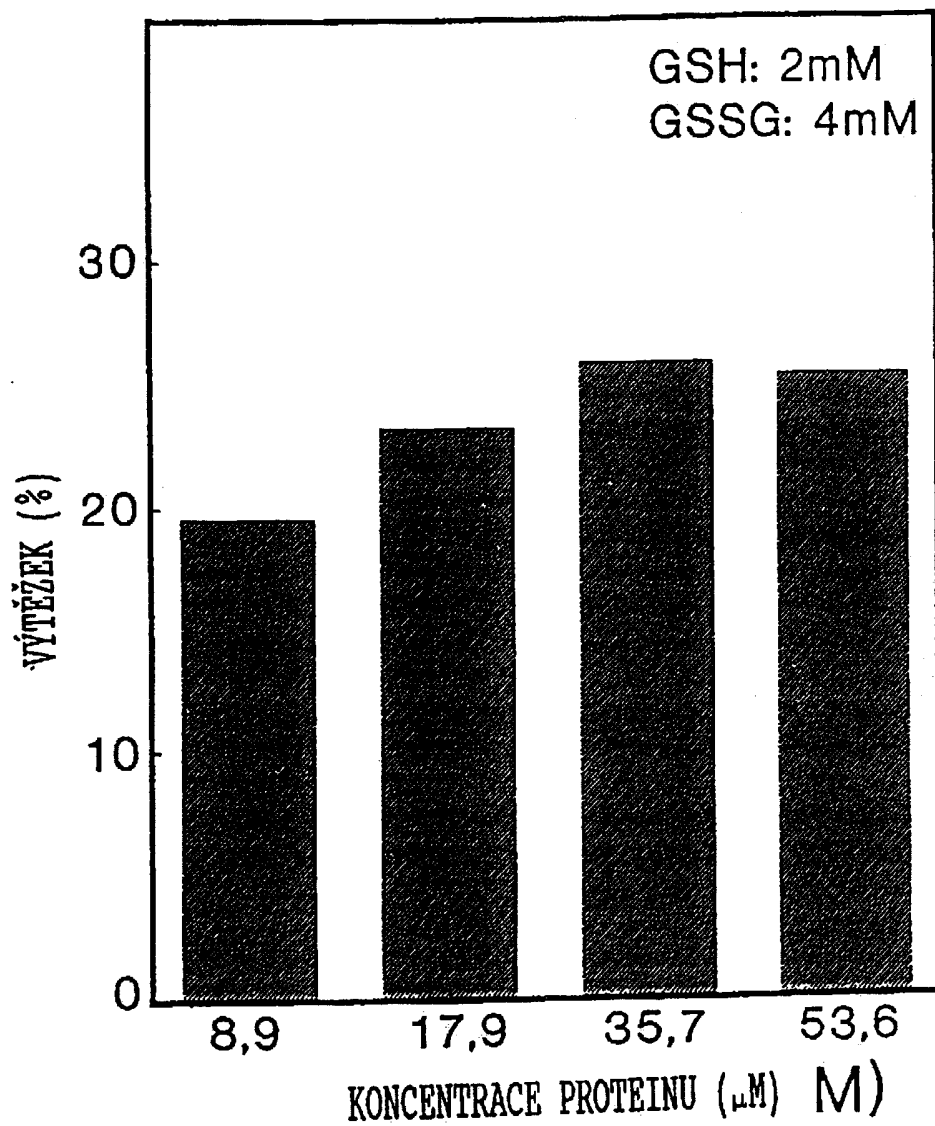
Konverze urokinázy s jedním řetězcem na urokinázu se dvěma řetězci v přítomnosti plazminogenu je podporována Apo AI-M/Apo AI-M, zatímco Apo AI izolovaný z plazmy nemá významný účinek na tento systém.

Pozorované účinky Apo AI-M/Apo AI-M na fibrinolytické zkoušky použité při těchto studiích jsou vyšší v porovnání s účinky, které jsou zřejmé u Apo AI izolovaného z plazmy. Apo AI-M/Apo AI-M má silnou schopnost stimulovat fibrinolytickou aktivitu, která předčí Apo AI. Je pravděpodobné, že tento zvýšený účinek Apo AI-M/Apo AI-M předčí Apo AI bude také zjištěn in vivo.

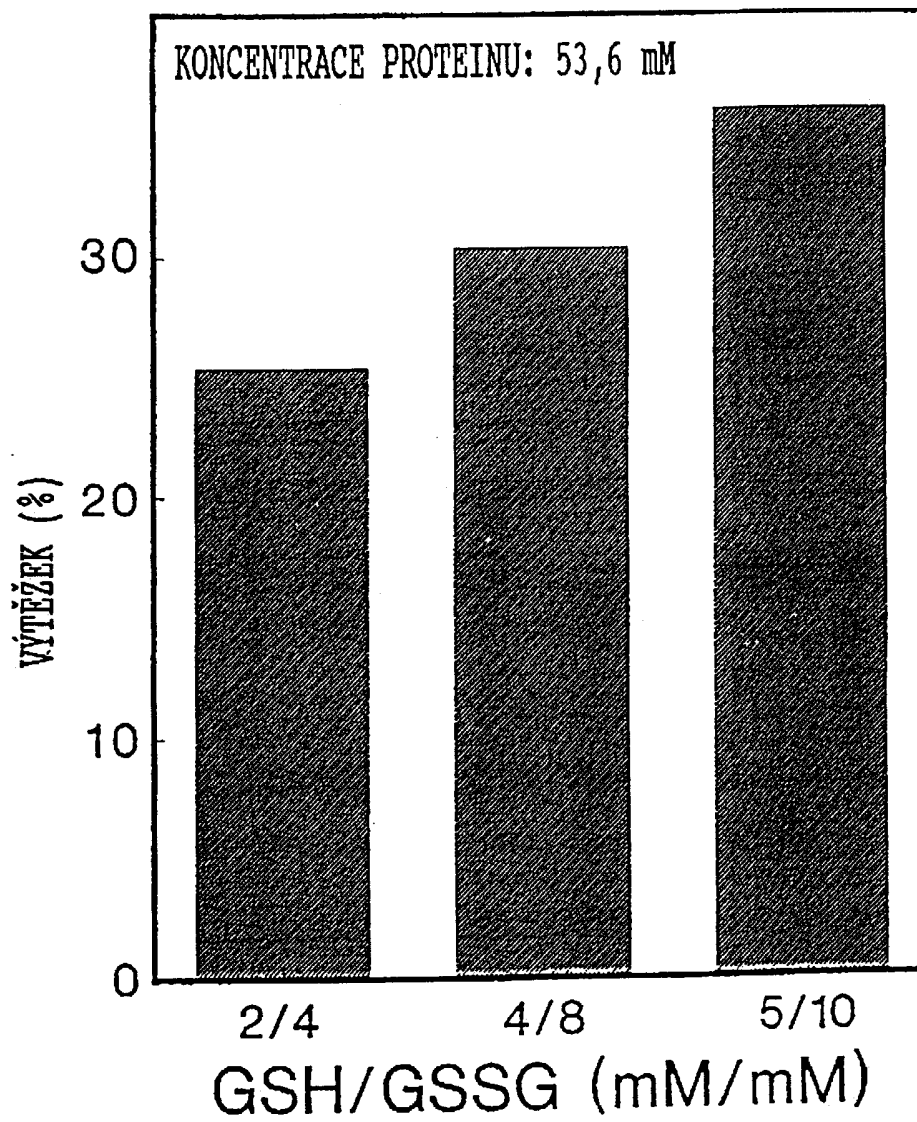
## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dimerový preparát apolipoproteinu AI-Milano s čistotou dimeru alespoň 90 %.
2. Dimer apolipoproteinu AI-Milano podle nároku 1, který má čistotu dimeru alespoň 98 %.
3. Dimer apolipoproteinu AI-Milano podle nároku 1, který pochází z plazmy.
4. Dimer apolipoproteinu AI-Milano podle nároku 1, který je vyroben rekombinantně.
5. Farmakologický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje dimer podle nároku 1 spolu s nosnou látkou.
6. Farmakologický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje dimer podle nároku 1 spolu se stabilizačním prostředkem a popřípadě s nosnou látkou.
7. Farmakologický prostředek podle nároku 5 nebo 6, vyznačující se tím, že je spolu s přípravkem snižujícím lipidy a nosnou látkou.
8. Farmakologický prostředek podle nároku 5, vyznačující se tím, že obsahuje dimer spolu se sloučeninou stabilizující lipidy, popřípadě s přípravkem snižujícím lipidy a popřípadě s nosnou látkou.

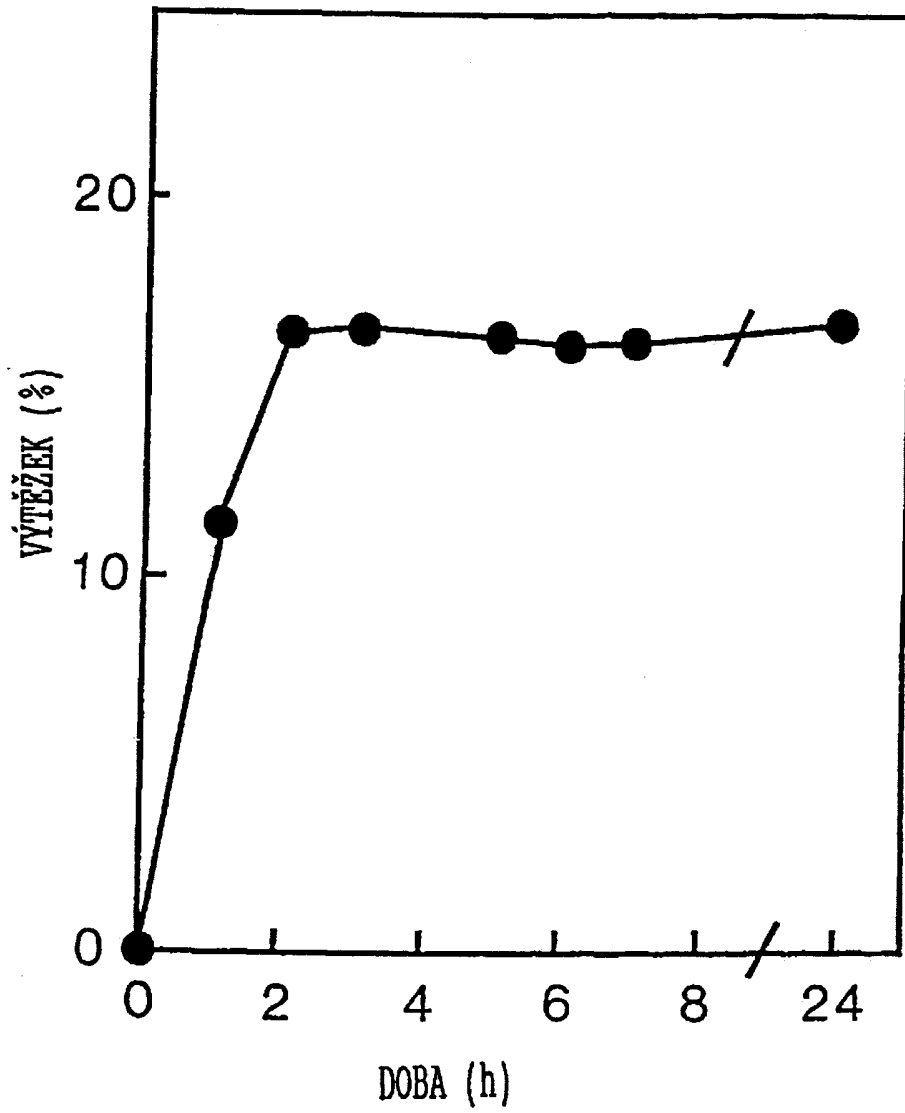
9. Farmakologický prostředek podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje fosfolipid popřípadě s přípravkem snižujícím lipidy, a popřípadě s nosnou látkou.
10. Způsob výroby dimeru podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se
- 5 a) vyrobí apolipoprotein AI-Milano rekombinantní technologií, jako vnitrobuněčný fúzní protein v *Escherichia coli*, potom převede libovolný přítomný monomer na dimer a poté se dimer čistí na čistotu dimeru alespoň 90 %, výhodně na čistotu dimeru alespoň 98 %, nebo
- 10 b) vyrobí apolipoprotein AI-Milano rekombinantní technologií, při které se apolipoprotein AI-Milano, monomer a dimer vylučují do kultivačního média pro bakterie v expresním systému v *Escherichia coli*, libovolný přítomný monomer potom převede na dimer a poté se dimer čistí na čistotu dimeru alespoň 90 %, výhodně na čistotu dimeru alespoň 98 %, nebo
- 15 c) zachytí plazma od nositelů apolipoproteinu AI-Milano, izolují HDL apolipoproteiny a oddělí dimer za použití chromatografie v několika krocích nebo
- d) zachytí plazma z apolipoproteinu AI-Milano na nosných látkách, čistí monomer a poté převede na dimer a čistí dimer na čistou formu.
- 20 11. Použití dimeru podle nároku 1 pro výrobu léčiva obsahujícího dimer, k léčbě aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob.
12. Použití dimeru podle nároku 1 pro výrobu léčiva obsahujícího dimer, který působí jako prekursor léčiva s monomerem, k léčbě aterosklerózy a kardiovaskulárních chorob.
- 25 13. Použití podle nároku 11 nebo 12 pro výrobu léčiva k prevenci a léčbě závažných kardio-cirkulárních zdravotních potíží, jako je infarkt myokardu, labilní angina, akutní periferní vaskulární okluze a restenóza po koronární angioplastice.
- 30 14. Použití podle nároku 11 nebo 12 pro výrobu léčiva k léčbě chronických arteriálních stavů.
15. Použití podle nároku 11 nebo 12 pro výrobu léčiva k prevenci a léčbě trombózy.
- 35 16. Použití podle nároku 15 pro výrobu léčiva ke stimulaci fibrinolýzy.
17. Použití podle nároku 11 nebo 12, při kterém léčivo také obsahuje přípravek snižující lipid.
- 40 18. Způsob podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protein z vnitrobuněčné fuze v odstavci a) se zpracuje kyselinou mravenčí, poté co se připravil v *Escherichia coli* a před převedením libovolného přítomného monomeru na dimer.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Spojovník- $\Delta$ ApoAI-Eco

Délka spojovník-D $\Delta$ ApoAI-Eco (cyklické): 28 bp; 8 bp;  
 Jednoduchá restrikce: od 1 do 28;

× AvaII	× BanII	
× EcoRI	× Bsp1286	
	× DsaI	
	× EcoT141	
	× NcoI	
	× NspII	
	× StyI	
GAATTCGGAC	CCACCGCAGA	GCCCATGG
AsnSerAsp	ProProGlnSerProTrp	
10	20	28

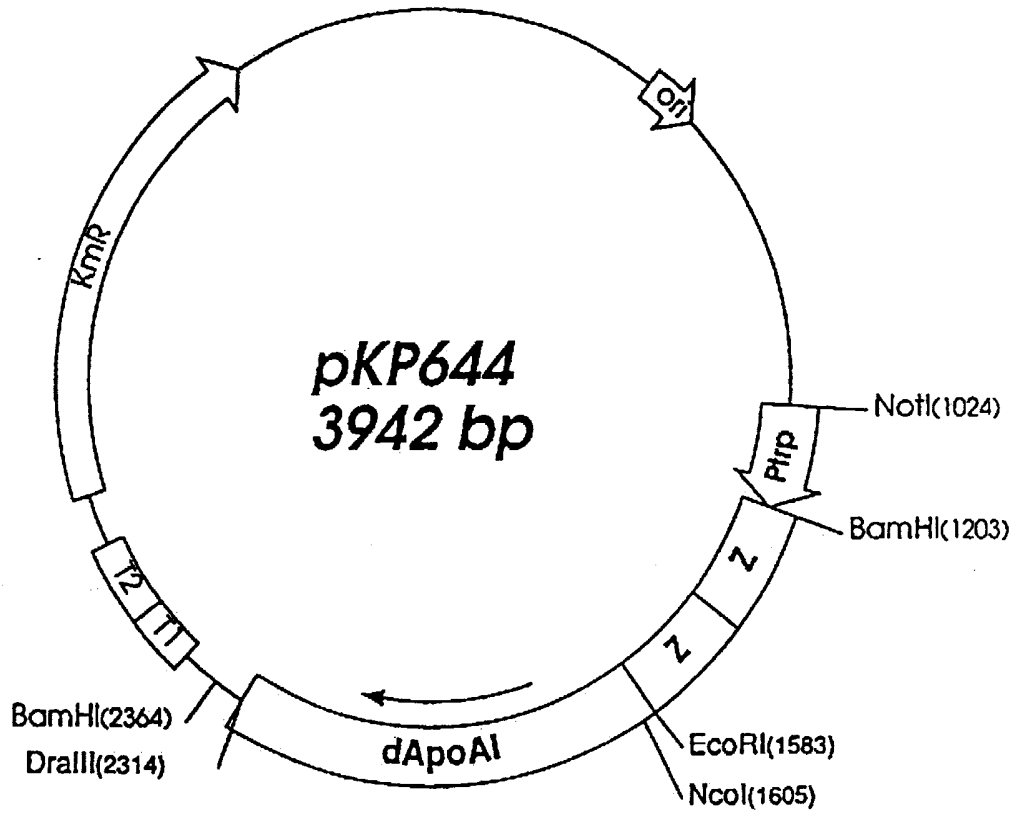
D $\Delta$ ApoAI-Eco-5 : 22 bp; +1 při: 1;

5'-AATTCGGACC CACCGCAGAG CC  
 10 20 22

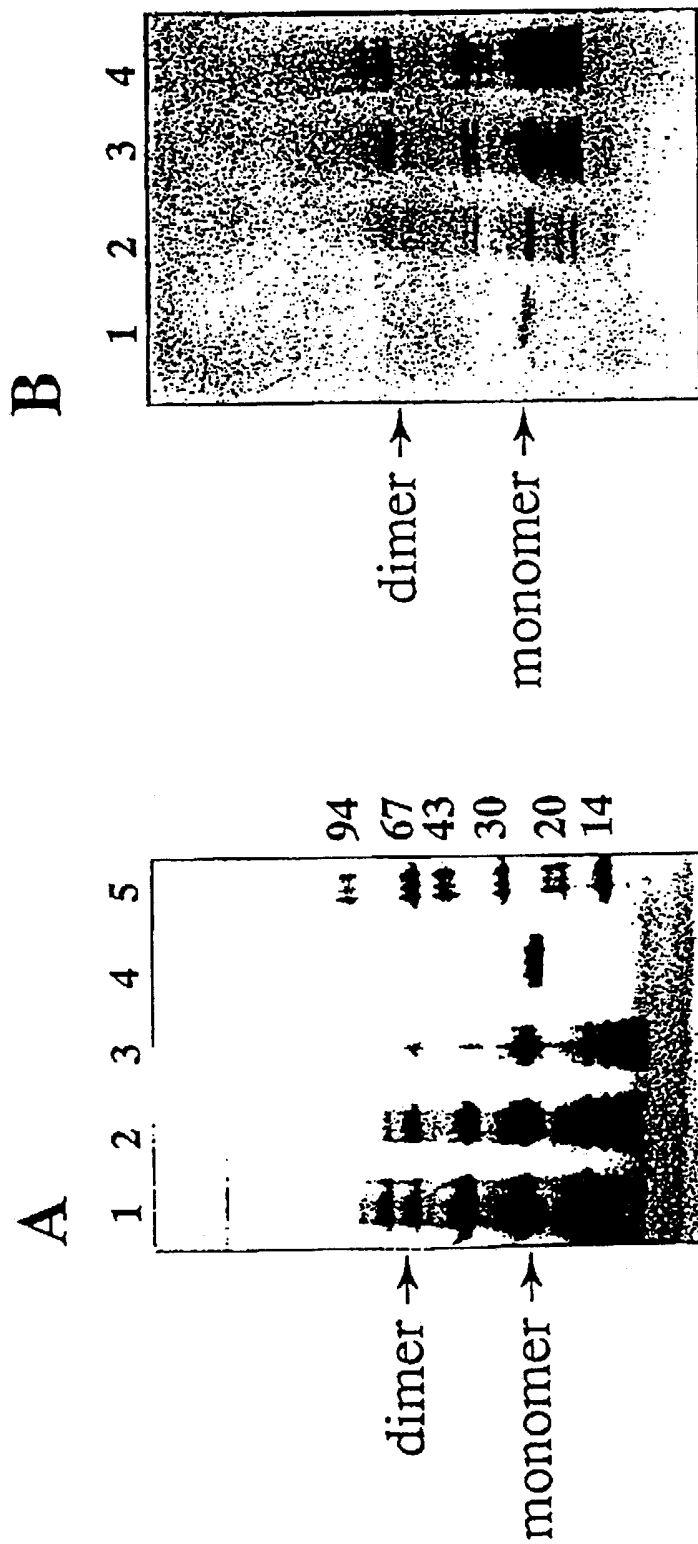
D $\Delta$ ApoAI-Eco-3 : 22 bp; +1 při: 1;

5'-CATGGGCTCT GGGTGGGTC CG  
 10 20 22

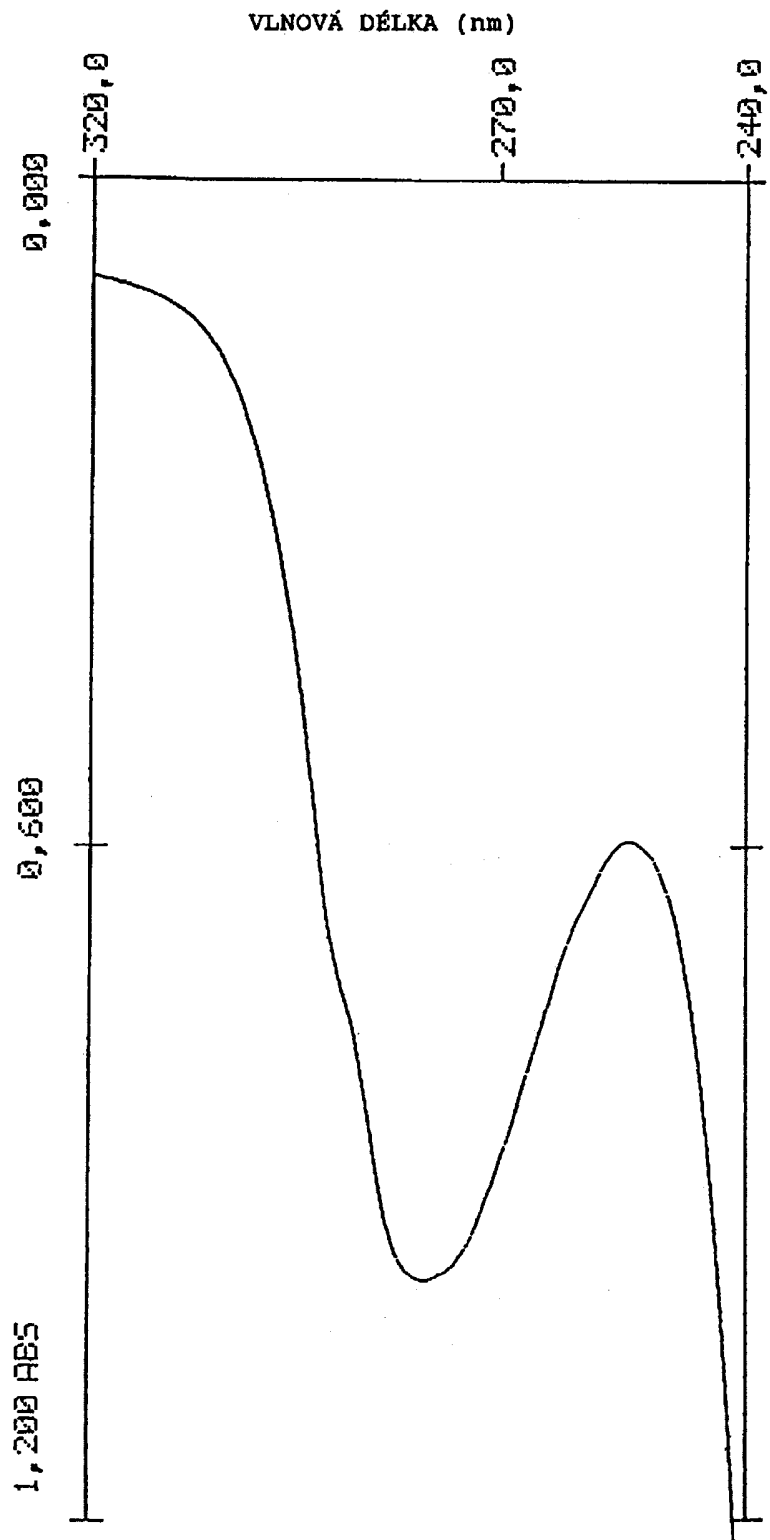
Obr. 4



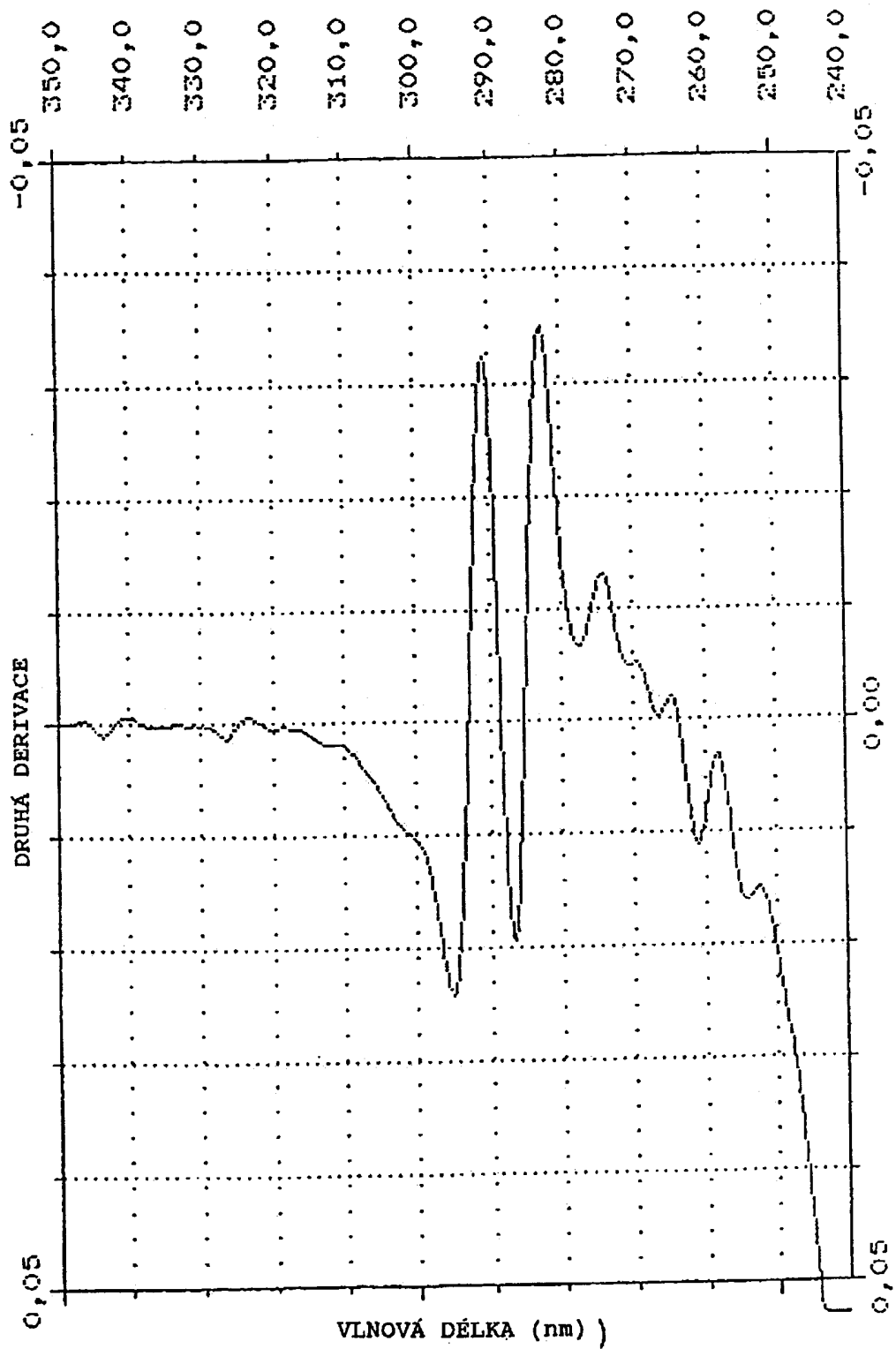
Obr. 5



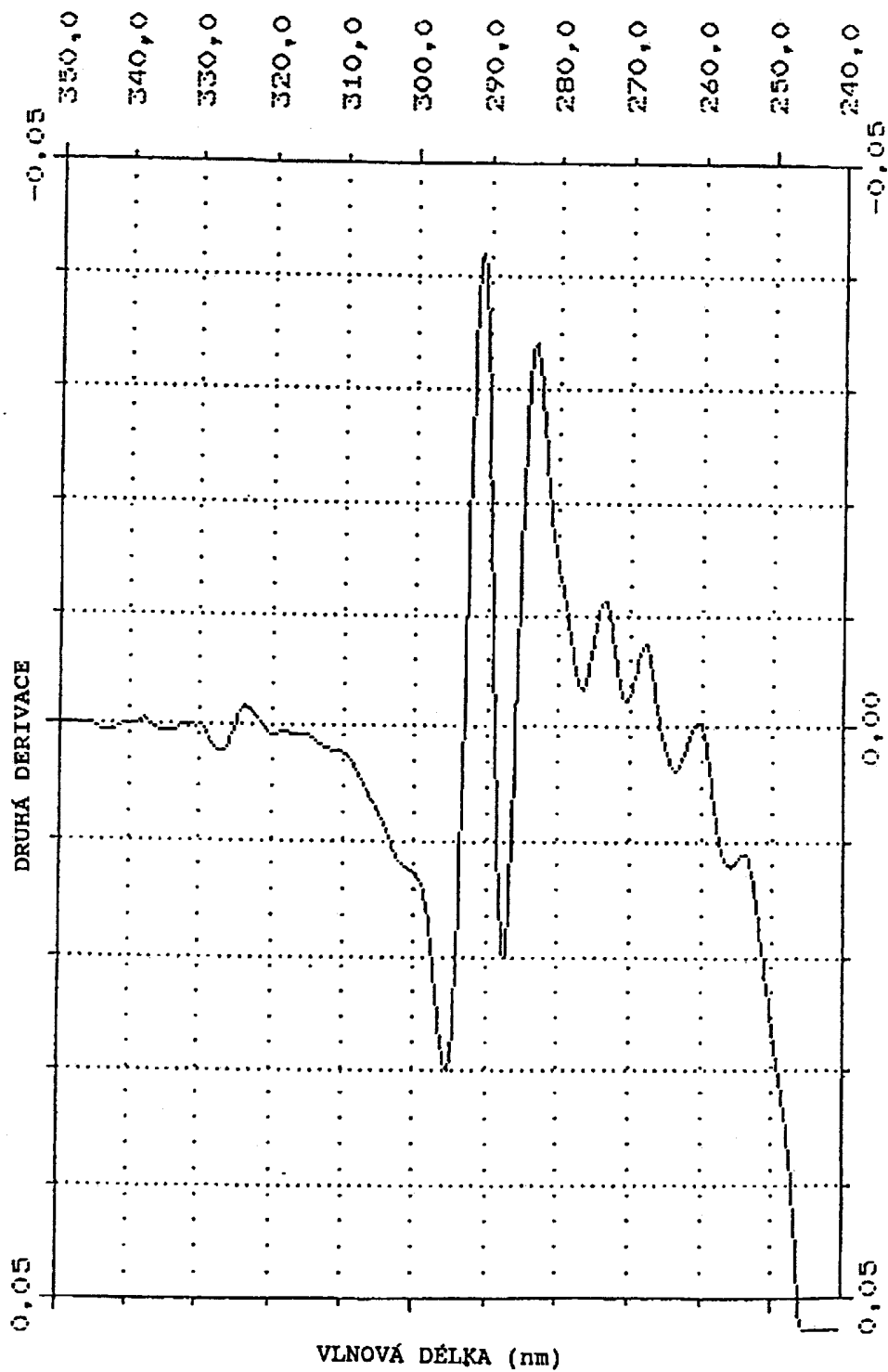
Obr. 6



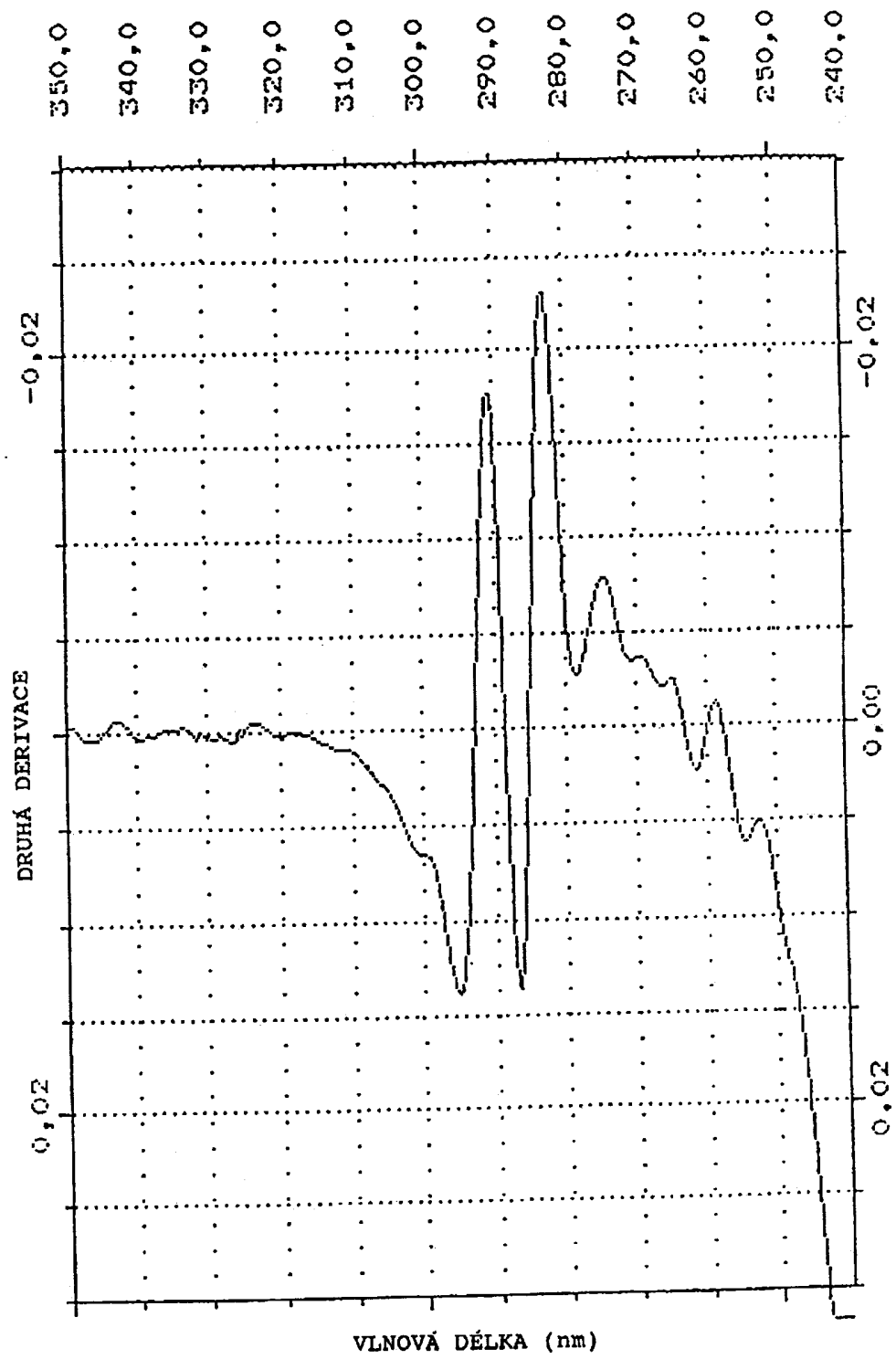
Obr. 7



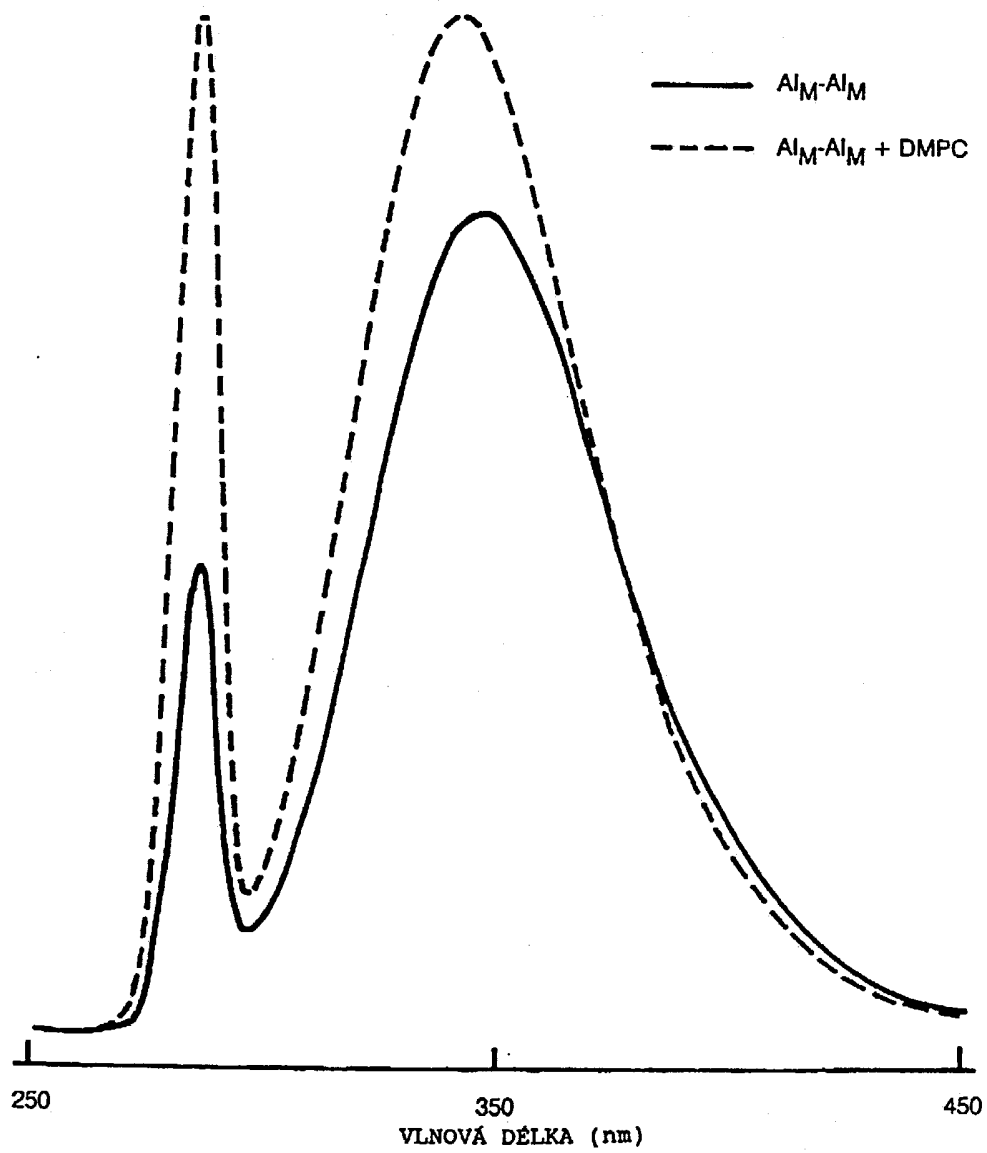
Obr. 8



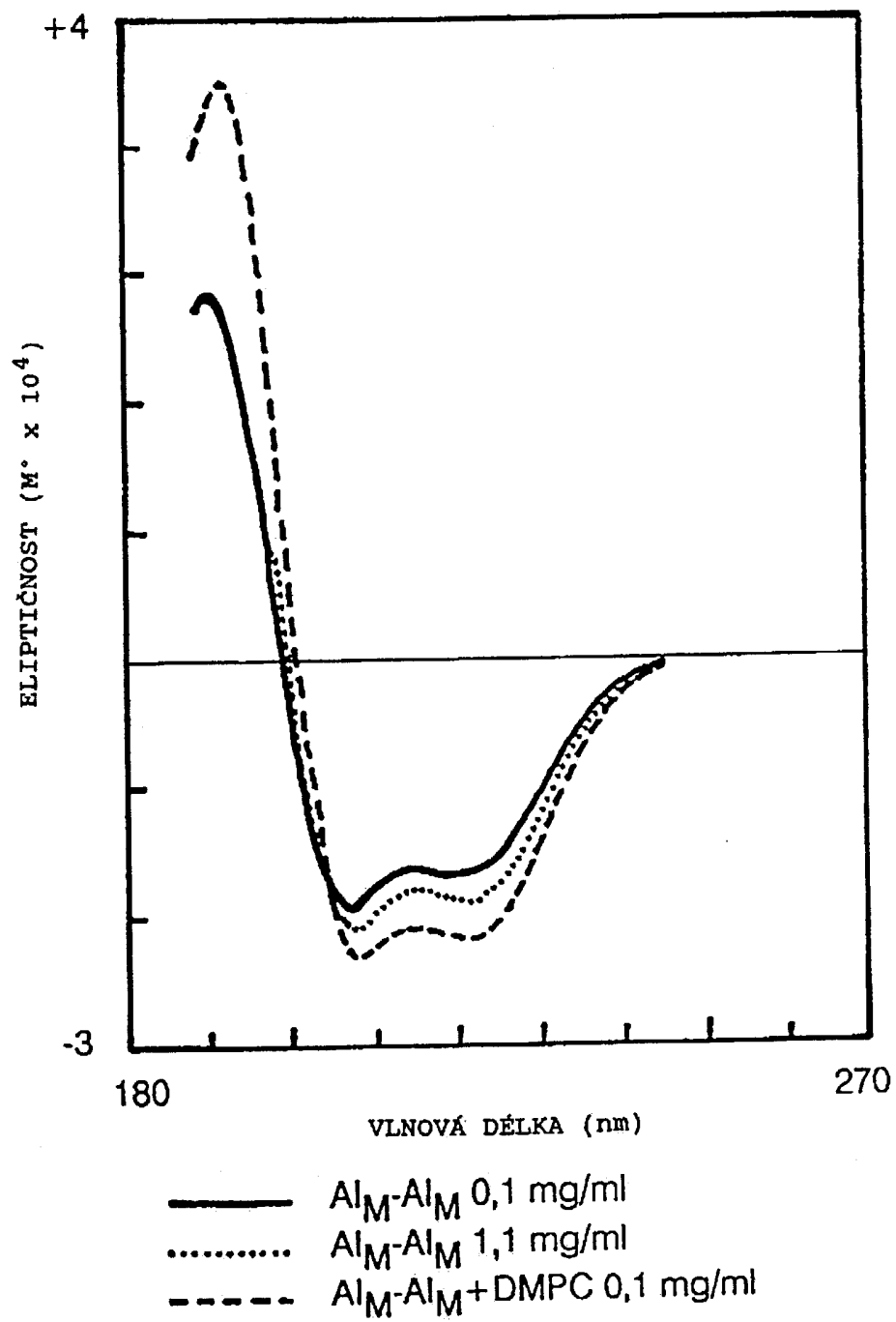
Obr. 9



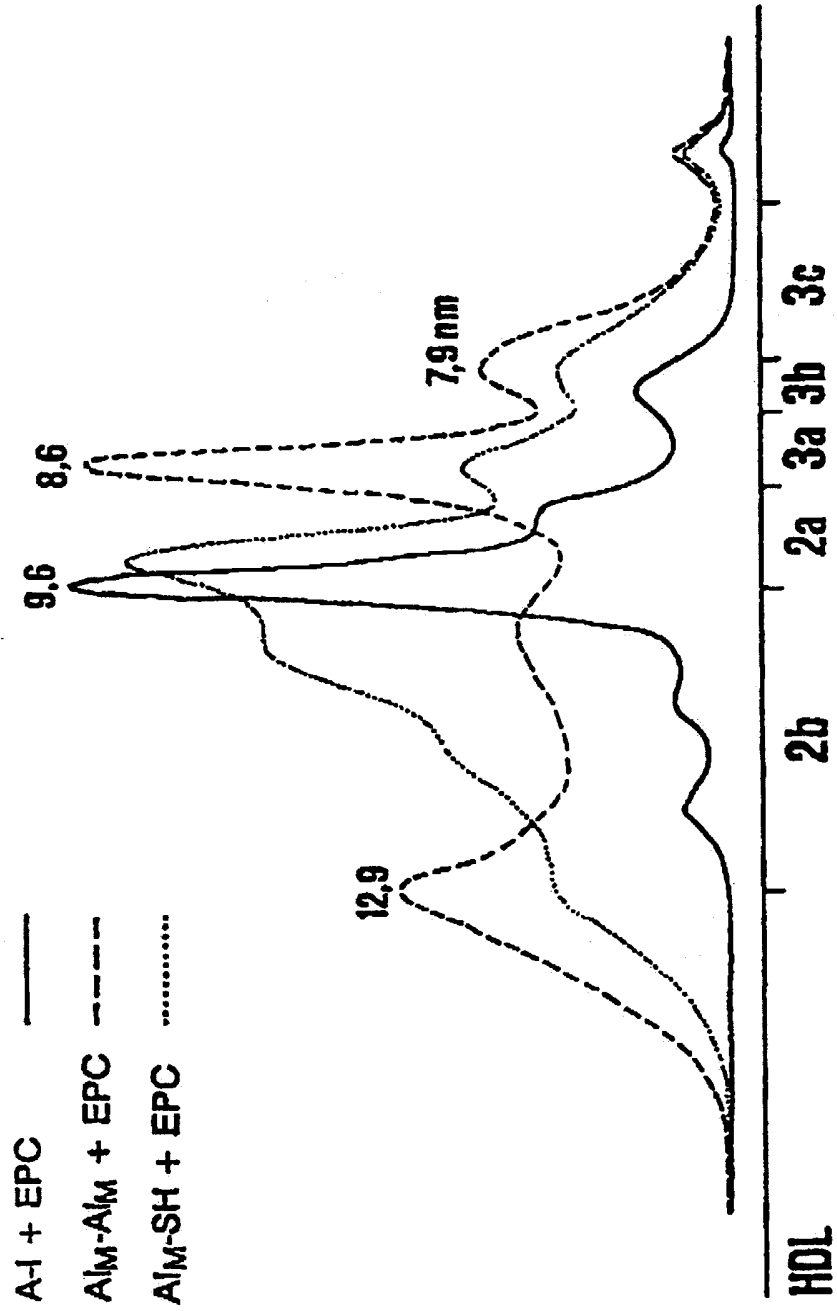
Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12



Konec dokumentu

Obr. 13