

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 -214

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

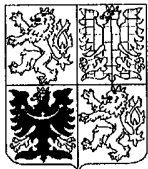
C 12 N 15/70

C 12 N 15/72

C 12 N 15/24

C 07 K 14/54

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.01.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.01.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/99100967**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(71) Přihlašovatel:

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, Leverkusen, DE;

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Plasmidy, jejich konstrukce a jejich využití ve
výrobě interleukinu -4 a muteinů interleukinu-4**

(57) Anotace:

Konstrukce a využití expresních plasmidů ve výrobě
rekombinantního interleukinu-4 (IL-4) a muteinů interleukinu-
4.

CZ 2000 - 214 A3

PLASMIDY, JEJICH KONSTRUKCE A JEJICH VYUŽITÍ VE VÝROBĚ INTERLEUKINU-4 A MUTEINŮ INTERLEUKINU-4.

Oblast techniky

Vynález se týká konstrukce a použití expresních plasmidů ve výrobě rekombinantního interleukinu-4 (IL-4) a muteinů interleukinu-4.

Dosavadní stav techniky

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

Dvojitý mutein interleukinu-4 (IL-4 DM) je varianta IL-4 s dvěma změnami aminokyselin v pozicích 121 a 124 nazvaná IL-4 R121D Y124D. IL-4 DM je schopen blokovat obě aktivity IL-4 a IL-13. Na rozdíl od všech bodových mutantů žádné zbytkové agonistické aktivity nebyly pro tento mutein nikdy nalezeny. Má se za to, že tyto antagonistické vlastnosti IL-4 DM jsou užitečné pro léčbu onemocnění, která

zahrnují vývoj T_{H2} a/nebo produkci IgE (Ryan, J. *Allergy Clin. Immunol.* 99, 1 - 5, 1997).

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

Hlavní kritéria pro účinný a bezpečný expresní systém jsou:

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

Několik aspektů expresního plasmidu je důležitých pro výše uvedená kritéria (Hannig a kol., *TIBTECH.* 16, 54 - 60, 1998). Jsou to:

- promotor
- ribosomální vazebné místo (rbs)
- využití kodónu příslušného genu
- transkripční terminátor
- gen pro rezistenci
- regulace exprese
- počátek replikace (ori).

Podstata vynálezu

Podle vynálezu byly vytvořeny expresní plasmidy pro IL-4 a muteiny IL-4 s modifikacemi ve všech příslušných elementech pro účinný a bezpečný expresní systém. Kvalita

a vhodnost příslušného expresního systému byla klasifikována zejména podle následujících kritérií:

- výtěžek IL-4 a muteinů IL-4
- stabilita plasmidu
- udržení indukční schopnosti.

Předmětem tohoto vynálezu je proto vytvoření metody pro konstrukci na použití expresního plasmidu pro výrobu rekombinantního interleukinu-4 (IL-4) a muteinů interleukinu-4 ve velkém měřítku. Navíc by měl nově vytvořený systém hostitele/vektoru být vhodný pro expresi dalších proteinů (cytokinů, růstových faktorů, rozpustných receptorů, protilátek atd.). Překvapivě bylo zjištěno, že bakterie transformované plasmidem podle tohoto vynálezu poskytují mnohonásobně větší rychlosti exprese a stabilitu plasmidu a exprese než bylo pozorováno po transformaci stejného hostitele jinými známými plasmidy. Proto je použití plasmidů dle tohoto vynálezu mnohem výhodnější pro produkci rekombinantního interleukinu-4 a muteinů interleukinu-4 ve srovnání se všemi dříve známými plasmidy.

Nově vyvinutý vektorový systém obsahuje následující prvky:

T5 promotor

Promotor bakteriofága T5 *E. coli* společně se dvěma *lac* operátorovými sekvencemi je odvozen z plasmidu pQE30 (Qiagen), náležícího do skupiny plasmidů pDS (Bujard a kol., *Methods Enzymol.* 155, 416 - 433, 1987 a Stüber a kol., *Immunological Methods*, I. Lefkowitz and B. Pernis, eds., *Academic Press, Inc. Vol. IV*, 121 - 152, 1990).

T7 g10 ribosomální vazebné místo

Vazebné místo ribosomu (rbs) je odvozeno z oblasti před genem 10 bakteriofága T7 (T7g10 vedoucí sekvence). Gen 10 fága T7 kóduje plášťový protein, který je hlavním proteinem exprimovaným po infekci fágem T7. T7 g10 rbs byl získán z vektoru pET-9a (Studier a kol., *Methods Enzymol.* 185, 60 - 89, 1990). T7 g10 vedoucí sekvence zahrnuje oblast okolo 100 bp (Olins et al., *Gene* 227 - 235, 1988). Ve finálním expresním konstruktu je oblast před XbaI místem odstraněna. T7 g10 vedoucí sekvence nyní tedy zahrnuje 42 bp a obsahuje záměnu jedné báze z G na A v pozici 3638 v tomto zde popisovaném plasmidu.

Využití kodónů přirozené sekvence IL-4

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

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

Transkripční terminátor

Fragment z T7 DNA obsahující transkripční terminátor T_ø je odvozen z vektoru pET-9a (*Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 - 89, 1990*). Transkripční terminátory určují místa, kde komplex mRNA - RNA polymerasa - DNA disociuje a tím končí transkripce. Přítomnost transkripčního terminátoru na konci vysoce exprimovaného genu má několik výhod: minimalizují nedostupnost RNA polymerasy, která by byla zahrnuta v nadbytečné transkripci, omezují délku mRNA na minimální potřebnou délku a tím omezuje výdej energie. Vzhledem k tomu, že silná transkripce by mohla interferovat s počátkem replikace, zvyšuje terminátor transkripce stabilitu plasmidu prostřednictvím udržení počtu kopií (*Balbas a Bolivar, Methods Enzymol. 185, 14 - 37, 1990*).

Gen kódující resistenci

Gen kanamycinové resistance je odvozen z vektoru pET-9a (*Studier a kol., Methods Enzymol. 185, 60 - 89, 1990*). Původně se jedná o *kan* gen Tn903 z vektoru pUC4KISS (*Barany, Gene 37, 111 - 123, 1985*). Ve zde popisovaném plasmidu je *kan* gen v opačné orientaci než geny pro IL-4 a mutein IL-4, takže nedochází ke zvýšení množství produktu

kan genu po indukci v důsledku pročtení terminátoru transkripce z T5 promotoru. Kanamycin byl vybrán jako selekční marker neboť je preferovaným antibiotikem pro GMP-účely. Navíc jsou vektory založené na rezistenci ke kanamycinu stabilnější než plasmidy s ampicilinovou (*bla*) rezistencí. Selektce na ampicilinu má tendenci ke ztrátám neboť tato látka je degradována sekretovaným enzymem: β -laktamasou. Způsob bakteriální rezistence ke kanamycinu závisí na aminoglykosidové fosfotranferase, která inaktivuje antibiotikum.

Regulace exprese

Kontrolovaná genová exprese je absolutně nezbytná pro nastavení stabilního plasmidového systému, obzvláště, je-li požadovaný protein zhoubný pro hostitelské buňky. Výhodný plasmid podle předmětného vynálezu využívá indukovatelný systém založený na *lac* systému sestávajícího z genu pro *lac* represor (*lacI*) a dvou syntetických sekvencí *lac* operátoru předcházejících ve fúzi promotor bakteriofága T5 *E. coli*. Promotor *lacI*^Q a strukturní gen *lacI* byl izolován z vektoru pTrc99A (Amman et al., Gene 69, 301 - 315, 1988). *I*^Q představuje promotorovou mutaci vedoucí k nadprodukcí *lacI* represoru. *Lac* represor standardního typu je tetramerní molekula sestávající ze čtyř identických podjednotek o 360 aminokyselinách, každá. Tetramer *lac* represoru je dimerem dvou funkčních dimerů. Čtyři podjednotky jsou drženy pohromadě svazkem čtyř helixů tvořených zbytky 340-360. Při izolaci *lacI* genu z vektoru pTrc99A pomocí štěpu *NarI* byly zbytky za aminokyselinou 329 odstraněny a 10 aminokyselin které nejsou normálně kódovány *lacI* genem bylo přidáno. Je známo, že mutace nebo delece probíhající v C-terminální části *lacI*, za aminokyselinou 329, poskytují funkční dimery

které se jeví jako fenotypově podobné standardnímu represoru (Pace a kol., *TIS* 22, 334 - 339, 1997).

Počátek replikace (ori)

Počátek replikace (ori) zde popisovaného plasmidu je odvozen z vektoru pET-9a, jehož ori pochází z pBR322. Výhodná plasmid podle předmětného vynálezu proto nese pMB1 (ColEI) replikon. Plasmidy s tímto replikonem jsou mnohakopiové plasmidy, které se replikují "relaxovaným" způsobem. Minimálně 15 - 20 kopií plasmidu je udržováno v každé bakteriální buňce za normálních růstových podmínek. Běžný počet zde popisovaného plasmidu je v tomto rozmezí. Replikace počátku replikace ColEI-typu je iniciována 555-nukleotidovým transkriptem RNA, RNAII, který tvoří stabilní hybrid se svým DNA templátem poblíž ori. Hybrid RNAII-DNA je poté štěpen RNasou H v ori za vzniku volného 3'OH, který slouží jako primer pro DNA polymerasu I. Tato iniciace syntézy DNA je negativně regulována RNA I, což je 108-nukleotidová molekula RNA komplementární k 5' konci RNA II. Interakce antisense RNA I s RNA II způsobuje konformační změnu RNA II, která inhibuje vazbu RNA II k DNA templátu a následně zabraňuje iniciaci syntézy plasmidové DNA. Vazba mezi RNA I a II je zvýšena malým proteinem o velikosti 63 aminokyselin (Rop proteinem, Represor of primera), který je kódován genem umístěným 400 nukleotidů po směru transkripce od počátku replikace (Sambrook a kol., *Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989*). Delece *rop* genu vede ke zvýšení počtu kopií a prostřednictvím zvýšení množství genu ke zvýšení hladiny exprese heterologních genů kódovaných plasmidem. Toto zjištění bylo rovněž učiněno v případech zkoušených expresních vektorů pro IL-4. Ale ukázalo se, že *rop*⁻-plasmidy jsou nestabilní a při fermentaci za

neselektivních podmínek dochází k jejich ztrátě. Proto obsahuje replikon zde popisovaného plasmidu *rep* gen pro zajištění vysoké stability plasmidu. V popisu předmětného vynálezu popisovaný plasmid postrádá *mob* gen, který je nutný pro mobilizaci a proto není schopen řídit svůj vlastní konjugační přenos z jedné bakterie do jiné.

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

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

Metody použité během vývoje expresního systému jsou uvedeny níže.

Materiály a metody

Enzymy

Restrikční endonukleasy, alkalická fosfatasa z telecího střeva, T4 polynukleotid kinasa a T4 DNA ligasa byly získány od firmy Boehringer Mannheim a GIBCO-BRL a byly

použity dle doporučení dodavatele.

Metody práce s rekombinantní DNA

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

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

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

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

5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAA3' (Sekv. 1)

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

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

Přehled obrázků na výkresech

OBR.1 až OBR. 4:

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

OBR.5:

Plasmidová stabilita expresních vektorů muteinu IL-4 pRO21.1.0 a pRO.2.1.0. Vektor pRO2.1.0 zůstává zcela stabilní přes 78 generací bez selekce antibiotiky. Na rozdíl od tohoto je expresní vektor pRO21.1.0, který je založen na komerčně dostupném plasmidu pET-30a (Novagen), ztracen velmi rychle. Pouze 16 % kolonií obsahuje plasmid po 78 generacích bez kanamycinové selekce.

OBR.6:

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

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Test stability plasmidu

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

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

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

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

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

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

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

Příklad 2

Exprese

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

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

SEKVENCE

<110> Bayer AG

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

<130> Plasmidy pro muteiny IL-4

<160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> neznámý

<220>

<223> Popis neznámého organismu: primer

<400> 1

tcaattgtga gcggataaca atttcacaca tctagaata atttgтта actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNA

<213> Neznámý

<220>

<223> Popis neznámého organismu: Člověk

<400> 2

ttagaaaaac	tcatcgagca	tcaaatgaaa	ctgcaattta	ttcatatcag	gattatcaat	60
accatatttt	tgaaaaagcc	gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca	120
taggatggca	agatcctggg	atcggctctg	gattccgact	cgtccaacat	caatacaacc	180
tattaatttc	ccctcgtcaa	aaataagggt	atcaagttag	aatcaccat	gagtgacgac	240
tgaatccggg	gagaatggca	aaagcttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	300
gccattacgc	tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaacccaa	ccgttattca	ttcgtgattg	360
cgcctgagcg	agacgaaata	cgcgatcgc	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	420
atgcaaccgg	cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	480
ttcttcta	acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcatc	540
atcaggagta	cggataaaat	gcttgatggg	cggaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	600
tagtctgacc	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcga	cctttgccat	gtttcagaaa	660
caactctggc	gcatcgggct	tcccatacaa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgcg	720
attatcgcga	gcccatttat	acccatataa	atcagcatcc	atgttgggat	ttaatcgcgg	780
cctcgagcaa	gacgtttccc	gttgaatatg	gctcataaca	ccccttgat	tactgtttat	840
gtaagcagac	agttttattg	ttcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	900
gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaa	gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	960
taatctgctg	cttgcaaaaca	aaaaaaccac	cgtaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	1020
aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	1080
ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	1140
catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	1200
ttaccggggt	ggactcaaga	cgatagttac	cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaacgg	1260
ggggttcgtg	cacacagccc	agcttggagc	gaacagacct	caccgaactg	agatacctac	1320
agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	ccgaaggagg	aaaggcggac	aggtatccgg	1380
taagcggcag	ggtcggaaaca	ggagagcgc	cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	1440

atctttatag	tctctgctggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	1500
cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	1560
ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	ttcctgctgt	atccccgat	tctgtggata	1620
accgtattac	cgcttttgag	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	1680
gcgagtcagt	gagcgaggaa	gcggaagagc	gcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcac	1740
tgtgctggtat	ttcacaccgc	aatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	1800
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtagactggg	tcatggctgc	gccccgacac	1860
ccgccaacac	ccgctgacgc	gcectgacgg	gcttgtctgc	tccccgcac	cgcttacaga	1920
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	1980
cgcgcgaggg	agctgoggtta	aagctcatca	gcgtggctcgt	gaagcgattc	acagatgtct	2040
gcctgttcat	ccgctccag	ctcgttgagt	ttctccagaa	gcgttaatgt	ctggcttctg	2100
ataaagcggg	ccatgttaag	ggcggttttt	tctctgtttgg	tactgatgac	ctccgtgtaa	2160
gggggatttc	tgttcatggg	ggtaatgata	ccgatgaaac	gagagaggat	gctcacgata	2220
cggtttactg	atgatgaaca	tgcccgggta	ctggaacggt	gtgagggtaa	acaactggcg	2280
gtatggatgc	ggcgggacca	gagaaaaatc	actcagggtc	aatgccagcg	ctcatgagcc	2340
cgaagtggcg	agcccgatct	tccccatcgg	tgatgtcggc	gatataggcg	ccagcaaccg	2400
cacctgtggc	gccggtgatg	ccggcccacga	tgegtccggc	gtagaggatc	gagatccatt	2460
tacgttgaca	ccatcgaatg	gtgcaaaacc	tttcgcggtta	tggaatgata	gcgcccggaa	2520
gagagtcaat	tcagggtggt	gaatgtgaaa	ccagtaacgt	tatacagatg	cgagagat	2580
gcccgtgtct	cttatcagac	cgtttcccgc	gtggtgaacc	aggccagcca	cgtttctgcg	2640
aaaaacgccc	aaaaagtgga	agcggcgatg	gcggagctga	attacattcc	caaccgctg	2700
gcacaacaac	tggcgggcaa	acagtctgtg	ctgatggcg	ttgccacctc	cagtctggcc	2760
ctgcacgcgc	cgtcgcaaat	tgtcgcggcg	attaaatctc	gcgcccgatca	actgggtgcc	2820
agcgtggtg	tgtcagatggt	agaacgaagc	ggcgtcgaag	cctgtaaagc	ggcgggtgcac	2880
aatcttctcg	cgcaacgcgt	cagtgggctg	atcattaact	atccgctgga	tgaccaggat	2940
gccattgctg	tggaagctgc	ctgcactaat	gttccggcgt	tatttcttga	tgtctctgac	3000
cagacaccca	tcaacagtat	tattttctcc	catgaagacg	gtaccgcact	gggctgtggag	3060
catctggtcg	cattgggtca	ccagcaaatc	gcgctgttag	cgggcccatt	aagttctgtc	3120
tcggcgcgct	tgcgtctggc	tggctggcat	aaatatctca	ctcgcaatca	aattcagccg	3180
atagcggaac	gggaaggcga	ctggagtggc	atgtccgggt	ttcaacaaac	catgcaaatg	3240
ctgaatgagg	gcatcgttcc	cactgcgatg	ctgggttgcca	acgatcagat	ggcgtctggc	3300
gcaatgocgc	ccattaccga	gtccgggctg	cgctgtggg	cggatatctc	ggtagtggga	3360
tacgacgata	ccgaagacag	ctcatgttat	atcccgccgt	taaccacat	caaacaggat	3420
tttcgcctgc	tggggcaaac	cagcgtggac	cgcttctctc	aactctctca	gggccaggcg	3480
gtgaagggca	atcagctggt	gcccgtctca	ctggtgaaaa	gaaaaaccac	cctggctcga	3540
gaaatcataa	aaaatttatt	tgctttgtga	gcggataaca	attataatag	attcaattgt	3600
gagcggataa	caatttcaca	catctagaaa	taattttatt	taactttaag	aaggagatat	3660
acatatgcac	aaatgcgata	tcacctgca	ggaaatcctc	aaaaccctga	attctctgac	3720
cgaacagaaa	accctgtgca	ccgaactgac	cgttaccgac	atcttcgctg	cttcgaaaaa	3780
caccaccgaa	aaagaaacct	tctgcccgtg	tgctaccggt	ctgcgtcagt	tctactctca	3840
ccacgaaaaa	gacacccggt	gocctgggtg	taccgctcag	cagttccacc	gtcacaacaa	3900
gctgatccgt	ttcctgaaac	gtctggaccg	taacctgtgg	ggtctggctg	gtctgaacag	3960
ctgcccgggt	aaagaagcta	accagtctac	cctggaaaaac	ttcctggaac	gtctgaaaaac	4020
catcatggac	gaaaaagact	ctaaatgctc	ttcttaataa	ggatccggct	gctaacaaaag	4080
cccgaagga	agctgagttg	gctgctgcca	ccgctgagca	ataactagca	taaccctctg	4140
gggcctctaa	acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaagg	aggaactata	tccggataat	4200
tc						4202

DR. MILOŠ VŠETEČKA
advokát
120 00 PRAHA 2, HÁKOVA 2

PV1000-214

~~16648~~

P A T E N T O V É N Á R O K Y

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

2. *E. coli* /pRO2.1.0

3. *Escherichia coli* transformovaná jedním nebo více plasmidy nároků 1 nebo 2.

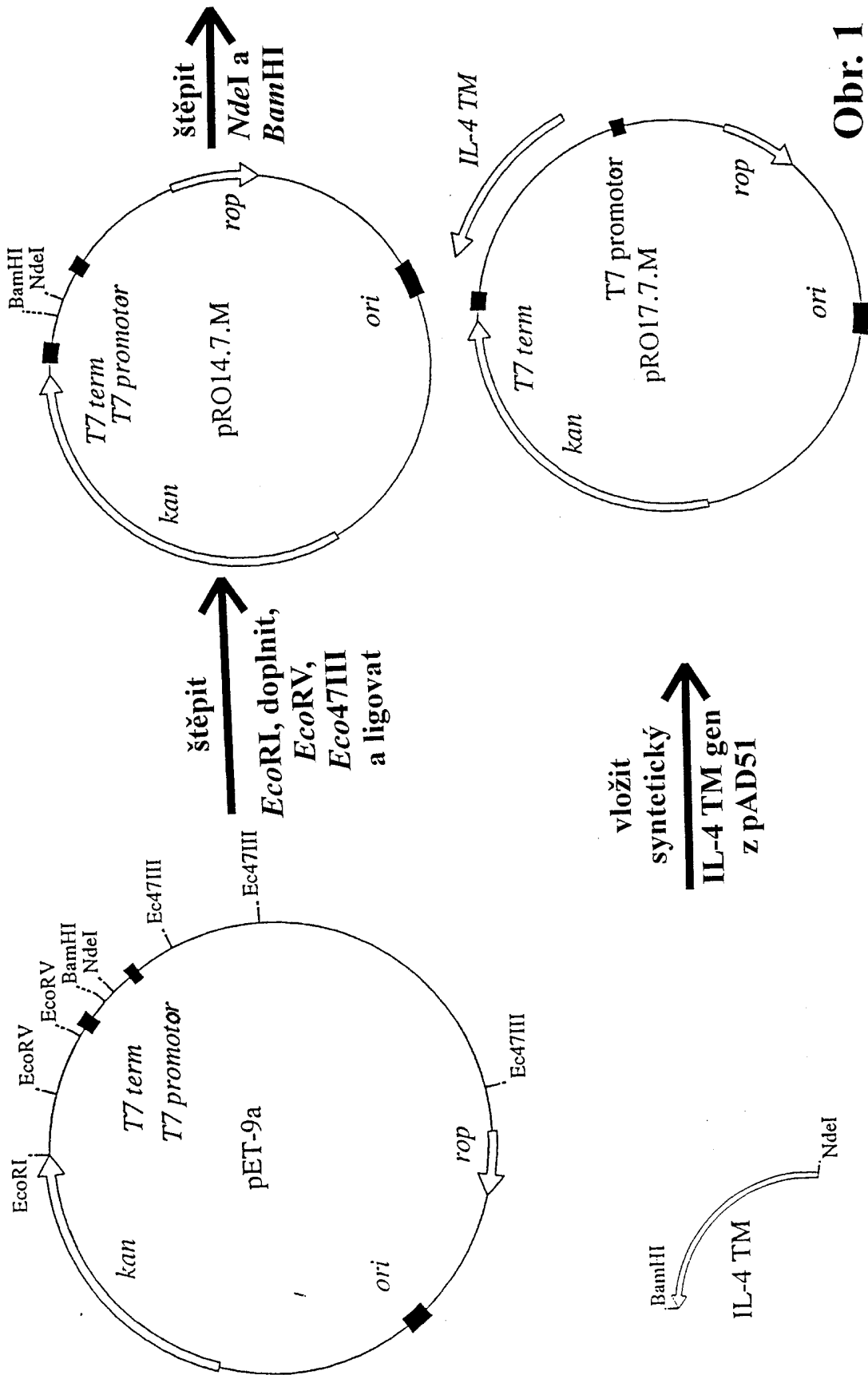
4. Použití plasmidů dle nároků 1 nebo 2 v metodě přípravy IL-4 a muteinů IL-4

Zastupuje :

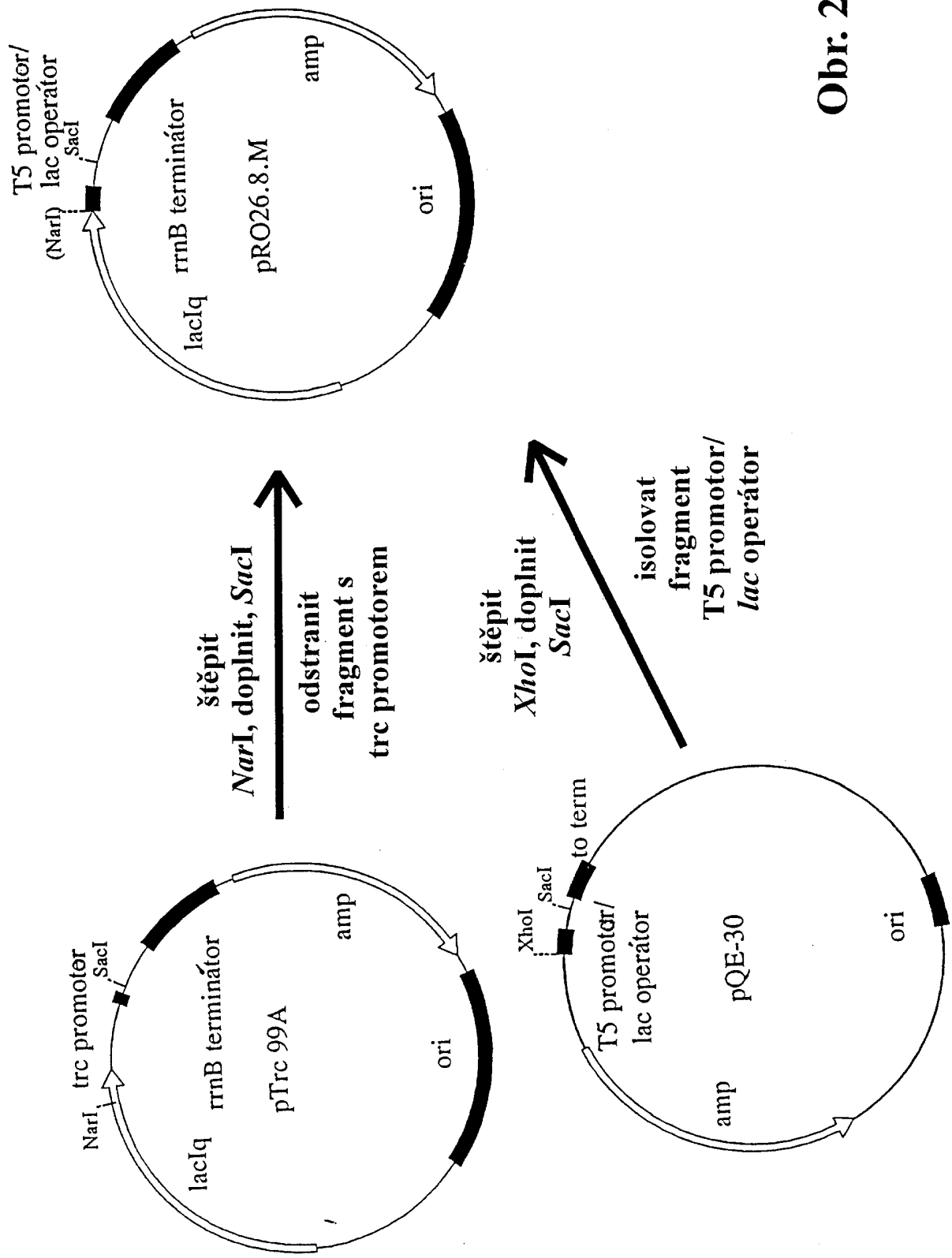
Dr. Miloš Všetečka

07.03.00

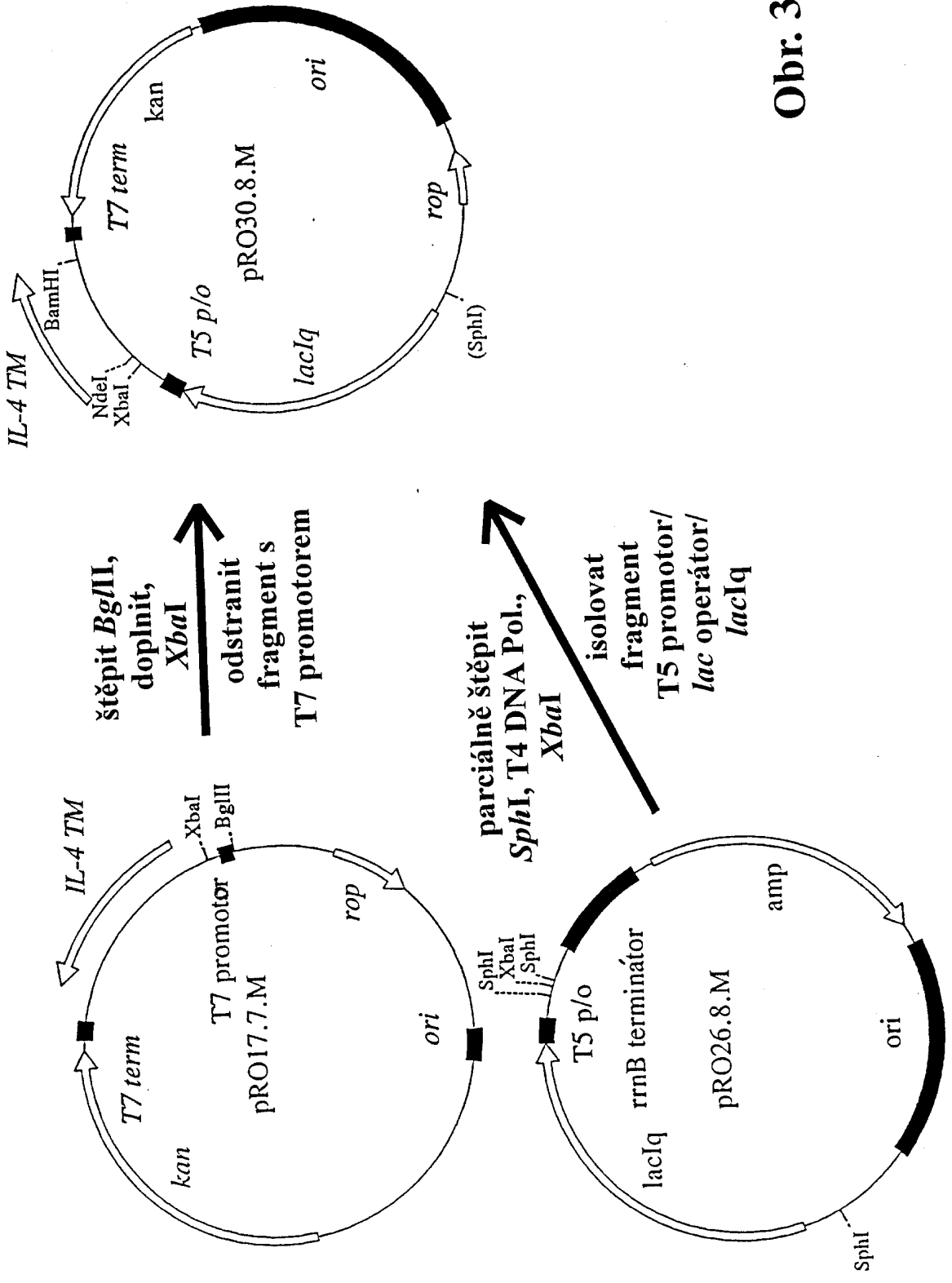
PV 2070-24
16648



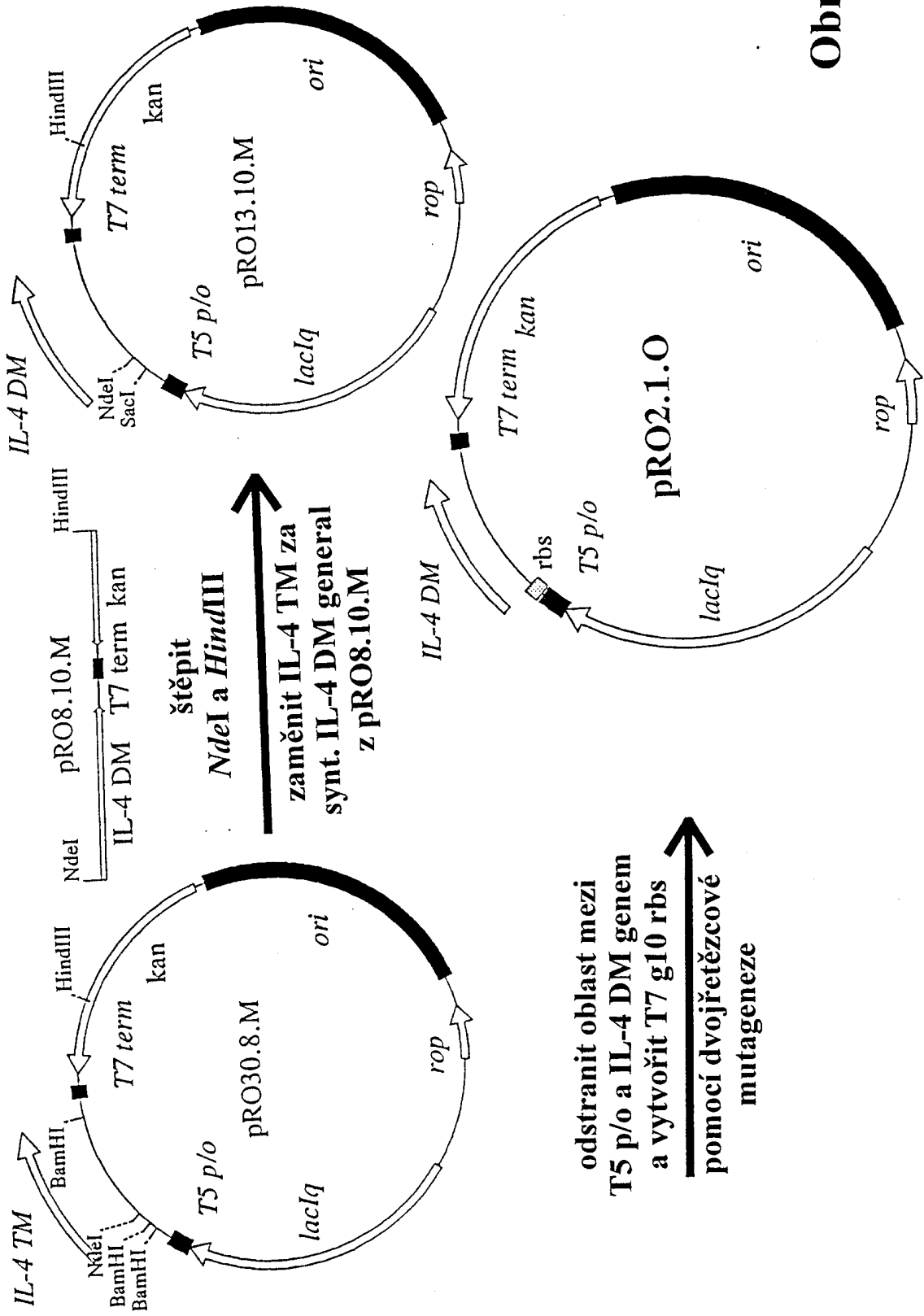
Obr. 1



Obr. 2

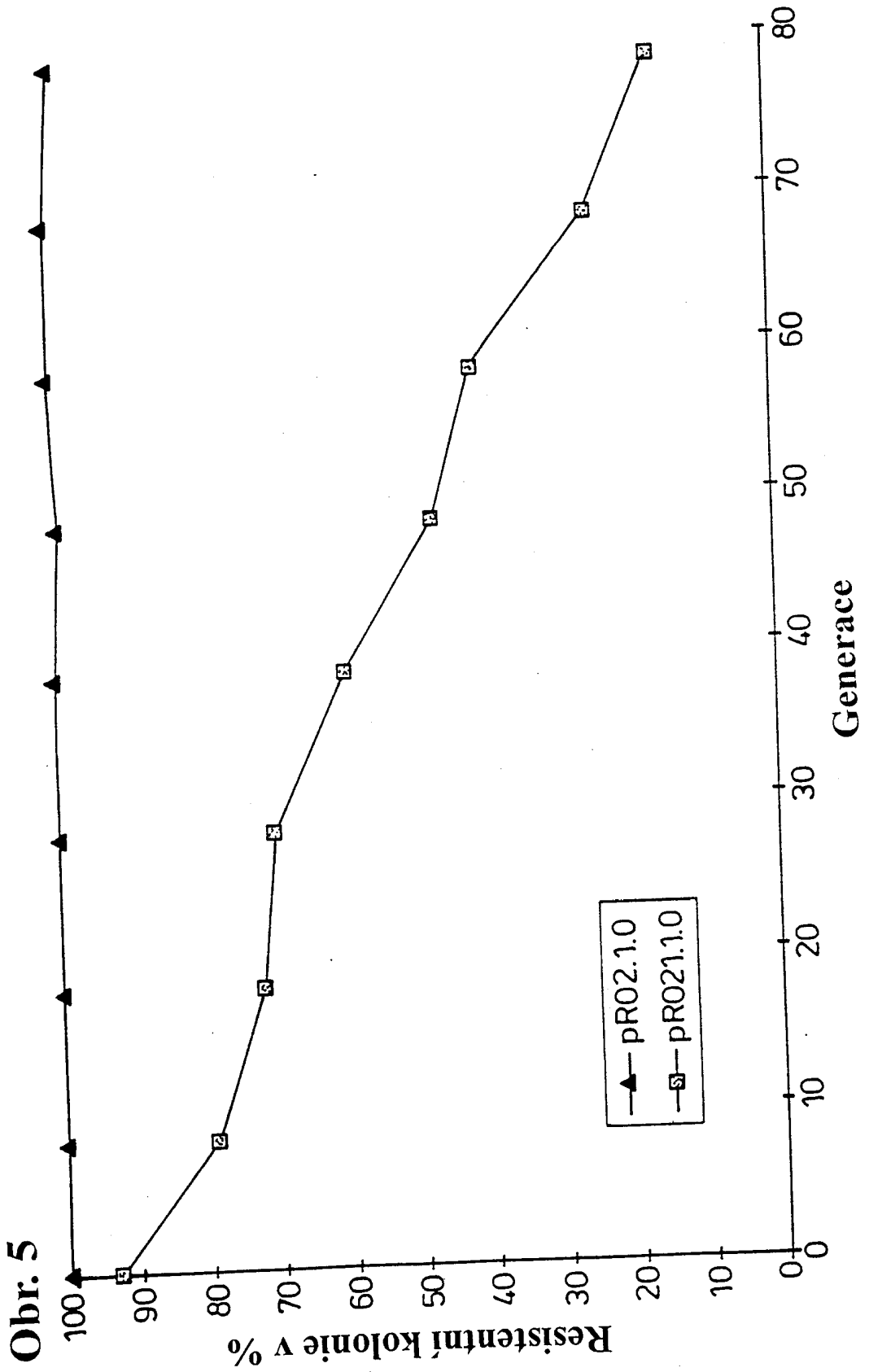


Obr. 3



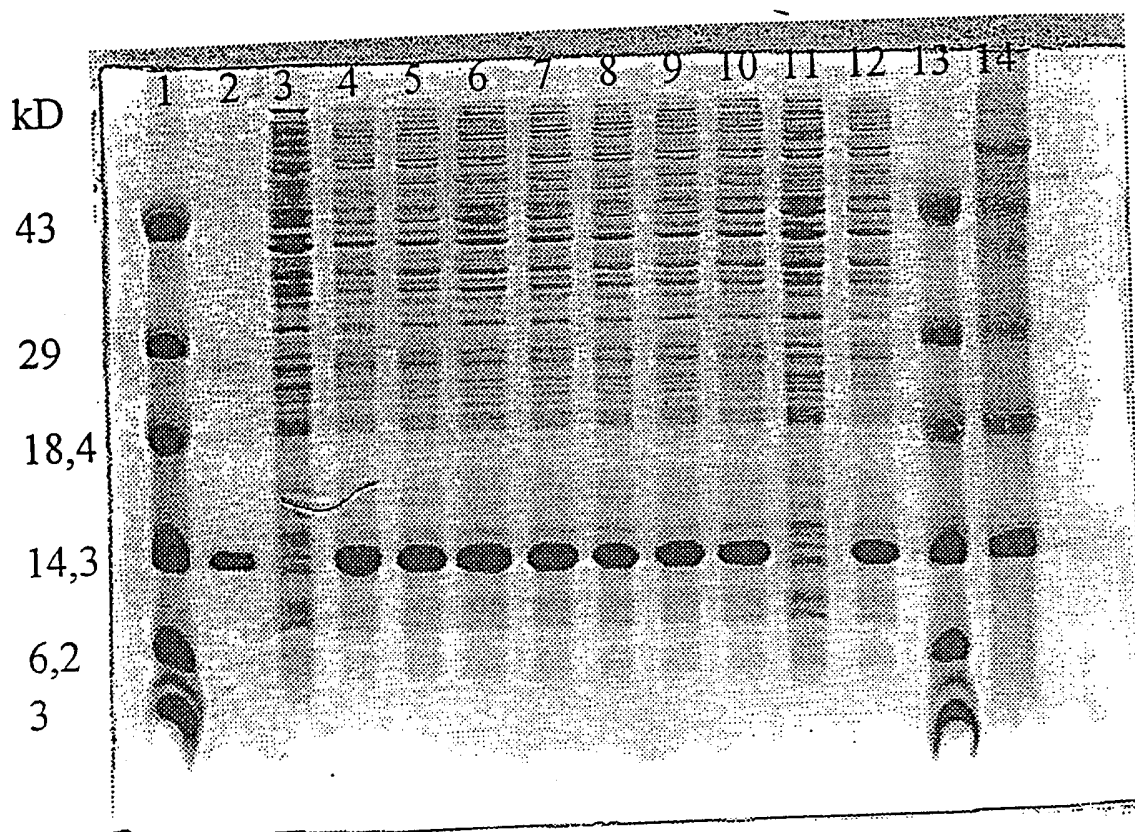
Obr. 4

07.03.00



07.03.00

Obr. 6



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

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