

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.08.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/1367**

(33) Země priority: **AT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/07643**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/11057**

(21) Číslo dokumentu:

2002 -481

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/57

C 12 N 15/62

C 12 N 15/70

C 12 N 9/50

C 12 N 1/21

C 12 P 21/06

///(C 07 K 14/54, C 07 K 14/56, C 12 N 1/21,
C 12 R 1:19)

(71) Přihlašovatel:

BIOCHEMIE GESELLSCHAFT M. B. H., Kundl, AT;

(72) Původce:

Stempfer Günter, Kramsach, AT;

Windisch Jörg, Kramsach, AT;

Knauseder Franz, Kirchbichl, AT;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob rekombinantní produkce heterologního
polypeptidu pomocí peptidu s autoproteolytickou
aktivitou**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu rekombinantní produkce požadovaného heterologního polypeptidu s jasně definovaným homogenním N-koncem v bakteriálním hostiteli, kdy fúzní protein obsahující peptid s autoproteolytickou aktivitou autoproteázy N^{pro} pestiviru a heterologní polypeptid vytváří cytoplazmatická inkluzní tělíska v hostitelských buňkách, tato inkluzivní tělíska jsou pak izolována a ošetřena tak, aby se požadovaný heterologní polypeptid vyštěpil z fúzního proteinu autoproteolyticky působením N^{pro} aktivity.

Způsob rekombinantní produkce heterologního polypeptidu pomocí peptidu s autoproteolytickou aktivitou

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu rekombinantní výroby požadovaného heterologního polypeptidu s jasně definovaným homogenním N-koncem v bakteriální hostitelské buňce, přičemž nejdříve exprimovaný fúzní protein, který obsahuje peptid mající autoproteolytickou aktivitu autoproteázy N^{pro} pestiviru a heterologní polypeptid, se tvoří ve formě inkluzních tělísek v cytoplazmě, tato inkluzní tělíska se pak izolují a ošetří tak, že požadovaný polypeptid je vyštěpen z fúzního proteinu působením autoproteolytické aktivity N^{pro}.

Dosavadní stav techniky

Při přípravě rekombinantních proteinů v heterologních organismech jako např. při expresi humánních nebo jiných eukaryotických proteinů v bakteriálních buňkách je často obtížné získat jasně definovaný N-konec, který by byl pokud možno 100% homogenní. až se týká především rekombinantních farmaceutických proteinů, jejichž aminokyselinová sekvence by v mnoha případech měla být shodná s aminokyselinovou sekvencí proteinů přirozeně se vyskytujících u člověka/zvířat.

Při normální, přirozené expresi, např. u člověka, mnohé farmaceutické proteiny, které se užívají, jsou transportovány do extracelulárního prostoru, přičemž štěpení signální sekvence

přítomné v prekurzorovém proteinu právě pro tento účel vede ke vzniku jasně definovaného N-konce. Takový homogenní N-konec není vždy snadné připravit, např. při expresi v bakteriálních buňkách, a až z několika důvodů.

K produkci v průmyslovém měřítku jsou mnohé farmaceutické proteiny produkovány v cytoplazmě bakteriálních buněk (např. *Escherichia coli*), jelikož je zde možné dosáhnout akumulace v požadovaném množství, a kromě toho se často tvoří nerozpustná inkluzní tělíska (IB), která jsou velmi výhodná pro další zpracování a purifikaci. Navíc protein exprimovaný ve formě IB je chráněn intracelulárními proteázami proti degradaci proteázami (R. Rudolph, in: *Protein Engineering: Principles and Practices*. Eds. Jeffrey L. Cleland and Charles S. Craik, John Wiley & Sons Inc., (1995), ISBN 0-471-10354-3).

Avšak produkce materiálu ve formě IB vyžaduje *in vitro* nové svinutí ("refolding") exprimovaného proteinu. To lze provést v mnoha případech metodami, které jsou odborníkům známy (R. Rudolph et al. (1996), in: *Protein Function: A Practical Approach*, Ed.: Creighton, T.E., 1-39). Při těchto postupech se protein ve formě IB solubilizuje přidáním silného denaturačního činidla v redukujících podmínkách a pak se renaturuje.

Jen ve výjimečných případech je možný export do bakteriálního periplazmatického prostoru pomocí eukaryotické prosekvence nebo signální sekvence, protože se zde může akumulovat jen velmi malé množství produktu z důvodu nízké transportní kapacity bakteriálního exportního mechanismu.

Bakteriální cytoplazma se výrazně liší od extracelulárního prostoru eukaryot. Na jedné straně jsou zde redukující podmínky, na druhé straně zde není žádný mechanismus pro odštěpení N-koncové vedoucí ("leader") sekvence

z maturovaného (zralého) proteinu. Syntéza všech cytoplazmatických proteinů začíná methioninem, který je kódován příslušným iniciačním (startovním) kodonem (ATG = iniciace translace). Tento N-koncový methionin je u mnoha proteinů zachován, zatímco u jiných je odštěpen methioninaminopeptidázou (MAP), která je přítomna v cytoplasmě a je vlastní hostiteli. Účinnost štěpení závisí v podstatě na dvou parametrech:

1. povaha následující aminokyseliny a
2. Lokalizace N-konce v trojrozměrné struktuře proteinu.

N-koncový methionin je přednostně odstraněn, když následující aminokyselinou je serin, alanin, glycin, methionin nebo valin a když N-konec je exponován, tzn. když není "ukryt" uvnitř proteinu. Na druhé straně, když je následující aminokyselina jiná, především nabitá aminokyselina (kyselina glutamová, kyselina asparagová, lysin, arginin), nebo když je N-konec lokalizován uvnitř proteinu, ve většině případů k odštěpení N-koncového methioninu nedojde (Knippers, Rolf (1995) *Molekulare Genetik*, 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. ISBN 3-13-103916-7).

Dokonce i když aminokyselina podporující štěpení je přítomna v poloze 2, štěpení je zřídka úplné. Obvykle významné množství (1-50%) zůstane neovlivněno MAP.

V minulosti produkce rekombinantních farmaceutických proteinů v bakteriálních buňkách se jednoduše vkládal methionin-kódující ATG startovní kodon před otevřený čtecí rámec (ORF) pro maturovaný protein (tj. bez signální sekvence nebo jiných extenzí N-konce). Exprimovaný protein pak měl sekvenci "H₂N-Met-cílový protein". Pouze v několika případech bylo možné dosáhnout úplného odštěpení N-koncového methioninu MAP hostitele. Většina proteinů připravovaných tímto způsobem

byla tudíž buďto nehomogenní na svém N-konci (jednalo se o směs Met-formy a formy bez Met) nebo měly všechny molekuly dodatečnou cizorodou aminokyselinu (Met) na svém N-konci (pouze Met-forma).

Tato nehomogenita nebo odchylka od přírodní sekvence je však v mnoha případech nepřijatelná, neboť takové produkty často vykazují odlišné imunologické (např. indukce protilátek) a farmakologické vlastnosti (biologický poločas, farmakokinetika). Z těchto důvodů je nyní nutné produkovat většinou přírodně identické produkty (homogenní a bez cizorodé aminokyseliny na N-konci). V případě cytoplazmatické exprese je nápravou zpravidla fúze štěpné sekvence ("leader" sekvence) pro specifickou endopeptidázu (např. Faktor Xa, enterokináza, KEX endopeptidázy, IgA proteáza) nebo aminopeptidázu (např. dipeptidylaminopeptidáza) na N-konec cílového proteinu. Avšak až představuje další krok a vynaložení dalších nákladů a materiálu při následném (tzv. downstream) zpracování produktu. Navíc v přítomnosti IB v mnoha případech vedoucí sekvence narušuje a někdy zcela zabraňuje svinutí proteinu.

Takže existuje stálá potřeba nových způsobů přípravy požadovaného heterologního cílového proteinu, který je exprimován v bakteriálních buňkách ve formě inkluzních tělísek, ze kterých pak může být připraven cílový protein s požadovaným uniformním N-koncem. Takový způsob přípravy požadovaného cílového proteinu z inkluzních tělísek užitím virové autoproteázy N^{pro} z pestiviru je předmětem předkládaného vynálezu.

Pestiviry tvoří skupinu patogenů, které způsobují značné ekonomické ztráty v chovech prasat a přežvýkavců po celém

světě. Zvláště významným patogenem je klasický virus horečky prasat (CSFV, "Classical swine fever virus"), který způsobuje přenosné onemocnění a podléhá tudíž ohlašovací povinnosti. Ztráty způsobené virem průjmu hovězího dobytka (BVDV, "bovine viral diarrhoea virus") jsou také značné, zejména z důvodu pravidelného výskytu intrauterinní infekce plodů.

Pestiviry jsou malé obalové viry, jejichž genom velikosti 12,3 kb působí přímo jako mRNA, ze které jsou v cytoplazmě transkribovány virové produkty. K tomu dochází ve formě jediného polyproteinu, který obsahuje přibližně 4000 aminokyselin a který je naštěpen virovým a buněčnými proteázami na 12 zralých proteinů.

Do nynějška byly identifikovány dvě virově kódované proteázy u pestivirů, a sice autoproteáza N^{pro} a serinová proteáza NS3. N-koncová proteáza N^{pro} je lokalizována na N-konci polyproteinu a má zjevnou molekulovou hmotnost 23000 (D). Katalyzuje štěpení, ke kterému dochází mezi jejím vlastním C-koncem (Cys168) a N-koncem (Ser169) nukleokapsidového proteinu C (R. Stark et al., J. Virol. 67 (1993), 7088-7095). Navíc duplikace genu N^{pro} byly popsány u cytopatogenních virů BVDV. V nich je druhá kopie N^{pro} na N-konci podobně duplikované NS3 proteázy. Autoproteolytické štěpení proteinu N^{pro} -NS3 bylo pozorováno i v tomto případě (R. Stark et al., viz výše).

N^{pro} je autoproteáza délky 168 aminokyselin a zjevnou M_r 20000 (Dalton, D) (*in vivo*). Je prvním proteinem v polyproteinu pestivirů (CSFV, BVDV nebo BDV ("border disease virus")) a podléhá autoproteolytickému odštěpení od následujícího nukleokapsidového proteinu C (M. Wiskerchen et al., J. Virol. 65 (1991), 4508-4514; Stark et al., J. Virol. 67 (1993),

7088-7095). Toto štěpení se uskutečňuje za poslední aminokyselinou sekvence N^{pro}, tj. Cys168.

Podstata vynálezu

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že autoproteolytická funkce autoproteázy N^{pro} může být využita k vyštěpení heterologního polypeptidu z fúzního proteinu, který byl exprimován ve formě inkluzních tělísek v bakteriálním expresním systému a který obsahuje autoproteázu N^{pro} z pestiviru a heterologní polypeptid. Takže neštěpený N^{pro} fúzní protein je izolován z inkluzních tělísek, solubilizován a pak štěpen v průběhu "znovusvinutí" ("refolding").

Jeden aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu rekombinantní produkce heterologního polypeptidu, který obsahuje kroky, kdy

(I) kultivují se bakteriální hostitelské buňky, které jsou transformované expresním vektorem obsahujícím molekulu nukleové kyseliny, která kóduje fúzní protein, přičemž fúzní protein obsahuje první polypeptid, který má autoproteolytickou funkci autoproteázy N^{pro} z pestiviru, a druhý polypeptid, který je navázán na první polypeptid na C-konci prvního polypeptidu takovým způsobem, že druhý polypeptid může být vyštěpen z fúzního proteinu autoproteolytickou aktivitou prvního polypeptidu, a druhý polypeptid je heterologní polypeptid, přičemž kultivace probíhá za podmínek, které vedou k expresi fúzního proteinu a k vytváření odpovídajících cytoplazmatických inkluzních tělísek,

(II) izolují se inkluzní tělíska z hostitelských buněk

- (III) izolovaná inkluzní tělíska se solubilizují,
- (IV) solubilizát se naředí tak, aby vznikl reakční roztok, ve kterém proběhne autoproteolytické vyštěpení heterologního polypeptidu z fúzního proteinu a
- (V) izoluje se vyštěpený heterologní polypeptid.

Polypeptid s autoproteolytickou funkcí autoproteázy N^{pro} pestiviru je především autoproteáza N^{pro} pestiviru, nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou.

V popisu předkládaného vynálezu termín "heterologní polypeptid" znamená polypeptid, který není v přírodě odštěpován autoproteázou N^{pro} pestiviru z přírodně se vyskytujícího fúzního proteinu nebo polyproteinu. K příkladům heterologních polypeptidů patří průmyslové enzymy nebo polypeptidy s farmaceutickou aktivitou, především farmaceutickou aktivitou u člověka.

K příkladům výhodných polypeptidů s humánní farmaceutickou aktivitou patří cytokiny jako jsou interleukiny, např. IL-6, interferony jako jsou leukocytární interferony, např. interferon α 2B, růstové faktory, především růstové faktory účastníci se hematopoézy hojení poranění, jako jsou např. G-CSF, erythropoetin nebo IGF, hormony jako je např. humánní růstový hormon (hGH), protilátky anebo vakcíny. Ve způsobu podle vynálezu je pestivirus výhodně vybrán ze skupiny obsahující CSFV, BDV a BVDV, zvláště výhodně je pestivirus CSFV.

Výhodný způsob podle předkládaného vynálezu je takový, kdy první polypeptid fúzního proteinu obsahuje následující aminokyselinovou sekvenci autoproteázy N^{pro} z CSFV (viz také sekvence s přístupovým číslem X87939 v databázi EMBL)

(aminokyseliny 1 až 168, čteno ve směru od N-konce do C-konce)

(1) -MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTT
LRDLPRKGDCRSGNHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPYHRAPLEFFDEAQFCEVTKRIGRVT
GSDGKLYHIYVCVDGCILLKLA KRGTPTLKWIRNFTNCPLWVTSC- (168),

nebo aminokyselinovou sekvenci jejího derivátu, který má autoproteolytickou aktivitu.

Polypeptidy s autoproteolytickou aktivitou autoproteázy N^{pro} pestiviru mohou být deriváty autoproteázy N^{pro} pestiviru, získané z autoproteázy N^{pro} pestiviru mutagenezí, zejména užitím substitucí, delecí, adicí a/nebo inzercí aminokyselin, pokud je uchována požadovaná autoproteolytická aktivita, především pro vytváření požadovaných heterologních polypeptidů s homogenním N-koncem. Způsoby přípravy takových derivátů mutagenezí jsou odborníkům známy. Takovými mutacemi je možné optimalizovat aktivitu autoproteázy N^{pro} vzhledem k různým heterologním proteinům, které mají být vyštěpeny z fúzního proteinu. Po přípravě nukleové kyseliny, která kóduje fúzní protein, který kromě požadovaného heterologního proteinu obsahuje derivát autoproteázy N^{pro} vykazující jednu nebo více mutací vzhledem k přírodně se vyskytující autoproteáze N^{pro} , se určí, zda je požadovaná funkce přítomna stanovením autoproteolytické aktivity.

Autoproteolytická aktivita může být např. detekována nejdříve solubilizací izolovaných/purifikovaných IB v roztoku 7 M guanidin/HCl a pak naředěním 1:100 v reakčním pufru. Po inkubaci 24 hodin se reakční roztok vyšetří SDS-PAGE, zda došlo ke štěpení. Pro identifikaci podílu naštěpených a nenaštěpených molekul se provede Western přenos (Western blot). Podíl

naštěpeného materiálu se stanoví denzitometrickou analýzou SDS-PAGE gelů obarvených Coomassie modří.

Výhodný způsob podle předkládaného vynálezu je např. takový, kdy expresní vektor obsahuje nukleovou kyselinu, která kóduje fúzní protein, který má N-koncový úsek, kde byla jedna nebo několik aminokyselin deletováno nebo substituováno v úsek aminokyselin 2 až 21, pokud vzniklý derivát nadále vykazuje autokatalytickou funkci autoproteázy N^{pro} v požadovaném rozsahu. Podle vynálezu výhodný derivát autoproteázy N^{pro} ve fúzním proteinu obsahuje např. aminokyselinovou sekvenci autoproteázy N^{pro} z CSFV s delecí aminokyselin 2 až 16 nebo 2 až 21. Je také možné prostřednictvím substituce nebo adice aminokyselin změnit nebo vložit aminokyselinovou sekvenci, např. se vnese aminokyselinová sekvence, která napomáhá při purifikaci.

Molekula nukleové kyseliny, která je zvláště výhodná ve způsobu podle vynálezu kóduje takový fúzní protein, kde první polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci Glu22 až Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou, přičemž první polypeptid dále má Met jakožto N-konec a heterologní polypeptid je napojen přímo na aminokyselinu Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV.

Molekula nukleové kyseliny, která je podobně výhodná ve způsobu podle vynálezu, kóduje fúzní protein, kde první polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci Pro17 až Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou, přičemž první polypeptid dále má Met jakožto N-konec a heterologní polypeptid je napojen přímo na aminokyselinu Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV.

Molekula nukleové kyseliny ve způsobu podle vynálezu je především ve formě molekuly DNA.

Expresní vektor pro způsob podle předkládaného vynálezu výhodně obsahuje alespoň jednu sekvenci pro kontrolu exprese. Sekvence pro kontrolu exprese jsou především promotory (např. *lac*, *tac*, *T3*, *T7*, *trp*, *gac*, *vhb*, *lambda pL* nebo *phoA*), vazebná místa ribozomů (např. přirozená vazebná místa ribozomů patřící k výše zmíněným promotorům, *cro* nebo syntetická vazebná místa ribozomů), nebo terminátory transkripce (např. *rrnB T1T2* nebo *bla*). Zmíněné hostitelské buňky jsou výhodně bakteriální buňky rodu *Escherichia*, především *E. coli*. Avšak mohou být užity i jiné bakteriální buňky. Ve výhodném provedení vynálezu je expresním vektorem plazmid.

Bakteriální hostitelské buňky pro způsob podle předkládaného vynálezu mohou být vybrány ze skupiny obsahující následující mikroorganismy: Gram-negativní bakterie rodu *Escherichia*, např. *E. coli*, nebo jiné Gram-negativní bakterie, např. *Pseudomonas* sp., jako je např. *Pseudomonas aeruginosa*, nebo *Caulobacter* sp., jako je např. *Caulobacter crescentus*, nebo Gram-pozitivní bakterie jako jsou bakterie rodu *Bacillus* sp., především *Bacillus subtilis*. Zvláště výhodné hostitelské buňky jsou *E. coli*.

Bakteriální hostitelské buňky, tj. expresní kmen těchto buněk, se kultivuje obvyklým mikrobiologickým způsobem, který je odborníkovi znám. Kmen je kultivován z jedné výchozí kolonie na živném médiu, ale je také možné jako výchozího materiálu užít kryoprezervovanou suspenzi buněk (buněčné banky). Kmen se obecně kultivuje v několika stupňovém procesu, aby byla získána dostatečná biomasa pro další zpracování.

V malém měřítku probíhá kultivace v protřepávaných kultivačních lahvích, ve většině případů je možné užít úplné médium (např. LB živné médium). Avšak může se užít také

specificky definované médium (např. citrátové médium). Pro kultivaci se připraví maloobjemová prekultura hostitelského kmenu (inokulovaná jedinou kolonií nebo kryoprezervovanou buněčnou suspenzí), teplota při této kultivaci obvykle není kritická pro pozdější výsledky exprese, takže se rutinně provádí při vyšších teplotách (např. 30°C nebo 37°C). Hlavní kultura se nasadí ve větším (např. 500 ml), kde je především nutné zajistit dobré provzdušnění (velký objem kultivační nádoby proti objemu obsahu, vysoká rychlost rotace). Jelikož je úmyslem dosáhnout exprese ve formě nerozpustných inkluzních tělísek, hlavní kultura se ve většině případů provádí při relativně vysokých teplotách (např. 30 nebo 37 °C). Indukovatelné systémy jsou zvláště vhodné k produkci inkluzních tělísek (např. užitím promotorů *trp*, *lac*, *tac* nebo *phoA*). Po té, co bylo dosaženo pozdní logaritmické fáze (obvykle při optické hustotě 0,5 až 1,0 v třepaných lahvích) se v těchto systémech přidá induktor (např. indolylakrylová kyselina, isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid = IPTG) a inkubace pokračuje dále 1 až 5 hodin. V průběhu této doby se většina N^{pro} fúzního proteinu deponuje v bakteriální cytoplazmě ve formě inkluzních tělísek. Buňky je pak možné sklídit a dále zpracovat.

Ve větším měřítku víceetapový kultivační proces probíhá v řadě bioreaktorů (fermentorů), přičemž je výhodné užít definovaná živná média, aby bylo možné zlepšit ovládání a kontrolu procesu. Kromě toho je možné významně zvýšit nárůst biomasy a tvorbu produktu dávkováním určitých živin ("živná dávka"). Jinak je proces analogický procesu v malém měřítku v třepaných lahvích. Tak např. se užije fermentor pro předběžnou fázi a fermentor pro hlavní fázi a zvolí se kultivační teploty shodné s teplotami při kultivaci v lahvích.

Fermentor pro předběžnou fázi je inokulován inokulem, které se vypěstuje z jediné kolonie nebo z kryokultury v kultivační lahvi. Ve fermentoru je také třeba zajistit dobré provzdušňování a přítomnost dostatečné koncentrace induktoru, zejména pak v hlavní fázi. Indukční fáze však musí být někdy jinak dlouhá než indukce v kultivační lahvi. Výsledné buňky se pak užijí pro další zpracování.

Ve způsobu podle předkládaného vynálezu se inkluzní tělíška izolují z hostitelských buněk způsobem, který je odborníkům znám a byl popsán např. v publikacích: R. Rudolph et al., in: Creighton, T.E. (Ed.), Protein Function, A Practical Approach, IRL Press, (1996), 1-39; R. Rudolph, in: H. Tschesche (Ed.), Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research, De Gruyter, Berlin, (1990), 149-171; R. Rudolph, in: J.L. Cleland & C.S. Craik (Eds.), Protein Engineering: Principles and Practices, Wiley-Liss Inc., (1995), 283-298.

Tak například po ukončení fermentace se buňky sklídí centrifugací. Inkluzní tělíška (IB) přítomná v buňkách se získají po rozrušení buněk např. vysokotlakou disperzí jednoduše centrifugací při nízkých otáčkách rotoru. Čistota z hlediska požadovaného cílového proteinu se může zlepšit opakovaným resuspendováním IB v různých pufrch, např. s NaCl (např. 0,5 až 1,0 M) a/nebo s detergenty (např. Triton X-100). To obvykle vede k odstranění většiny cizorodých proteinů z IB. Zbytky cizorodých proteinů obvykle nenarušují autoproteolytické štěpení.

Solubilizace se rutinně provádí rozpuštěním IB např. v pufru obsahujícím guanidin (např. 0,1 M tris/HCl, 6,0 M guanidin/HCl, 5 mM EDTA, 50 mM DTT) (viz např. R. Rudolph et al., (1996); R. Rudolph (1990), R. Rudolph (1995), cit. výše).

Po odstranění nerozpustného materiálu např. centrifugací lze v supernatantu provést stanovení koncentrace proteinu.

Autoproteolytického vyštěpení heterologního polypeptidu z fúzního proteinu se dosáhne naředěním solubilizátu štěpicím puforem (např. v poměru 1 ml solubilizátu + 99 ml štěpicího pufru), např. puforem obsahujícím Tris, výhodně v koncentraci 0,8-1,0 M, nebo štěpicím puforem obsahujícím arginin, výhodně s 0,4-0,6 M argininem, např. při neutrálním pH, výhodně při pH 7,0-7,5, a při teplotě např. nižší než 30°C, výhodně 10 až 20°C, čímž se vytvoří reakční roztok (viz také R. Rudolph (1996), cit. výše). Štěpicí roztok se pak inkubuje po určitou dobu, např. 12 hodin, a míra štěpení N^{pro} pak může být analyzována např. pomocí SDS-PAGE.

Ve výhodném provedení je solubilizát naředěn puforem obsahujícím arginin tak, aby výsledná koncentrace argininu byla do 1,0 M, výhodně 0,4 až 0,6 M. Alternativně se naředění provede dialýzou solubilizovaných inkluzních tělísek proti vhodnému štěpicímu pufru obsahujícímu arginin.

Teplota reakčního pufru pro štěpení je v rozmezí 0 °C až 30°C, výhodná teplota je 10 °C až 20 °C.

pH reakčního pufru je např. v rozmezí 5,0 až 9,0. pH je výhodně 7,0 až 8,0, zvláště výhodně 7,0 až 7,5.

Tam, kde je to vhodné, reakční pufr obsahuje také DTT v koncentraci 0,5 až 100 mM. DDT koncentrace je výhodně přibližně 5,5 mM.

Koncentrace proteinu v reakčním roztoku pro štěpení je např. v rozmezí 20 až 150 µg/ml. Koncentrace proteinu je výhodně nižší než 40 µg/ml.

Reakční pufr při štěpení může obsahovat Tris/HCl v koncentraci např. do 1,0 M. Koncentrace Tris/HCl je výhodně

0,8 M až 1,0 M.

Místo pufru obsahujícího arginin nebo Tris/HCl pufru je možné užít i jiný pufrovací systém.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu je pH štěpicího pufru 7,0 až 7,5, teplota při štěpení je 10 °C až 20 °C, koncentrace proteinu nepřesahuje 40 až 50 µg/ml, a přitom štěpicí pufr obsahuje jakožto redukční činidlo 5mM DTT.

A nakonec, heterologní polypeptid, který byl vyštěpen z fúzního proteinu, je izolován způsobem, který je odborníkům znám (viz např. M.P. Deutscher, in: *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, Academic Press Inc., (1990), 309-392).

Následující příklady slouží k ilustraci a předkládaného vynálezu, aniž by jakkoliv omezovaly jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Exprese a *in vitro* štěpení N^{pro}-hGH (humánní růstový hormon)

Fúzní proteiny jsou produkovány heterologní expresí v bakteriálním expresním systému *Escherichia coli* (vektor p160TP1 s hostitelem W3110). Všechny elementy pro konstrukci vektoru tohoto systému pocházejí z genomu *E. coli*.

p160TP1 je vektor odvozený z pBR322, ve kterém je exprese řízena modifikovaným *E. coli* *trp* promotorem s deletovaným atenuátorem. Sekvence Shine-Dalgarnova v atenuátorovém peptidu ze stejného operonu byla užita jako

vazebné místo ribozomů (RBS). Dvojitý terminátor T1T2 z genu *E. coli* *rrnB* zajišťuje, společně s terminátorem genu *bla* ponechaným v konstrukt, účinnou terminaci transkripce.

Expresní kazeta byla vložena do místa *EcoRI* v pBR322 v opačném směru (proti směru hodinových ručiček, tj. opačně orientovaná než je gen rezistence k tetracyklinu). Gen pro β -laktamázu (*bla*) byl deletován společně s promotorem. Strukturní geny pro heterologní proteiny, které mají být exprimovány, jsou vloženy (obecně jako PCR fragmenty přiměřeně naštěpené) prostřednictvím štěpného místa *XbaI* v poloze 3506.

Expresní plazmid (NPH-pET) sloužil jako zdroj strukturního genu N^{pro} -hGH. Plazmid obsahuje známý expresní vektor pET11a (F.W. Studier et al., *Methods. Enzymol.* 185 (1990), 60-89). Nejdříve byl fúzní protein sestávající z N^{pro} a CSFV nukleokapsidového proteinu klonován do expresního vektoru. To umožnilo prvních 16 aminokyselin (aa) přírodní sekvence N^{pro} (MELNHFELLYKTSKQK) nahradit 10 aa dlouhou oligo-histidinovou sekvencí (MASHHHHHHH) napomáhající purifikaci. Štěpné místo *SpeI* bylo vneseno do výsledného expresního plazmidu v místě spojení mezi N^{pro} a nukleokapsidovým proteinem cílenou mutagenezí. To umožnilo deletovat strukturní gen pro nukleokapsidový protein z vektoru restrikcí *SpeI* (na 5'-konci) a *XhoI* (na 3'-konci). Odpovídající linearizovaný vektor N^{pro} -pET11a byl oddělen od fragmentu nukleokapsidového genu preparativní gelovou elektroforézou. Pak bylo možné vložit strukturní gen hGh prostřednictvím "lepivých" konců *SpeI* a *XhoI*.

Byly potřebné následující přípravné práce. Strukturní gen byl amplifikován pomocí vysoce přesného systému PCR (například Pwo systém od firmy Roche Biochemicals, postup byl

proveden podle pokynů výrobce) z cDNA knihovny humánního mozku.

Pro tento účel byly použity následující oligonukleotidy:

Oligonukleotid 1 ("N-koncový"):

5'- ATAATTACTA GTTGTTCCTC AACCATTCCTC TTATCCAGGC C -3'

Oligonukleotid 2 ("C-koncový"):

5'- ATAATTGGAT CCTCGAGTTA TTAGAAGCCA CAGCTGCCCT CCAC -3'

Pomocí těchto oligonukleotidů bylo vneseno štěpné místo SpeI na 5'-konec, a štěpné místo XhoI bylo vneseno na 3'-konec. Navíc byl na 3'-konec strukturního genu vložen dvojitý stop kodon ochre (TAATAA) kvůli účinné terminaci translace. Štěpné místo SpeI na předním konci dovoluje ligaci ve shodě se čtecím rámcem vektoru N^{pro}-pET11a popsaného výše. Štěpné místo XhoI na zadním konci umožňuje přímé klonování. Takto připravený plazmid byl nazván NPH-pET.

Tento plazmid NPH-pET byl, jak již bylo zmíněno, užit jako zdroj strukturního genu pro fúzní protein N^{pro}-hGH. Pro tento účel byla užitá vysoce přesná PCR s Pwo polymerázou, kdy templátem byl plazmid NPH-pET linearizovaný XhoI. Pro přípravu fragmentu vhodného pro klonování byly použity následující primery:

Přední konec (odpovídá N-konci proteinu) strukturního genu:

5'-AGGGTATCTA GAATTCTATG CAGTGGGAG TGGAGGAACC G-3'

Zadní konec (odpovídá C-konci proteinu) strukturního genu:

5'-AGAATTAAGC TTCTAGATTA TTAGAAGCCA CAGCTGCCCT CCAC-3'

Štěpná místa XbaI (přední a zadní) použitá pro následné klonování jsou vyznačena podtržením, a start-kodon (ATG) a stop-kodon (TAATAA) jsou vyznačeny většími typy.

Tyto dva oligonukleotidy vedly k amplifikaci strukturního genu s otevřeným čtecím rámcem (ORF) pro fúzní protein (FP), kde purifikační pomůcka His₇ a předcházející aminokyseliny (s výjimkou methioninu nezbytného pro zahájení translace) byly zcela odstraněny.

Sekvence PCR fragmentu (1072 bp), který obsahuje otevřený čtecí rámce pro fúzní protein N^{pro}-hGH je uveden níže. Start-kodon a dva stop-kodony jsou vyznačeny tučně a štěpná místa XbaI užitá pro klonování jsou vyznačena podtržením.

5' - AGGGTATCTAGAATTCTATGCCAGTGGGAGTGGAGGAACCGGTGTATGACACCGCGGGGA
GACCACTATTTGGGAACCCAAGTGAGGTACACCCACAATCAACGCTGAAGCTGCCACACGACA
GGGGGAGAGGAGATATCAGAACAACACTGAGGGACCTACCCAGGAAAGGTGACTGTAGGAGTG
GCAACCATCTAGGCCCGGTTAGTGGGATATACATAAAGCCCGGCCCTGTCTACTATCAGGACT
ACACGGGCCCAGTCTATCACAGAGCTCCTTTAGAGTTCTTTGATGAGGCCAGTTCTGCGAGG
TGACTAAGAGAATAGGCAGGGTCACGGGTAGTGATGGTAAGCTTTACCACATATATGTGTGCG
TCGATGGTTGCATACTGCTGAAATTAGCCAAAAGGGGCACACCCAGAACCCTAAAGTGGATTA
GGAACTTCACCAACTGTCCATTATGGGTAAGTAGTTGTTTCCCAACCATTCCTTATCCAGGC
CTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGG
AGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCT
CCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCA
ACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGACAGTTCC
TCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCC
TAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGA
CTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGATGACGCAC
TACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCC
TGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAATAATCTAGAGCTTAA

TTCT-3'

Tento ORF tedy kóduje fúzní protein znázorněný níže, kde proline v pozici 2 odpovídá prolinu v pozici 17 původního přírodního proteinu N^{pro} . Sekvence fúzního proteinu N^{pro} -hGH (344 aminokyselin, z toho 153 aminokyselin je N^{pro} a 191 aminokyselin je hGH) je následující (čteno ve směru od N-konce k C-konci), kde prolin 17 (pozice 2 fúzního proteinu) z přírodní sekvence N^{pro} je uveden kurzívou a sekvence hGH je vyznačena tučně:

MPVGVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTTLRDLPRKGDCRSGNHLGPV
SGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFCEVTKRIGRVTGSDGKLYHIYVCVDGCILL
KLAKRGTPRTLKWIRNFTNCPLWVTSCFPTIPLSRPFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYI
PKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN
SLVYGASDSNVYDLLKDLLEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGL
LYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

Fúzní protein má M_r 39316,92 (D) v redukovaném stavu, a po případném rozštěpení by část N^{pro} (redukovaná) měla M_r 17220,02 (D) a část hGH (redukovaná) by měla 22114,88 (D). N^{pro} obsahuje šest cysteinů a hGH čtyři. Je pravděpodobné, že v bakteriální cytoplazmě jsou tyto cysteiny většinou v redukované formě. V průběhu dalšího opracování dochází pravděpodobně alespoň k částečnému vytvoření disulfidických můstků. Je třeba předpokládat, že N-koncový methionin ve fúzním proteinu (nebo části N^{pro}) je většinou štěpen methioninaminopeptidázou (MAP) vlastní hostiteli, což by redukovalo M_r přibližně o 131 (D) na 39186 (D) (FP) a 17089 (D) (N^{pro}).

PCR fragment s popsaným strukturním genem pro FP byl purifikován a naštěpen XbaI, a dva produkty štěpení byly odděleny od cílového fragmentu. Tento fragment byl pak ligován do expresního vektoru p160TP1.

Vektor byl nejdříve linearizován štěpením XbaI a na 5'-konci defosforylován působením telecí intestinální fosfatázy (CIP). Pro ligaci byla užita T4 DNA ligáza. Ligovaná DNA byla vnesena elektroporací do buněk *Escherichia coli* K-12 DH10B a buňky pak byly nanесeny na plotny s LB ("Luria broth") agarem obsahujícím 15 mg/l tetracyklinu. Z této transformace vznikly četné kolonie. Plazmidová DNA byla izolována z několika klonů a byla vyšetřena restriční analýzou na přítomnost inzertu správné velikosti a orientace. Jeden klon byl vybrán a byla provedena jeho podrobná analýza a charakterizace restričními enzymy a sekvencováním. Plazmid odpovídal všem předchozím výpočtům a analýzám. Tento plazmid byl nazván pNPH1 a byl použit v další práci.

Sekvence N^{pro}-hGH expresního plazmidu pNPH1 (4840 bp) je uvedena níže. Start-kodon a stop-kodon fúzního proteinu N^{pro}-hGH jsou podtrženy. Otevřený čtecí rámec probíhá v opačné orientaci než jak je znázorněno v této formě.

5'-GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTT
AAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGG
CACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCG
GGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTT
GATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGT
CCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCT
GTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGG
CGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGC

TTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTT
GCATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCT
AATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAG
CTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCAT
GCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTG
GAGCGCGACGATGATCGGCCTGTGCTTGCGGTATTCGGAATCTTGACGCCCCTCGCTCAAGC
CTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGC
GGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCAT
TATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCA
GGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTC
GATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCCGCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTT
GGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATG
GAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACTACTCCA
AGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAAC
ATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCATCTCGGGCAGCGTTGGGTCC
TGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTCTGCTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGC
CTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAA
ACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAA
ACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTA
CCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTC
TGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGT
TCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATG
AACAGAAATTCCCCCTTACACGGAGGCATCAAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACA
TGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGG
ATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCC
TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAG
CTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCG
GGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTA
TGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATG
CGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC

GGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA
ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG
AAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCT
CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTT
TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC
TACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCTCGAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAA
TTTGATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCCTGCCCGCCACCCTCCGGGCGGTTGCTTCGCAA
CGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTACCCGACAAACAACAGA
TAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTGACTGAGCCTTTCGTTTTATTCTAGATTATTAGAAGCCAC
AGCTGCCCTCCACAGAGCGGCACTGCACGATGCGCAGGAATGTCTCGACCTTGTCCATGTCCT
TCCTGAAGCAGTAGAGCAGCCGTAGTTCTTGAGTAGTGCGTCATCGTTGTGTGAGTTTGTGT
CGAACTTGCTGTAGGTCTGCTTGAAGATCTGCCCAGTCCGGGGGCTGCCATCTTCCAGCCTCC
CCATCAGCGTTTGGATGCCTTCCTCTAGGTCCTTTAGGAGGTCATAGACGTTGCTGTCAGAGG
CGCCGTACACCAGGCTGTTGGCGAAGACACTCCTGAGGAACTGCACGGGCTCCAGCCACGACT
GGATGAGCAGCAGGGAGATGCGGAGCAGCTCTAGGTTGGATTTCTGTTGTGTTTCTCCTCGT
TGGAGGGTGTGCGAATAGACTCTGAGAAACAGAGGGAGGTCTGGGGGTCTGCAGGAATGAAT
ACTTCTGTTCTTTGGGATATAGGCTTCTTCAAACCTCCTGGTAGGTGTCAAAGGCCAGCTGGT
GCAGACGATGGGCGCGGAGCATAGCGTTGTCAAAGGCCTGGATAAGGGAATGGTTGGGAAAC
AACTAGTTACCCATAATGGACAGTTGGTGAAGTTCCTAATCCACTTTAGGGTTCTGGGTGTGC
CCCTTTTGGCTAATTTTACGAGTATGCAACCATCGACGCACACATATATGTGGTAAAGCTTAC
CATCACTACCCGTGACCCTGCCTATTCTCTTAGTCACCTCGCAGAACTGGGCCTCATCAAAGA

ACTCTAAAGGAGCTCTGTGATAGACTGGGCCCCGTGTAGTCCTGATAGTAGACAGGGCCGGGCT
 TTATGTATATCCCACCTAACCGGGCCTAGATGGTTGCCACTCCTACAGTCACCTTTCTGGGTA
 GGTCCCTCAGTGTGTTCTGATATCTCCTCTCCCCCTGTCGTGTGGCAGCTTCAGCGTTGATT
 GTGGGTGTACCTCACTTGGGTTCCCAAATAGTGGTCTCCCCGCGGTGTCATACACCGGTTCTT
 CCACTCCCCTGGCATAGAATTCTAGATACCCTTTTTACGTGAACTTGCGTACTAGTTAACTA
 GTTCGATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTTCAGAAATATTTGCCAGAACCGTTATGATGTCGGC
 GCAAAAAACATTATCCAGAACGGGAGTGCGCCTTGAGCGACACGAATTATGCAGTGATTTACG
 ACCTGCACAGCCATACCACAGCTTCCGATTGGCTGCCTGACGCCAGAAGCATTGGTGCACCGT
 GCAGTCGAGATGCGCGTCGGCACCCCTGGCGATCACCGACCATGACACCACAGCAT-3'

Hostitelský kmen *Escherichia coli* pro expresi fúzního proteinu N^{pro}-hGH byl vybrán na základě zvažení produktivity a biologické bezpečnosti. Kmen *Escherichia coli* K-12 je nejlépe charakterizovaná linie druhu *E. coli* (viz B.J. Bachmann; in: J.L. Ingraham et al., (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1987a), pp. 1191-1219; B.J. Bachmann 1987b; Barbara J. (1987b) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Vol. 2. Ed.: F. C. Neidhard. Am. Soc. Microbiol., Washington DC (1987b), 807-876; K.F. Jensen, *J. Bacteriol.* 175 (1993), 3401-3407) a je obecně považována za bezpečnou.

Escherichia coli K-12 W3110 (ATCC 27325) je prototropní derivát silně příbuzný s divokým typem *Escherichia coli* K-12 a je často využíván jako hostitelský kmen pro expresi heterologních proteinů. Byl uložen v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection, ATCC) a má následující genotyp:

[F⁻ mcrA mcrB IN(rrnD-rrnE)1 lambda⁻]

Kmen byl zakoupen ze sbírky ATCC. Jeho růst byl vynikající na plně syntetickém médiu bez komplexního zdroje dusíku a účinné řízení růstového procesu při průmyslovém zpracování je proto možné.

Expresní kmen W3110[pNPH1] byl připraven transformací již popsaneho expresního plazmidu pNPH1 do W3110. Transformace byla provedena elektroporací užitím 10% glycerolu jako média pro resuspendování. 50 ng (1 μ l) roztoku pNPH1 ve vodě bylo smícháno se 30 μ l suspenze buněk W3110 a pak podrobena pulzu 1800 V v 1 mm kyvetě (Eppendorf Electroporator 2510). Buňky pak byly resuspendovány v médiu SOC, třepány 1 hodinu ve 37°C a pak vysety na plotny s LB (Luria broth) agarem a 15 mg/l tetracyklinu. Z této transformace po inkubaci ve 37 °C (přes noc) vznikly četné klony.

Středně velké kolonie s odlišitelnými okraji byly odebrány a staly se základem pro expresní kmen W3110[pNPH1]. Klon byl kultivován a pak konzervován v kryoampulích v teplotě -80°C (hlavní buněčná banka, MCB, "master cell bank"). Pro běžnou denní práci byl kmen vždy nanesen na plotnu s LB agarem obsahujícím tetracyklin.

Kmen W3110[pNPH1] z jediné kolonie na agarové plotně byl použit pro inokulaci předkultury v LB médiu s tetracyklinem 15 mg/l (200 ml v 1 l kultivační láhvi s míchacími přepážkami). Předkultura byla třepána při 250 rpm ve 30 °C po dobu 14 hodin, kdy dosáhla OD_{600} přibližně 1,0. 10ml alikvot předkultury byl užit k inokulaci hlavní kultury (v 330 ml citrátového média v 1 l kultivační láhvi s míchacími přepážkami) (3% inokulum). Hlavní kultura pak byla kultivována ve 37 °C (250 rpm) až do dosažení OD_{600} 0,8, kdy byla indukována produkce fúzního

proteinu přidáním 50 µg indolylakrylové kyseliny na 1 ml kultury (výsledná koncentrace, zásobná roztok byl 5 mg/ml ve 100 % ethanolu analytické čistoty). Kultury byly dále kultivovány 4 hodiny, ve 37 °C při 250 rpm dokud nebylo dosaženo OD₆₀₀ 1,5 až 3,0.

Kultury pak byly přeneseny do sterilních 500 ml centrifugačních lahví a centrifugovány 30 minut při 10,000 g. Supernatant po centrifugaci byl odstraněn a pelety byly zamraženy v -80 °C až do dalšího zpracování.

Přibližně 12 g (čerstvá hmotnost) peletu buněk BL12 1(DE3) bylo resuspendováno ve 30 ml 50 mM Tris/HCl, 5 mM benzamidinu, pH 8,0 a homogenizováno užitím mixéru Ultraturrax. Po přidání 0,5 mM EDTA a 0,1 % (hmot./obj.) lysozymu, byla buněčná suspenze inkubována 30 minut v ledové lázni. Následné ošetření ultrazvukem (7 x 20 sekund, s 20 přestávkami po 20 sekundách) vedlo k úplnému rozpadu buněk. Pak bylo k suspenzi přidáno 10 mM MgCl₂ a 0,006 % (hmot./obj.) DNázy a suspenze se inkubovala ve 4 °C po 30 minut. Nerozpustné a rozpustné složky byly pak odděleny centrifugací (JA 20; 7700g). Pelet byl suspendován ve 40 ml 50 mM Tris/HCl, 5 mM benzamidinu, 5 mM EDTA, pH 8,0 a znovu centrifugován (JA 20; 7700g). Tento krok byl opakován ještě dvakrát a vzniklý pelet byl suspendován ve 40 ml 20 mM Tris/HCl, pH 7,0. K suspenzi bylo přidáno 20 mL 1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, pH 7,0 a suspenze se inkubovala 30 minut v ledové lázni. Nakonec byla provedena další centrifugace (JA 20; 7700g) a promytí vodou. Vzniklý pelet představuje materiál inkluzních tělísek N^{pro}-hGH (IB N^{pro}-hGH).

Po té následovalo rutinní resuspendování přibližně 100 mg IB materiálu ve 2 ml 6,0 M guanidinhydrochloridu,

0,1 M Tris, 5 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 9,0 po 30 minut při teplotě místnosti. Nerozpustné složky pak byly odstraněny centrifugací (10 minut/30000 g). Stanovení proteinu se pak provedlo v získaném supernatantu (koncentrace proteinu přibližně 20 mg/ml). Solubilizát takto připravený byl buďto ihned použit k testům štěpení nebo byl uschován při teplotě -20°C (nejdéle po 7 dnů).

Příklad 2

Štěpení inkluzních tělísek fúzních proteinů v různých podmínkách

Odštěpení části N^{pro} bylo umožněno v principu naředěním solubilizátu 1:100 (nebo větším) ve štěpicím pufru (reziduální koncentrace guanidinhydrochloridu $\leq 0,06$ M). Koncentrace proteinu byla rutinně 20 μ g/ml (případné výjimky jsou zvýrazněny).

Dále bylo možné dosáhnout štěpení části N^{pro} dialýzou (1:100) solubilizovaného materiálu proti štěpicímu pufru.

Rozsah odštěpení N^{pro} části může být určen detekcí produktů štěpení užitím SDS-PAGE. Po ukončení SDS-PAGE je gel fotografován a měří se intenzita příslušných pásů. Příslušné pásy se identifikují pomocí Western blotu v předběžných testech.

Příklad 2.1

In vitro štěpení N^{pro}-hGH argininem

Štěpení probíhalo při ředění (1:100) solubilizátu ve

štěpicím pufru (20 mM tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0 a určitá koncentrace argininu) při teplotě místnosti. Koncentrace proteinu ve štěpné směsi byla 20 $\mu\text{g/ml}$. Rozsah štěpení byl stanoven po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

Ukázalo se, že účinnost štěpení N^{pro} může být významně zvýšena přidavkem argininu do štěpicího pufru. Maximum štěpení probíhalo při koncentraci argininu 0,4 až 0,6 M.

Příklad 2.2

Vyštěpení N^{pro} z N^{pro} -hGH argininem při různých teplotách

Štěpení probíhalo při ředění (1:100) solubilizátu ve štěpicím pufru (20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0, 0 až 1,0 M arginin) vždy při dané teplotě. Koncentrace proteinu ve štěpné směsi byla 20 $\mu\text{g/ml}$. Rozsah štěpení byl stanoven po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

Ukázalo se, že největší štěpení probíhalo při teplotách mezi 10 a 20 °C.

Příklad 2.3

Míra vyštěpení N^{pro} z N^{pro} -hGH jako funkce pH při různých teplotách

Štěpení probíhalo při ředění (1:100) solubilizátu ve štěpicím pufru (20 mM tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0, 0,5M arginin) vždy při daném pH. Koncentrace proteinu ve štěpné směsi byla 20 $\mu\text{g/ml}$. Rozsah štěpení byl stanoven po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

pH štěpicího pufru se systematicky měnilo od 5,0 do 9,0. Ukázalo se, že při použité koncentraci argininu bylo optimum pH pro štěpení fúzního proteinu N^{pro} -hGH 7,0 až 7,5.

Příklad 2.4

Vyštěpení N^{pro} z N^{pro}-hGH při různých koncentracích DTT

V tomto pokuse se zkoumala závislost účinnosti štěpení na koncentraci DTT.

Štěpení probíhalo při ředění (1:100) solubilizátu ve štěpicím pufru (20 mM tris/HCl, 2 mM EDTA, , pH 7,0, 0,5M arginin, 0 až 100mM DTT, 15 °C). Vzhledem k přítomnosti DTT v solubilizátu i varianta "0 DTT" obsahovala 0,5mM DTT. Koncentrace proteinu ve štěpné směsi byla 20 µg/ml. Rozsah štěpení byl stanoven po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

Maximálního štěpení bylo dosaženo při koncentraci 5,5M DTT.

Příklad 2.5

Vliv různého pH solubilizátu na štěpení N^{pro}-hGH

Štěpení probíhalo při ředění (1:100) solubilizátu při různých pH (pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0) ve štěpicím pufru (20 mM tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0, 0 až 0,8M arginin, 15 °C). Hodnoty pH byly upraveny titrací solubilizačního pufru na požadované pH před smícháním s IB. Koncentrace proteinu ve štěpné směsi byla 20 µg/ml. Rozsah štěpení byl stanoven po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

Ukázalo se, že pH optimum solubilizátu je 7,0 až 8,0.

Příklad 2.6

Kinetika vyštěpení N^{pro} z N^{pro}-hGH

Reaktivace denaturovaného N^{pro}-hGH byla zahájena naředěním (1:100) v 20 mM Tris/HCl, 0,5 M arginin, 2 mM EDTA,

10 mM DTT, pH 7,0, při 15°C.

Ukázalo se, že konce štěpení bylo dosaženo po 24 hodinách.

Příklad 2.7

Vyštěpení N^{pro} z N^{pro}-hGH ředěním při různých koncentracích proteinu

Štěpení probíhalo naředěním (1:100) solubilizátu ve štěpicím pufru (20 mM Tris/HCl, 0,5M arginin, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0, 15 °C). Kontrola štěpení byla provedena po 24 hodinách detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE.

Ukázalo se, že koncentrace protein vyšší ≥ 40 $\mu\text{g/ml}$ vedla k významnému snížení účinnosti štěpení. Další testy ukázaly, že optimální koncentrace proteinu je 20-40 $\mu\text{g/ml}$.

Příklad 2.8

Vyštěpení N^{pro} z N^{pro}-hGH dialýzou v závislosti na koncentraci proteinu

Ze solubilizovaného N^{pro}-hGH IB materiálu byl odstraněn guanidinhydrochlorid dialýzou (1:100) proti pufru (20 mM Tris/HCl, 0,5M arginin, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,0, 4 °C) a tím bylo zahájeno štěpení. Po 24 hodinách bylo detekcí štěpných produktů užitím SDS-PAGE stanoveno, zda došlo ke štěpení.

Ukázalo se, že odštěpení části N^{pro} lze dosáhnout nejen naředěním, ale také dialýzou solubilizovaného materiálu.

Příklad 2.9

Účinnost vyštěpení N^{pro} z N^{pro} -hGH v závislosti na koncentraci Tris/HCl

Štěpení probíhalo ředěním (1:100) solubilizátu ve štěpicím pufru (2 mM EDTA, 20 mM DTT, pH 7,0, 0,1 až 1,0 M Tris/HCl, 15 °C). Kontrola štěpení byla provedena po 24 hodinách detekcí produktů pomocí SDS-PAGE.

Ukázalo se, že zvyšující se koncentrace Tris/HCl v pufru až do 0,8 M zlepšovala výtěžek štěpení N^{pro} z fúzního proteinu. Zvýšení nad tuto hodnotu nevedlo k žádnému měřitelnému zlepšení N^{pro} štěpení.

Je proto výhodné, aby reakce probíhala při koncentraci Tris/HCl 0,8-1,0 M.

Příklad 3

Exprese a *in vitro* štěpení N^{pro} -pGH (prasečí růstový hormon)

Příprava expresního vektoru N^{pro} -pGH začala od pNPH1 (viz Příklad 1). Plazmid byl linearizován BglII a amplifikován pomocí PCR. Tím bylo možné amplifikovat celý plazmid kromě úseku strukturního genu hGH (od kodonu pro Phe1 ke kodonu pro Phe191) užitím Pwo polymerázy a oligonukleotidových primerů bez 5'-fosfátu. Purifikovaný PCR fragment byl užit jako vektor pro ligaci se strukturním genem pGH. Odstranění 5'-fosfátu (například užitím telecí intestinální fosfatázy nebo alkalické fosfatázy arktických garnátů) zabraňuje cirkularizaci self-ligací.

Strukturní gen pGH byl podobně připraven PCR

amplifikací. Jako templát byla použita cDNA knihovna prasete (např. "5'-stretch" cDNA knihovna z prasečích jater od firmy Clontech nebo cDNA knihovna z prasečího mozku nebo štítné žlázy). Pro amplifikaci byly užity následující primery, které byly v průběhu syntézy opatřeny 5'-fosfátovou skupinou:

Přední konec (odpovídající N-konci proteinu) strukturního genu (Phe1 až Ser7):

5'- TTC CCA GCC ATG CCC TTG TCC -3'

Zadní konec (odpovídající C-konci proteinu) strukturního genu (Phe190 to Val184):

5'- GAA GGC ACA GCT GCT CTC CAC -3'

PCR fragment obsahuje pouze ORF (strukturní gen) zralého pGH. Ligací (užitím T4 DNA ligázy) se vytvořil ORF pro N^{pro}-pGH analogický výše popsanému pNPH1. Fúzní protein dále popsaný je kódován tímto ORF. Ligovaná DNA byla vložena elektroporací do buněk *Escherichia coli* K-12 DH10B (elektrokompetentní buňky od firmy Life Technologies, genotyp *Escherichia coli* K-12 F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG), které byly vysety na LB agarové plotny s 15 mg/l tetracyklinu. Tato transformace poskytla mnoho klonálních kolonií. Z několika klonů byla izolována plazmidová DNA a vyšetřena restriční analýzou na přítomnost inzertu správné velikosti a orientace. Jeden klon byl vybrán a podrobně charakterizován restriční analýzou a sekvencováním DNA. Plazmid odpovídal očekávání. Byl označen pNPP1 a použit pro další práci.

V následující aminokyselinové sekvenci (čtena ve směru

od N-konce k C-konci) fúzního proteinu N^{pro}-pGH (celkem 342 aminokyselin, z toho 153 aminokyselin odpovídá N^{pro} a 189 aminokyselin odpovídá pGH) je prolin 17 (poloha 2 ve fúzním proteinu) z přírodní sekvence N^{pro} vyznačen kurzívou a sekvence pGH je vyznačena tučně.

MPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTTLRDLPRKGDCRSGNHLGPV
SGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFCEVTKRIGRVTGSDGKLYHIYVCVDGCILL
KLAKRGTPRTLKWIRNFTNCPLWVTSCFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYI
PEGQRYSIQNAQAACFSETIPAPTGKDEAQQRSVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRVFTNSL
VFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDALLKNYGLLSC
FKKDLHKAETYLVRVMKCRRFVESSCAF

FP v redukovaném stavu má M_r 38819,82 (D), a po případném rozštěpení by část N^{pro} (redukována) měla M_r 17220,02 (D) a část pGH (redukována) by měla 21617,79 (D). N^{pro} obsahuje šest cysteinů a pGH čtyři. Je pravděpodobné, že v bakteriální cytoplazmě jsou tyto cysteiny většinou v redukované formě. V průběhu dalšího opracování dochází pravděpodobně alespoň k částečnému vytvoření disulfidických můstků. Je třeba předpokládat, že N-koncový methionin ve fúzním proteinu (nebo části N^{pro}) je většinou štěpen methioninaminopeptidázou (MAP) vlastní hostiteli, což by redukovalo M_r přibližně o 131 (D) na 38689 (D) (FP) a 17089 (D) (N^{pro}).

Expresní kmen W3110[pNPP1] byl připraven jak bylo popsáno v Příkladu 1 transformací (elektroporací) expresního plazmidu pNPP1 do *Escherichia coli* K-12 W3110. Ani v tomto případě detailní charakterizace neodhalila žádné odchylky od očekávaného restrikčního profilu.

Středně velká kolonie s odlišitelnými okraji byla odebrána a stala se základem pro expresní kmen W3110[pNPH1]. Klon byl kultivován a pak konzervován v kryoampulích v teplotě -80°C (hlavní buněčná banka, MCB, "master cell bank"). Pro běžnou denní práci byl kmen vždy nanesen na plotnu s LB agarem obsahujícím tetracyklin.

Expresa fúzního proteinu N^{pro} -pGH probíhala stejně jak bylo popsáno v Příkladu 1 pro fúzní protein N^{pro} -hGH.

Příprava N^{pro} -pGH IB se prováděla stejně jak bylo popsáno v Příkladu 1 pro fúzní protein N^{pro} -hGH.

Příklad 4

In-vitro vyštěpení N^{pro} z N^{pro} -pGH

Solubilizační a renaturační testy odpovídající testům popsaným výše pro N^{pro} -hGH byly provedeny také pro fúzní protein N^{pro} -pGH. Po variaci různých parametrů (jak bylo výše popsáno) bylo zjištěno, že *in-vitro* odštěpení části N^{pro} z fúzního proteinu N^{pro} -pGH bylo i v tomto případě možné po solubilizaci a renaturaci.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob rekombinantní produkce heterologního polypeptidu v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy

(I) kultivují se buňky bakteriálního hostitelského kmene, který je transformován expresním vektorem obsahujícím molekulu nukleové kyseliny, která kóduje fúzní protein, který obsahuje první polypeptid, který má autoproteolytickou funkci autoproteázy N^{pro} z pestiviru, a druhý polypeptid, který je navázán na první polypeptid na C-konci prvního polypeptidu takovým způsobem, že druhý polypeptid může být odštěpen z fúzního proteinu autoproteolytickou aktivitou prvního polypeptidu, přičemž druhý polypeptid je heterologní polypeptid, a kultivace probíhá v takových podmínkách, které vedou k expresi fúzního proteinu a vytvoření odpovídajících cytoplazmatických inkluzních tělísek,

(II) izolují se inkluzní tělíška z hostitelských buněk,

(III) solubilizují se izolovaná inkluzní tělíška,

(IV) solubilizát se naředí, čímž vznikne reakční roztok, ve kterém dojde k autoproteolytickému vyštěpení heterologního polypeptidu z fúzního proteinu, a

(V) izoluje se vyštěpený heterologní polypeptid.

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pestivirus je vybrán ze skupiny obsahující CSFV, BDV a BVDV.

3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e

t í m, že pestivirus je CSFV.

4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že první polypeptid obsahuje následující aminokyselinovou sekvenci:

(1) -MELNHFELLYKTSKQKPVGVVEEPVYDTAGRPLFGNPSEVHPQSTLKLPHDRGRGDIRTT
LRDLPRKGDCRSNGHLGPVSGIYIKPGPVYYQDYTGVPVYHRAPLEFFDEAQFCEVTKRIGRVT
GSDGKLYHIYVCVDGCILLKLA KRGT PRTLKWIRNFTNCPLWVTSC- (168),

nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou.

5. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že první polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci od Glu22 do Cys168 z autoproteázy N^{pro} z CSFV nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou, přičemž první polypeptid má Met jako N-konec, a heterologní polypeptid je přímo navázán na aminokyselinu Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV.

6. Způsob podle nároku v y z n a č u j í c í s e t í m, že první polypeptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci od Pro17 do Cys168 z autoproteázy N^{pro} z CSFV nebo její derivát s autoproteolytickou aktivitou, přičemž první polypeptid má Met jako N-konec, a heterologní polypeptid je přímo navázán na aminokyselinu Cys168 autoproteázy N^{pro} z CSFV.

7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekula nukleové

kyseliny je molekula DNA.

8. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7
v y z n a č u j í c í s e t í m, že expresní vektor je
plazmid.

9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8
v y z n a č u j í c í s e t í m, že bakteriální hostitelské
buňky jsou buňky *E. coli*.