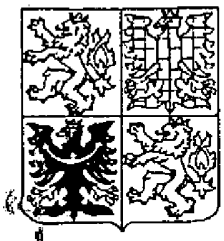
ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 1714-92

(13) A3

(51) Int. Cl.[5]:
C 07 K 7/40
A 61 K 37/26

(22) 05.06.92

(32) 11.06.91

(31) 91/715183

(33) US

(40) 12.05.93

(71) ELI LILLY AND COMPANY,Indianopolis, Indiana, US;

(72) Belagaje Rama M., Indianopolis, Indiana, US;
DiMarchi Richard Dennis, Carmel, Indiana, US;
Heath William Francis Jr., Fishers, Indiana, US;
Long Harlan Beall, Carmel, Indiana, US;

(54) Polypeptid, způsob jeho přípravy, farmaceutický prostředek, který ho obsahuje a jeho použití jako žto meziproduktu pro přípravu inzulinu

(57) Nové molekuly, odvozené od složek proinzulinu rekombinantní DNA technologií. Molekuly vzorce A-C-B, kde znamená A A-řetězec inzulinu, B B-řetězec inzulinu a C spojující peptid, mají účinnost podobnou inzulinu a jsou vhodné pro ošetřování diabetes mellitus zvláště nezávislé na inzulinu. Jsou také užitečné jakožto meziprodukty pro výrobu inzulinu novým rekombinantním způsobem. Rekombinantní sloučeniny, které jsou kodem pro sloučeniny podle vynálezu.

Polypeptid, způsob jeho přípravy, farmaceutický prostředek, který ho obsahuje a jeho použití jakožto meziproduktu pro přípravu inzulinu

Oblast techniky

Vynález se týká polypeptidu A-C-B proinzulin, způsobu jeho přípravy, farmaceutického prostředku, který ho obsahuje a použití A-C-B-proinzulinu jakožto meziproduktu pro přípravu inzulinu.

Dosavadní stav techniky

Intenzivní studie diabetes vedly k tomu, že inzulin je skutečně nejlépe prostudován ze všech bílkovinových molekul. Proto je inzulin výhodným substrátem pro zkoušení vlivu obměn v primární struktuře vyššího řádu bílkovinové struktury a funkce. Rekombinantní DNA technologie usnadňuje generaci nových inzulinových analogů pro SAR a terapeutická použití. Katalogované efekty takových obměn pravděpodobně objasní pravidla řídící vztah mezi primárními a vyššími řády konformace bílkoviny. Takové modifikace primární struktury jsou poměrně vzácnější se zřetelem na nativní sekvenci. Avšak takové omezené odlišnosti od nativní sekvence poskytují málo informací, jelikož jde o odlišnou cestu.

Úkolem sledování biochemie je spíše konstrukce umělých molekul s předem určenými funkcemi než naděje na objevení přírodně se vyskytující sloučeniny, mající žádoucí vlastnosti. Přes významné pokroky ve stavu techniky chybí příklady syntetických analogů, které se značně liší svojí primární strukturou od svých přírodně se vyskytujících protějšků. Vynález využívá dobře charakterizované molekuly inzulinu pro vývoj syntetického analogu proinzulinu, který se značně liší strukturou a fyzikálními vlastnostmi od přírodně se vyskytující proinzulinové molekuly a od známých analogů proinzulinu.

Inzulin je bílkovina, sestávající ze dvou podjednotkových polypeptidů, obecně označovaných jakožto A-řetězec a B-řetězec, které jsou kovalentně vázány prostřednictvím disulfidických vazeb. Lidský inzulin, který je representativním příkladem inzulinové struktury, je graficky znázorněn na obr. 29. Biochemický

způsob výroby inzulinu je v oboru dobře znám a popsal ji například Stryer L., Biochemistry, 2. vydání, 1981, W.H. Freeman & Co., San Francisco, str. 847 až 848. Přírodní in vivo chemická cesta k inzulinu vede přes předproinzulin a proinzulin jakožto meziprodukty.

Inzulin se rekombinančně připravuje prostřednictvím exprese proinzulinu a následným enzymatickým zpracováním. Proinzulin, bezprostřední prekursor inzulinu, je jednořetězcová bílkovina. Dva řetězce inzulinové molekuly se produkují excisí interní oblasti, běžně označovanou jakožto C-region nebo C-peptid proinzulinu. Po vytvoření intrařetězcového a interřetězcového disulfidického sesítění se internální polypeptidová sekvence (C-peptid) vypustí působením trypsinu a enzymů karboxypeptidasy B, čímž se získá funkční inzulinová molekula.

Provede se translace proinzulinovového genu k dosažení odpovídající aminokyselinové sekvence B-řetězec/C-peptid/A-řetězec. Jelikož rekombinantní produkce inzulinu začíná spíše u proinzulinové molekuly než u předproinzulinové molekuly, má rekombinantní proinzulinová molekula charakteristicky methioninový zbytek na aminokyselinovém konci. Proto se tento methionin, odvozený od N-konce proinzulinu, přenáší a zůstává na aminokyselinovém konci inzulinového B-řetězce. Proto se tento methioninový zbytek neodstraní bakteriální hostitelskou buňkou. Je proto nutné chemicky nebo enzymaticky odstraňovat tento N-koncový methionin in vitro k získání nativní proinzulinové nebo inzulinové molekuly.

Působení methionylaminové peptidasy (MAP), bílkoviny vlastní E. coli, odstraňuje N-koncový deformylovaný methionin za podmínky, že druhým zbytkem není arginin, aspartát, glutamin, glutamát, isoleucin, leucin, lysin nebo methionin. Přezkoušení primární struktury inzulinové molekuly, přičemž lidský inzulin je representativním příkladem, uvedeným na obr. 29, dokládá, že N-koncový zbytek B-řetězce, odpovídající N-koncovému zbytku přírodního proinzulinu, je fenylalanin. Tento transkripční a translační pořádek brání odstranění N-koncového methioninu z rekombinačně E. coli produkované proinzulinové molekuly působením MAP. Avšak N-koncovou aminokyselinou A-řetězce je glyacin, jehož pří-

tomnost neihhibuje působení MAP. Proto, v případě reverzní sekvence transiace ze systému B-řetězec/C-peptid/A-řetězec na A-řetězec/C-peptid/B-řetězec bude působení MAP eliminovat N-koncový methionin. Tím se také vyloučí potřeba dodatečného translačního odstraňování N-koncevého methioninu, což má velké obchodní a technické přednosti.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je polypeptidová sloučenina obecného vzorce I

$$Met_x\text{-}A\text{-}C\text{-}B \qquad (I)$$

kde znamená

Met aminokyselinu methionin,

x O nebo 1,

A řetězec A inzulinu nebo jeho funkční derivát,

B řetězec B inzulinu nebo jeho funkční derivát,

C C-peptid inzulinu nebo peptid obecného vzorce

$X_1 - X_2 - P - X_3 - X_4$

kde znamená

X_1, X_2, X_3 a X_4 bazické aminokyseliny, které jsou stejné nebo odlišné a

P peptid obsahující 4 až 35 aminokyselin s výjimkou cysteinu,

a její farmaceuticky vhodné soli.

Podstatou vynálezu je také způsob přípravy funkční inzulinové molekuly nebo inzulinového analogu, při kterém se používá nových výchozích látek a nových meziproduktů. Tento nový způsob přípravy přes inzulinový prekursor, je založen na inverzi kodující sekvence proinzulinu ze systému B-řetězec/C-peptid/A-řetězec na systém A/řetězec/C-peptid/B-řetězec. Nový, vytvořený inzulinový prekursor vylučuje potřebu posttranslačního chemického nebo enzymatického odstraňování N-koncového methioninu z rekombinantní inzulinové molekuly.

Vynález se také týká nového meziproduktu inzulinového prekursoru, který v podstatě sestává z prvků, ze kterých se konstru-

uje inzulin biosyntetickou cestou. Tyto nové inzulinové prekursory mají: (a) větší inzulinovou aktivitu než přírodně se vyskytující proinzulin, (b) delší poločas in vivo se zřetelem na inzulin z přírodního proinzulinu a (c) vykazují zvýšenou schopnost vázat IGF-I receptor ve srovnání s přírodním proinzulinem. Charakteristiky a omezení vynálezu vyplývají ze studia konstrukce nové molekuly, zvláště se zřetelem na C-peptid, který je instruktivní pro konstrukci analogických molekul proinzulinu a inzulinu.

Restrikční místo a funkční mapy na přiložených výkresech jsou přibližná znázornění popisovaného rekombinantního DNA vektoru. Informace o retrikčním místu není vyčerpávající: proto může být více restrikčních míst pro daný typ na vektoru, než je na obr. znázorněno.

Na obr. 1 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pkC283.
Na obr. 2 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pkC283PX.
Na obr. 3 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pkC283-L.
Na obr. 4 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pkC283-LB.
Na obr. 5 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pkC283-PRS.
Na obr. 6 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL32.
Na obr. 7 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pNM789.
Na obr. 8 je schéma konstrukce plasmidu 120.
Na obr. 9 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL47.
Na obr. 10 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pPR12.
Na obr. 11 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pPR12AR1.
Na obr. 12 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL110.
Na obr. 13 je schéma konstrukce plasmidu pL110C.
Na obr. 14 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pCZR126S.
Na obr. 15 je schéma, objasňující základní rozdíly orientace A-řetězce, B-řetězce a C-peptidu a BCA a ACB proinzulinové molekuly.
Na obr.16 je schéma způsobu konstrukce ACB-PI kodující sekvence,odvozené od kompozitu kompatibilní kratší syntetické DNA sekvence.
Na obr. 17 je specifická DNA sekvence, zahrnutá v konstrukci analogu lidského ACB-PI genu, použitého při konstrukci ACB-PI genu.

Na obr. 18 je jedno provedení umístění restrikčních endonukleazových štěpicích bodů, určených do analogu lidské ACB-PI kodující sekvence, čímž se usnadňuje integrace do zvláštních klonovacích vektorů, příkladně uvedených.

Na obr. 19 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pRB181.

Na obr. 20 je restrikční místo a funkční mapa plasmidu pRB182.

Na obr. 21 je reversní fázová HPLC analyza Met-ACB proinsulinu a ACB-proinzulinu. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v příkladech.

Na obr. 22 je peptidové mapování ACB-proinzulinu po trypsin/pepsinové digesci. Chromatogram vykazuje rezultující peptidy spolu s elučními posicemi tří možných disulfidických isomerních peptidů.

Na obr. 23 jsou výsledky zkoušky vázání lidského placentálního inzulinového receptoru. Graf ukazuje konkurenci lidského inzulinu, lidského proinzulinu, ACB-proinzulinu, Met-ACB-proinzulinu s ^{125}I inzulinem v případě vázání na inzulinový receptor.

Na obr. 24 je vázání lidského placentálního IGF-I receptoru. Diagram představuje konkurenci lidského IGF-I, Met-ACB-proinzulinu, ACB-proinzulinu, lidského inzulinu a lidského proinzulinu s ^{125}I IGF-I v případě vázání na IGF-I receptor.

Na obr. 25 je HPLC analyza proteolytické transformace ACB-proinzulinu na inzulin. Chromatogram předvádí (a) reakci po 24 hodinách, (b) biosyntetický lidský inzulin a (c) biosyntetický lidský proinzulin. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v příkladech.

Na obr. 26 je znázorněna preparativní HPLC chromatografie proinzulinové konverzní reakce.

Na obr. 27 je peptidová mapa inzulinu z konverní reakce.

Na obr. 28 je vázání lidského placentálního inzulinového receptoru. Je znázorněna konkurence s ^{125}I inzulinem lidského inzulinu a lidského inzulinu, připraveného z ACB-proinzulinu se zřetelem na vázání na lidský inzulinový receptor.

Na obr. 29 jsou znázorněny rozdíly primární struktury mezi přirodně se vyskytujícími molekulami (BCA) lidského proinzulinu a nového invertovaného (ACB) lidského proinzulinu.

Pro účely tohoto popisu se používá následujících výrazů:

ACB-hPI zkratka pro lidský ACB proinzulin

ACB-PI zkratka pro ACB proinzulin

ACB proinzulin je polypeptidová molekula, která obsahuje (a) aminokyselinou sekvenci odpovídající inzulinovému A-řetězci nebo jejímu funkčnímu analogu, vázanou sekvenciálně na (b) spojovací peptid, který váže karboxylovou koncovou aminokyselinu inzulinového A-řetězce na aminovou koncovou aminokyselinu inzulinového B-řetězce, přičemž spojovací peptid obsahuje alespoň 8 aminokyselin, vázených sekvenciálně na (c) aminokyselinovou sekvenci odpovídající inzulinovému B-řetězci nebo jeho funkčnímu analogu.

A-řetězec A-řetězec inzulinu nebo jeho funkčního analogu, který vytváří jednu nebo dvě subjednotky inzulinové molekuly

Ala aminokyselina alanin

Analog sloučenina, která je strukturálně podobná jiné sloučenině. Pokud se výrazu používá v souvislosti s polypeptidy, vztahuje se na primární, sekundární nebo terciární strukturu

Arg aminokyselina arginin

Asn aminokyselina asparagin

Asp aminokyselina asparagová kyselina

B-řetězec B-řetězec inzulinu nebo jeho funkčního analogu, odpovídající větší subjednotce dvou řetězců inzulinové molekuly

pár bází (bp) se týká DNA nebo RNA. Zkratky A,C, G a T odpovídají 5'-monofosfátovým formám nukleotidů (deoxy)adenin, (deoxy)citidin, (deoxy)guanin a (deoxy)thymidin, jak se vyskytují v DNA molekulách. Zkratky U, C, G a T odpovídají 5'-monofosfátovým formám nukleotidů uracil, cystidin, guanin a thymin, jak se vyskytují v RNA molekulách. V DNA s dvojím řetěz-

cem se pár bází může vztahovat na partnerský vztah A s T nebo C s G. V heteroduplexu DNA/RNA se pár bází může vztahovat na partnerský vztah T s U nebo C s G.

BCA proinzulin přírodně se vyskytující proinzulin nebo jeho funkční analogy. Jde o výraz, používaný k rozlišení ACB-proinzulinové molekuly, zde popsané, přičemž translační řád inzulinových subjednotek je převrácen.

C-peptid polypepdivová sekvence alespoň osmi aminokyselin, kde je tento polypeptid umístěn mezi inzulinový A-řetězec aminokyselinové sekvence (nebo funkčního analogu aminokyselinové sekvence inzulinového A-řetězce) a inzulinový B-řetězec aminokyselinové sekvence (nebo analogu aminokyselinové sekvence inzulinového B-řetězce) umožňující dostatečné konformační permutace pro vhodné vytvoření intrařetězcových a interřetězcových disulfidických můstků inzulinové prekursorové molekuly.

Cys aminokyselina cystein nebo polovina cystinového zbytku kovalentně vázaného prostřednictvím disulfidického můstku na jinou polovinu cystinového zbytku.

DNA desoxyribunekleová kyselina.

EDTA zkratka ethylendiamintetraoctové kyseliny.

ED5O zkratka poloviční maximální hodnoty.

FAB-MS zkratka hmotové spektrometrie s bombardováním rychlými atomy.

Funkční analog molekula nebo sloučenina mající podobné funkční vlastnosti avšak modifikovanou strukturu se zřetelem na přírodně se vyskytující formu molekuly nebo sloučeniny.

Gln aminokyselina glutamin.

Glu aminokyselina glutamová kyselina.

Gly aminokyselina glycin.

His aminokyselina hystidin.

hPI	zkratka pro lidský proinzulin.
inzulin	bílkovinový hormon nebo jeho funkční analog, který snižuje hladinu cukru v krvi a stimuluje využití glukozy a blokuje glykogenolyzu. Je univerzálně zjišťován u savců, majících pankreas.
inzulinový prekursor	jednořetězcový polypeptid, který vzniká, když se internální aminokyselinová sekvence vyřízne ze dvouřetězcové molekuly inzulinu nebo analogu inzulinu.
Ile	aminokyselina isoleucin.
Leu	aminokyselina leucin.
Lys	aminokyselina lysin.
Met	aminokyselina methionion nebo její deformylovaný analog.
Met-ACB-PI	zkratka methionyl ACB proinzulinu.
Met-ACB-hPI	zkratka methionyl ACB lidského proinzulinu.
Met-ACB-proinzulin	ACB proinzulinová molekula s methioninovým zbytkem kovalentně vázaným na aminokonec ACB-proinzulinové molekuly.
mRNA	mediátorová RNA.
MWCO	zkratka excisní molekulové hmotnosti.
NIDDM	zkratka diabetes mellitus nezávislé na inzulinu.
NLe	norleucin.
Nva	norvalin.
Orn	ornithin.
Phe	aminokyselina fenylalanin.
Plasmid	extrachromosomální spontáně se replikující genetický element.
PMSF	zkratka fenylmethylsulfonylfluoridu.
Pro	aminokyselina prolin.
Čtecí rámec	nukleotidová sekvence, ze které translací dochází ke "čtení" v tripletech translačním aparátem tRNA a ribosomů a příbuzných faktorů každého tripletu v souhlase s příslušnou aminokyselinou. Protože je každý triplet oddělený a téže délky, musí být kodující sekvence násobkem tří, včlenění nebo vypuš-

tění (koncová posunová mutace) páru bází může vést ke dvěma odlišným bílkovinám, zakodovávaným stejnou sekvencí. K pojištění proti tomu tripletové kodony odpovídající žádanému polypeptidu, musí být vázány v násobku tří od iniciačního kodonu, to je, musí být dodržen správný "čtecí rámec".

Rekombinantní DNA klonovací vektor — jakékoliv autonomní replikační činidlo včetně, avšak bez jakéhokoliv omezení, plasmidů a fágů, zahrnující DNA molekulu, ke které jeden nebo několik segmentů DNA může být přidáno nebo je přidáno.

Rekombinantní DNA expresní vektor — jakýkoliv rekombinantní DNA klonovací vektor, do něhož je včleněn promotor.

Replikon — DNA sekvence, která řídí a umožňuje autonomní replikaci plasmidu nebo jiného vektoru.

RNA — ribonukleová kyselina.

RP-HPLC — zkratka pro reverzní fázovou vysoko účinnou kapalinovou chromatografii.

Ser — aminokyselina serin.

Thr — aminokyselina threonin.

Transkripce — proces, kdy se genetická informace, obsažená v nukleotidové sekvenci DNA, přepisuje do komplementární RNA sekvence.

Translace — proces překládání genetické informace z mediátorové RNA do primární struktury polypeptidového řetězce pro specifikaci a přímou syntezu polypeptidového řetězce.

Tris — zkratka pro tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Trp — aminokyselina tryptofan.

Tyr — aminokyselina tyrosin.

Val — aminokyselina valin.

Vektor — replikon, používaný pro transformaci buněk v genové manipulaci nesoucí polynukleotidové sekvence odpovídající vhodným bílkovinovým molekulám, které při kombinaci se vhodnou řídicí sekvencí dodávají specifické vlastnosti hostující buňce, která

se má transformovat. Plasmidy, viry a bakteriofág jsou vhodnými vektory, jelikož jsou replikony ve vlastním slova smyslu. Umělé vektory se konstruují vyříznutím a spojováním DNA molekul z různých zdrojů za použití restrikčních enzymů a ligas. Vektory zahrnují rekombinantní DNA klonovací vektory a rekombinantní DNA expresní vektory.

X-gal zkratka pro 5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid.

Vynález se tedy týká polypeptidových sloučenin obecného vzorce I

$$Met_x\text{-}A\text{-}C\text{-}B \qquad (I)$$

kde znamená

Met aminokyselinu methionin,

x 0 nebo 1,

A řetězec A inzulinu nebo jeho funkční derivát,

B řetězec B inzulinu nebo jeho funkční derivát,

C C-peptid inzulinu nebo peptid obecného vzorce

$X_1 - X_2 - P - X_3 - X_4$

kde znamená

X_1, X_2, X_3 a X_4 bazické aminokyseliny, které jsou stejné nebo odlišné a

P peptid obsahující 4 až 35 aminokyselin s výjimkou cysteinu.

Sloučeniny obecného vzorce I mají dvě oddělená působení:

(a) jakožto prekursory rekombinantní produkce inzulinu a

b) jakožto nezávislé, terapeuticky účinné sloučeniny.

Užitečnost sloučenin podle vynálezu obecného vzorce I jakožto prekursorů inzulinu, je dále popsána.

Sloučeniny obecného vzorce I konstituují nové "proinzulinové" bílkoviny nebo inzulinové prekursory, dále označované jakožto "ACB-proinzuliny", které mají nezávisle příznivé vlastnosti vedle toho, že jsou meziprodukty na nové cestě k inzulinu, jak je dále popsáno. Podle výhodného provádění vynálezu, jak je příklady doloženo, mají sloučeniny obecného vzorce I následující a-

minokyselinou sekvenci: (sekvence ID číslo 1)

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
Tyr Cys Asn Arg Arg Glu Ala Glu Asp
Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln
Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys
Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
Tyr Thr Pro Lys Thr

Na obr. 15 a 29 je graficky objasněn celý strukturální rozdíl mezi přírodním "BCA" proinzulinem a novým, invertovaným "ACB" proinzulinem. Strukturální rozdíly přírodního proinzulinu (označovaného zde a na obr. 15 jakožto BCA-proinzulin na rozdíl od nového invertovaného ACB-proinzulinu) a ACB-proinzulinu jsou enormní.

V oboru je dobře známo, že určité obměny struktury bílkoviny jsou dostatečné k inhibici nebo k naprostému předejití vlastní formace sekundární a terciární struktury, což vede k nefunkční bílkovině. To platí zvláště pro molekuly, které závisí na vlastní formě disulfidických příčných vazeb pro dosažení účinnosti, jako má proinzulin a inzulin. To je zcela neočekávatelné a překvapující, že konformačmí rozdíl mezi ACB-proinzulinem a BCA-proinzulinem vede k molekule, která (a) má významně větší inzulinovou účinnost než nativní proinzulin a (b) po vyříznutí C-peptidu vytváří funkční inzulinovou molekulu se všemi disulfidickými příčnými vazbami vhodně vytvořenými a bez N-koncového methioninového zbytku na A-řetězci.

Zjistilo se, že forma proinzulinu, střižená na Arg65-Gly66 vazbě, má větší inzulinovou účinnost než přírodní forma proinzulinu, pravděpodobně jakožto výsledek uvolnění aminokyselinového koncového zbytku na A-řetězci obsaženém v místě a v celé struktuře proinzulinu (Peavy D.E. a kol., 1985, J. Biol. Chem., ročník

260, str. 13989 až 13394). ACB-proinzulinová molekula má má volný aminokyselinový konec A-řetězce, avšak vykazuje zvýšenou účinnost, když se C-peptid zakotví na obou koncích za vytvoření stabilnější konformace.

Primární struktura inzulinu a proinzulinu je široce modifikována. Tyto modifikace poskytly inzulinové a proinzulinové molekuly mající nejrůznější žádoucí vlastnosti, užitečné pro ošetřování různých forem diabetes, k usnadnění průmyslové (zvláště rekombinantní) výroby a/nebo k výrobě výhodnějších farmaceutických prostředků. Representativní, nikoliv však vyčerpávající seznam takových modifikací je v následující tabulce I. Vynález se tedy týká ACB-proinzulinových molekul se změnami v primární struktuře, jejichž representativní seznam je uveden v Tabulce I. Způsobem podle vynálezu se připravují inzulinové analogy se včleněnými proimárními strukturálními změnami, jejichž representativní seznam je zřejmý z následující tabulky I.

Tabulka I

Inzulinové a proinzulinové analogy

A. Změny jedné aminokyseliny

Gly A_{21}	Glu A_{21}	hSer A_{21}	Thr B_{10}	Asp B_{25}
Ser A_{21}	Leu A_{21}	Gly A_{22}	Asp B_{10}	His B_{25}
Ala A_{21}	Met A_{21}	Ala A_{22}	Arg B_{10}	Glu B_{26}
His A_{21}	Tyr A_{21}	Asp B_9	Ile B_{12}	Glu B_{27}
Asp A_{21}	Val A_{21}	Asn B_9	His B_{16}	Asp B_{28}
Thr A_{21}	Ile A_{21}	His B_9	Gln B_{17}	Ala B_{30}
Gln A_{21}	Trp A_{21}	Glu B_{10}	Gln B_{20}	des-B_{30}
Thr_{30}-NH_2	Ala_{30}-NH_2			

B. Změny dvou amihokyselin

Gly A_{21} a	Asp B_{10}	His A_{21} a	Lys B_{27}
Ser A_{21} a	Asp B_{10}	Asp A_{21} a	Lys B_{27}
Thr A_{21} a	Asp B_{10}	Gly A_{21} a	Arg B_{27}
Ala A_{21} a	Asp B_{10}	Ser A_{21} a	Arg B_{27}
His A_{21} a	Asp B_{10}	Thr A_{21} a	Arg B_{27}
Asp A_{21} a	Asp B_{10}	Ala A_{21} a	Arg B_{27}
Gly A_{21} a	Thr B_{10}	Glu B_{27} a	Glu B_{16}
Ser A_{21} a	Thr B_{10}	Asp B_5 a	Asn B10
Thr A_{21} a	Thr B_{10}	Glu B_{12} a	Gln B_{13}
Ala A_{21} a	Thr B_{10}	Ser B_{14} a	Asp B_{17}
His A_{21} a	Thr B_{10}	Lys B_{28} a	Pro B_{29}
Asp A_{21} a	Thr B_{10}	His A_{21} a	Arg B_{27}
Gly A_{21} a	Arg B_{10}	Asp A_{21} a	Arg B_{27}

Tabulka I (pokračování)

Ser A_{21} a	Arg B_{10}	Glu B_{12} a	des B_{30}
Thr A_{21} a	Arg B_{10}	Asp B_{10} a	Ser B_2
Ala A_{21} a	Arg B_{10}	Asp B_{10} a	Asp B_{28}
His A_{21} a	Arg B_{10}	Glu B_{10} a	Glu A_{13}
Asp A_{21} a	Arg B_{10}	Glu B_{27} a	Ser A_{13}
Asp B_{10} a	des-B_{30}	Glu B_{27} a	Asp A_{21}
Thr B_{10} a	des-B_{30}	Glu B_{27} a	Glu B_1
Arg B_{10} a	des-B_{30}	Glu B_{27} a	Asp B_9
Gly A_{21} a	Lys B_{27}	Gly A_{21} a	Ala B_{30}
Ser A_{21} a	Lys B_{27}	Ser A_{21} a	Ala B_{30}
Thr A_{21} a	Lys B_{27}	Thr A_{21} a	Ala B_{30}
Ala A_{21} a	Lys B_{27}	Ala A_{21} a	Ala B_{30}
des B_{29} a	des B_{30}	hSer A_{21} a	Ala B_{30}

C. Změny tří aminokyselin

A_{21} Gly + Lys B_{27} + Gln A_{17}
A_{21} Ser + Lys B_{27} + Gln A_{17}
A_{21} Thr + Lys B_{27} + Gln A_{17}
A_{21} Ala + Lys B_{27} + Gln A_{17}
A_{21} His + Lys B_{27} + Gln A_{17}
A_{21} Asp + Lys B_{27} + Gln A_{17}
Gly A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
Ser A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
Thr A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
Ala A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
His A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
Asp A_{21} + Lys B_{27} + Gln B_{13}
Gly A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17}

Tabulka I (pokračování)

Ser A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln A_{17}
Thr A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln A_{17}
Ala A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln A_{17}
His A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln A_{17}
Asp A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln A_{17}
Gly A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
Ser A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
Thr A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
Ala A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
His A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
Asp A_{21}	+ Arg B_{27}	+ Gln B_{13}
Asp B_{10}	+ His A_{8}	+ His B_{25}
Glu B_{10}	+ Glu A_{3}	+ Glu B_{22}
Glu B_{27}	+ Ser B_{5}	+ Asp B_{5}
Glu B_{27}	+ His A_{8}	+ Asp B_{9}
Glu B_{27}	+ Asp A_{21}	+ Asp B_{9}
des B_{28}	+ des B_{29}	+ des B_{30}
Gly A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
Ser A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
Thr A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
Ala A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
His A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
Asp A_{21}	+ Asp B_{10}	+ Ala B_{30}
Gly A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
Ser A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
Thr A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
Ala A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
His A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
Asp A_{21}	+ Thr B_{10}	+ Ala B_{30}
Gly A_{21}	+ Arg B_{10}	+ Ala B_{30}
Ser A_{21}	+ Arg B_{10}	+ Ala B_{30}

Tabulka I (pokračování)

Thr A_{21} + Arg B_{10} + Ala B_{30}
Ala A_{21} + Arg B_{10} + Ala B_{30}
His A_{21} + Arg B_{10} + Ala B_{30}
Asp A_{21} + Arg B_{10} + Ala B_{30}
Gly A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
Ser A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
Thr A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
Ala A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
His A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
Asp A_{21} + Asp B_{10} + des B_{30}
Gly A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
Ser A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
Thr A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
Ala A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
His A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
Asp A_{21} + Thr B_{10} + des B_{30}
Gly A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
Ser A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
Thr A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
Ala A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
His A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
Asp A_{21} + Arg B_{10} + des B_{30}
Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Lys B_{28} + Pro B_{29}

Tabulka I (pokračování)

Asp A_{21} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Glu B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}
Glu B_{28} + Pro B_{29} + des B_{30}
Lys B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}
Lys B_{28} + Pro B_{29} + des B_{30}
Arg B_{27} + Gly A_{21} + ThrB_{30}-NH2

D. Změny čtyř aminokyselin

Gly A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Ser A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Thr A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Ala A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Asp A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
His A_{21} + Lys B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Gly A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Ser A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Thr A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Ala A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Asp A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
His A_{21} + Arg B_{27} + Gln A_{17} + Gln B_{13}
Glu B_{10} + His A_{8} + His B_{4} + His B_{27}
des B_{27} + des B_{28} + des B_{29} + des B_{30}
Gly A21 + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Asp B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}

Tabulka 1 (pokračování)

Thr A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Thr B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Arg B_{10} + Glu B_{28} + Pro B_{29}
Gly A21 + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Asp B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ser A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Thr A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Ala A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
His A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Asp A_{21} + Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29}
Gly A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}
Ser A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}
Thr A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}
Ala A_{21} + Glu B_{28} + Pro B_{29} + Ala B_{30}

Tabulka I (pokračování)

His	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Asp	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Gly	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Ser	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Thr	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Ala	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
His	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Asp	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Gly	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Ser	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Thr	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Ala	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
His	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Asp	A_{21}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Gly	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Ser	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Thr	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Ala	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
His	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Asp	A_{21}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Asp	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Thr	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Arg	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Asp	B_{10}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Thr	B_{10}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Arg	B_{10}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ Ala B_{30}
Asp	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Thr	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Arg	B_{10}	+ Glu B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}
Asp	B_{10}	+ Lys B_{28}	+ Pro B_{29}	+ des B_{30}

Tabulka I (pokračování)

Thr B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29} + des B_{30}

Arg B_{10} + Lys B_{28} + Pro B_{29} + des B_{30}

des B_{27} + des B_{28} + des B_{29} + des B_{30}

E. Změny pěti aminosyselin

des B_{26} + des B_{27} + des B_{28} + des B_{29} + des B_{30}

Jakkoliv je výhodné používat přírodně se vyskytující C-peptidové sekvence, jak shora uvedeno, jsou přípustné variace délky a aminokyselinové sekvence tohoto peptidu a získá se nicméně funkční ACB-PI molekula. Molekulární modelovací studie ukazují, že C-peptidová oblast shora uvedených ACB-PI může mít i délku jen 8 aminokyselin. Tyto studie dále ukazují, že C-peptid může být delší než je jeho přirozená délka (35 aminokyselin v případě lidského proinzulinu) a stále ještě umožňuje vhodné vytvoření sekundární, terciární a kvarterní struktury zralé inzulinové molekuly. Jedinými požadavky je (1) aby délka byla dostatečná k umožnění vytvoření vlastní disulfidické vazby v ACB-proinzulinové molekule a (2) aby byla odštěpitelná od ACB-PI molekuly s doprovodným vytvořením inzulinu.

Jiná provedení vynálezu zahrnují ACB-proinzulinové molekuly králíků, opic, koní, krys I a krys II, vepřů, skotu, psů, morčat, činčil nebo kachen. Je výhodné, aby aminokyselinová sekvence ACB-proinzulinové molekuly těchto alternativních druhů byla přírodně se vyskytující sekvencí aminokyselin A-řetězce následovanou přírodně se vyskytující sekvencí C-peptidu, následovanou přírodně se vyskytující sekvencí B-řetězce. Jiná provedení vynálezu se zaměřují na funkční analogy proinzulinové molekuly, odvozené od shora uvedených druhů.

ACB-proinzulinové útvary obsahující C-peptidy obecného vzorce:

X_1-X_2-(4 - 8 aminokyselin)-X_3-X_4

X_1-X_2-(9 - 13 aminokyselin)-X_3-X_4

X_1-X_2-(14 - 19 aminokyselin)-X_3-X_4

X_1-X_2-(20 - 24 aminokyselin)-X_3-X_4

X_1-X_2-(25 - 31 aminokyselin)-X_3-X_4

kde znamená X_1, X_2, X_3 a X_4 bázické aminokyseliny, přičemž X_1, X_2, X_3 a X_4 jsou stené nebo různé a kde intervenující aminokyseinová sekvence neobsahuje cysteinový zbytek, se mohou rovněž použít při provádění vynálezu. Podle výhodného provedení vynálezu se volí X_1, X_2, X_3 a X_4 ze souboru zahrnujícího Arg, Lys a Orn.

Intervenující poptidy o délce řetězce větší než 35 aminokyselin jsou podle vynálezu plně užitečné. Avšak se vzrůstající délkou C-peptidu současně vzrůstá konformační nezávislost ACB-proinzulinové molekuly, mající tak prodloužený C-peptid. Vzrůstající konformační nezávislost vede obecně k molekule se sníženou účinností vytvářet vlásenkový útvar. Proto podle výhodného provedení vynálezu obsahuje C-peptid méně než přibližně 35 aminokyselin.

Kromě nové struktury bílkoviny, doložené jejími meziprodukty, prokázaly tyto nové sloučeniny také terapeutický význam. Jakkoliv většina biologické účinnosti proinzulinu je v řetězcích A a B, nebyl znám možný vliv C-peptidové vazby na biologickou účinnost proinzulinu. Uvolněním aminokyselinové koncové skupiny glycinu A-1 se získal inzulinový analog, který má větší inzulinovou účinnost než přírodní BCA-proinzulin, podržuje si déle in vivo poločasové charakteristiky přírodního proinzulinu. ACB-proinzulin má také schopnost stimulovat DNA syntezu v buňkách hladkého svalstva pro svoji schonost vázat IGF-I receptor.

Biologické účinnosti dvou invertovaných proinzulinů se charakterizují četnými zkouškami in vivo a in vitro. Ve všech případech invertované proinzuliny vykazují účinnost přijímat glukozu, která leží mezi účinností inzulinu a proinzulinu. Při zkoušení na schopnost konkurence se ^{125}inzulinem se zřetelem na vázání na placentální membránové inzulinové receptory, Met-ACB-proinzulin a ACB-proinzulin poskytují ED_{50} hodnoty 5,5 a 3,1 nM ve srovnání k inzulinu (0,45 nM) a proinzulinu (20,4 nM) jak je zřejmé z obr. 23 a z tabulky II.

Tabulka II

Biologické aktivity invertovaných proinzulinových analogů in vitro

Analog	ED_{50} (nM) Receptor inzulinuu	Receptor IGF-I	Transport glukozy
Inzulin	0,45	328,00	0,043
IGF-I	ND	0,45	ND
proinzulin	20,40	10000,00	ND
ACB-proinzulin	3,10	520,00	0,83
Met-ACB-proinzulin	5,50	940,00	2,50

ND = nestanoveno

Schopnopst ACB-proinzulinů stimulovat přijímání glukozy adipocyty se rovněž měří a poskytuje podobné hodnoty pro potenci těchto dvou bílkovin ve srovnání s inzulinem, jak je ukázáno v tabulce II. Na rozdíl od jejich chování na inzulinovém receptoru jsou obě molekuly mnohem podobnější k inzulinu než k proinzulinu se zřetelem na schopnost stimulovat DNA syntezu v lidských buňkách hladkého svalstva.

Invertované proinzuliny jsou značně účinnější in vivo než in vitro a vykazují stejné prodloužení trvání působení, jak je zřejmé z tabulky III.

Tabulka III

Hypoglycemické působení inzulinových analogů in vivo

Látka	Max. hypoglycenické působení (%)[1] 1 hodina	2 hodiny	ED_{50}(nM)[2] 1 hodina	2 hodiny	Relativní biologické působení na inzulin 1 hodina	2 hodiny
H-insulin	59,0±4,3	45,7±6,7	1,0±0,01	1,6±0,09	100,0	100,0
hPI	55,1±2,6	61,0±4,0	9,1±1,7	8,2±0,8	14,3±2,8	19,5± 1,8
MetACBhPI	54,4±8,4	64,8±3,8	8,4±0,4	5,1±0,0	15,4±0,7	31,3± 0,0
ACB-hPI	60,5±9,5	69,5±9,5	3,3±1,0	3,4±0,8	39,6±3,6	47,1±10,6

[1] Maximální hypoglycemické působení se vyjadřuje jako procentová

změna od času nula, korigovaná pro kontrolní skupinu při téže zkoušce

[2] Hodnoty ED_{50} znamenají koncentrci bílkoviny, která poskytuje poločas maximální hypoglycemické účinnosti 1 nebo 2 hodiny po subkutanním podání

Všechny hodnoty v tabulce III jsou středem ±S.E.M. pro tři oddělená stanovení v případě lidského inzulinu a pro dvě oddělená stanovení v případě každého proinzulinu.

Lidský inzulin produkuje maximální hypoglycemickou odezvu jednu hodinu po subkutanním podání a koncentrace glukozy v krvi se vrací na základní hodnotu po 3 až 4 hodinách. Lidský proinzulin a ACB-proinzuliny produkují maximální hypoglycemické působení 2 hodiny po subkutanním podání a pokračují k vytváření větší biologické odezvy v průběhu další 3 až 4 hodinové periody, přičemž velikost odezvy závisí na podané dávce. Kromě toho se zjistilo, že invertované proinzuliny jsou zhruba dvojnásobně účinné než proinzuliny in vivo, přičemž ACB-proinzulin je účinnější než Met-ACB-proinzulinová sloučenina, jak je zřejmé z tabulky III.

Vynález se také týká způsobu ošetřování diabetes mellitus. Vynález se rovněž týká způsobu ošetřování diabetes mellitus nezávislého na inzulinu. Tento způsob ošetřování je založen na podávání organismu množství ACB-proinzulinu v dávce přibližně 10 až 1000 μg/kg. Výhodnou dávkou je přibližně 10 až 100 μg/kg účinné látky. Typická denní dávka pro dospělého člověka je přibližně 0,5 až 100 mg.

Při provádění tohoto ošetřování se sloučenina obecného vzorce I podle vynálezu může podávat jakožto jedna denní dávka nebo v několika dávkách za den. Režim ošetřování může vyžadovat podávání v průběhu delší doby. Množství na podávanou dávku nebo celkové podávané množství závisí na takových faktorech, jako je povaha a závažnost onemocnění, věk a celkový zdravotní stav ošetřovaného a snášenlivost nemocného pro podávanou sloučeninu obecného vzorce I podle vynálezu.

Obvykle se ošetřování provádí podáváním sloučeniny obecného vzorce I intravenozní infuzí. Při tomto způsobu se sterilní far-

maceutický prostředek vhodné rozpustné soli sloučeniny včleňuje do fyziologické kapaliny, jako je například 5% dextrozový roztok a získaný roztok se pomalu podává infuzí IV. Může se však také použít jiného způsobu infuze IV.

Sloučeniny obecného vzorce I, to je ACB-proinzuliny jsou užitečné pro náhradu dlouho působícího bazálního inzulinu. ACB-proinzulinové analogy mají značný terapeutický význam, zvláště v případě diabetes mellitus nezávislé na inzulinu (NIDDM) k řízení glukozového metabolismu.

Vynález se dále týká farmaceutických prostředků, obsahujících jakožto účinnou látku sloučeninu obecného vzorce I podle vynálezu. Sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I, s výhodou ve formě farmaceuticky vhodných solí, se mohou zpracovávat pro orální nebo parenterální podání pro terapeutické nebo profylaktické ošetřování diabetes mellitus a/nebo diabetes mellitus nezávislé na inzulinu (NIDDM).

Například se sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I mohou mísit s běžnými farmaceutickými nosiči a excipienty a používat ve formě například tablet, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů a oplatek. Farmaceutické prostředky, obsahující ACB-proinzulinovou sloučeninu, mohou obsahovat účinné látky hmotnostně 0,1 až 90 % a obecně obsahují účinné látky hmotnostně 10 až 30 %. Farmaceutické prostředky mohou obsahovat běžné nosiče a excipienty, jako jsou kukuřičný škrob, želatina, laktoza, sacharoza, mikrokrystalická celulóza, kaolin, mannitol, fosforečnan divápenatý, chlorid sodný a kyselina alginová.

Jakožto rozptylovací činidla, běžně používaná ve farmaceutických prostředcích podle vynálezu, se uvádějí kroskaramellosa, mikrokrystalická celulóza, kukuřičný škrob, glykolát a kyselina alginová.

Jakožto pojivo tablet se uvádí akacia, methylcelulóza, natriumkarboxymethylcelulóza, poylvinylpyrrolidon (Povidone), hydroxypropylmethylcelulóza, sacharoza, škrob a ethylcelulóza.

Jakožto mazadla, kterých se může použít, se uvádějí stearát hořečnatý nebo jiné kovové stearáty, kyselina stearová, kapalný silikon, mastek, vosky, oleje a koloidní oxid křemičitý.

Může se rovněž použít ochucovacích přísad, jako je například peprmint, olej libavky položené a šery aroma.

Může být rovněž žádoucí přidávat barvicí přísadu, aby měla dávkovací forma hezčí vzhled nebo k napomáhání identifikace farmaceutického prostředku.

Pro intravenozní (IV) podání se může rozpouštět ve vodě rozpustná forma sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I v jedné z běžně používaných intravonozních kapalin a farmaceutický prostředek se může podávast intravenozní infuzí. Může se použít například fysiologické solanky, Ringerova roztoku nebo 5% dextrozového roztoku.

Pro intramuskulárně podávané farmaceutické prostředky se může rozpouštět sterilní vhodně rozpustná sůl sloučenin podle vynálezu obecného vzorce I, například hydrochloridová sůl a podávat ve farmaceuticky vhodném ředidle, jako je pyrogenu prostá voda (destilovaná voda), fyziologická solanka nebo 5% glukozový roztok. Vhodná, nerozpustná forma sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu se může zpracovávat a podávat jakožto suspenze ve vodné bázi nebo ve farmaceuticky vhodné olejové bázi, jako je například ester mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, například ethyloleát.

Pro orální podání jsou zvláště vhodné sterilní farmaceutické prostředky ve formě vhodné soli ACB-proinzulinu, jako je například hydrochloridová sůl, formulované v ředidle, jako je například destilovaná nebo deionizovaná voda.

Nebo může být jednotkovou dávkovací formou sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I roztok sloučeniny, s výhodou její soli, ve vhodném ředidle ve sterilně hermeticky uzavřených ampulích. Koncentrace sloučeniny v jednotkové dávce se může měnit a může být například přibližně hmotnostně 1 % až přibližně 50 % v závislosti na formě příslušné sloučeniny a na její rozpustnosti a na dávce, určené lékařem.

Vynález se dále týká způsobu rekombinantní produkce ACB-PI bílkovin nebo Met-ACB-PI bílkovin, přičemž tento způsob zahrnuje:

1. vytvoření syntetického genu, přičemž tento gen zahrnuje DNA sekvenci zakodující ACB-PI peptidovou sloučeninu obecného vzorce I,

2. vnesení tohoto genu do vhodného vektoru obsahujícího promotor operátorovou regionální funkci v hostující molekule,
3. orientování uvedeného genu ve vektoru k dosažení transkripce a translace syntetického genu a aby byl gen pod transkripční kontrolou promotor operátorového regionu,
4. tranformování hostující buňky vektorem,
5. kultivaci hostující buňky za podmínek vhodných k navození transkripce a translace genu a
6. získání a čištění produkované peptidové sloučeniny.

Syntetické geny, in vitro a in vivo transkripce a translace, vedoucí k produkci sloučenin obecného vzorce I podle vynálezu, jsou známy ze stavu techniky. Vzhledem k přírodní degeneraci genetického kodu, pracovník v oboru zná konstrukci potřebného počtu DNA sekvencí pro zakodování sloučenin obecného vzorce I.

Podle výhodného provedení způsobu vynálezu, jak je také příklady doloženo,se dosahuje rekombinantní produkce sloučenin obecného vzorce I za použití syntetického genu zahrnujícího DNA sekvenci" (sekv. ID číslo 2).

Tato DNA sekvence zakodovává sloučeninu obecného vzorce I do aminokyselinové sekvence (sekv. ID číslo 1).

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
Tyr Cys Asn Arg Arg Glu Ala Glu Asp
Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln
Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln
Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys
Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
Tyr Thr Pro Lys Thr

Gen zakodující ACB-proinzulinovou molekulu se může vytvořit syntetickou metodologií. Taková metodologie konstrukce syntetického genu je v oboru dobře známa (Brown E.L., Belagaje R., Ryan M.J. a Khorana H.G., 1979, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., svazek 68, str. 109 až 151). DNA segmenty, odpovídající

příslušnému proinzulinovému genu, se generují za použití běžného DNA syntetizujícího přístroje, jako jsou DNA syntetizer Applied Biosystems Model 380A nebo 380B (obchodně dostupné u společnosti Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404). Syntetický ACB-PI gen se může vytvářet tak, aby měl restrikční endonukleazová místa štěpení na jednom ze dvou konců transkriptu k usnadnění izolace a k intergaci do expresních a amplifikačních plasmidů. Volba restrikčních míst je taková, aby se vhodně orientovaly ACB-PI kodující sekvence s řízením sekvencí k dosažení vhodného čtecího rámce a exprese ACB-PI molekuly. Může se včleňovat obměna jiných takových míst štěpení v závislosti na použitých konstruktech určitého plasmidu a mohou se generovat technikami o sobě známými v oboru. Schematické znázornění tohoto procesu je na obr. 16.

Specifické sekvence kompozitu, objasňující konstrukci 278 páru bází lidské ACB-PI molekuly jsou na obr. 17. Výhodné provedení vynálezu, používající ACB-PI kodující sekvence, je na obr. 18, který objasňuje pozice restrikce endonukleasových štěpicích míst pro EcoRI, HindIII, NdeI a BamHI. Sekvence na obr. 18 odpovídá výhodným ACB-proinzulinovým kodujícím sekvencím lidského, příkladně uváděného ACB-PI.

Jak je příkladně uvedeno, ACB-PI gen se vytváří ze dvou polovin, jak je zřejmé z obr. 16. Jedna polovina genu se vytváří mísením a ligací oligonukleotidů 1, 2, 5 a 6. Zatímco druhá polovina genu se vytváří mísením a ligací oligonukleotidů 3,4,7 a 8, jak je zřejmé z obr. 16. Obě poloviny genových fragmentů se čistí 15% polyakrylamidovou gelovou elektroforezou. DNA se získá elektroforeticky z gelu vykrojením oblasti gelu, odpovídající ACB-PI genovým polovicím a podrobením tenkého výřezu elektroforeze. Elektroforeticky izolované fragmenty DNA se pak odsolují na sloupci Sephadexu G-50 nebo jeho ekvivalentu. ACB-PI genové poloviče se pak navzájem spojí za vzniku ACB-PI genu, který se pak integruje do vhodného vektoru pro amplifikaci (zvýšení počtu kopií) DNA.

Syntetické geny, zakodující sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu, se mohou včleňovat do vektorů vhodných pro klo-

novaci účely. Pro tento účel dostupné různé plasmidy a techniky integrace a amplifikace a selekce jsou v oboru dobře známy (Sambrook J., Fritsch E.F., Miniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.vydání, svazek 1, Cold Spring Harbor Press, 1989). DNA sekvence se také může amplifikovat za použití polymerazové řetězové reakce, popsané v Current Protocols in Molecular Biology, (1989 a doplňky), Wilwy Interscience, N.Y.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu se používá pUC18 plasmidu (obchodně dostupný u společnosti Boehringer-Mannheim Biochemicals, P.O.Box 50414, Indianopolis, Indiana 46250) pro DNA amplifikační fázi. Volba plasmidu pUC18 se vztahuje na přítomnost EcoRI a HindIII restrikční endonukleasové štěpicí body v mnohačetném klonovacím místu pUC18. Volba amplifakčního plasmidu určuje restrikční endonukleasové body štěpení ACB-PI kodující sekvence. Volba plasmidu a konstrukce syntetického ACB-PI genu jdou ruku v ruce, jelikož amplifikační plasmid určuje restrikční sekvenci pro včlenění do ACB-PI sekvence a odpovídajících sekvencí oligonukleotidů používaných pro konstrukci syntetického AVB-PI genu.

Podle jednoho provedení vynálezu se přibližně 5 μg pUC18 plasmidu suspenduje v 10 μl pufru, vhodného pro jedno z určitých restrikčních enzymových míst určené do ACB-PI syntetického genu. Podle výhodného provedení vynálezu, příklady doloženého, je tímto restričním enzymem HindIII. Plasmid pUC18 se v souhlase s tím suspenduhe v 10 μl HindIII pufru (1 M chlorid sodný, 50 mM chlorid hořečnatý, 100 mM tris-HCl, hodnota pH = 8,0, 10 mM dithioerythritol). Do tohoto roztoku se přidá ekvivalent 20 jednotek vhodného restrikčního enzymu. Podle výhodného provedení vynálezu to odpovídá 2 μl HindIII, který je získatelný od společnosti Boehringer-Mannheim Biochemicals, P.O.Box 50414, Indianopolis, Indiana 46250. Roztok se zředí 85 μl vody, mírně se míchá a nechá se inkubovat při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Reakce se ukončí a DNA se vysráží za použití tří objemů ethanolu, 0,3 M v octanu sodném. Peleta se odstředí a vysuší.

Peleta se pak znova suspenduje v 10 μml restrikčního enzymového pufru, přizpůsobeného k jinému distálnímu volenému rest-

rikčnímu enzymovému místu ACB-PI genu. Podle výhodného provedení vynálezu, příklady doloženého, je EcoRI jiným restrikčním enzymovým místem. Peleta se tudiž suspenduje v 10 µl EcoRI pufru (1M chlorid sodný, 100 mM chlorid hořečnatý, 500 mM tris-HCl, hodnota pH 7,5, 10 mM dithiorythritol). Do tohoto roztoku se přidá ekvivalent 20 jednotek vhodné reatriční endonukleasy, s výhodou EcoRI. EcoRI a HindIII restrikční enzymya různé jiné restrikční endonukleasy, které se mohou použítv tomto protokolu, jsou obchodně dostupné například u společnosti Boehringer-Mannheim Biochemicals, P.O.Box 50414, Indianopolis,Indiana 46250. Pak se přidá 88 µl vody a roztok se mírně míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Reakce se pak ukončí a DNA se vysráží třemi objemy ethanolu, 0,3 M v octanu sodném. DNA ze shora uvedené digesce se pak podrobuje elektroforese na 1% agarosovém gelu o nízké teplotě tání. Větší restrikční fragment, odpovídající linearizovanému vektoru DNA, se odřízne z gelu. Vektor DNA se získá vedením gelového tenkého řezu sloupcem Elutip-d^{R} (obchodně dostupný u společnosti Schlichter & Schuell, Keene, NH, USA) v podstatě v souhase s instrukcemi výrobce. DNA se pak vysráží, jak shora uvedeno a vysuší se, DNA se ukládá v 30 µl 10 mM tris-HCl, hodnota pH 8,0.

Přibližně 5 µl vektoru DNA se smísí s 10 pikomol syntetických DNA fragmentů, odpovídajících dvěma polovinám ACB-PI syntetického genu, v 50 µl ligačního pufru (50 mM tris-HCl, hodnota pH 7,6, 100 mM chlorid hořečnatý, 10 mM DTT (dithiothreitol), 800 mM ATP a 3,5 jednotek T4 DNA ligazy (obchodně dostupné u společnosti Boehringer-Mannheim Biochemicals, P.O.Box 50414, Indianopolis, Indiana 46250). Reakční směs se pak inukubuje při teplotě 4 °C přes noc a pak se transformuje do vymrazených kompetentních E.coli DH5α buněk (obchodně dostupných u společnosti Bethesda Research laboratories, Inc., P.O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20877) o sobě známým způsobem pro pracovníky v oboru a znázorněných ve standardních laboratorních příručkách, jako je například Sambrook J. a kol., jak shora uvedeno. Transformanty výhodného provedení podle vynálezu se nechávají růst při teplotě 37 °C přes noc na x-gal TY agarových destičkách, obsahujících 100 µg/ml am-

picillinu. Volba antibiotika a prostředí závisí na amplifikačním vektoru a použité buněčné linii.

Klony, obsahující správný inzert, se volí modro/bílou kolonovou selekcí. Ztráta funkčnosti lacZ genu se přičítá transformantům, jelikož bod inzerce klonovací oblasti pUC18 je v lacZ kodující sekvenci. Selekce klonů, obsahujících vhodnou sekvenci, se potvrzuje ds-DNA sekvencováním za použití Sequenasy ^{R} (obchodně dostupné u společnosti United States Biochemical Corp., P.O. Box 22400, Cleveland, OH 44122) podle protokolu, dodávaného výrobcem. Výsledný plasmid lidské ACB-PI sekvence se určuje pRB181. Vyvíjející se řetězec, nesoucí amplifikační plasmid, se pak nechává růst přes noc při teplotě 37 °C v prostředí TY, obsahujícím 100 μg/ml ampicilinu a plasmid, obsahující syntetickou ACB-hPI kodující sekvenci se izoluje způsobem, který popsal Maniartis T., Fritsch, E.F. a Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982), str. 89 až 94. Obecně přibližně 20 μg plasmidu DNA, shora izolovaného, se suspenduje ve 20 μl pufru, vhodného pro jeden z "vnitřně" začleněných do restrikčních míst. Volba těchto "vnitřních" restrikčních míst je funkcí volby vektoru pro expresi, používaného ve vztahu k řídicím oblastem vektoru pro expresi. Podle výhodného provedení vynálezu, příklady doloženého, je restrikčním enzymem volby NdeI. Ke shora uvedenému roztoku se přidá přibližně 40 jednotek restrikčního enzymu, 175 μl vody a mírně se míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Pak se přidá přibližně 40 jednotek jiné "vnitřní" restrikční endonukleasy (podle příkladného výhodného provedení BamHI) a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dalších dvou hodin. Reakce se pak ukončí a DNA se vysráží třemi objemy ethanolu, 0,3 M v octanu sodném. Roztok se pak podrobuje elektroforeze na 1,2% agarosovém gelu o nízké teplotě tání. Fragment, odpovídající přibližně 265 bp ACB-hPI kodující sekvenci, se pak odřízne od gelu. ACB-hPI DNA se získá vedením sloupcem Elutip-d^{R}, jak je popsáno v příkladu 2. Po vysrážení a vysušení ve vakuu se DNA ukládá v 25 μl 10 mM tris-HCl, hodnota pH 8,0.

Expresní plasmid, kterého se používá, se může volit z čet-

ných alternativ, má vhodnou kontrolní oblast a vhodná restrikční místa usnadňující integraci ACB-PI kodující sekvence operativně se zřetelem na řídicí oblasti. Nejrůznější vektory pro expresi, užitečné pro transformaci prokaryotických a transfektních eukaryotických buněk jsou v oboru dobře známy. Jakožto příklady takových vektorů provexpresi se uvádějí pTrc 99A, pKK223-3, pKK223-2, pDR540 tac promotorový vektor pDR trp promotorový vektor, pcz20, pLEBBGH2 a pL110C. Podle nejvýhodnějšího provádění způsobu podle vynálezu, jak je příklady doloženo, pokud je hostitelskou buňkou E. coli K12 buňka, je vektorem pro expresi pCZR126S. Plasmid se může připravovat podle dále uvedeného příkladu 3.

K dosažení účinné transkripce syntetického genu, musí být gen operativně asociován s promotorovou operátorovou oblastí. V oboru jsou dobře známy nejrůznější promotor operátorové oblasti funkční v E.coli hostitelských buňkách. Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu, jak je příklady doloženo, je promotorovou operátorovou oblastí promotorová oblast lambda pL.

Podle výhodného provedení je oblast promotorového operátoru syntetického genu, jenž má zakodovanou sloučeninu obecného vzorce I, umístěna v téže následné orientaci vzhledem k počátečnímu kodonu ATG, jakou zaujímá promotorová operace vzhledem k počátečnímu kodonu ATG genu, z něhož byla odvozena. Syntetické nebo modifikované promotorové operátorové oblasti jsou vytvořeny o sobě známým způsobem ze stavu techniky. Jestliže se používá takových syntetických nebo modifikovaných promotor operátorových oblastí, mají být orientovány se zřetelem na ATG startující kodon ACB-PI genu, jak je určeno jejich kreátory.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu, jak je příklady doloženo, se suspenduje přibližně 15 μg zvoleného expresního plasmidu (pCZR126S) ve 20 μl pufru, odpovídajícího prvnímu ze dvou "vnitřních" restrikčních míst ACB-PI kodující sekvence (způsobem objasňujícím NdeI restrikční místo). Přidává se přibližně 40 jednotek restrikčního enzymu (například NDeI), 175 μl vody a inkubuje se po dobu dvou hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci se DNA vysráží ve třech objemech ethanolu, 0,3 M v octanu

sodném, jak shora uvedeno, vysuší se a suspenduje se ve 20 µl restrikčního enzymového pufru odpovídajícího druhému "vnitřnímu" restrikčnímu místu (způsobem objasňujícím BamHI restrikční místo). Pak se přidá přibližně 25 jednotek druhého restrikčního enzymu (například BamHI) a přibližně 178 µl vody, mírně se promíchá a inkubuje se po dobu dalších dvou hodin při teplotě 37 °C. Reakce se pak ukončí a DNA se vysráží třemi objemy ethanolu 0,3 M v ethylacetátu. Vektor pCZR126S, izolovaný tímto způsobem, se pak podrobuje elektroforeze na 1% agarozovém gelu s nízkou teplotou tání. Větší fragment, odpovídající vektoru DNA, se pak ve formě tenkého řezu odřízne z gelu a vektor DNA se izoluje vedením přes sloupec Elutip-d^{R}. Po vysrážení a vysušení se ukládá v 35 µl 10mM tris-HCl, hodnota pH 8,0.

Přibližně 2,5 µl shora uvedeného vektoru DNA roztoku se pak smísí s přibližně 12 µl roztoku čištěného ACB-PI fragmentu, shora připraveného. Do tohoto roztoku se přidá 4 µl 10mM ATP, 0,5 µl 1M dithiothreitolu, 5 µl 10X ligazového pufru (500 mM tris-HCl, hodnota pH 7,6, 100 mM chlorid hořečnatý), 26 µl vody a 0,5 µl (3,5 jednotek) T4 DNA ligasy (obchodně dostupné u společnosti Pharmacia, Inc., 800 Centennial Avenue, Piscataway, N.J. 08854). Reakční směs se pak inkubuje při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin.

Jak příklady doloženo, ligační směs se zředí 50 µl 10 mM tris-HCl (hodnota pH 7,6) a 3 µl chloridu vápenatého a následně se použije k přímé transformaci příslušných buněk E. coli K12 RV308, jak je popsáno v příkladu 3A. Podle výhodného provedení vynálezu buňky E. coli K12 RV308 se používají jakožto hostující buňky, mohou se však použít také četné jiné buňky, přičemž se příkladně uvádějí E. coli K12 L201, L687, L693, L507, L640, L641, L695, L814 (E. coli B), přičemž tento výčet není míněn jako omezení. Transformované hostitelské buňky se pak vnesou na vhodné prostředí za selektivního tlaku antibiotika odpovídajícího resistenci přítomného genu na expresní plasmid. Kultura se pak inkubuje po dobu vhodnou pro hostitelskou buňku a při teplotě vhodné pro hostitelskou buňku.

Způsoby transformace buněk shora uvedenými vektory, jsou v oboru dobře známy a obecně je popsali Maniatis a kol. (1988)

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York Current Protocols in Molecular Biology (1989) a doplňky. Tato metodologie transformace buněk E. coli, používaná při nejvýhodnějším provádění způsobu podle vynálezu, je příklady objasněna a doložena. Přesné podmínky, za kterých se buňky E. coli transformují a kultivují, závisejí na povaze E. coli hostujících buněk a na použitých expresních nebo klonovacích vektorech. Například vektory, které včleňují tepelně zaveditelné promotor operátorové oblasti, například c1857 tepelně zaveditelnou lamda fágovou promotor operátorovou oblast, vyžadují teplotní posun v kultivačních podmínkách k navození bílkovinové syntezy.

K expresi bílkovin dochází ve vysoce koncentrovaných bakteriálních expresních systémech, charakteristicky se agregují na granule nebo inkluzní útvary, které obsahují vysokou hladinu bílkoviny (Kreuger a kol. (1990) Protein Folding, Gierasch & King, str. 136 až 142, American Association for the Advancement of Science Publication No. 89-18S, Washington, D.C.) Takové bílkovinové agregáty se museji solubilizovat pro další čištění a izolaci žádaného bílkovinového produktu. Id. Pro solubilizaci bílkovin se mohou použít nejrůznější techniky užívající silně denaturovaných roztoků, jako je například guanidinium-HCl a/nebo slabě denaturovaných roztoků, jako je například dithiothreitol (DTT). Postupné odstranění denaturačních činidel (často dialyzou) v převáděcím roztoku umožňuje, aby denaturovaná bílkovina přijala svoji nativní konformaci. Příslušné podmínky denaturace a převedení se stanovují pro určitý bílkovinový expresní systém a/nebo pro příslušnou bílkovinu.

Přezkoušení ACB-proinzulin obsahující bakterie po fermantaci indikuje přítomnost granulovaných útvarů. Po izolaci, solubilizaci a sulfitolyze se rekombinantní bílkoviny oddělí na anexovém sloupci. Mono Q chromatografie sulfitolyzovaných bílkovin se provádí po odsolení reverzní fázovou HPLC, čímž se získají dva ACB-proinsulinové fondy ("pool"). Fond A (32 mg) vykazuje hmotový pík 9878 podle FAB-MS a aminokoncová sekvence vykazuje Gly-Ile-Val. Fond B (115 mg) vykazuje hmotový pík 10009 podle FAB-MS a

aminokoncová sekvence vykazuje Met-Gly-Ile. Spolu s hodnotami aminokyselinové analyzy, se zdá, že fond A odpovídá autentickému ACB-proinzulin-S-sulfonátu zatímco fond B odpovídá ACB-proinzulin-S-sulfonátové molekule plus odpovídajícímu iniciátorovému methioninovému zbytku k iniciaci kodonu. RP-HPLC, aminokyselinová analyza a N-koncové sekvencování ukazují, že oba bílkovinové fondy jsou znečištěny majoritní složkou druhého fondu kromě několika jiných píků.

S-Sulfonáty obou ACB-proinzulinových molekul se konvertují na disulfidicky zpárované vlásenkové ACB proinzulinové molekuly za použití kombinace vysoké hodnoty pH a přidaného thiolu , jak popsal Frank B.H. a kol., (1981), Peptides, Synthesis, Structure and Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium (Rich, D.H. a Gross E.), str. 729 až 738, Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Obě molekuly vytvářejí vlásenkovou strukturu v dobrém výtěžku (více než 75 %) a čistí se reverzní fázovou HPLC, čímž se získá 33 mg MetO-Gly1-ACB-proinzulinu (2-86) (Met-ACB-proinzulin) a 4 mg Gly1-ACB-proinzulinu (2-86) (ACB-proinzulin). Nízké výtěžky každého analogu jsou způsobeny potřebou konzervativních řezů ve fondu a shromážděním frakcí z čištění i minimalizaci příčné kontaminace mezi dvěma invertovanými proinzulinovými formami. Bílkoviny se charakterizují se zřetelem na čistotu a identitu použitím RP-HPLC (obr. 21) aminoterminálním sekvencováním, aminokyselinovou analyzou a FAB-MS s očekávanými výsledky. Kromě toho se Gly1-ACB proinzulinová (2-86) molekula analyzuje se zřetelem na vzor zpárování disulfidických vazeb.

Vynález se týká dále způsobu rekombinantní produkce nativních inzulinových bílkovin nebo inzulinových analogů, při kterém se

1. vytváří syntetický gen, přičemž tento gen zahrnuje DNA sekvenci zakodující ACB-PI peptidovou sloučeninu obecného vzorce I, kde x znamená 1,
2. tento gen se vnáší do vhodného vektoru obsahujícího promotor operátorovou regionální funkci v hostující molekule E. coli,
3. uvedený gen se orientuje ve vektoru k dosažení transkripce a translace syntetického genu a aby byl gen pod transkripční

kontrolou promotor-operátorové oblasti,

4. hostující buňka E. coli se transformuje vektorem,
5. transformovaná hostující buňka E. coli se kultivuje za podmínek vhodných k navození transkripce a translace genu
6. ACB-PI peptid se získá a čistí,
7. ACB-PI peptid se štěpí vhodnými peptidazami nebo chemickými činidly, takže se C-peptid odštěpí.

Vynález tedy poskytuje zcela novou cestu pro přípravu inzulinu za použití rekombinantní DNA technologie. Vynález využívá použití zcela nového genu, mRNA a proinzulinových meziproduktů pro produkci funkční lidské inzulinové molekuly spolu s konstituováním nové rekombinantní biosyntetické cesty k inzulinu. ACB-proinzulinová molekula se výrazně liší svojí strukturou od nativní proinzulinové molekuly (zde označované "BCA-proinzulin" pro účely srovnání) a přesto se může účinně konvertovat za získání funkční inzulinové molekuly.

Tato nová cesta přípravy inzulinu je odlišná od současného způsobu replikace přírodních procesů v odlišných organismech. Tento alternativní způsob vede k inzulinu za značných úspor v rekombinantní produkci obchodně významných množství inzulinu eliminací požadavku odstraňování N-koncového methionu z rekombinantní molekuly za použití cathepsinu C nebo jiných způsobů za využití vnitřního působení methionylaminopeptidazy E. coli hostující buňky k odstranění N-koncového methioninu.

Jelikož je odstranění N-koncového methioninového zbytku ACB-PI závislé na přítomnosti MAP, musí zvolená hostující buňka vnitřně produkovat MAP nebo musí být konstruována k produkci MAP. Proteasa MAP je vlastní buňkám E. coli. Proto se může použít různých řad buněk E. coli, které produkují MAP, při způsobu podle vynálezu. Jakožto příklad E. coli hostujících buněk, užitečných při provádění způsobu podle vynálezu, se uvádějí buněčné řady E. coli K12 L201, L687, L693, L507, L640, L641, L695, L814 (E. coli B). Podle výhodného provádění vynálezu je E. coli hostující buňkou E. coli K12 RV308.

Konverze ACB-PI molekuly s jednoduchým řetězcem na funkční nativní inzulin nebo na inzulinový analog vyžaduje odštěpení in-

ternálního C-peptidu. To je možné enzymatickými nebo chemickými prostředky například bromkyanovým štěpením. Jestliže se použije aminokyselinových sekvencí nativního lidského proinzulinu, A-řetězec, B-řetězec a P-peptid, při konstrukci ACB-hPI peptidu, jak příkladně doloženo, je aminokyselinová sekvence ACB-hPI peptidu následující:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10

Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys
A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20

Asn Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val
A21 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9

Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 C19

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
C20 C21 C22 C23 C24 C25 C26 C27 C28 C29

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Phe Val Asn Gln
C30 C31 C32 C33 C34 C35 B1 12 B3 B4

His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12 B13 B14

Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
B15 B16 B17 B18 B19 B20 B21 B22 B23 B24

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
B25 B26 B27 B28 B29 B30

Následující diagram objasňuje trypsinenzymatický model

zpracování ACB-PI, používaný při konverzi ACB-PI na inzulin:

Trypsin				↓	↓					↓	↓		
ACB-PI	Tyr	Cys	Asn	Arg	Arg	Glu	.....	Gln	Lys	Arg	Phe	Val	Ile
ACB-PI#	19	20	21	22	23	24		63	64	65	66	67	68
Insulin#	A19	A20	A21	C1	C2	C3		C42	C43	C44	B1	B2	B3

Jelikož trypsin štěpí na karboxypolohách Arg21, ARg22, Lys64 a Arg65, získá se směs inzulinových bílkovin při tryptickém štěpení ACB-PI. Ty zahrnují:

Arg_{A22}, Arg_{A23}, Arg_{B-1} insulin
Arg_{A22}, Arg_{B-1} insulin
Arg_{A22}, Arg_{A23} insulin
Arg_{A22} insulin

Následující štěpení shora uvedených druhů s karboxypeptidazou B odstraňuje argininové zbytky z karboxykonce A-řetězce, čímž se produkuje

Arg_{B-1} inzulin
nativní inzulin

Může se tudíž produkovat nativní lidský zralý inzulin proteolytickým štěpením ACB-hPI meziproduktu. B-koncový methioninový zbytek ACB-PI molekuly se vnitřně odstraňuje s přibližně 30% účinností působení methionylaminopeptidasy (MAP) v hostující buňce.

ACB-proinzulin se konvertuje na lidský inzulin použitím trypsinu a karboxypeptidasy B, jak se používá pro normální proinzulin a jak popsal Kemmler W. a kol., (1971) J. Biol. Chem., svazek 246, str. 6786 až 6791. Konverze ACB-proinzulinu na inzulin vyžaduje podstatně drsnější podmínky než odpovídající transformace proinzulinu. Reakce se sleduje RP-HPLC, jak je ukázáno na obr. 25 a vykazuje naprosté vymizení výchozího materiálu spolu s výskytem několika nových bílkovinových píků. Obr. 25 se týká transformace A-C-B-proinzulinu na lidský inzulin. Na ose x se odečítá doba v sekundách, na ose y odezva v milivoltech. Spodní

křivka platí pro lidský proinzulin, vyšší pro lidský inzulin a nejvyšší odpovídá 23 hodinové transformaci. Legenda k obr. 25:

Způsob	HBL 4 PK
Chemik číslo	Harlan
Sloupec	15 cm VYDAC C18
Koncentrace	
Gradient	
Příprava vzorku	
Podmínky	
Zařízení	8
Den zkoušky	07/12/90
Detektor	214 NM, 02 AUFS
	"0,1 mg/ml
	52,5 5,2.317,35,0,5
	použité zředění 0,1N HCl

45C, 1 ml/min, 40 UL injekci, A-0,1% TFA. B-DITTO/50% CH_3CN

— A = 201,1/2
lidský proinzulin
— C = B<17
23 hodinová traqnsformace
— řada III3 injekce 2
lidský inzulin

Po enzymovém štěpení se získaná peptidová směs rozdělí na své složky za použití RP-HPLC, jak je zřejmé z obr. 26 a různé frakce se shromáždí a analyzují se, jak je doloženo v tabulce IV.

Legenda k obr. 26, který se týká transformace Gly-A-C-B HPI na BHI přes trypsin & CPB. Na ose x se odečítá doba v sekundách, na ose y odezva v milivoltech.

Způsob	HBL 4 PK
Chemik číslo	Harlan
Sloupec	15 cm VYDAC C18 pep & Prot
Podmínky	
Zařízení	8
Den zkoušky	07/26/90
Detektor	214 nm, 2,0 AUFS

1 mg vzorku + trYpsin a CPB
45C, 1 ml/min, A-O,1% TFA, B-"v 50% CH_3CN
grad" 35-52,5/5 až 60/5 až 53/30 ař 90/.1
— řada III3 injekce 4
podíl A528MHO25

Tabulka IV
Analyza peptidů z proteolytické transformace ACB-proinzulinu na inzulin

		Analytická metoda			
Pík #	Identita	FAB/MS	AAAa	HPLC	Peptidová mapa
2 + 4	B22 30	ND	ano	ND	ND
3 + 5	B22 29	ND	ano	ND	ND
9	C-peptid	3020,3	ND	ano	ND
14	DOP-inzulin C	4866,4	ano	ND	ND
16	Arg-inzulin	5964.8	ano	ND	ND
17	inzulin	5808,5	ND	ano	ano
17	des-Thr-inzulin	5707,3	ND	ND	ano

ND = nestanoveno
[a]Amino kyselinová analysa
[b]V8 proteásový peptid mapující [c]deS_ ($B22^{-30}$_inzulin
[d]des-Thr^{B30}-inzulin

Píky 2 + 4 a 3 + 5 na obr. 26 se identifikují jakožto GFFYTPK = Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys (B^{23-29}) a GFFYTPKT = Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (B^{23-30}), což je pravděpodobně výsledkem štěpení trypsinem na Arg-22 B-řetězce inzulinu (Tabulka IV) a jsou jakožto dublety pro nutnost dvou oddělených jednotlivých vstřiků na sloupec. Pík 9 (obr. 26) se identifikuje jako C-peptid na základě koeluce C-peptidovým standardem a molekulovým hmotovým stanovením FAB-MS (tabulka IV). Pík 14 (obr. 26) odpovídá des-oktapeptid (B^{23-30}) inzulinu, což je druhý produkt reakce, který poskytuje pík 2 a 3. Pík 16 se identifikuje jako mono-Arg-inzulin, pravděpodobně mono-Arg(A22)-inzulin, na základě FAB-MS a aminokyselinové analyzy (tabulka IV). Větší izolovaný pík z trans-

formace je frakce 17 (133 μg). Tento bílkovinový pík koeluuje s autentickým biosyntetickým lidským inzulinem za použití RP-HPLC, jak dokládá obr. 27, na kterém je peptidová mapa inzulinu. Na ose x se odečítá doba v sekundách, na ose y odezva v milivoltech.

Legenda k obr. 27:

Způsob	WYL-O
Chemik číslo	A885
Sloupec	ZORBAX C8 150A
Příprava vzorku	
Podmínky	
Zařízení	159
Den zkoušky	08/07/90
Detektor	214 NM

enzymové štěpení jako přes WOT-O

A: 5%ACN/75%H_2O/20% 1,25M Na_2SO_4

— řada 718 injekcí 1
podíl AS0086
— řada 718 injekcí 2
podíl A52-8MH-025-17

Při analyze FAB-MS se získá pík molekulové hmotnosti 5808,5, jak se očekává pro lidský inzulin. Kromě toho se pozoruje menší pík molekulové hmotnosti 5707,3, představující 10 až 125 % veškeré bílkoviny a identifikovaný jako des-Thr(B30) inzulin. Des-Thr (B30) inzulin je znám ke kochramatografování s lidským inzulinem za RP-HPLC systému, použitého tak, že se neočekává neúspěch k oddělení tohoto materiálu od inzulinu. Pík 17 se také analyzuje za použití Staphylococcus aureus V8 proteazového peptidu, mapujícího podle Chance R.E a kol. (1981), Peptides. Synthesis, Structure and Function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium (Rich, D.H. & Gross, E.), str. 721 až 728, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, přičemž se zjišťuje, že je identický s biosyntetickým lidským inzulinem za očekávání, že se pozoruje malý

pík, reprezentující (GFFYTPK) Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys (z des-Thr(B^{30})inzulinu) vedle normálního píku (GFFYTPKT) Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr, jak je zřejmé z obr. 27. Jak je zřejmé z obr. 30, produkovaný inzulin proteolytickou transformací ACB-inzulinu je 100% biologicky aktivní při receptorových zkouškách lidského placentálního inzulinu.

Pro další stanovení, zdali bílkovina, produkovaná příkladným enzymatickým štěpením ACB-proinzulinů odpovídá nebo neodpovídá nativnímu lidskému inzulinu, se porovnávají obrazce trypsin + pepsinového štěpení ACB-proinzulinem produkované bílkoviny ve srovnání s obrazci trypsin + pepsinových štěpících obrazců lidského inzulinu. Prostřednictvím trypsin + pepsinového štěpení lidského inzulinu se získá stabilní A1-13/B1-11 fragment plus četné jiné menší fragmenty, jak popisuje Toren, P a kol., (1988) Anal. Biochem. svazek 169, str. 287 až 299. Z 12 možných inzulinových disulfidických izomerů, obsahujících jednoduchý A a B řetězec, pouze tři mohou poskytovat volné a oddělené fragmenty při štěpení s pepsinem, jmenovitě přírodní hormon a dva disulfidické izomery chemicky syntetizované dříve, jak popisuje Sieber P.a kol.,(1978) Hoppe-Seylor's Z. Physiol. Chem., svazek 359, str. 113 až 123. Fragment A1-13/B1-11 se získá z trypsin/pepsinového štěpení ACB-proinzulinu a porovnává se s fragmenty A1-13/B1-11, získanými z těchto tří inzulinových izomerů. Kompletní pepsinové štěpení ukazuje, že větší HPLC pík koeluuje s A1-13/B1-11 fragmentem z přírodního inzulinu a že neobsahuje žádný z píků soutěžících A1-13/B1-11 fragmentů ze dvou disulfidických izomerů, jak je ukázáno na obr. 22. Větší štěpný pík se čistí (53 μg) a podle zjištění má očekávané aminokyselinové složení pro A1-13/B1-11.

Následující příklady praktického provedení vynález objasňují, nijak jej však neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce syntetického ACB-proinzulinového genu

278 pár bází DNA fragment, který zakodovává lidský ACB-proinzulinový gen se udrčí na bázi dobře známé aminokyselinové sekvence lidské proinzulinové molekuly a zahrnuje sekvence:(pozitivní řetězec sekv ID číslo 2, negativní řetězec = sekv ID číslo 3)

5' - AGCTTCATATGGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTG
3' - AGTATACCCGTAACACCTTGTTACGACATGGTCGTAGACGAGGGAC

TACCAGCTGGAGAACTACTGCAACCGCCGTGAGGCAGAGGACCTGCAGGTG
ATGGTCGACCTCTTGATGACGTTGGCGGCACTCCGTCTCCTGGACGTCCAC

GGTCAGGTGGAGCTGGGCGGTGGCCCGGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCGCTG
CCAGTCCACCTCGACCCGCCACCGGGCCCACGTCCGTCGGACGTCGGCGAC

GCCCTGGAGGGTTCCCTGCAGAAGCGTTTTTTGAACCAACACCTGTGCGGC
CGGGACCTCCCAAGGGACGTCTTCGCAAAAAACTTGGTTGTGGACACGCCG

TCCCACCTGGTGGAAGCTCTGTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTC
AGGGTGGACCACCTTCGAGACATGGACCACACGCCACTTGCACCGAAGAAG

TACACCCCGAAGACCTAGGATCCG - 3'
ATGTGGGGCTTCTGGATCCTAGGCTTAA - 5'

Nukleotidové sekvence se modifikují na svých zakončeních 5' a 3' přidáním bází k vytvoření NDeI a BamHI restrikčních poloh lemovaných HindIII a ECoRI polohami pro klonování genu do polyspojovníkové oblasti pUC18 plasmidu. Osm syntetických oligonukleotidů (oblasti 1 - 8 ve shora uvedeném grafu), lišících se délkou od 56 do 74 bází, jak shora uvedeno, se generují za použití DNA syntetizeru Applied Biosystems Model 380A nebo 380B (obchodní produkt společnosti Applied Biosystems, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) podle pokynů výrobce a čistí se elektroforezou na 15% polyakrylamidového gelu. Tyto oligonukleotidy se fosforylují za použití [gamma-p32] ATP a polynukleotidové kinásy a pak se komplexují s T4 DNA ligasou k vytvoření dvou 139 párů

bázi dlouhých DNA duplexů, jak popisuje Brown, E.L.,, Belagaje R., Ryan M.J. a Khorana H.G., (1979), Method in Enzymology, Academic Press, N.Y. 68, str. 109 až 151.

První polovina ACB-PI genu se formuje mísením nefosforylovaného oligonukleotidu 1 fosforylovanými oligonukleotidy 2, 5 a 6, zatímco druhá polovina genu se formuje mísením fosforylovaných oligonukleotidů 3, 4 a 7 nefosforylovaným oligonukleotidem 8. Obě poloviny genových fragmentů se čistí na 15% polyakrylamidovém gelu a DNA se získá z gelového tenkého řezu elektroforeticky a odsolením na sloupci Sephadexu G-50.

Příklad 2

Konstrukce plasmidu pRB 181

Přibližně 5 μg plasmidu pUC18 (obchodně dostupný u společnosti Boehringer-Mannheim) se suspenduje v 10 μl 10X HindIII pufru (1M chloridu sodného, 50 mM chloridu hořečnatého, 100 mM tris-HCl, hodnota pH 8,0, 10 mM dithioerythritolu), ve 2 μl HindIII restrikční endonuklease (obchodně dostupná u společnosti Boehringer-Mannheim, 20 jednotek), v 85 μl vody, mírně se míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. DNA se vysráží třemi objemy ethanolu, 0,3 M v octanu sodném. Po odstředění a usušení ve vakuu se peleta rozpustí v 10 μl 10X EcoRI pufru (1M chloridu sodného, 100 mM chloridu hořečnatého, 500 mM tris-HCl, hodnota pH 7,5, 10 mM dithioerythritolu), ve 2 μl EcoRI restrikčního enzymu (obchodně dostupný u společnosti Boehringer-Mannheim,20 jednotek), v 88 μl vody, mírně se míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dalších dvou hodin. DNA se opět vysráží třemi objemy ethanolu, 0,3 M v octanu sodném, a podrobuje se elektroforeze na 1% agarosovém gelu s nízkou teplotou tání. Větší HindIII/Eco RI restrikční fragment (2623 bp) se odřízne z gelu a DNA se získá vedením sloupcem Elutip-d^{R} (obchodně dostupný u společnosti Schlicher & Schuell, Keene, NH, 03431) podle návodu výrobce. Po vysrážení a usušení se DNA skladuje v 30 μml 10mM tris-HCl, hodnota pH 8,0 při teplotě 4 °C.

Přibližně 5 μl tohoto vektoru DNA se smísí s 10 pikomoly

dvou syntetických DNA fragmentů, shora připravených, v 50 µl ligačního pufru (50mM tris-HCl, 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM DTT, 800 uM ATP a 3,5 jednotek T4 DNA ligasy, hodnota pH 7,6).Reakční směs se inkubuje při teplotě 4 °C přes noc a převede se do zmrazených příslušných buněk E. coli DH5 (obchodně dostupných u společnosti Bethesda Research Laboratories, Inc., P.O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20877). Transformanty se nechávají růst přes noc při teplotě 37 °C na x-gal TY agarových destičkách, obsahujících 100 µg/ml ampicilinu. Volí se klony obsahující správný inzert ztrátou funkcionálního lacZ genu podle modro/bílé kolonové selekce a potvrzuje se ds-DNA sekvencováním za použití Sekvenasové soupravyy (obchodně dostupná u společnosti United States Biochemical Corp.). Získaný plasmid se označuje jako pRB181.

Příklad 3

Konstrukce rekombinantních vektorů a hostitelů

A. Konstrukce plasmidu pCZR126S

1. Izolace plasmidu pkC283

Lyofily E. coli K12 BE1201/pKC283 se získají u společnosti Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604, pod číslem NRRL BG-15830. Lyofily se dekantují do zkumavky obsahující 10 ml LB prostředí (10 g Bacto-tryptonu, 5 g Bacto kvasničného extraktu a 10 g chloridu sodného na litr, hodnota pH nastavena na 7,5) a inkubuje se po dobu dvou hodin při teplotě 32 °C, přičemž se vytvoří kultury 50 µg/ml v ampicilinu a pak se inkubuje při teplotě 32 °C přes noc. Buňky E. coli K12 BE1201/pKC283 se kultivují při teplotě 32 °C, jelikož buňky obsahují k teplotě citlivý cI represní gen, integrovaný do buněčné DNA. Jesliže se použijí buňky, které obsahují divoký typ lambda pL represorového genu nebo které neobsahují lambda pL promoter při izolačním postupu, jak popsáno v následujících příkladech, je inkubační teplota 37 °C.

Malý díl kultury, pěstované přes noc, se vnese na LB-agarové destičky (LB prostředí s 15 g/l Bacto-agaru), obsahující 5

μg/ml ampicilinu tak, že se získá jednoduchý kolonový izolát E. coli K12 BE1201/pKC283. Získaná jednoduchá kolona se naočkovává do 10 ml LB prostředí, obsahujícího 50 μg/ml ampicilinu a inkubuje se přes noc při teplotě 32 °C za intenzivního třepání. Naočkovává se 10 ml kultury, kultivované přes noc, do 500 LB prostředí, obsahujícího 50 μg/ml ampicilinu a inkubuje se při teplotě 32 °C za intenzivního třepání tak dlouho, až kultura dosáhne stacionární fáze.

Následující procedura je přizpůsobená podle Maniatis a kol., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory). Buňky se sklidí odstředěním při 4000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a pak se supernatant zahodí. Buněčná peleta se promyje ve 100 ml ledově chladného STE pufru (0,1M chloridu sodného, 10 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,8 a 1 mM EDTA). Po promytí se buněčná peleta resuspenduje v 10 ml Roztoku 1 (50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl, hodnota pH 8,0 a 10 mM EDTA), obsahujícím 5 mg/ml lysozymu a ponechá se při teplotě místnosti po dobu 10 minut. Přidá se 20 ml Roztoku 2 (0,2 N hydroxidu sodného a 1 % SDS) do buněk zpracovaných lysozymem a roztok se mírně míchá za inverze. Směs se inkubuje na ledu po dobu 10 minut.

Přidá se 15 ml ledově chladného 5 M octanu draselného, hodnota pH 4,8 do zpracované směsi buněk a roztok se míchá za inverze. Roztok se inkubuje na ledu po dobu 10 minut. Připraví se 5 M roztok octanu draselného přidáním 11,5 ml ledové kyseliny octové do 28,5 ml vody a 60 ml 5 M octanu draselnéiho. Získaný roztok je 3 M se zřetelem na draslík a 5 M se zřetelem na acetát.

Lysovaná směs buněk se odstřeďuje v odstředivce Beckman SW27 (nebo v rovnocenné odstředivce) při počtu otáček 20000/min po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Buněčná DNA a zlomky vytvářejí peletu na dně zkumavky. Získá se přibližně 36 ml supernatantu a přidá se 0,6 objemů isopropanolu, smísí se a získaný roztok se ponechá při teplotě místnosti po dobu 15 minut. Plasmid DNA se získá ostřeďováním při 12000 g po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Supernatant se vyhodí a DNA peleta se promyje 70% ethanolem při teplotě místnosti. Ethanolový promývací roztok se dekantuje a peleta se vysuší ve vakuovém desikátoru. Peleta se pak re-

suspenduje v 8 ml TE pufru (10 mM Tris-HCl, hodnota pH 8,0 a 1mM EDTA).

Přidá se 8 g chloridu cesného do DNA roztoku. Přibližně 0,8 ml 10 mg/ml roztokuu ethidiumbromidu ve vodě se přidá na každých 10 ml roztoku chloridu cesného - DNA. Konečná hustota roztoku je přibližně 1,55 g/ml a ethidiumbromidová koncentrace je přibližně 600 µg/ml. Roztok se převede do odstředivkové zkumavky Beckman Type 50, naplní se po vrch parafinovým olejem, utěsní se a odstřeďuje se při počtu otáček 45000/min po dobu 24 hodin při teplotě 20 °C. Po odstředění jsou viditelné dva pásy DNA v obyčejném světle. Po odstranění čepičky ze zkumavky, se odstraní nižší DNA pás použitím stříkačky s hypodermní jehlou #21, zavedenou z boku odstředivkové zkumavky.

Ethidiumbromid se odstraní opakovanou extrakcí vodou nasycenou 1-butanolem. Chlorid cesný se odstraní dialyzou proti TE pufru. Po extrakcích pufrovaným fenolem a pak chloroformem se DNA vysráží, promyje se 70% ethanolem a vysuší se. Získá se přibližně 1 mg plasmidu pKC283 a uloží se při teplotě 4 °C v TE pufru při koncentraci přibližně 1 µg/µl. Restrikční poloha a funkční mapa plasmidu pKC283 je na obr. 1.

Příklad 3.A.2

Konstrukce plasmidu pKC283PX

Přibližně 10 µl plasmidu pKC283 DNA, připraveného způsobem podle příkladu 1, se smíchá se 20 µl systému 10 X střední- solný restrikční pufr (500 mM chlorid sodný, 100 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 100 mM chlorid hořečnatý a 10 mM DTT), 20 µl 1 mg/ml BSA, 5 µl restričního enzymu PvuII (přibližně 50 jednotek, jak definováno společností Bethesda Research Laboratories (BRL), od které jsou všechny zde používané restrikční enzymy) a 145 µl vody a získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Restrikční enzymové reakce, zde popisované, se rutinně ukončují fenolovou a pak chloroformovou extrakcí, po které se provede vysrážení DNA, promytí ethanolem a resuspendování DNA v TE pufru. Po ukončení PvuII štěpení, jak shora popsáno, PvuII

štěpený plasmid pKC283 DNA se vysráží a pak se resuspenduje v 5 µl TE pufru.

Přibližně 600 pikomol (pM) XhoI spojovníků (5'-CCTCGAGG-3') (sekvence Id číslo 4) se kinazuje ve směsi obsahující 10 µl 5 X pufru Kinasa (300 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,8, 50 mM chloridu hořečnatého a 25 mM DTT), 5 µl 5 mM ATP, 24 µl vody, 0,5 µl T4 polynukleotidové kinasy (přibližně 2,5 jednotek, jak definováno P-L Biochemicals), 5 µl 1 mg/ml BSA a 5 µl 10 mM spermidinu inkubací směsi při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

Přibližně 12,5 µl kinasovaných XhoI spojovníků se přidá do 5 µl PvuII štěpeného plasmidu pkC283 DNA a pak se přidá 2,5 µl 10 X ligasového pufru (300 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,6, 100 mM chlorid hořečnatý a 50 mM DTT), 2,5 µl 1 mg/ml BSA, 7 µl 5 mM ATP, 2,5 µl (přibližně 2,5 jednotek podle P-L Biochemicals) T4 DNA ligasy, 2,5 µl 10 mM spermidinu a 3 µl vody do DNA. Výsledná ligační reakční směs se inkubuje přes noc při teplotě 4 °C. Po ukončení ligační reakce se reakční směs nastaví tak, aby měla složení vysoce slaného pufru (0,1 M chloridu sodného, 0,05 M Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 10,0 mM chloridu hořečnatého a 1 mM DTT). Přidá se přibližně 10 µl (100 jednotek) restrikčního enzymu XhoI do směsi a získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin.

Reakce se ukončí a XhoI štěpená DNA se vysráží, resuspenduje a provede se ligace shora popsaným způsobem s tou výjimkou, že se do ligační směsi nepřídá žádný XhoI spojovník. Ligatovaná DNA je žádaným plasmidem pKC283PX. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pKC283PX je na obr. 2.

Příklad 3.A.3

Konstrukce E. coli K12 MO (lambda ±)/pKC283PX

E. coli K12 MO(lambda+) se může získat od Northern Regional Research Laboratories, kde je uloženo pod číslem NRRL B-15993, v lyofilizovaném stavu. E. coli K12 MO(lambda+) obsahuje divoký typ lambda pL CI represorový gen, takže transkripce z hybridu pL-lpp promoteru podle vynálezu neprobíhá v buňkách E. coli K12

MO(lambda+). Lyofily se rekonstituuji, jednoduché kolonie MO(lambda+) se izolují a připraví se 10 ml přes noc kultivovaých MO(lambda+) buněk v podstatě způsobem podle příkladu 29A1 s tou výjimkou, že teplota při inkubaci je 37 °C a v růstovém prostředí se nepoužívá žádného ampicilinu.

Použije se 50 µl kultury kultivované přes noc k naočkování 5 ml LB prostředí, které také obsahuje 10 mM síran hořečnatý a 10 mM chlorid hořečnatý. Kultura se inkubuje při teplotě 37 °C přes noc za intenzivního třepání. Následující ráno se kultura zředí na 200 ml LB prostředím, obsahujícím 10 mM síranu hořečnatého a 10 mM chloridu hořečnatého. Zředěná kultura se inkubuje při teplotě 37 °C za intenzivního třepání až je absorbance při 550 nm (A_{550}) přibližně 0,5, což indikuje hustotu buněk přibližně 1 x 10^8 buněk/ml. Kultura se ochladí na 10 minut v lázni ledové vody a buňky se pak shromáždí odstřeďováním při 4000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Buněčná peleta se resuspenduje ve 100 ml studeného 10 mM síranu hořečnatého a pak se bezprostředně znova peletizuje odstředěním. Buněčná peleta se resuspenduje ve 100 ml 30 mM chloridu vápenatého a inkubuje se na ledu po dobu 20 minut.

Buňky se opět shromáždí odstředěním a resuspendují se v 10 ml 30 mM chloridu vápenatého. Půl mililitrový podíl buněk se přidá do ligované DNA, připravené podle příkladu 29A2; DNA se připraví 30 mM v chloridu vápenatém. Směs buněk a DNA se inkubuje na ledu po dobu jedné hodiny, tepelně se na ni působí při 42 °C po dobu 90 sekund a pak se ochladí na ledu v průběhu přibližně dvou minut. Směs buněk a DNA se zředí na 10 ml LB prostředím ve 125 ml baňkách a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Nanesou se 100 µl podíly na LB agarové destičky obsahující ampicilin a inkubují se při teplotě 37 °C až do výskytu kolonií.

Kolonie se jednotlivě kultivují a plasmid DNA jednotlivých kolonií se zkoumá restrikční enzymovou analyzou a gelovou elektroforézou. Plasmid DNA se izoluje způsobem podle příkladu 29A1, avšak stupeň gradientu chloridu cesného se vynechává dokud se žádané E. coli K12 MO(lambda+)/pKC283PX transformáty neidentifikují. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pKC283PX je na obr. 2.

Příklad 3.A.4

Konstrukce E. coli K12 MO (lambda ±)/pKC283-L

Připraví se 10 μg plasmidu pKC283PX DNA způsobem podle příkladu 29A1 a rozpustí se v 2o μl 10X vysoce slaného pufru, 20 μl 1 mg/ml BSA, 5 μl (přibližně 50 jednotek) restrikčního enzymu Bg1II, 5 μl (přibližně 50 jednotek) restrikčního enzymu XhoI a 150 μl vody a získaná reakční směs se inkubuje po dobu dvou hodin při teplotě 37 °C. Reakce se ukončí a po vysrážení Bg1II-XhoI štěpené DNA se DNA resuspenduje v 5 μl TE pufru. Syntetizuje a kinazuje se DNA spojovník s konci DNA s jednoduchým řetězcem charakteristický restrikčním enzymovým štěpením Bg1II a XhoI. Spojovník se kinazuje v podstatě způsobem podle příkladu 3A2. DNA spojovník má následující strukturu:

```
5'-GATCTATTAACTCAATCTAGAC-3'
      |||||||||||||||||||          (sekv. ID číslo 5)
   3'-ATAATTGAGTTAGATCTGAGCT-5'    (sekv. ID číslo 6)
```

Shora uvedený spojovník se syntetizuje z deoxyoligonukleotidů s jednoduchým řetězcem o sobě známým způsobem. Deoxyoligonukleotidy s jednoduchým řetězcem se mohou syntetizovat za použití komerčně dostupných zařízení, jako je například syntetizátor 380 DNA Syntetizer společnosti Applide Biosystems (850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404),, který využívá fosforamiditové chemie. Jiné procesy pro syntezu DNA jsou v oboru rovněž známy. Běžně modifikovaný fosfortriesterový způsob syntetzy DNA s jednoduchým řetězcem popsal Itakura a kol., 1977, Science 198:1056 and Crea a kol., 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:576. Kromě toho popsal speciální způsob DNA syntezy Hsiung a kol., 1983, Nucleic Acid Research 11:3227 a Narang a kol., 1980, Methods in Enzymology 68:90.

Spojovník a Bg1II-XhoI štěpený plasmid pKC283PX se ligatuje v podstatě způsobem podle příkladu 3A2. Ligatovaná DNA konstituuje žádaný plasmid pKC283PX. Restrikční místo a funkční mapa plas-

midu pKC283-L jsou na obr. 3. Plasmid pKC283-L DNA se používá k transformaci E. coli K12 MO(lambda+) a rezultující E. coli K12 MO(lambda+)/pKC283-L transformanty se identifikují v podstatě způsobem podle příkladu 3A3.

Příklad 3.A.5.

Konstrukce E. coli K12 MO(lambda+)/pKC283-LB

Přibližně 10 μg plasmidu pKC283-L DNA, připraveného v podstatě způsobem podle příkladu 29A1, se rozpustí ve 20 μl 10X vysoce slaného pufru, 20 μl 1 mg/ml BSA, 5 μl (přibližně 50 jednotek restrikčního enzymu XhoI a 155 μl vody a získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. XhoI štěpený plasmid pKC283-L DNA se pak vysráží z reakční směsi přidáním tří objemů 95% ethanolu a jedné desetiny objemu 3 M octanu sodného, inkubuje se v lázni suchý led - ethanol po dobu 5 minut a odstředí se. Získaná DNA peleta se promyje 70% ethanolem, vysuší se a resuspenduje se ve 2 μl 10X zlomového translačního pufru (0,5 M Tris-HCl, hodnota pH 7,2, 0,1 M síranu hořečnatého a 1 mM DTT), v 1 μl roztoku 2 mM v každém deoxynukleotidtrifosfátu, 15 μl vody, 1 μl (přibližně 6 jednotek podle P-L Biochemicals) Klenow, který je velkým fragmentem E. coli DNA polymerasy I a v 1 μl 1 mg/ml BSA. Získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 25 °C po dobu 30 minut. reakce se ukončí inkubací roztoku při teplotě 70 °C po dobu 5 minut.

BamHI spojovníky (5'CGGGATCCCG-3')(sekv. ID číslo 7) se kinasuje a ligatuje na XhoI štěpený, Klenowem zpracovaný plasmid pKC283-L DNA v podstatě způsobem podle příkladu 3A2. Po ligační reakci se DNA štěpí s přibližně 100 jednotkami BamHI po dobu přibližně dvou hodin při teplotě 37 °C ve vysoce slaném pufru. Po BamHI štěpení se připraví DNA pro ligaci v podstatě stejným způsobem jako podle příkladu 3A2.

Přibližně 5,9 kb BamHI restrikční fragment se cirkularizuje ligací a transformuje se na E. coli K12 MO(lambda+) v podstatě stejným způsobem jako podle příkladu 3A2 a 3A3. E. coli K12 MO (lambda+)/pKC283-LB transformanty se identifikují a pak se při-

pravi plasmid pKC283-L DNA v podstatě způsobem podle příkladu 3A1. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pKC283-LB jsou na obr. 4.

Příklad 3.A.6

Konstrukce E. coli K12 MO(lambda+)/pL32

Přibližně 10 μg plasmidu pKC283PX se štěpí restričním enzymem SalI ve vysoce slaném pufru, zpracuje se Klenowem a ligatuje se na EcoRI spojovník (5'GAGGAATTCCTC-3')(sekv. ID číslo 8) v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A5 s výjimkou používaného výchozího plasmidu, restrikčního enzymu a spojovníku. Po štěpení s restrikčním enzymem EcoRI, které vede k odštěpení přibližně 2,1 kb DNA, přibližně 4,0 kb EcoRI se restrikční fragment cirkularizuje ligací na výsledný plasmid pKC283PRS. Ligatované DNA se používá k transformaci E. coli K12 MO(lambda+) v podstatě stejným způsobem jako podle příkladu 3A3. E. coli K12 MO(lambda+)/pKC283-LB transformanty se identifikují a pak se připraví plasmid pKC283PRS DNA v podstatě způsobem podle příkladu 3A1. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pKC283PRS jsou na obr.5.

Přibližně 10 μg plasmidu pKC283PRS se štěpí ve 200 μl vysoce slaného pufru s přibližně 50 jednotkami každého z restrikčních enzymů PstI a SphI. Po inkubasci reakční směsi při teplotě 37 °C po dobu přibližně dvou hodin se reakční směs podrobuje elektroforeze na 0,6% agarozovém gelu s nízkou teplotou gelování (společnosti FMC Corporation, Marine Colloids Division, Rockland, Maine 04841) po dobu 2 až 34 hodin při přibližně 130 V a přibližně 75 mA v Tris-acetátovém pufru.

Gel se zabarví ve zředěném roztoku ethidiumbromidu a pás DNA, konstituující přibližně 0,85 kb PstI-SphI restrikční fragment,, který se zviditelní v dlouhovlnném ultrafialovém světle, se odřízne od gelu ve formě malého segmentu. Objem segmentu se stanoví podle hmotnosti a hustoty segmentu a přidá se stejný objem 10 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,6 do zkumavky obsahující segment. Segment se pak roztaví inkubací při teplotě 72 °C. Získá se přibližně 1 g přibližně 0,85 kb PstI-SphI

restrikčního fragmentu plasmidu pKC283-PRS v objemu asi 100 µl. Analogicky se štěpí plasmid pKC283-LB s restrikčními enzymy PstI a SphI, a výsledný přibližně 3,0 kb restrikční fragment se izoluje elektroforézou agarosového gelu a připraví se k ligaci.

Přibližně 0,85 kb PstI-SphI restrikční fragment plasmidu pKC283PRS se ligatuje na přibližně 3,0 kb PstI-SphI restrikční fragment plasmidu pKC283-LB v podstatě způsobem podle příkladu 3A2. Ligatovaná DNA konstituuje žádaný plasmid pL32. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL32 jsou na obr. 6. Plasmid pL32 se transformuje na buňky E. coli K12 MO(lambda+) v podstatě stejným způsobem jako podle příkladu 3A3. Plasmid pL32 DNA se připravuje z E. coli K12 MO(lambda+)/pL32 transformantů v podstatě způsobem podle příkladu 3A1. Analyza plasmidu pL32 DNA dokládá, že více než jeden EcoRI spojovník je vázán na Klenowem zpracovaná SalI zakončení plasmidu pKC283PX. Obsah více než jednoho EcoRI spojovníku neovlivňuje použitelnost plasmidu pL32, nebo derivátu plasmidu pL32 a může se zjistit podle přítomnosti XhoI restrikčního místa, které se generuje, kdykoliv jsou spolu vázány dva spojovníky EcoRI. Alternativně se může konstruovat plasmid pL32 odštěpením SalI-EcoRI a ligací podle prvního odstavce tohoto příkladu na plasmid pKC283-LB.

Příklad 3.A.7

Konstrukce E. coli K12 MO(lambda±)/pL47

E. coli K12 RV308/pNM789 se může získat od Northern Regional Research Laboratories, kde je uloženo pod číslem NRRL B-18216 v lyofilizovaném stavu. Restrikční místo a funkční mapa pNM789 jsou na obr. 7. Plasmid DNA se extrahuje z kultury v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 1, přičemž však inkubační teplota je 37 °C. Suspenduje se 10 µg pNM789 ve 200 µl PvuII pufru (50 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 60 mM chloridu sodného a 6 mM chloridu hořečnatého). Přidá se jedna jednotka PvuII a reakční směs se inkubuje po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Enzym se inaktivuje udržováním na teplotě 65 °C po dobu 10 minut. Pak se přidá 30 µl BamHI pufru ((200 mM Tris-HCl, hodnota

pH 8,0, 1M chloridu sodného a 70 mM chloridu hořečnatého), 70 μl vody a 10 jednotek BamHI a reakční směs se inkubuje po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Pak se přidá 5 jednotek alkalické fosfatasy a inkubuje se po dobu jedné hodiny při teplotě 65 °C. Oddělí se fragmenty DNA na 1% agarozovém gelu a čistí se DNA jednoduchý řez fragmentu (obr. 8).

DNA spojovník s chybějícím zakončením a BamHI zakončením se syntetizuje v podstatě způsobem podle příkladu 3A4. Tento spojovník (na 118 v obr. 8) má následující strukturu:

```
5'-CTGTGCCTTCTAG-3'
   ||||||||||||
3'-GACACGGAAGATCCTAG-5'
```

(sekv. ID číslo 9)
(sekv. ID číslo 10)

Shora uvedený spojovník je kinasován a ligatován do BamHI-PvuII štěpeného plasmidu pNM789 v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A2. Této ligační směsi se používá k transformaci buněk E. coli K12 RV308 a izolace plasmidu se provádí na těchto transformantech v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A3. Selektují se některé plasmidy, které obsahují vhodný PvuII fragment (494bp) a XbaI-BamHI fragment (628bp). Sekvence alespoň dvou z nich se stanovuje sekvenováním z polohy BamHI se zřetelem na polohu SmaI a selektuje se jeden klon s žádanou sekvencí. Tento plasmid jakožto meziprodukt se označuje jako plasmid 120. Schema tohoto postupu a restrikční místo a funkční mapa plasmidu 120 jsou na obr. 8.

K izolaci EK-BGH kodující DNA se štěpí přibližně 10 μg plasmidu 120 ve 200 μl vysoce slaného pufru obsahujícího 50 jednotek každého z restrikčních enzymů XbaI a BamHI. Štěpné produkty se oddělí na agarozovém gelu elektroforezou a přibližně 0,6 kb XbaI-BamHI restrikční fragment, který zakodovává EK-BGH, se izoluje a připraví pro ligaci v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 29A6.

Plasmid pL32 se také štěpí restrikčními enzymy XbaI a BamHI a přibližně 3,9 kb restrikční fragment se izoluje a připraví pro ligaci. Přibližně 3,9 kb XbaI-BamHI restrikční fragment plas-

midu pL32 se liguje na přibližně 0,6 kb XBaI-BamHI restrikční fragment plasmidu 120 v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A2, čímž se získá plasmid pL47. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL47 jsou na obr. 9. Plasmid pL47 se pak transformuje na E. coli K12 MO(lambda+) v podstatě stejným způsobem jako podle příkladu 3A3 a identifikují se E. coli K12 MO(lambda+)/pL47 transformanty. Plasmid pL47 DNA se připravuje z transformantů v podstatě způsobem podle příkladu 3A1.

Příklad 3.A.8

Konstrukce E. coli K12 RV308/pPR12AR1

Plasmid pPR12 obsahuje k teplotě citlivý pL represorový gen cI857 a plasmid pBR322 a gen přispívající k odolnosti k tetracyklinu. Plasmid pPR12 je popsán v americkém patentovém spise číslo 4 436815 (uděleném 13. března 1984). Restrikční místo a funkční mapa pPR12 jsou na obr. 10.

Přibližně 10 µg plasmidu pPR12 se štěpí s přibližně 50 jednotkami restrikčního enzymu EcoRI ve 200 µl vysoce slaného pufru při teplotě 37 °C dvou hodin. EcoRI štěpený plasmid pPR12 DNA se vysráží a zpracovává se činidlem Klenow v podstatě způsobem podle příkladu 3A5. Po Klenowě reakci se EcoRI štěpí, Klenowem zpracovaný plasmid pPR12 DNA se recirkularizuje ligací způsobem v podstatě stejným, jako je popsáno v příkladu 3A2. Ligovaná DNA , která konstituuje žádaný plasmid pPR12ΔR1, se používá k transformaci E. coli K12 RV308 v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A3, avšak selekce je založena na odolnosti tetracyklinu (5 µg/ml) nikoliv na odolnosti ampicilinu. E. coli K12 RV308 je dostupný v NRRL pod číslem NRRL B-15624. Po identifikaci transformantů E.coli K12 RV308/pPR12ΔR1 se připravuje plasmid pPR12ΔR1 DNA z trasformantů v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A11.

Přibližně 10 μg plasmidu pPR12ΔR1 se štěpí přibližně 50 jednotkami restrikčního enzymu AvaI ve 200 μl středně slaného pufru při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Plasmid pPR12ΔR1 DNA štěpený AvaI se vysráží a zpracuje se činidlem Klenow v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A5. Po Klenowě reakci se AvaI štěpený, činidlem Klenow zpracovaný plasmid pPR12ΔR1 DNA ligatuje na EcoR1 spojovníky (5'-GAGGAATTCCTC-3') v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A2. Po legaci spojovníku se DNA vysráží a pak se resuspenduje v přibližně 200 μl vysoce slaného pufru, obsahujícího přibližně 50 jednotek restrikčního enzymu EcoR1. Získaná reakční směs se inkubuje při teploitě 37 °C po dobu přibližně dvou hodin. Po EcoR1 štěpení se reakční směs vnese na agarozový gel a přibližně 5,1 kb EcoR1 restrikčního fragmentu se čistí v podstatě způsobem podle příkladu 3A6. Přibližně 5,1 kb EcoR1 restrikční fragment recirkularizuje ligací v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A2. Ligatovaná DNA konstituuje žádaný plasmid pPR12AR1. Plasmid pPR12AR1 se transformuje na E. coli K12 RV308 v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A3, přičemž je však selekce založena na odolnosti teracyklinu a nikoliv na odolnosti ampicilinu. Po identifikaci E. coli K12 RV308/pPR12AR1 tranformantů se připraví plasmid pPR12AR1 DNA v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A1.Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pPR12AR1 je na obr. 11.

Příklad 3.A.9

Konstrukce E. coli K12 RV308/pL110

Přibližně 10 μg plasmidu pPR12AR1 DNA se suspenduje v přibližně 200 μl vysoce slaného pufru, obsahujícího přibližně 50 jednotek každého z restrtikčních enzymů PstI a EcoRI a štěpicí reakční směs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu přibližně dvou hodin. Restikční směs se pak vnese na agarozový gel a izoluje se přibližně 2,9 kb PstI-EcoR1 restrikčního fragmentu a připraví se pro ligaci v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A6.

Přibližně 10 μg plasmidu pL47 se štěpí restrikčními enzymy PstI a BamHI ve 200 μl vysoce slaného pufru při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. PstI a BamHI štěpená DNA se vnese na agarozový gel a izoluje se přibližně 2,7 kb PstI-BamHI restrikčního fragmentu, který obsahuje počátek replikace a část genu, přispívajícího k odolnosti ampicilinu a připraví se pro ligaci v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A6. V oddělené reakci se přibližně 10 μg plasmidu pL47 DNA štěpí restrikčními enzymy EcoRI a BamHI v 200 μl vysoce slaného pufru při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin a izoluje se přibližně 1,03 kb EcoRI a BamHI restrikční fragment, který obsahuje novou transkripční a translační aktivační sekvenci a EK-BGH kodující DNA a připraví se pro ligaci v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A6. Přibližně 2 μg přibližně 1,03 kb EcoRI a BamHI restrikčního fragmentmentu se použije při konstrukci plasmidu pL110.

Přibližně 2,7 kb PstI-BamHI a přibližně 1,03 kb EcoRI a BamHI restrikčních fragmentmentů plasmidu pL110 se ligátuje na přibližně 2,9 kb PstI-EcoRI restrikční fragment plasmidu pPR12AR1 ke konstrukci plasmidu pL110 a ligatované DNA se použije k transformaci E. coli K12 RV308 v podstatě stejném způsobu, jako je popsáno v příkladu 3A2 a 3A3, přičemž se však využívá odolnosti k tetracyklinu a nikoliv odolnosti k ampicilinu jakožto báze pro selekci transformantů.

Dvě PstI restrikční enzymy rozpoznávací místa jsou v EK-BGH kodující oblasti, která není vyznačena v restrikčním místu a na funkčních mapách na obr. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL110 je na obr. 12.

Příklad 3.A.10

Konstrukce E. coli K12 RV308/pL110C

Příklad 3.A.10.a

Konstrukce E. coli K12 RV308/pL110CA

Přibližně 1 μg plasmidu pL110 DNA se štěpí s restrikčním enzymem NdeI ve 20 μl celkového objemu, obsahujícího 2 μl 10X vysoce slaného pufru (1,0 M chloridu sodného, 0,50 M Tris-HCl, hod-

nota pH 7,5, 0,10 M chloridu hořečnatého a 10 mM dithiothreitolu) a 3 jednotky NdeI enzymu po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Reakční směs se extrahuje systémem fenol/chloroform a DNA se vysráží ethanolem. NdeI štěpený plasmid pL110 DNA se rozpustí v 50 µl 1X Klenow pufru (40 mM fosforečnanu draselného, hodnota pH 7,5, 6,6 mM chloridu hořečnatého, 1,0 mM 2-merkaptoethanolu, 33 µM dATP, 33 µM dCTP, 33 µM dGTP a 33 µM TTP). Přidají se 2 µl (přibližně 10 jednotek, New England Biolabs) velkého fragmentu E. coli DNA polymerasy I, známé jakožto činidlo Klenow, a smísí se s DNA a získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 16 °C po dobu jedné hodiny. Reakce se ukončí extrakcí fenolem a DNA se čistí běžným způsobem. NdeI štěpená, činidlem Klenow zpracovaná DNA se pak ligatuje s T4 DNA ligasou při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin. Získaná DNA se použije k běžné transformaci E. coli K12 kmen RV308 (NRRL B-15624). Transformanty se selektují na L-agarových destičkách, obsahujících 100 µg/ml ampicilinu a plasmidy se izolují z resistentních kolonií způsobem rychlé alkalické extrakce, kterou popsali Birnboim a Doly. Selektuje se plasmid (pL110A podle obr. 13) prostý místa NdeI.

Příklad 3.A.10.b

Konstrukce fágu pL110B místně specifickou mutagenesí

Protokol pro eliminaci BamHI místa v genu udělujícím odolnost proti tetracyklinu při místně specifické mutagenese je na pravé straně obr. 13.

Příklad 3.A.10.b(i)

Konstrukce fágu M13Tc3

Plasmid pL110 slouží jakožto zdroj genu dodávajícího odolnost proti tetracyklinu. Přibližně 50 µg plasmidu pL110 v 50 µl TE pufru se přidá do 25 µl 10X HindIII pufru a 170 µl vody. Přibližně 5 µl (přibližně 50 jednotek) restrikčního enzymu HindIII se přidá do roztoku plasmidu pL110 DNA a získaná reakční směs se inkubuje při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Přibližně 13 µl 2 M Tris-HCl, hodnota pH 7,4 a 5 µl (přibližně 50 jednotek) restrikčního enzymu EcoRI se přidá do HindII štěpeného plasmidu

pL110 DNA a reakční směs se inkubuje po dobu dvou dalších hodin při teplotě 37 °C. Reakce se ukončí extrakcí reakční směsi TE nasyceným fenolem, načež se fenol odstraní chloroformovou extrakcí. EcoRI-HindIII štěpený plasmid pL110 DNA se pak získá vysrážením a odstředěním, vnese se na 1% agarozový gel a izolouje se velký, přibližně 4,3 kb EcoRI-HindIII restrikční fragment a čistí se.

Přibližně 5 μg fágu m13mp18 (New England Biolabs) se rozpustí v 50 μl TE pufru a pak se štěpí HindIII a EcoRI shora popsaným způsobem. HindIII - EcoRI excizní fág M13mp18 DNA se čistí způsobem popsaným pro pL110 s tou výjimkou, že se izoluje a čistí přibližně 7,25 bk restrikční fragment.

Přibližně 100 nanogramů přibližně 4,3 kb HindIII - EcoRI fragmentu plasmidu pL110 se smísí s přibližně 100 nanogramy přibližně 7,25 kb HindIII - EcoRI fragmentu fágu M13mp18, 2 μl 10X ligasového pufru, 1 μl (přibližně 100 jednotek) T4 DNA ligasy a 14 μl vody. Ligační reakce se inkubuje při teplotě 15 °C po dobu 1,5 hodin. Ligatovaná DNA konstituuje žádaný fág m13Tc3 DNA. Reatrikční místo a funkční mapa fágu m13Tc3 je na obr. 13.

Jednoho ml přes noc pěstované kultury E. coli K12 JM109 (E. coli K12 JM101 od společnosti New England Biolabs se může použít místo E. coli K12 JM109) se používá k naočkování 50 ml živné půdy L a získaná kultura se inkubuje při teplotě 37 °C za provzdušňování tak dlouho, až $O.D._{660}$ je 0,3 až 0,4. Buňky se resuspendují ve 25 ml 10 mM chloridu sodného, inkubují se na ledu po dobu 10 minut a odděli se odstředěním. Buňky se resuspendují ve 1,15 ml 75 mM chloridu vápenatém. 200 μl podíl buněk se odstraní, přidá se do 10 μl ligatované DNA, shora připravené, a inkubuje se na ledu po dobu přibližně 40 minut. Směs buněk a DNA se inkubuje při teplotě 42 °C po dobu dvou minut a různé podíly (1, 10 a 100 μl) se odstraní a přidají se do 3 ml horního agaru (půda L s 0,5 % agaru se udržuje roztavená při teplotě 45 °C), který obsahuje také 50 μl 2% X-Gal, 50 μl 100 mM IPTG a 200 μl E. coli K12 JM109 v logaritmické růstové fázi.Směs buněk a horního agaru se pak nanese na L-agarové destičky, obsahující 40 mg/ml X-Gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-thiogalaktosid) a 0,1 mM IPTG (isopropyl-ß-D-thiogalaktosid) a destičky se inkubují při teplotě 37 °C přes noc.

Následující ráno se jednotlivě používá některých proti modré čirých plaketek k naočkování 2 ml živné půdy L a získané kultury se inkubují při teplotě 37 °C za provzdušňování po dobu dvou hodin. Absence modré barvy naznačuje, že došlo k žádoucí inzerci DNA. Potom se kultury odstředí a přidá se 200 µl získaného supernatantu do 10 ml kultur ($O.D._{550}$ =) E. coli K12JM109 rostoucích při teplotě 37 °C za provzdušňování. Tyto kultury se inkubují po dobu dalších 30 minut při teplotě 37 °C. Potom se buňky peletizují odstředěním a používá se jich pro přípravu replikační formy rekombinantního fágu, který obsahují. Dvouřetězcová replikační forma fágu DNA se izoluje z buněk za použití obrácené verze způsobu podle příkladu 1. Transformanty, obsahující fág M13Tc3 DNA, se identifikují restrikční enzymovou analyzou jejich fágu DNA.

Příklad 3.A.10.B(ii)
Příprava fágu m13Tc3 DNA s jednoduchým řetězcem

Odstředí se 1,5 ml přes noc pěstované kultury E. coli K12 JM109/m13Tc3 a 1200 µl supernatantu, obsahujícího fág m13Tc3, se použije naočkování 25 ml kultury E. coli K12JM109 při $O.D._{660}$ přibližně 0,4 až 0,5. Kultura se inkubuje po dobu 6 hodin při teplotě 37 °C za provzdušňování, odstředí se a získaný supernatant, přibližně 20 ml, se přenese do nové zkumavky. Přibližně 2 ml roztoku, obsahujícího 20 % polyethylenglykolu (PEG) 6000 a 14,6 % chloridu sodného, se přidá do supernatantu, který se pak inkubuje po dobu 20 minut.

Supernatant se odstřeďuje po dobu 25 minut při počtu otáček 7000/min a získaná peleta, která obsahuje fág m13Tc3 DNA s jednoduchým řetězcem, se resuspenduje v 500 µl TE pufru. DNA roztok se extrahuje dvakrát TE-nasyceným fenolem a dvakrát chloroformem. DNA s jednoduchým řetězcem se pak vysráží za použití octanu sodného a ethanolu a odstředí se. Získaná peleta se promyje 70% ethanolem, vysuší se a pak se rozpustí v 60 µl vody.

Příklad 3.A.10.b(iii)
Mutagenese

Fragment DNA s jednoduchým řetězcem, používaný v mutagene-

si se syntetizuje na automatickém systetizeru DNA. Fragment má sekvenci 5'-CCCGTCCTGTGGATACTCTACGCCGA-3' (sekv. ID číslo 11) a je homologický k oblasti obklupujicí BamHI polohu (5 -GGATCC-3') v genu přispivajicím k odolnosti proti tetracyklinu plasmidu pBR322 s tou výjimkou, že A zbytek druhý od zakončení 5' (nebo třetí od zakončení 3') je C v plasmidu pBR322. Tato obměna nemění aminokyselinové složení bílkoviny přispivajicí k odolnosti proti tetracyklinu, eliminuje však místo BamHI.

Přibližně 10 pikomol mutagenního primeru a M13 univerzální primer (Bethesda Research Laboratories (BRL)), P.O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20760) se individuálně zpracovávají 10 jednotkami (BRL) T4 polynukleotidkinasy ve 2o μl 1X kinasového pufru (60 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,8, 15 mM 2-merkaptoethanolu, 10 mM chloridu hořečnatého a 0,41 μM ATP) po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Kinasou zpracovaných DNA se používá v dále popsaném procesu mutagenese.

Teplotní hybridizační reakce se provádí vzájemným mísením 300 nanogramů (1,2 μl) fágu m13Tc3 s jednoduchým řetězcem, 1 pikomol (2 μl) univerzálního primeru, 1 pikomol (2 μl) mutagenního primeru, 2 μl 10X pufru pro teplotní hydridizaci (100 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 1 mM EDTA a 500 mM chloridu sodného) a 12,8 μl vody. Reakční směs se inkubuje při teplotě 80 °C po dobu dvou minut, při teplotě 50 °C po dobu 5 minut a pak se nechá ochladit na teplotu místnosti.

Extenzní reakce se provádí přidáním 5 μl 10X extenzního pufru (500 mM Tris-HCl, hodnota pH 8,0, 1 mM EDTA a 120 mM chloridu hořečnatého), 5 μl 2 mM dATP, 1 μl roztoku 6 mM v každém dGTP, TTP a dCTP; 1 μl přibližně 2 jednotky, Pharmacia P-L Biochemicals, 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08854) enzymu Klenow, 1 μl (100 jednotek) T4 DNA ligasy a 17 μl vody do směsi tepelně hybridované DNA. Extenzní reakční směs se inkubuje při teplotě místnosti po dobu jedné hodiny, pak při teplotě 37 °C po dobu 2,5 hodin a pak přes noc při teplotě 4 °C.

Reakce se ukončí dvěma extrakcemi TE-nasyceným fenolem a následnými dvěma extrakcemi chloroformem. DNA se vysráží ethanolem a octanem sodným. DNA se oděli odstředěním a resuspenduje

se v 50 µl vody a 6 µl 10X S1 pufru se pak přidá do roztoku DNA.

Roztok DNA se rozdělí do tří zkumavek. Přidá se přibližně 200 jednotek (Miles Laboratories) S1 nukleasy do dvou zkumavek. Jedna S1 reakční směs se inkubuje při teplotě místnosti po dobu 5 minut, druhá po dobu 10 minut. Reakce se ukončí extrakcí reakční směsi dvakrát TE-nasyceným fenolem. Po fenolových extrakcích následují dvě extrakce chloroformem. Pak se DNA vysráží z reakční směsi octanem sodným a ethanolem. Nezpracovaný vzorek DNA slouží jako negativní kontrola. S1 zpracované vzorky se udržují od sebe odděleně po dobu zbylé procedury, poskytují však podobné výsledky.

DNA pelety se resuspendují ve 20 µl vody a 10 µl získaného roztoku se použije k transformaci E. coli K12 JM109 (může se však rovněž použít E. coli K12 JM101) v souhlase s postupem používaným při konstrukci fágu m13Tc3, přičemž se však na destičky nepřidává ani IPTZG ani X-Gal.

Replikativní forma DNA s dvojím řetězcem z přibližně 48 plaketek se izoluje shora popsaným způsobem a zkoumá se na přítomnost BamHI restrikčního místa. Izoláty bez BamHI místa se dále třídí při přípravě DNA s jednoduchým řetězcem, jak shora popsáno. DNA s jednoduchým řetězcem se sekvencuje za použití di-deoxysekvenčního způsobu (J.H. Smith, 1980, Methods in Enzymology 65: str. 560 až 580). Žádaný izolát se označuje jako pL110B (obr. 13).

Příklad 3.A.10.c

Konstrukce plasmidu pL110C

Přibližně 50 µg replikační formy fágu pL110B DNA se štěpí ve 250 µl 1X NheI pufru (50 mM chloridu sodného, 6 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,5, 6 mM chloridu hořečnatého a 6 mM 2-mekaptoethanolu) obsahujícího přibližně 50 jednotek NheI restrikčního enzymu při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Pak se přidá 5 µl 5M chloridu sodného do NheI štěpeného fágu pL110B DNA, načež se přidá 5 µl (přibližně 50 jednotek) SalI restrikčního enzymu. Štěpení se provádí po dobu dvou hodin při teplotě 37 °C. Žádaný přibližně 422 bp NheI - SalI fragment, obsahující mutátovaná oblast genu

způsobujícího odolnost proti tetracyklinu, se pak izoluje z akrylamidového gelu o sobě známým způsobem v oboru.

Plasmid pL11OA DNA se štěpí NheI a SalI za identických podmínek s tou výjimkou, že plasmid pL11OA se nahrazuje pro fág pL11OB. Přibližně 6,1 kb NheI - SAlI restrikční fragment plasmidu pL11OA se čistí od agarozy.

Žádaný plasmid pL11OC se konstruuje ligací spolu se 1OO nanogramy každého z NheI - SalI fragmentů pL11OA (přibližně 6,1 kb) a pl11OB (přibližně 422 bp) za použití o sobě známých způsobů. Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pL11OC je na obr. 13. Žádaný plasmid pL11OC dodává odolnost proti tetracyklinu 1O μg/ml tetracyklinu v E. coli avšak BamHI místo v genu, dodávajícím odolnost proti tetracyklinu, chybí.

Příklad 3.A.11

Konstrukce plasmidu pCZR111

Plasmid pL11OC obsahuje jednoduché ClaI restrikční místo, které se odstraní v průběhu následujících reakcí. Přibližně 1 μg plasmidu pL11OC se štěpí s ClaI v podstatě způsobem podle příkladu 3A2 s tou výjimkou, že se použije restrikčního enzymu ClaI a 1OX pufru (5OO mM chloridu sodného, 1OO mM Tris-HCl, hodnota pH 7,9 a 1OO mM chloridu hořečnatého). ClaI štěpená DNA se pak zpracovává činidlem Klenow v podstatě způsobem, který je popsán v příkladu 3A5 jedině s tou výjimkou, že se přidá jedině dCTP místo všech čtyr dNTP.

DNA se pak vysráží a resuspenduje se v 5O μl Mung Bean nukleasového pufru (5O mM octanu sodného, hodnota pH 5,O, 3O mM chloridu sodného a 1 mM síranu zinečnatého). Přidá se jedna jednotka Mung Bean nukleasy (obchodně dostupné od New England Biolabs) a reakční směs se inkubuje při teplotě 3O °C po dobu 3O minut. Zkumavka se pak umístí do ledu a přidá se chlorid sodný do O,2 M a směs se pak extrahuje systémem fenol/chloroform, vysráží se ethanolem a resuspenduje se v 1O mM Tris-HCl (hodnota pH 8,O). DNA se pak spontánně ligatuje a transformuje do buněk E. coli v podstatě způsobem podle příkladu 3A3 a 3A4. Výsledný plasmid se

označuje jako plasmid pCZR111.

Příklad 3.A.12

Konstrukce plasmidu pCZR126S

Přibližně 26 μg plasmidu pCZR111 se štěpí působením XbaI následujícím způsobem. 10X XbaI pufr, sestává z 600 mM Tris-HCl, 100 mM chloridu hořečnatého, 1M chloridu sodného a 10 mM 2-merkaptoethanolu, hodnota pH 7,5 (a má teplotu 37 °C). 50 μl 10X XbaI pufru, 15 μl XbaI (10 J(μl) a 185 μl vody se přidá do 250 μl vody obsahující přibližně 25 μg plasmidu pCZR111. Štěpení se provádí při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. XbaI štěpený pCZR111 se pak extrahuje fenolem, přidá se 1/10 objemu 3M octanu sodného,a 3 objemy ethanolu. Směs se inkubuje v lázni suchého ledu aethanolu po dobu 5 minut a pak se odstředí. Vysrážená DNA se resuspenduje v 50 μl vody.

XbaI štěpený plasmid pCZR111 se štěpí BamHI následujícím způsobem: 0,2 μl BamHI (10 J/μl), 10 μl BamHI pufru (100 mM Tris-HCl, 50 mM chloridu hořečnatého, 1 M chloridu sodného a 10 mM 2-merkapotoethanolu, hodnota pH 8,0, o teplotě 37 °C a 90 μl vody se přidá do 50 μl XbaI štěpeného pL110, získaného, jak shora uvedeno. Štěpení se provádí po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Štěpená pCZR111 se extrahuje do fenolu a přidá se 1/10 objemu octanu sodného a pak 3 objemy ethanolu. vysrážená DNA se resuspenduje v 50 μl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, hodnota pH 8,0.

XbaI a BamHI štěpený pCZR111 se pak vnese na agarosový gel a izoluje se DNA pás při přibližně 5,8 kb. Plasmid pCZR126S se produkuje ligací přibližně 5,8 kb fragmentu pCZR111 na XbaI na NdeI spojovník a syntetický gen kodující EKm hovězí růstový hormon, který obsahuje NdeI místo na zakončení 5' a BamHI místo na zakončení 3'.XbaI až NdeI sekvence se produkuje za použití standardní oligonukleotidové sekvenční metodiky a sesává z následujících sekvencí. (pozitivní řetězec: sekv. ID číslo 12, negativní řetězec = sekv. ID číslo 13).

```
5' CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAATAAGGAGGAATAATCA 3'
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
       TCCCATAATTATTACATATAACTAAAATTATTCCTCCTTATTAGTAT 5'
```

Uvedená sekvence se konstruuje chemickou syntezou obou řetězců a mísením k umožnění hydridizace. Gen, zakodující EK bGH se konstruuje z 16 chemnicky syntetizovaných kusů DNA s jednoduchým řetězcem o délce 71 až 83 nukleotidů, které zahrnují dohromady oba komplementární řetězce celého genu. Jeho synteza se provádí za použití zařízení Applied Biosystems (ABS) a sestává z následující sekvence (sekv. ID číslo 2 a 3).

```
5 ' TATGTTCCCATTGGATGATGATGATAAGTTCCCAGCCATGTCCTT
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ACAAGGGTAACCTACTACTACTATTCAAGGGTCGGTACAGGAA

GTCCGGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAGCTGGCTGCTGA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CAGGCCGGACAAACGGTTGCGACACGAGGCCCGAGTCGTGGACGTAGTCGACCGACGACT

CACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCCAGAA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GTGGAAGTTTCTCAAACTCGCGTGGATGTAGGGCCTCCCTGTCTCTATGAGGTAGGTCTT

CACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GTGGGTCCAACGGAAGACGAAGAGACTTTGGTAGGGCCGGGGGTGCCCGTTCTTACTCCG

CCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTCATCCAGTCGTGGCT
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGTCGTCTTTAGTCTGAACCTCGACGAAGCGTAGAGTGACGAGGAGTAGGTCAGCACCGA

TGGGCCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCTTGGTGTTTGGCACCTCGGA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ACCCGGGGACGTCAAGGAGTCGTCTCAGAAGTGGTTGTCGAACCACAAACCGTGGAGCCT

CCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGAGCT
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGCACAGATACTCTTCGACTTCCTGGACCTCCTTCCGTAGGACCGGGACTACGCCCTCGA

GGAAGATGGCACCCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CCTTCTACCGTGGGGGGCCCGACCCGTCTAGGAGTTCGTCTGGATACTGTTTAAACTGTG

AAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TTTGTACGCGTCACTGCTGCGCGACGAGTTCTTGATGCCAGACGAGAGGACGAAGGCCTT

GGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CCTGGACGTATTCTGCCTCTGCATGGACTCCCAGTACTTCACGGCGGCGM GCCCCTCCG

CAGCTGTGCCTTCTAG 3'
||||||||||||||||
GTCGACACGGAAGATCCTAG 5'
```

Konstrukce plasmidu pCZR126S se provádí ligací následujících složek přibližně 0,28 μg 5,8 fragmentu, získaného z plasmidu pL110 po kompletním štěpení s XbaI a parciálním štěpení s BamHI v celkovém objemu 2 μl, přibližně 0,18 μg syntetický gen kodujícího derivátu hovězího růstového faktoru, který má 5' zakončení odpovídající XbaI místu a 3' zakončení odpovídající BamHI místu v celkovém objemu 2,5 μl, 8,75 pikomol chemicky syntetizovaného XbaI na NdeI spojovník v 1 μl. Plasmidové složky se vnesou do 6 μl 5x ligačního pufru: 250 mM Tris-HCl, 50 mM chloridu hořečnatého, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (objem/objem) polyethylenglykolu 8000, hodnota pH 7,6, 2 μl ligasy a 16,5 μl vody. Ligační směs se inkubuje přes noc při teplotě 16 °C. Cirkularizovaný plasmid pCZR126S se pak používá ke transformaci buněk E. coli RV308 v podstatě stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 3A3. restrikční místo a funkční mapa plasmidu pCZR126S je na obr. 14.

Příklad 4

Konstrukce plasmidu pRB182

Přibližně 20 μg plasmidu pRB181, připraveného způsobem podle příkladu 2, se suspenduje ve 20 μl 10X NdeI pufru, 5 μl NdeI restrikčního enzymu (Boehringer-Mannheim, 40 jednotek), 175 μl vody, mírně se míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Pak se do reakční směsi přidá 4 μl BamHI restrikčního enzymu (Boehringer-Mannheim, 40 jednotek) a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dalších dvou hodin. DNA se vysráží třemi objemy ethanolu a 0,3M octanu sodného a provede se elektroforeza na 1,2% agarozovém gelu o nízké teplotě tání. Menší (přibližně 265 bp) NdeI/BamHI restrikční fragment, zakodující ACB lidský proinzulinový gen, se odřízne od gelu a DNA se získá vedením sloupcem Elutip-d způsobem, popsaným v příkladu 2. Po vysrážení a usušení se DNA ukládá v 25 μl 10 mM Tris-HCl, o hodnotě pH 8,0.

Přibližně 15 μg plasmidu pCZR126S (jehož konstrukce je shora uvedena v příkladu 3) se suspenduje ve 20 μl 10X NdeI pufru, 5 μl NdeI restrikčního enzymu (40 jednotek) a 175 μl vody, mírně se míchá a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. Po in-

kubaci se DNA vysráží třemi objemy ethanolu, jak shora uvedeno, vysuší se a resuspenduje se ve 20 µl 10X BamHI pufru, 2,5 µl BamHI restrikčního enzymu (25 jednotek) a 178 µl vody. Mírně se míchá a pak se reakční směs inkubuje při teplotě 37 °C po dobu dvou hodin. DNA se opět vysráží třemi objemy ethanolu a podrobí se elektroforeze na 1% agarozovém gelu o nízké teplotě tání. Větší fragment, odpovídající vektoru DNA se odřízne od thototo gelu a DNA se získá na slupci Elutip-d způsobem, popsaným v příkladu 2. Po vysrážení a usušení se vektor DNA ukládá při teplotě 4 °C v 35 µl 10 mM Tris-HCl o hodnotě pH 8,0.

Přibližně 2,5 µl vektoru DNA se smíchá s 12 µl čištěného ACB-proinzulinového genového fragmentu, jak shora uvedeno, 4 µl 10 mN ATP, 0,5 µl 1M dithiothreitolu, 5 µl 10X ligasového pufru (500 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,6, 100 mM chloridu hořečnatého), 16 µl vody a 0,5 µl T4 ENA ligasy (Pharmacia, Onc., 800 Centennial Avenue, Piscataway, N.J. 08854, 3,5 jednotek). Reakční směs se inkubuje při teplotě 4 °C po dobu 16 hodin. Ligatovaná směs se zředí 50 µl 10 mM Tris-HCl (hodnota pH 7,6) a 3 µl 1M chloridu sodného a následně se transformuje do E. coli K12 RV308 způsobem podle shora uvedeného příkladu 3A3. Buňky se nanesou na agarové destičky doplněné 5 µg/ml tetracyklinu a inkubují se přes noc při teplotě 32 °C.

Plasmidy z 3 mL kultur se izolují z kolonií odolných tetracyklinu způsobem rychlé alkalické extrakce, popsané v Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), vydal Maniatis T., Fritsch E.F. a Sambrook J., Cold Spring Harbor Publications, New York, str. 368 až 369. Přítomnost správného lidského ACB-proinzulinového genového fragmentu se stanovuje minitřídicí operací, kterou popsal Birnboim H.C., Edoly J. (1979) Nucleic Acids Res. 1, str. 1513 až 1523, za použití polakrylamidové gelové elektroforesy k analyze XbaI/BamHI štěpeného fragmentu. Tyto plasmidové inzerty se správným rozměrem (přibližně 314 bp) se selektují zesílením a čištěním. Expresní plasmid obsahující lidský ACB proinzulinový gen se označuje jako pRB182, Restrikční místo a funkční mapa plasmidu pRB182 je na obr. 20.

Příklad 5

Fementace

Provozní výroba buněk pro extrakci a čištění rekombinantního ACB-proinzulinu se provádí za použití BioFlo stolní fermentační nádoby (obchodně dostupné u společnosti New Brunswick Scientific Co., Inc. P.O.Box 986, 44 Talmadge Road, Edison, NJ 08817). Naočkovává se 5 litrů 2X TY půdy, obsahující 5 μg/ml tetracyklinu (získano u společnosti Sigma Chemical Co.) plus 1,0 ml protipěnicího prostředku SAG 5693 (obchodně dostupného u společnosti Union Carbide, Specialty Chemical Division, Danbury, CT 06817-0001) za použití 100 ml bakteriální kultury E. coli K12 RV 308 buněk, obsahující plasmid pRB182 a nechá se růst přes noc při teplotě 30 °C. Buňky se nechají růst při teplotě 32 °C až do konce exponenciální růstové fáze. Pak se přidají glukoza a aminokyseliny do koncentrace 0,2% a 0,1% a teplota se zvýší na 42 °C k navození syntezy bílkoviny. Buňky se získají z růstového prostředí dvě hodiny po navození odstřeďováním při 500 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Supernatant se vyhodí a peleta se promyje jednou ledově chladným TE pufrem (10 mM tris-HCl, hodnota pH 8,0, 1.mM EDTA).

Exprese a akumulace ACB-PI se stanoví zviditelněním celkové buněčné bílkoviny s následným oddělením do 10 až 20% polyakrylamidového gelu způsobem, který popsal Laemmli, U.K. (1970) Nature (London), 227, str. 680 až 685. Provede se lyze peletizovaných buněk přidáním modifikovaného vzorku pufru (0,125 M Tris-HCl, hodnota pH 6,8, 2% SDS, 30% glycerol, 1M 2-merkaptoethanol 5M močovina) a vaří se po dobu 5 minut. Pásy se zjišťují zabarvením modří Coomassie Blue kvantitativním sejmutím.

Specifická identifikace ACB-proinzulinu se stanoví analýzou "Western Blot" v podstatě jak popisuje Johnson D.A. a kol. (1984) Gene Anal. Techn, svazek 1, str. 3 až 8 za použití kozího anti-HPI, činmž se zjistí C-peptid, načež se přidá biotinylovaná druhá antilátka (oslí antikozí IgG) a zviditelní se s bílkovinovou detekční soupravou Vectastain (obchodně dostupná u společnosti Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Rd., Burlingam, CA

94010) v podstatě podle návodu prodejce.

Příklad 6

Čištění a charakterizace rDNA ACB-proinzulinu

Suspenduje se 43,5 g buněk E.coli (mokrá hmotnost) v 400 ml 20 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,6, obsahujícím 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10% sacharozu a 100 μg/ml lysozymu. Směs se intenzivně míchá při teplotě místnosti po dobu 1,5 hodin (přibližně 25 °C), chladí se na ledu po dobu 30 minut a buňky se rozruší působením zvuku. Granule se oddělí odstřeďováním při 200 g při teplotě 4 °C po dobu jedné hodiny. Granule se potom promyjí 20 mM Tris-HCl, 1M chloridu sodného, hodnota pH 7,6. Granule se rozpustí za míchání ve 200 ml 20 mM Tris-HCl, 8 M guanidin-HCl, hodnota pH 8,8. Pak se přidá 7 g siřičitanu sodného a 5 g $Na_2S_4O_6$ a roztok se míchá po dobu tří hodin při teplotě místnosti. Po odstředění se supernatant dialyzuje za použití 1000 MWCO dialyzačního vaku (obchodně dostupný u společnosti Spectrum Medical Industries, Inc. Los Angeles, CA 90060) proti třem změnám 2 litrů 10 mM octanu amonného, hodnota pH 7,4. Vzniklá sraženina se oddělí odstřeďováním při 2200 g při teplotě 40 °C po dobu jedné hodiny. Supernatant se okyselí na hodnotu pH 3,6 6 N kyselinou chlorovodíkovou a vytvořená sraženina se shromáždí a přidá se do sraženiny z dialyzátu.

Příklad 7

Čištění ACB-proinzulin-S-sulfonátu

Peleta, získaná způsobem podle příkladu 6, obsahující ACB-proinzulin-S-sulfonát, se rozpustí ve 20 mM Tris-HCl, 7,5 M močoviny, hodnota pH 7,6 a vnese se na sloupec Mono Q HR 10/10 (obchodně dostupný u společnosti Pharmacia LKB Biotechnology, 800 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854). Sloupec se eluuje rychlostí 0,5/min za použití 760 minutového gradientu 0,05 až 0,2 M chloridu sodného obsahujícího 20 mM Tris-HCl, hodnota pH 7,6, 7,5 M močoviny. Frakce se analyzují RP-HPLC za použití gradientu systému 30 až 42 % CH_3CN do 0,1 M monohydrogenfosforeč-

nanu amonného, hodnota pH 7,0, 1,5 ml/min na 0,46 x 25 cm sloupci Zorbax C8 (obchodně dostupný u společnosti DuPont, Wilmington, DE 19898), přičemž se udržuje teplota 45 °C. RP-HPLC separace se provádí za použití Rainin HP reverzní fázové HPLC aparatury (obchodně dostupná u společnosti Rainin Instruments, Woburn, MA 01801). Na základě analyzy obsahu frakcí RP-HPLC se shromáždí dva fondy odpovídající ACB-proinzulin-S-sulfonátu z Monoo Q sloupce a odsolí se na sloupci Zorbax C8 použitím RP-HPLC za použití gradientu 10 až 35 % CH_3CN do 0,1 M hydrogenuhličitanu amonného, hodnota pH 8,0, zmrazí se v kapalném dusíku a lyofilizuje se.

Příklad 8

Konverze ACB-proinzulinsulfonátu na ACB-proinzulin

ACB-proinzulinsulfonátový lyofilizát, připravený podle příkladu 7, se rozpustí v 50 mM glycinu, hodnota pH 10,5, při teplotě 4 °C na koncentraci přibližně 0,2 mg/ml. Do tohoto roztoku se přidají dva ekvivalenty cystein-HCl. Nechá se stát po dobu tří dnů, přičemž se ACB-proinzulin vytvoří v přibližně 75% výtěžku.

Bílkovinový roztok se pak okyselí kyselinou octovou na hodnotu pH 2,0, vnese se na sloupec RP-HPLC 2,2 x 25 cm Vydac C18 (obchodně dostupný u společnosti The Separations Group, Hesperia, CA 92345) a eluuje se isoktratickým pufrem 0,1% trifluoroctová kyselina v systému H_2O:CH_3CH (72 : 28) za 1,5 ml/min. Frakce, obsahující žádaný materiál, se shromáždí RP-HPLC do fondu, zmrazí se v kapalném dusíku a lyofilizují se.

Příklad 9

Stanovení párů disulfidických azeb v ACB-proinzulinu

250 mg bílkoviny se rozpustí v 250 ml 0,05 hydrogenuhličitanu amonného, hodnota pH 9,0. Přidá se 25 µl 0.1 mg/ml roztoku vepřového trypsinu (obchodně dostupný u společnosti Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178) ve vodě a inkubuje se za štěpení po dobu dvou hodin při teplotě 25 °C. Toto trypsinové štěpení, které uvolňuje N-zakončení řetězce B, se ukončí

přidáním 280 µl 0,1 N kyseliny chlorovodíkové. Pak se přidá 25 µl 0,1 mg/ml roztoku pepsinu (obchodně dostupného od společnosti Boehringer-Mannheim Biochemical, P.O.Box 50816, Indianopolis, Indiana 46250) v 0,01 N kyselině chlorovodíkové. Štěpicí směs se inkubuje po dobu 22 hodin při teplotě 25 °C, přičemž se štěpení ukončí přidáním 25 µl 0,1 mg/ml roztoku pepstatinu (obchodně dostupný u společnosti Sigma Chemical Co.) v 10% kyselině octové a 900 µl vody. Reakční směs se pak vnese na 4,6 x 450 mm sloupec Zorbax C8, udržovaný na teplotě 45 °C, který je vyvážený 0,1 M fosforečnanem sodným, hodnota pH 2,1, 1 ml/min a peptidy se eluují lineárním gradientem 15 až 30 % methylkyanidu ve výchozím pufru. Větší eluční pík při 25 % methylkyanidu se shromáždí, zředí se vodou, odsolí se na Sep-Pak patroně (obchodně dostupná u společnosti Waters) a lyofilizuje se. Shromážděný materiál se pak analyzuje aminokyselinovou analyzou na analyzátoru Model 6300 (obchodně dostupný u společnosti Beckman Instruments, Fullerton, CA 92634).

Uspořádání disulfidických vazeb ACB-proinzulinů se potvrzuje trypsin/pepsinovým štěpením molekul a následnou HPLC analyzou, jak popisuje Toren P a kol., (1988) Anal Biochem., ročník 169, str. 287 až 299.

Příklad 10

Transformace ACB-proinzulinu na lidský inzulin

Zpracovává se 1,03 mg ACB-proinzulinu 1 µg trypsinu (společnosti Sigma Chemical CO) a 10 µg karboxypeptidasy B (Lilly, vyčištěné z vepřového pankreas) ve 2 ml hydrogenuhličitanu amonného, hodnota pH 8,8, po dobu 23 hodin při teplotě 23 °C. Reakce se pak ukončí přidáním 2,0 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkové a vzorek se vnese ve formě dvou 2 ml vstřiků na sloupec Vydac C18 (obchodně dostupný u společnosti The Separations Group, Hesperia, CA 92345), vyvážený 0,1% vodnou trifluoroctovou kyselinou při udržování teploty 45 °C a eluuje se gradientovým programem po dobu 5 minut 17 až 26,25%, po dobu 5 minut 26,25 až 31,25% a po dobu 35 minut 31,25 až 42,5% methylkyamidem do 0,1% vodné kyseliny

trifluoroctové rychlostí 1 ml/min. Eluované peptidy se shromáždí a analyzují se FAB-MS, aminokyselinovou analyzou a v případě inzulin obsahujícího píku biologickou analyzou a mapováním peptidu.

Příklad 11

Biologická analyza ACB-proinzulinu

Inzulinová a IGF-I zkouška receptorového vázání za použití lidské placentální membrány se provádí v podstatě způsobem, který popsal Grappuso P.A. a kol. (1988) J. Clin. Endocrinol. Metab., ročník 67, str. 194 až 197 s tou výjimkou, že se inkubace provádí při teplotě 4 °C po dobu 18 hodin a membrány se shromáždí na jednotce Skatron Cell Harvester (obchodně dostupné u společnosti Skatron, Inc., Sterling, VA). Provádí se zkouška transportu glukozy v krysích adipocytech v podstatě způsobem, který popsal Kashwagi M. a kol., (1983), J. Clin. Invest., ročník 72, str. 1246 až 1254.

In vivo účinnost ACB-proinzulinu se stanoví na vyhladovělých krysách. Sameček hubené krysy Sprague-Dawley (dostupný u společnosti Charles River Laboratories, Wilmington, MA 01887) o tělesné hmotnosti 190 až 210 g se nechá bez potravy 16 hodin. Náhodně se volí 10 zvířat a rozdělí se do dvou skupin po pěti krysách. Kontrolní skupině se subkutanně vstříkne fysiologický roztok (0,1 ml na 100 g tělesné hmotnosti) zatímco experimentální skupině se vstříkne tentýž slaný roztok obsahující zkoušený peptid. Odebere se krev (0,1 ml) z ocasu každé krysy pro stanovení obsahu glukozy (Sigma Diagnostics, glucose [Trinder], adress) před podáním peptidu a potom 30 minut, 1, 2, 3 a 4 hodiny po podání peptidu. Vypočte se střední procentová změna od chvíle nula plus nebo minus S.E.M. krevní glukozy u kontrolní skupiny a ošetřné skupiny krys a konečné výsledky se vyjádří podle změn u experimentální a kontrolní skupiny. Stanovuje se působení 5 až 7 různých dávek.

Sekvenční přehled

(1) Obecná informace:

(i) Autoři: Belagaje, Rama M
DiMarchi, Richard D.
Heath, William F
Long, Harlan B

(ii) Název vynálezu: Polypeptid, způsob jeho přípravy, farmaceutický prostředek, který ho obsahuje a jeho použití jakožto meziproduktu pro přípravu inzulinu

(iii) Počet sekvencí: 13

(iv) Adresa:
(A) Název: Eli Lilly and Company
(B) ulice: Lilly Corporate Center
(C) město: Indianopolis
(D) stát: Indiana
(E) zem: USA
(F) ZIP: 46285

(v) Údaje pro počítač
(A) typ media:floppy disk
(B) počítač: IBM PC kompatibilní
(C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn release # 1,0, verse #1,25

(vi) Údaje pro přihlášku vynálezu
(A) číslo přihlášky vynálezu
(B) datum podání
(C) zatřídění

(viii) Údaje zástupce
(A) jméno: Conrad William A
(B) registrační číslo. 32089
(C) číslo : X-78866

(ix) telekominukační spojení
(A(telefon: 317-276-6013

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 1
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 86 aminokyselin
(B) typ: aminokyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: bílkovina

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln
20 25 30

Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala
35 40 45

Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
50 55 60

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
65 70 75 80

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
85

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 2

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 278 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 2

AGCTTCATAT GGGCATTGTG GAACAATGCT GTACCAGCAT CTGCTCCCTG TACCAGCTGG 60

AGAACTACTG CAACCGCCGT GAGGCAGAGG ACCTGCAGGT GGGTCAGGTG GAGCTGGGCG 120

GTGGCCCGGG TGCAGGCAGC CTGCAGCCGC TGGCCCTGGA GGGTTCCCTG CAGAAGCGTT 180

TTTTGAACCA ACACCTGTGC GGCTCCCACC TGGTGGAAGC TCTGTACCTG GTGTGCGGTG 240

AACGTGGCTT CTTCTACACC CCGAAGACCT AGGATCCG 278

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 3

(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 277 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 3

AATTCGGATC CTAGGTCTTC GGGTGTAGAA GAAGCCACGT TCACCGCACA CCAGGTACAG 60

AGCTTCCACC AGGTGGGAGC CGCACAGGTG TTGGTTCAAA AAACGCTTCT GCAGGGAACC 120

CTCCAGGGCC AGCGGCTGCA GGCTGCCTGC ACCCGGGCCA CCGCCCAGCT CCACCTGACC 180

CACCTGCAGG TCCTCTGCCT CACGGCGGTT GCAGTAGTTC TCCAGCTGGT ACAGGGAGCA 240

GATGCTGGTA CAGCATTGTT CCACAATGCC CATATGA 277

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 4
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 8 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 4
CCTCGAGG 8

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 5
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 22 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 5

GATCTATTAA CTCAATCTAG AC 22

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 6

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 22 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 6

TCGAGTCTAG ATTGAGTTAA TA 22

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 7

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 10 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 7

CGGGATCCG 10

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 8

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 12 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 8

GAGGAATTCC TC 12

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 9

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 13 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 9

CTGTGCCTTC TAG 13

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 10
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 17 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 10

GATCCTAGAA GGCACAG 17

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 11
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 26 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 11

CCCGTCCTGT GGATACTCTA CGCCGA 26

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 12
(i) sekvenční charakteristiky
(A) délka: 49 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězce: jednoduchý
(D) topologie: lineární
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 12

CTAGAGGGTA TTAATAATGT ATATTGATTT TAATAAGGAG GAATAATCA 49

(2) Informace pro sekv. ID číslo: 13

(i) sekvenční charakteristiky

(A) délka: 47 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězce: jednoduchý

(D) topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) sekvenční deskripce: sekv. ID číslo 13

TATGATTATT CCTCCTTATT AAAATCAATA TACATTATTA ATACCCT 47

Průmyslová využitelnost

Nové molekuly odvozené od složek proinzulinu rekombinantní DNA technologií. Sloučeniny podobné inzulinu, vhodné pro ošetřování diabetes mellitus, nezávislé na inzulinu. Nový způsob rekombinantní produkce inzulinu.

JUDr. Otakar Svorčík
advokát

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
19. XI. 92
DOŠLO
065080

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polypeptid obecného vzorce I

$$Met_x\text{-}A\text{-}C\text{-}B \qquad (I)$$

kde znamená

Met aminokyselinu methionin,

x 0 nebo 1,

A řetězec A inzulinu nebo jeho funkční derivát,

B řetězec B inzulinu nebo jeho funkční derivát,

C C-peptid inzulinu nebo peptid obecného vzorce

$X_1 - X_2 - P - X_3 - X_4$

kde znamená

X_1, X_2, X_3 a X_4 bazické aminokyseliny, které jsou stejné nebo odlišné a

P peptid obsahující 4 až 35 aminokyselin s výjimkou cysteinu,

a jeho farmaceuticky vhodné soli.

2. Polypeptid podle nároku 1 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 21 A-řetězce je volena ze souboru zahrnujícího Gly, Ala, Asp, a Asn.

3. Polypeptid podle nároku 2 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 10 B-řetězce je Asp.

4. Polypeptid podle nároku 3 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 30 B-řetězce je Ala nebo chybí.

5. Polypeptid podle nároku 3 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 29 B-řetězce je Pro.

6. Polypeptid podle nároku 5 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 28 B-řetězce je Glu nebo Lys.

7. Polypeptid podle nároku 2 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 27 B-řetězce je Arg.

8. Polypeptid podle nároku 7 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 13 B-řetězce je Gln.

9. Polypeptid podle nároku 7 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 17 A-řetězce je Glu.

10. Polypeptid podle nároku 7 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 21 A-řetězce je Gly a aminokyselina v poloze 30 B-

řetězce je Thr-NH_2.

11. Polypeptid podle nároku 2 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 29 B-řetězce je Pro.

12. Polypeptid podle nároku 11 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 28 B-řetězce je Glu nebo Lys.

13. Polypeptid podle nároku 12 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 30 B-řetězce je Ala.

14. Polypeptid podle nároku 2 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 30 B-řetězce je Ala.

15. Polypeptid podle nároku 1 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 10 B-řetězce je Asp nebo His.

16. Polypeptid podle nároku 15 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 28 B-řetězce je Asp.

17. Polypeptid podle nároku 15 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 30 B-řetězce je vypuštěna.

18. Polypeptid podle nároku 1 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 28 B-řetězce je Lys a aminokyselina v poloze 29 B-řetězce je Pro.

19. Polypeptid podle nároku 1 obecného vzorce I, kde aminokyselina v poloze 29 a 30 B-řetězce je vypuštěna.

20. DNA sloučenina zakodující kteroukoliv sloučeninu podle nároku 1 až 19.

21. Rekombinantní DNA vektor obsahující DNA sloučeninu podle nároku 20.

22. Způsob rekombinantní přípravy polypeptidu podle nároku 1 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

a. se vytváří DNA sekvence zakodující polypeptid podle nároku 1 až 19

b. tato DNA sekvence se vnáší do vhodného vektoru obsahujícího promotor operátorovou regionální funkci v hostující buňce,

c. orientuje se DNA sekvence ve vektoru k dosažení transkripce a translace DNA sekvence za transkripčního řízení promotor operátorového regionu,

d. tranformuje se hostující buňky vektorem,

e. kultivuje se hostující buňka za podmínek vhodných k navození transkripce a translace genu a

f. získá a čistí se produkovaný peptid zakodovaný DNA sekvencí.

23. Způsob přípravy polypeptidu obecného vzorce I podle nároku 1 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se postupuje syntezou peptidu v pevné fázi.

24. Způsob přípravy inzulinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

a. se připravuje polypeptid obecného vzorce I poodle nároku 1 až 19 a

b. štěpí se vhodnými peptidasami nebo chemickámi činidly k odštěpení C-peptidu.

25. Způsob přípravy inzulinu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

a. se konstruuje DNA sekvence zakodující polypeptid obecného vzorce I, podle nároku 1 až 19,

b. tato DNA sekvence se vnáší do vhodného vektoru obsahujícího promotor operátorovou regionální funkci v hostující buňce,

c. DNA sekvence se orientuje ve vektoru k dosažení transkripce a translace DNA sekvence a transkripční kontroly promotor-operátorové oblasti,

d. hostující buňka se transformuje vektorem,

e. transformovaná hostující buňka se kultivuje za podmínek vhodných k navození transkripce a translace genu

f. polypeptid zakodovaný DNA sekvencí se získá a čistí,

g. polypeptid zakodovaný genem se štěpí vhodnými peptidazami nebo chemickými činidly, takže se C-peptid odštěpí.

26. Farmaceutický prostředek pro ošetřování diabetes, NIDDM a pro stimulaci proliferace buněk hladkého svalstva, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako účinnou složku obsahuje polypeptid obecného vzorce I podle nároku 1 až 19 spolu s jedním nebo několika farmaceuticky vhodnými nosiči, excipienty nebo ředidly.

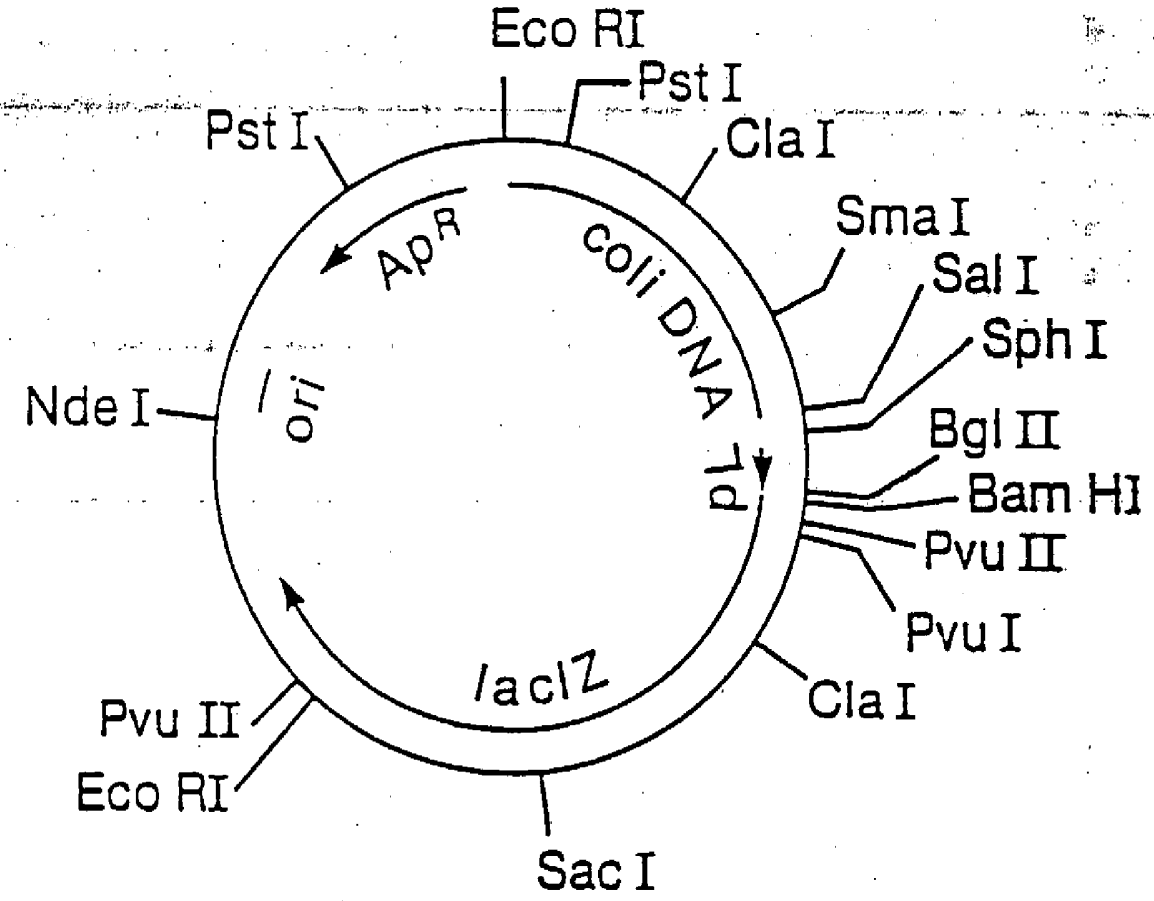
27. Použití polypeptidu obecného vzorce I podle nároku 1 až 19 pro ošetřování diabetes.

28. Použití polypeptidu obecného vzorce I podle nároku 1 až 19 pro ošetřování NIDDM.

29. Použití polypeptidu obecného vzorce I podle nároku 1 až 19 pro stimulaci proliferace buněk hladského svalstva.

Obr. 1

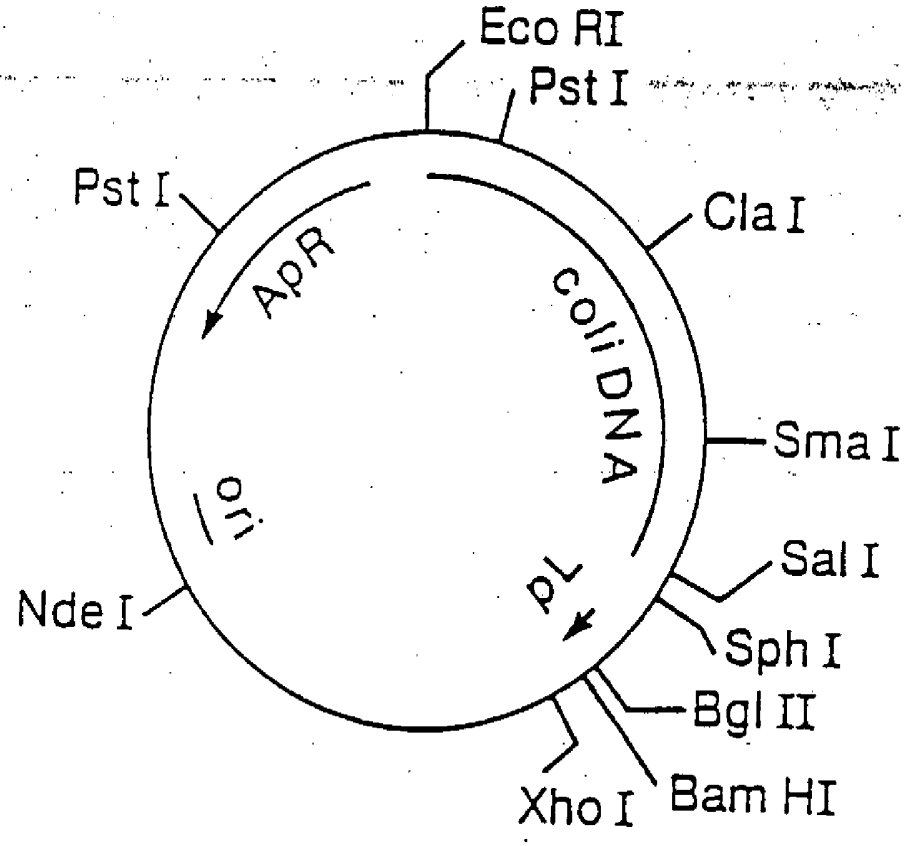
(~9.1 kb)



ČJ
0 6 5 0 8 0
19 XI 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

Obr. 2

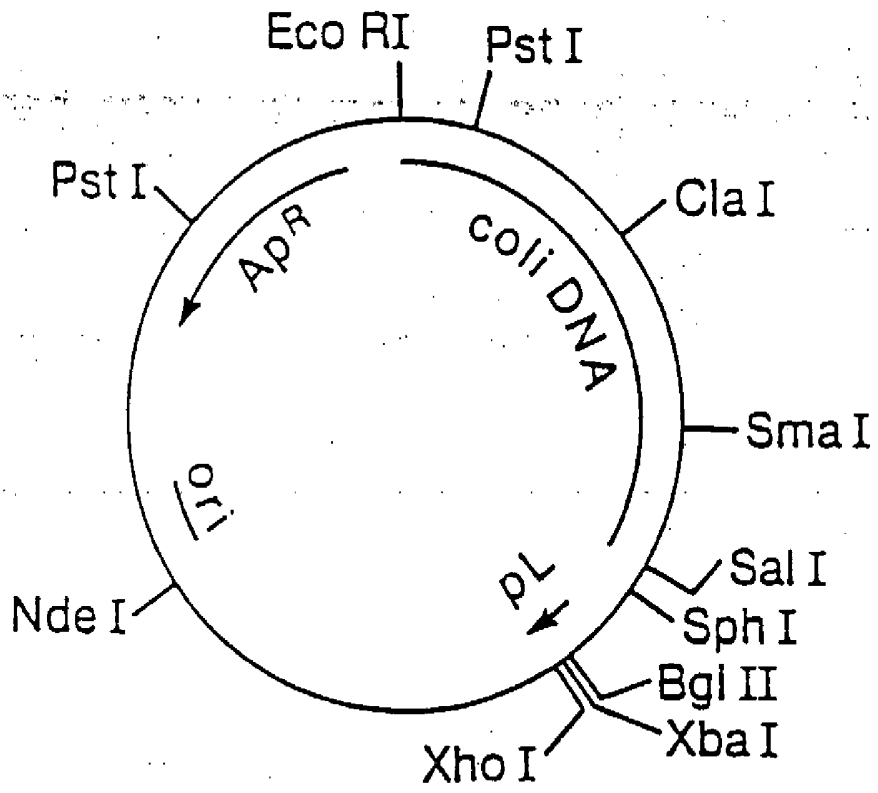
(~6.1 kb)



č.j. 65080
DOŠLO 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.

Obr. 3

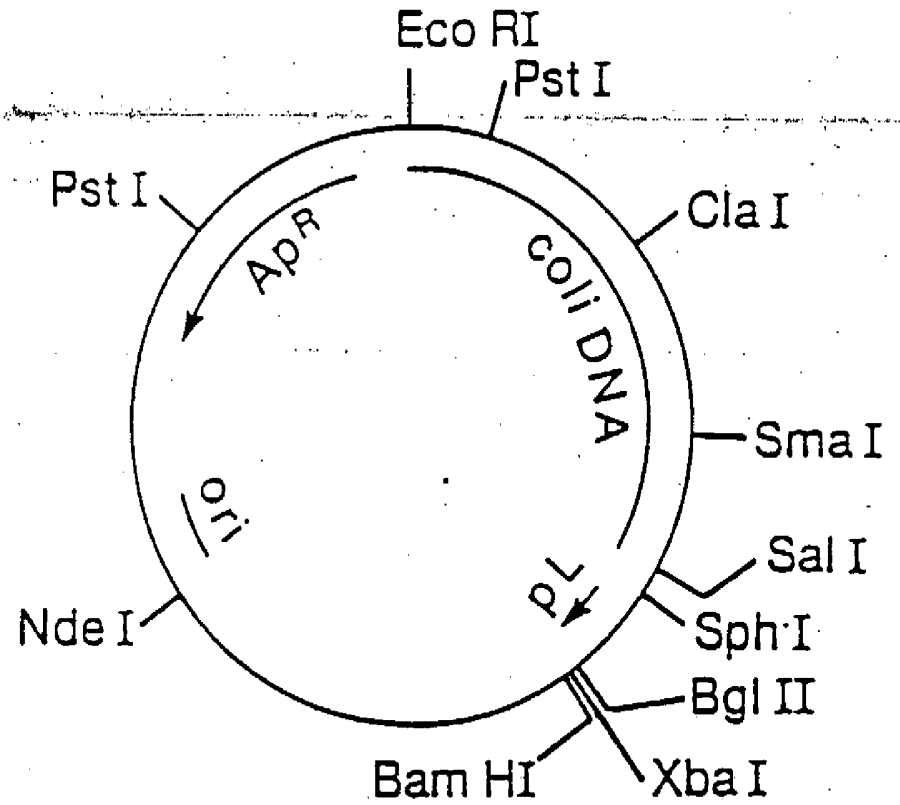
(~5.9 kb)



čj. 6 6 5 0 8 0
došlo 19. XI. 92
ÚŘAD
A OBJEVY

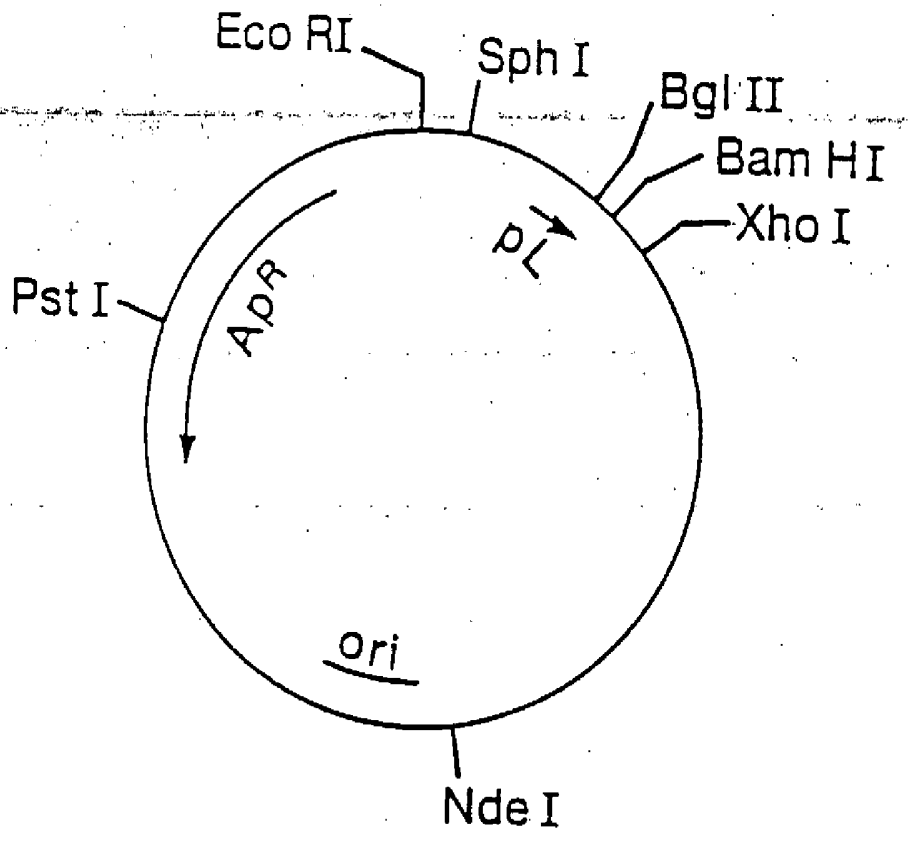
Obr. 4

(~5.9 kb)



č.j.
650 80
došlo
19 XI 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.

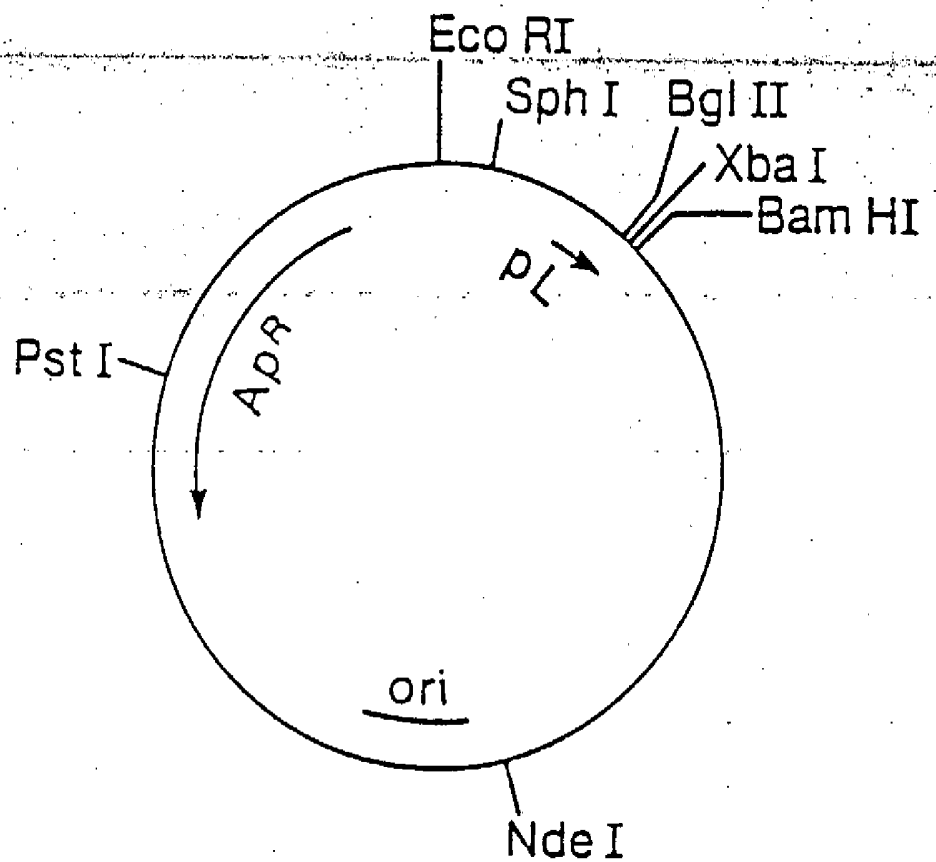
Obr. 5



U 5080
19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

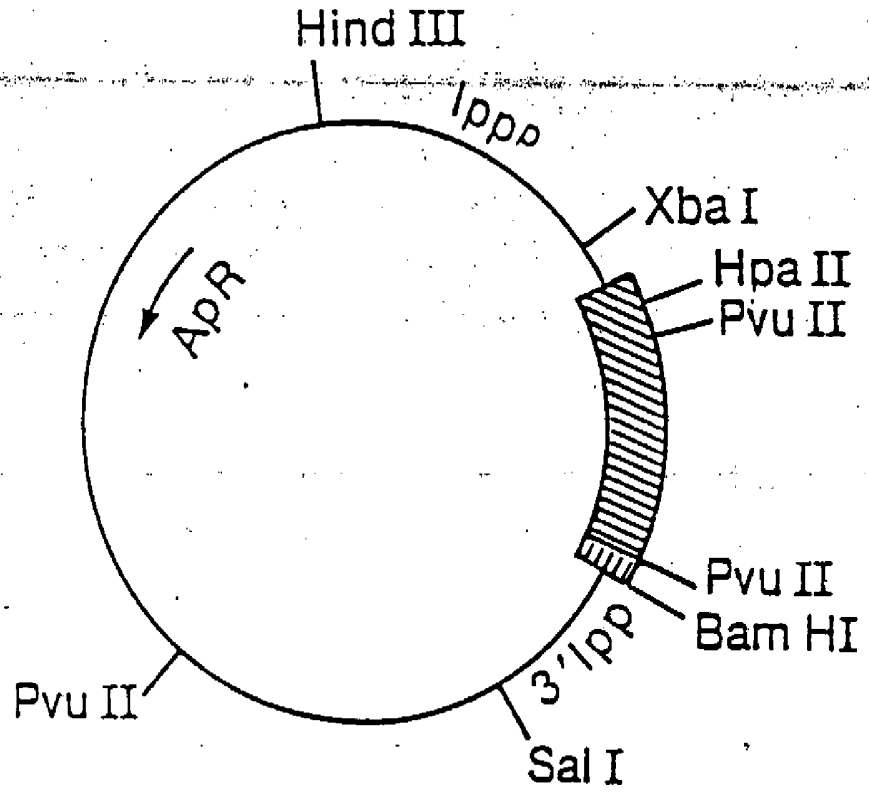
Obr. 6

(~3.9 kb)



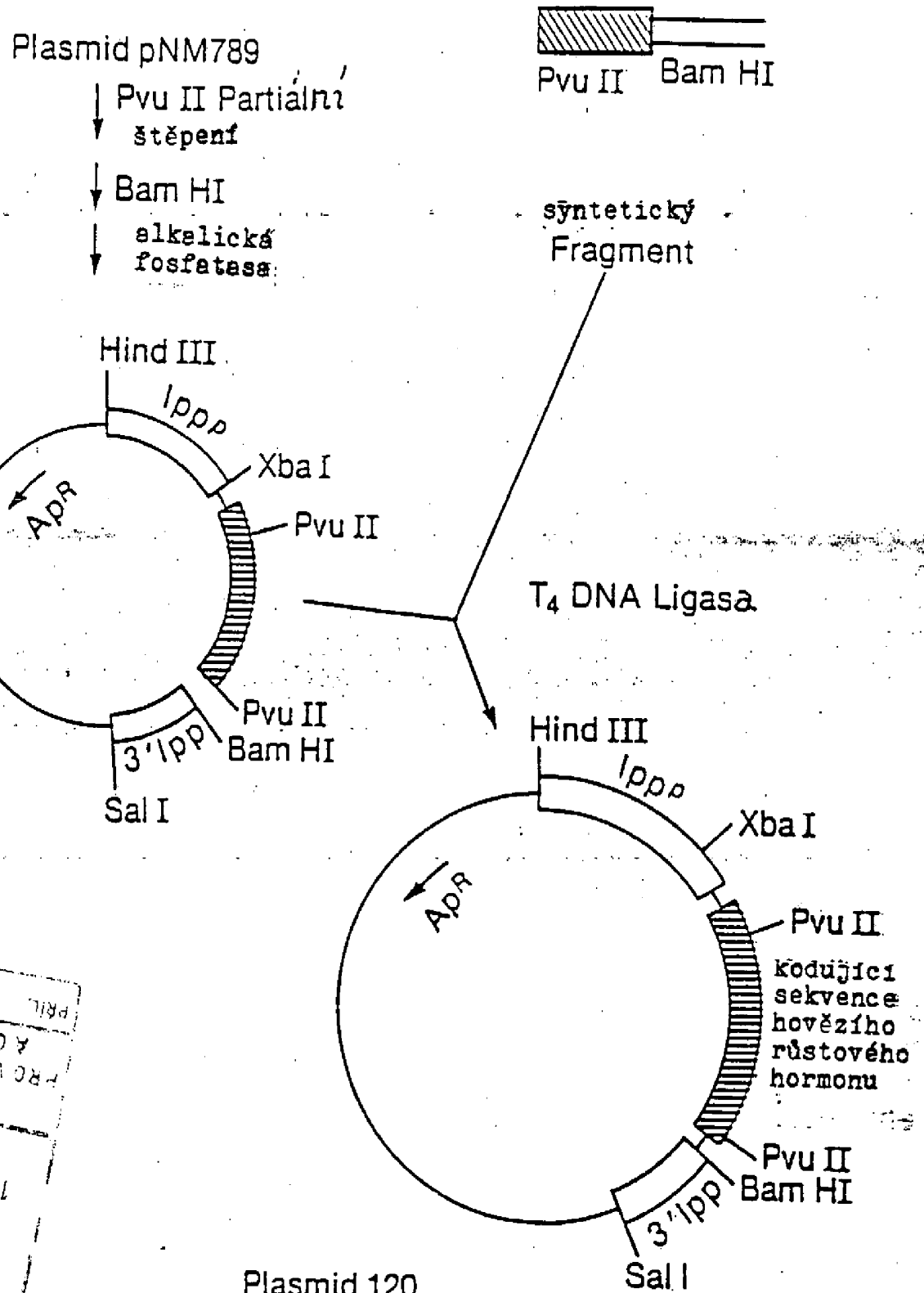
č.j. 6508
došlo 19 XI 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

Obr. 7



č.j. 5080
DOŠLO 19 XI '92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

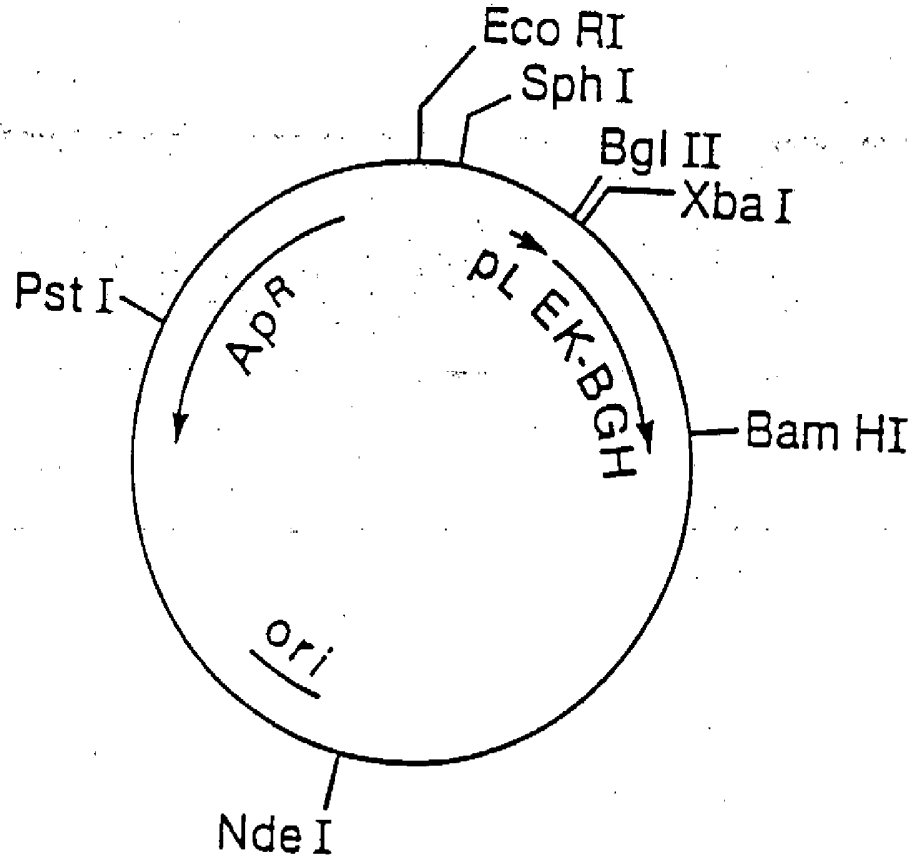
Obr. 8



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘIL.
19. XI. 92
DOSLO
0 6 5 0 8 0

Obr. 9

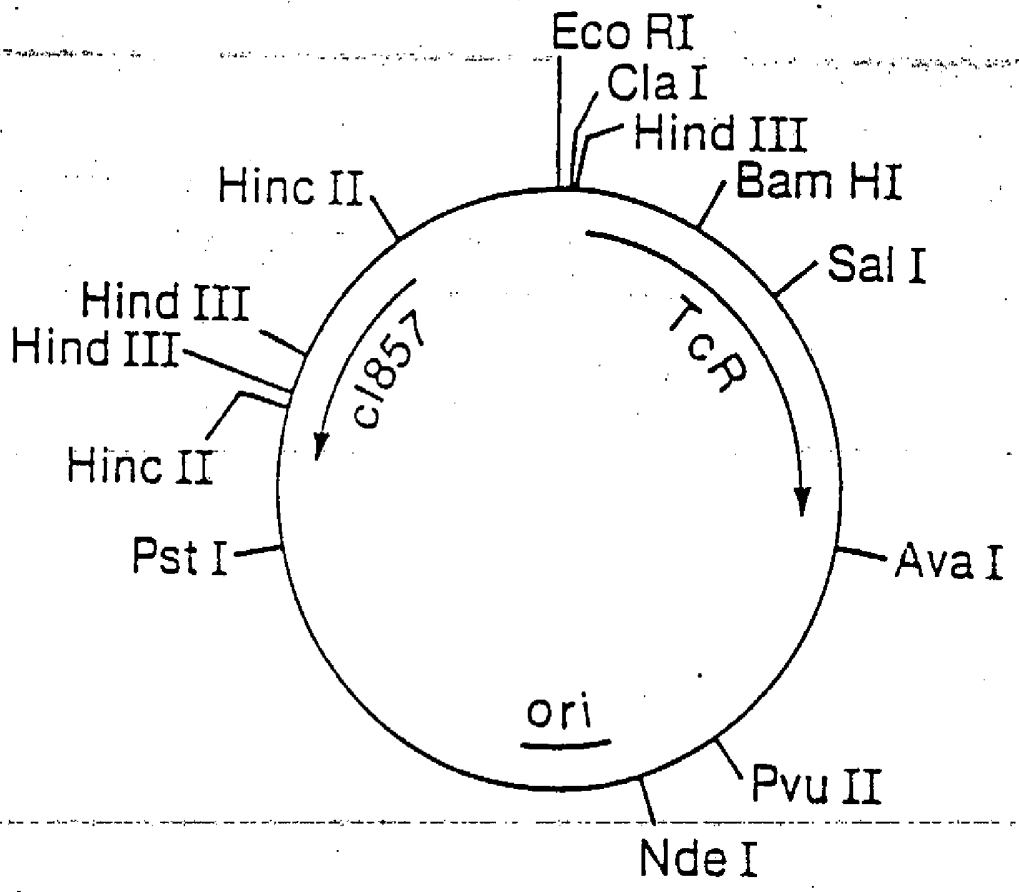
(~4.5 kb)



ČJ.
0 6 5 0 8 0
BOSTED
19. XI. 92
ÚŘAD

Obr. 10

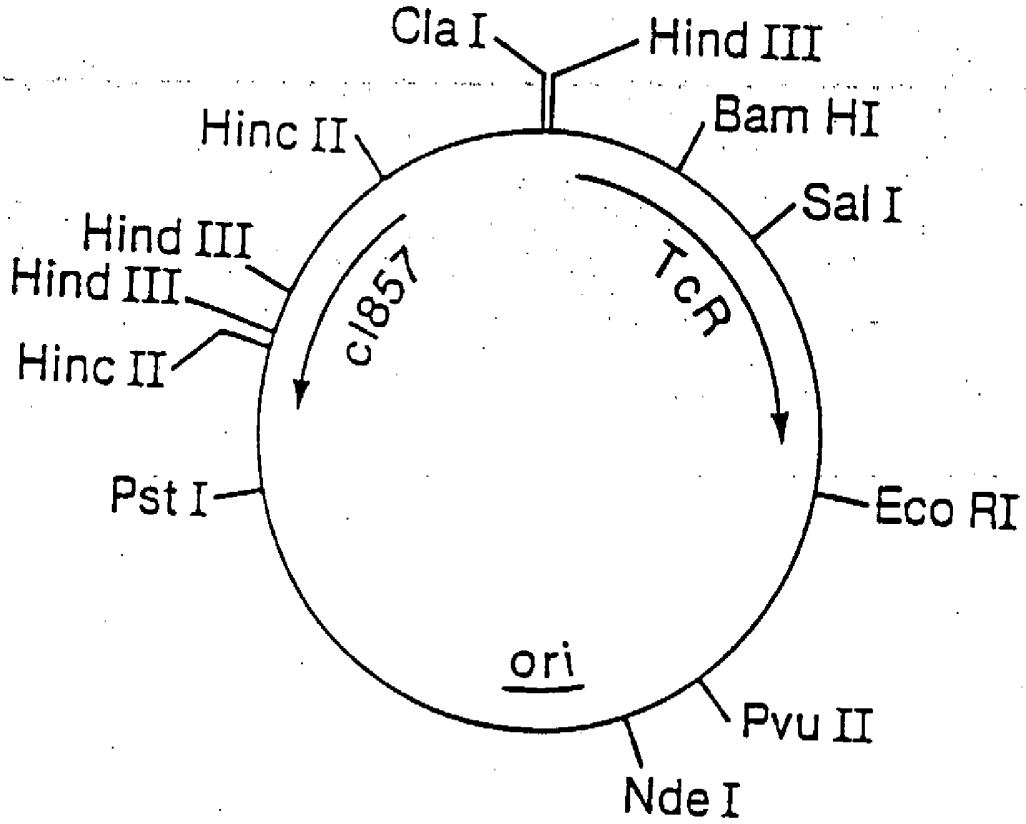
(~5.1 kb)



ČJ. 065080
19 XI 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

Obr. 11

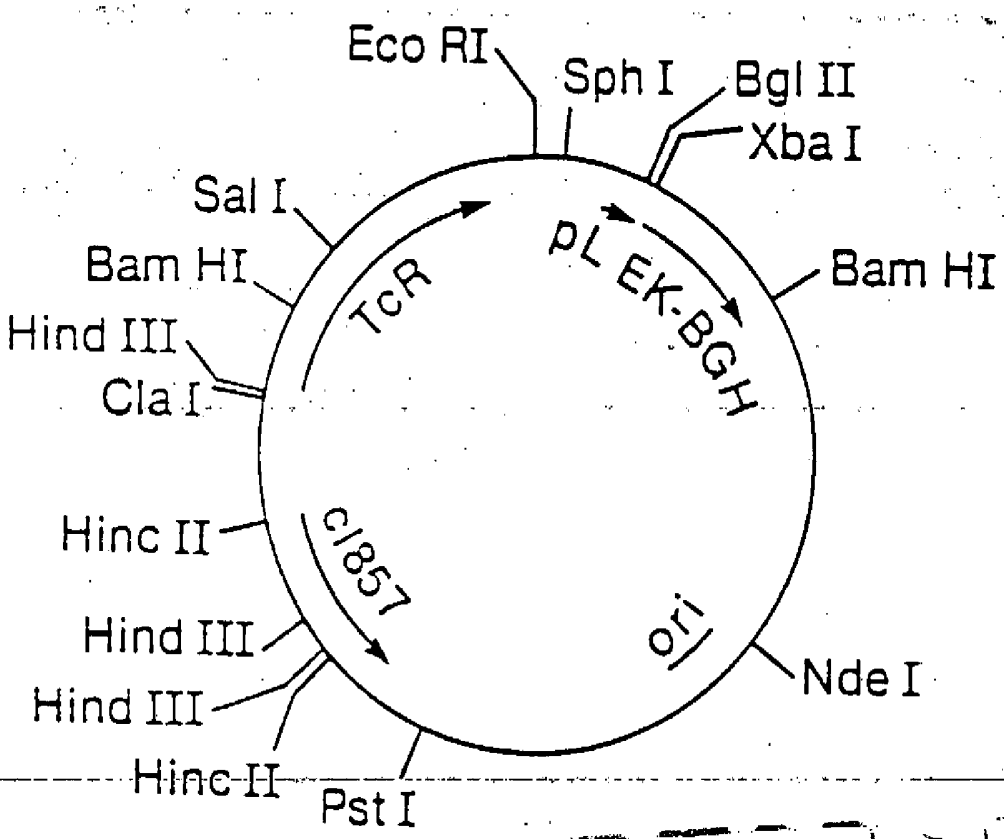
(~5.1 kb)



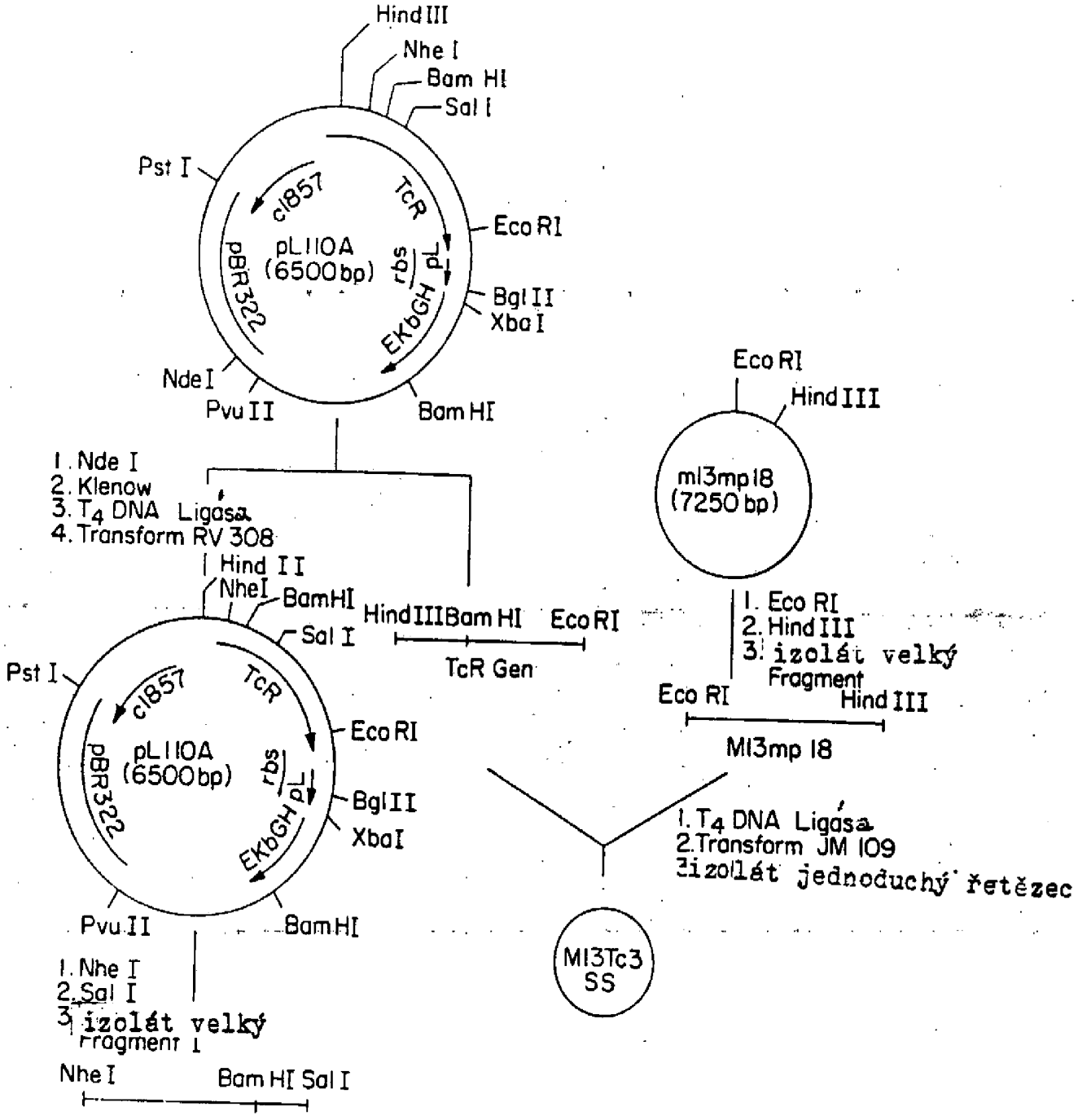
čj. 065080
19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

Obr. 12

(~6.6 kb)

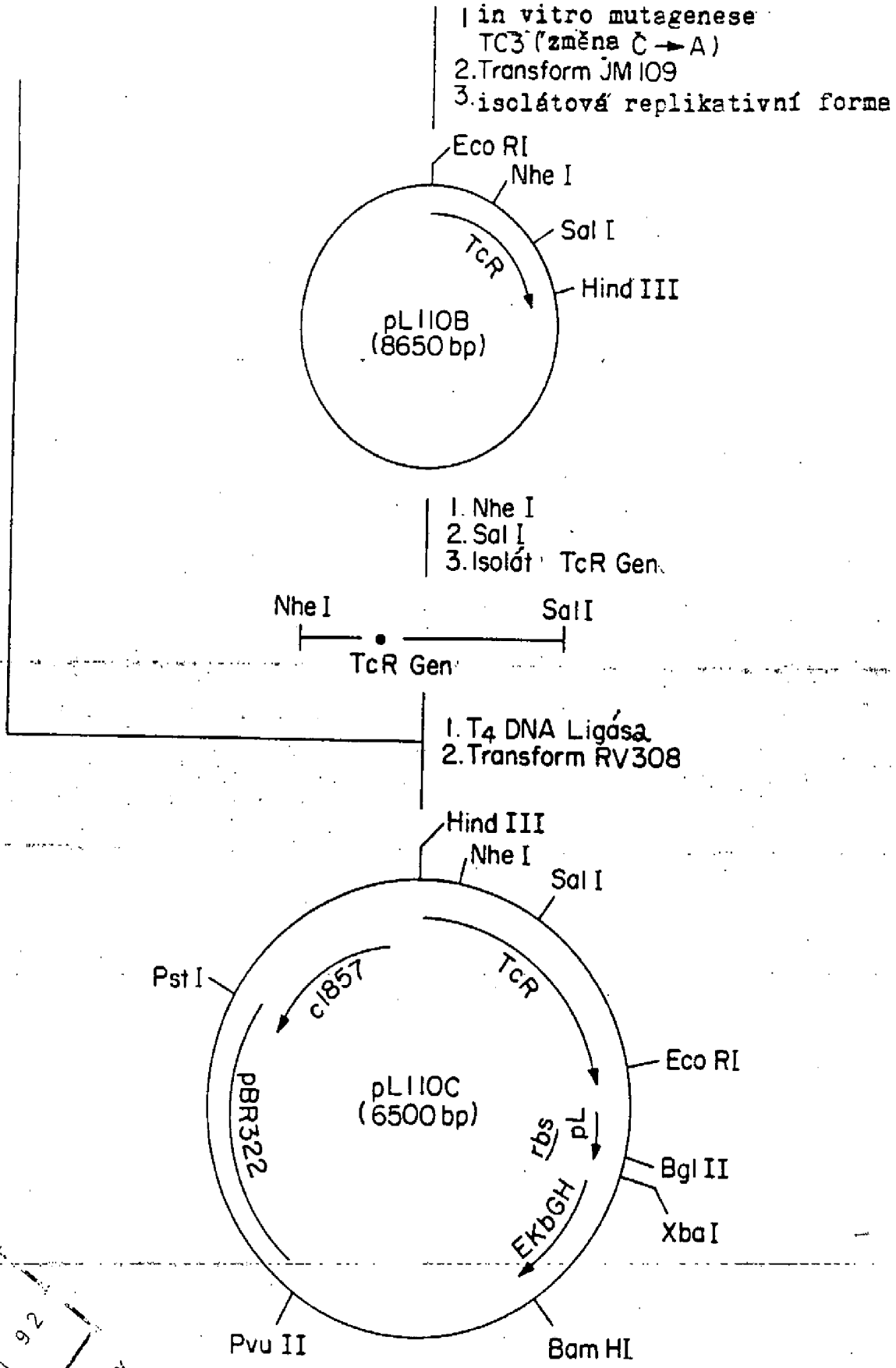


č.j.
0 6 5 0 8 0
DOŠLO
19. XI. 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.



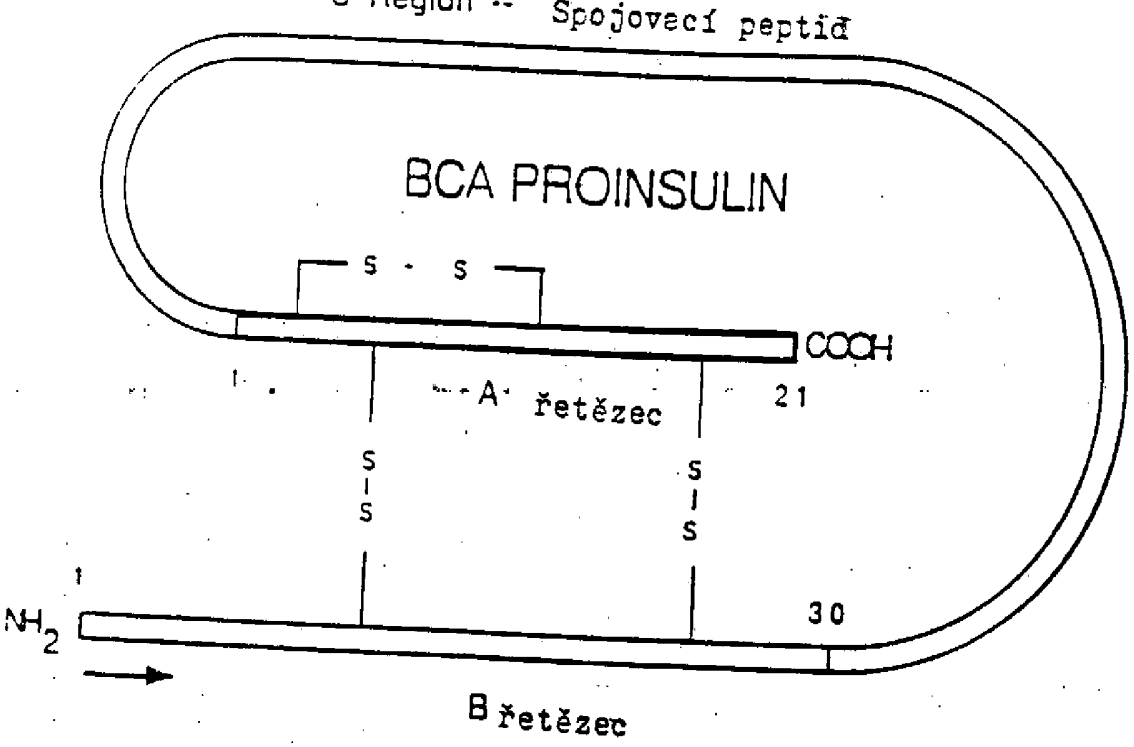
Obr. 13

č.j. 065080
DOŠLO 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.

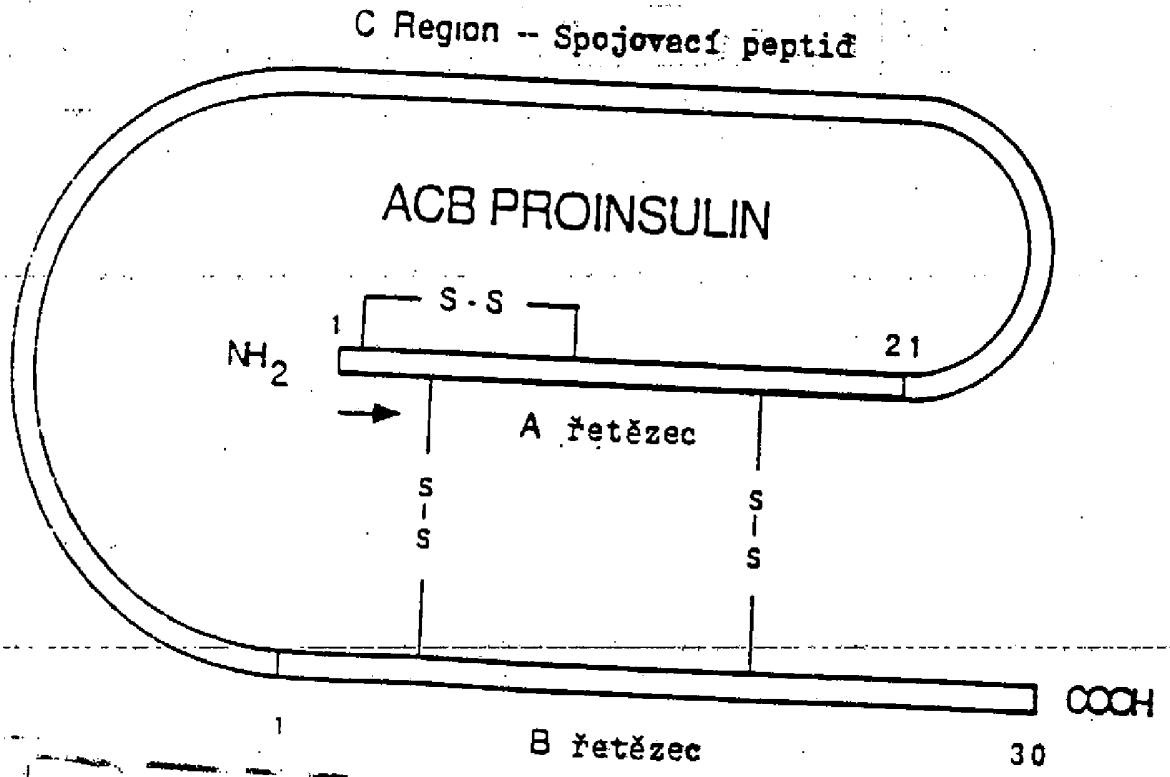


Obr. 1[redacted]4

065080
DOŠLO
19. XI. 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

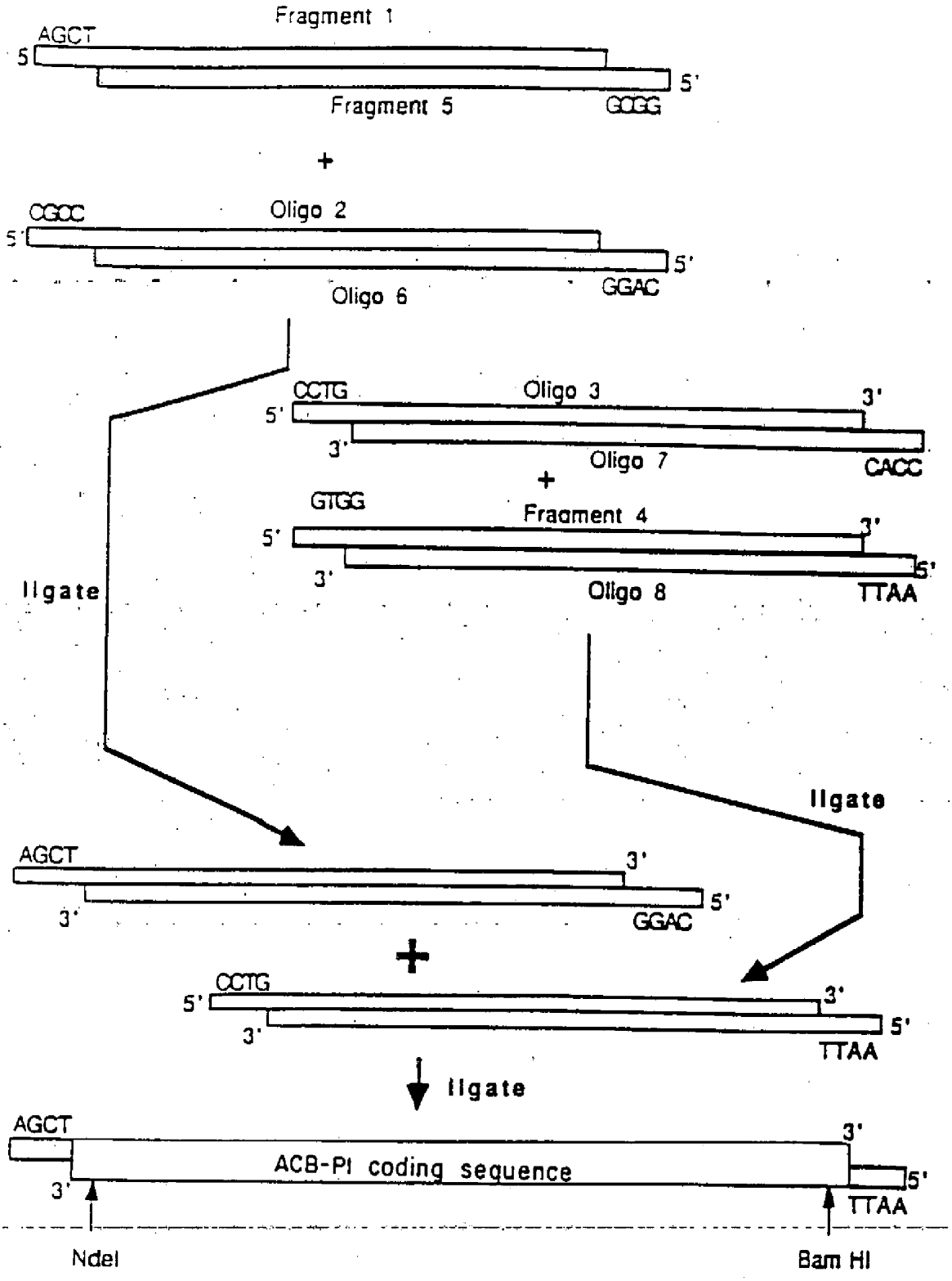


Obr. 15a



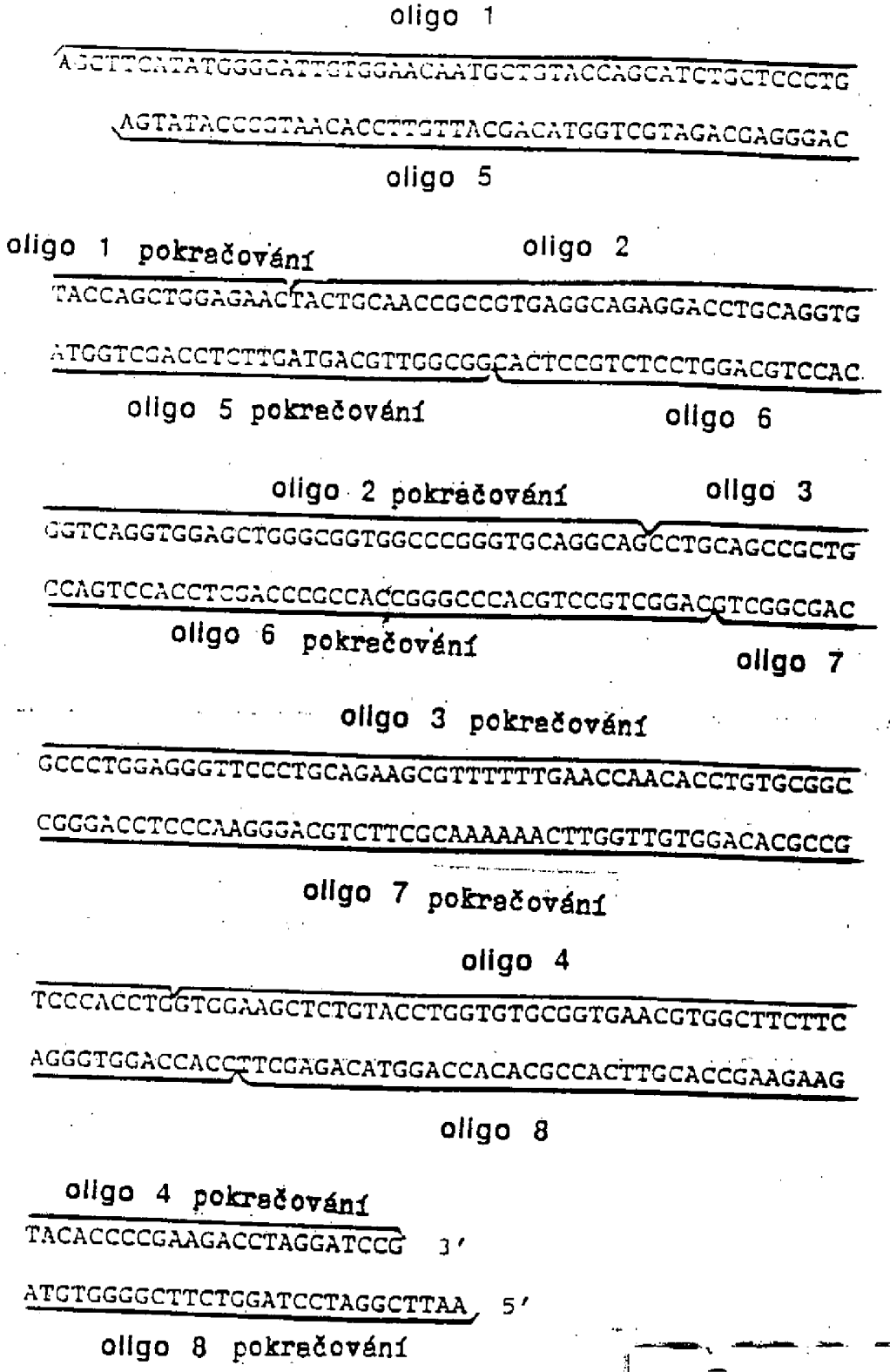
Obr. 15b

č.j. 065080
DOSLO 19. XI. 92
ÚŘAD REVIZNÁLEZY A OBJEVY



Obr. 16

ČJ. 05080
DOŠLO 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY



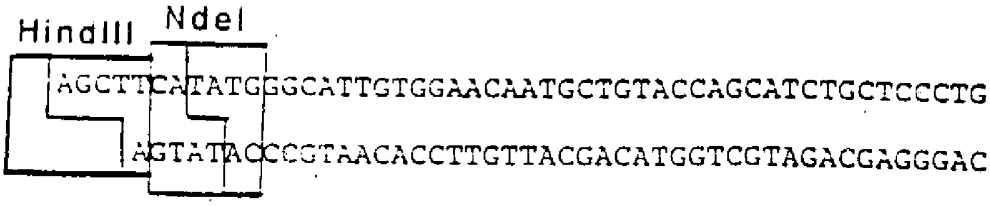
Obr. 17

č.j. 06508
DOŠLO 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

HindIII NdeI

AGCTTCATATGGGCATTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTG

AGTATACCCGTAACACCTTGTTACGACATGGTCGTAGACGAGGGAC



TACCAGCTGGAGAACTACTGCAACCGCCGTGAGGCAGAGGACCTGCAGGTG

ATGGTCGACCTCTTGATGACGTTGGCGGCACTCCGTCTCCTGGACGTCCAC

GGTCAGGTGGAGCTGGGCGGTGGCCCGGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCGCTG

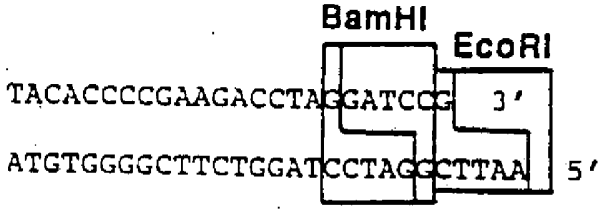
CCAGTCCACCTCGACCCGCCACCGGGCCCACGTCCGTCGGACGTCGGCGAC

GCCCTGGAGGGTTCCCTGCAGAAGCGTTTTTTGAACCAACACCTGTGCGGC

CGGGACCTCCCAAGGGACGTCTTCGCAAAAAACTTGGTTGTGGACACGCCG

TCCCACCTGGTGGAAGCTCTGTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTC

AGGGTGGACCACCTTCGAGACATGGACCACACGCCACTTGCACCGAAGAAG



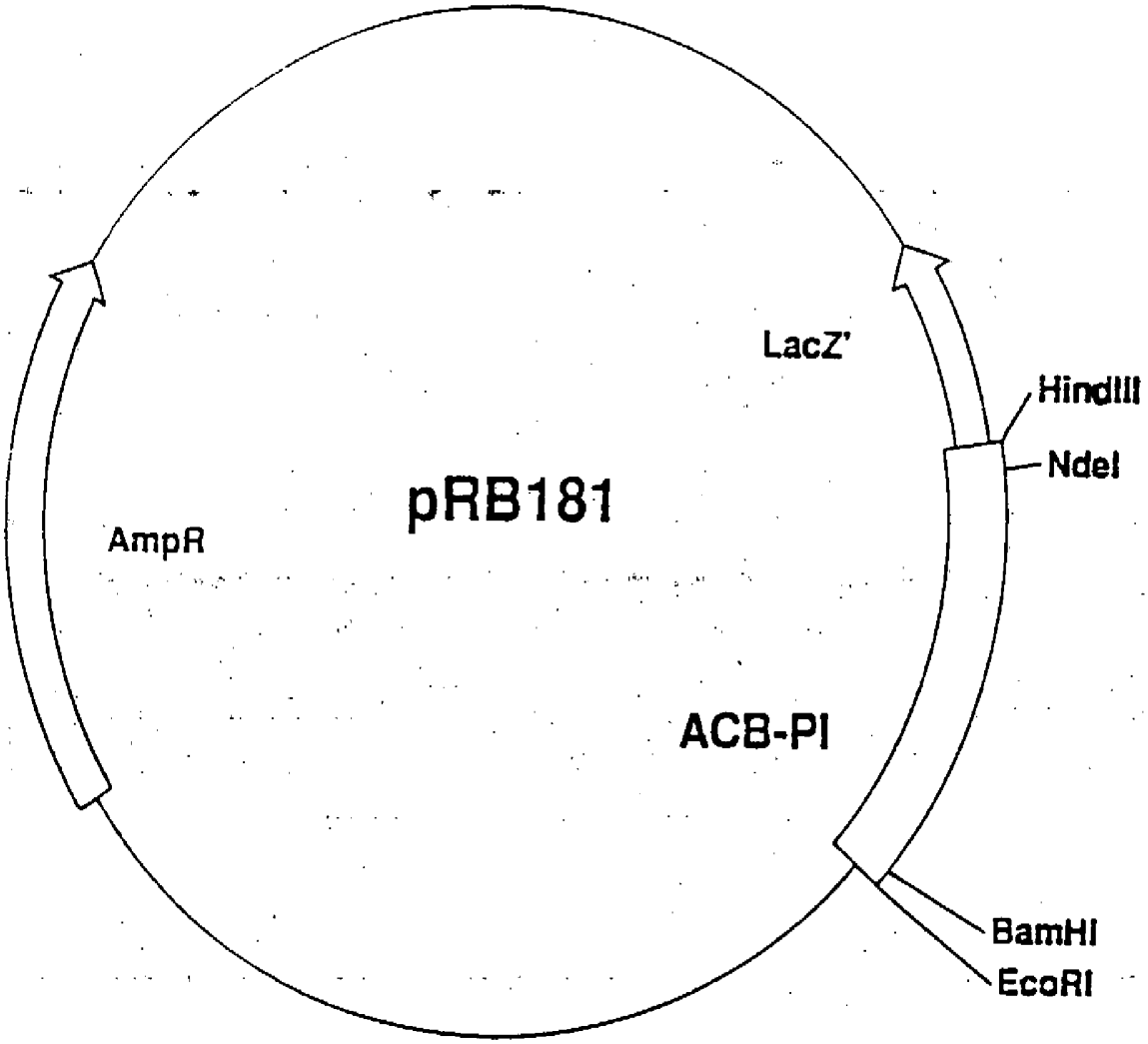
BamHI EcoRI

TACACCCCGAAGACCTAGGATCCG 3'

ATGTGGGGCTTCTGGATCCTAGGCTTAA 5'

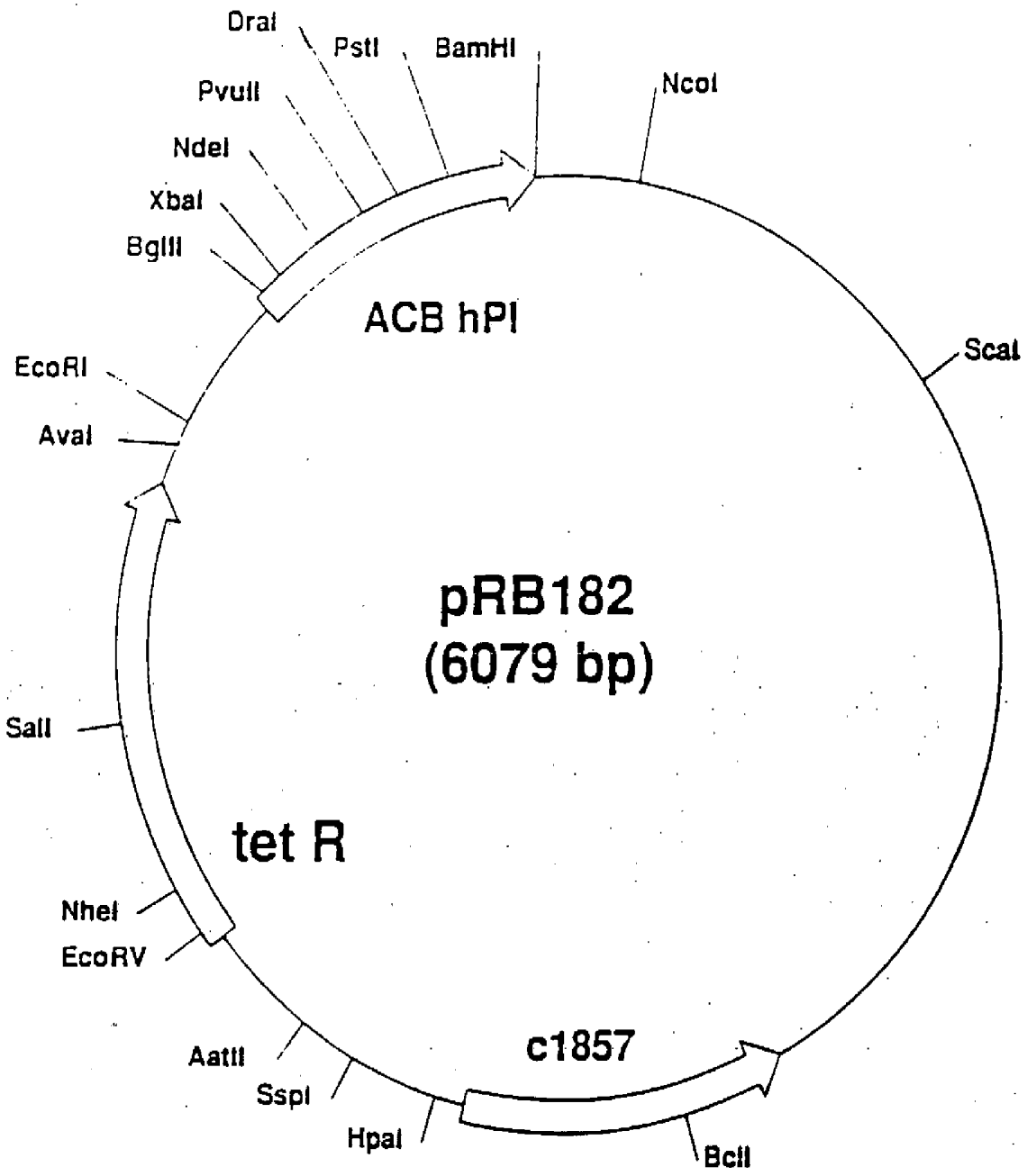
Obr. 18

Č.J. 065080
DOŠLO 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY
PŘÍL.



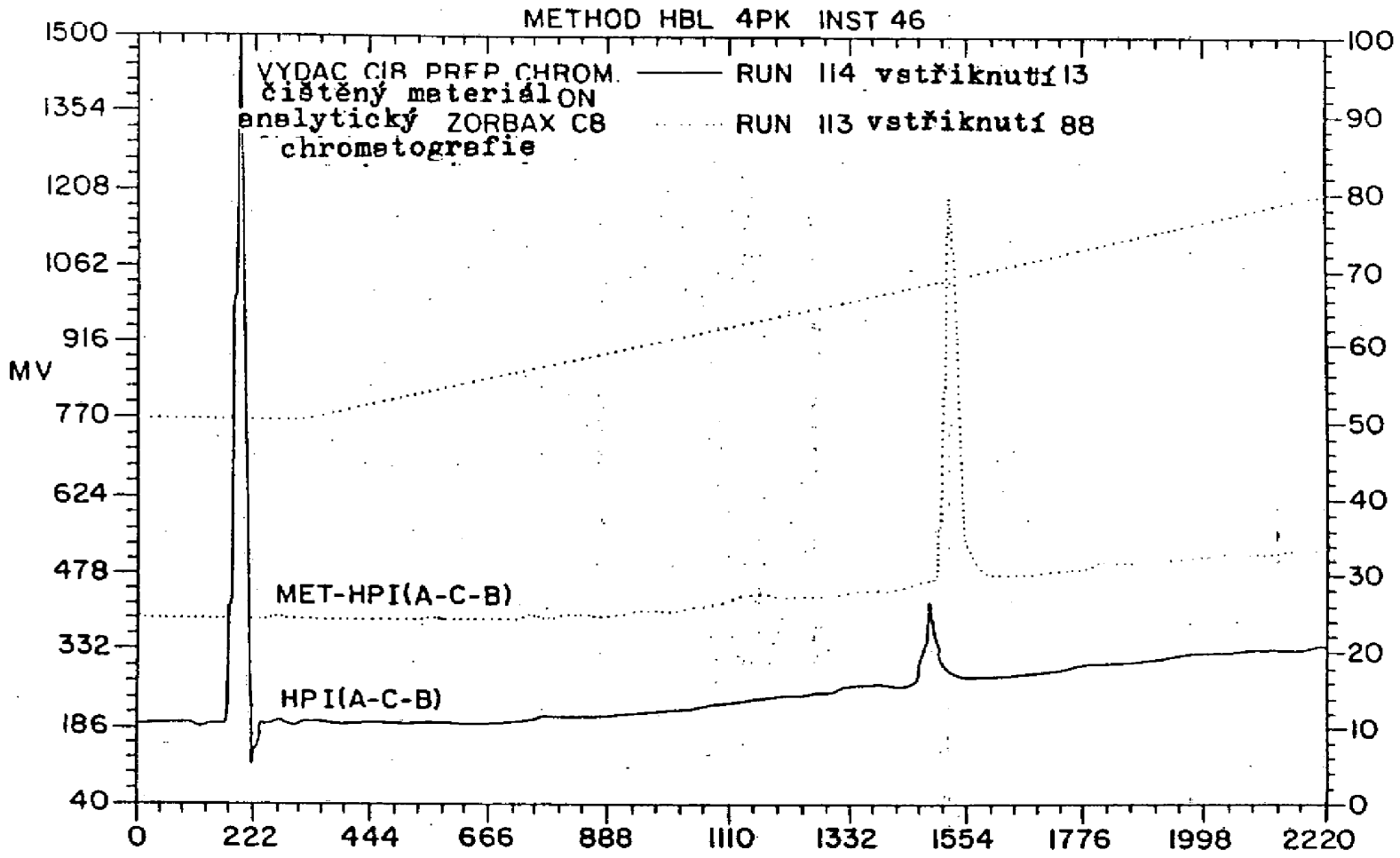
Obr. 19

č.j.
5 6 5 0 8 0
došlo
19 XI 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
příl.

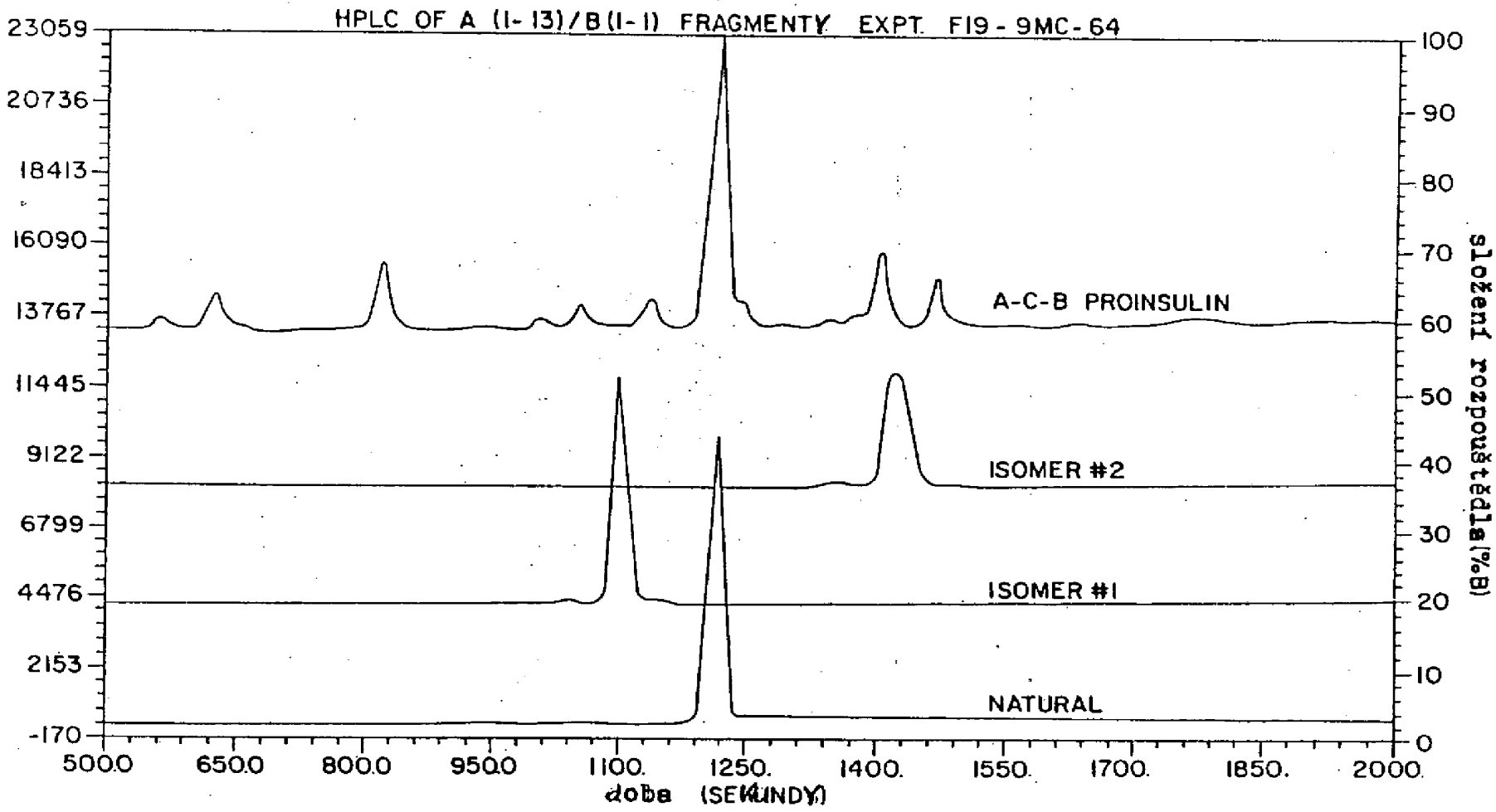


Obr. 20

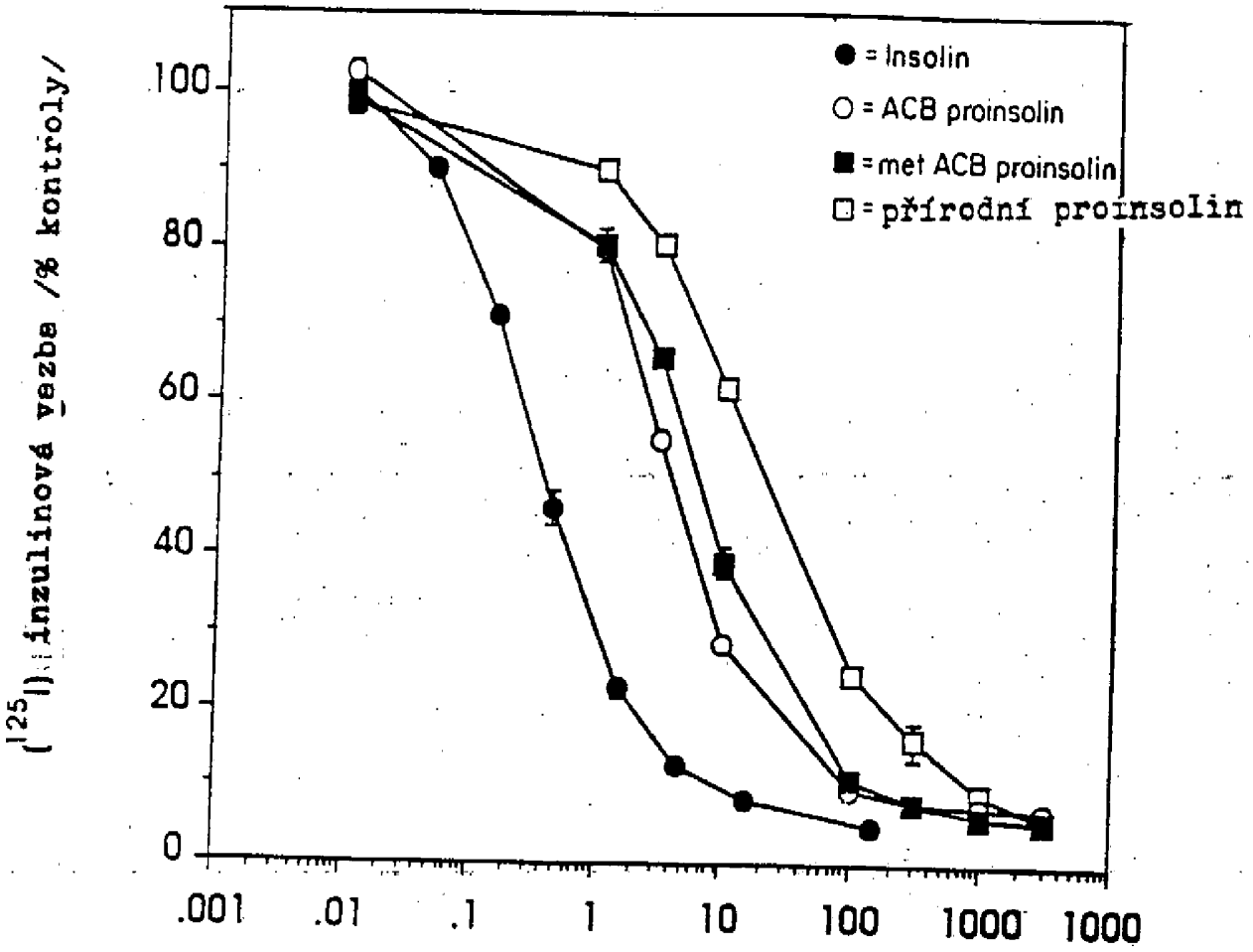
č.j. 65080
DOSLO 19 XI 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY


METHOD HBL 4PK INST 46
VYDAC CIR PREP CHROM. —— RUN 114 vstřiknutí 13
čištěný materiál ON
analytický ZORBAX C8 ····· RUN 113 vstřiknutí 88
chromatografie
MET-HPI(A-C-B)
HPI(A-C-B)
MV
1500
1354
1208
1062
916
770
624
478
332
186
40
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
222
444
666
888
1110
1332
1554
1776
1998
2220

Obr. 21

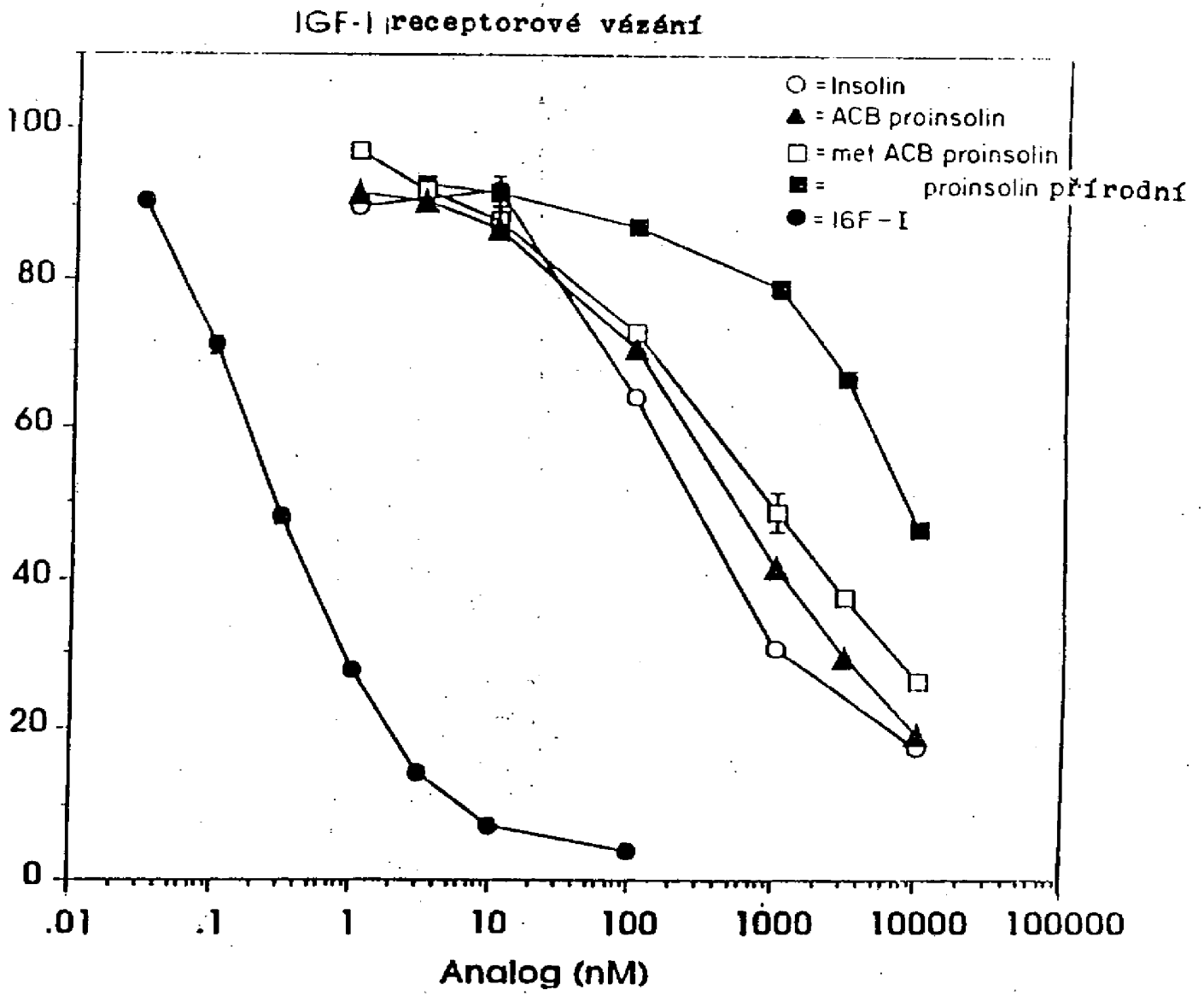

HPLC OF A (1-13)/B(1-1) FRAGMENTY EXPT. F19-9MC-64
23059
20736
18413
16090
13767
11445
9122
6799
4476
2153
-170
odezva (MILLIVOLT)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
složení rozpouštědla (%B)
A-C-B PROINSULIN
ISOMER #2
ISOMER #1
NATURAL
500.0
650.0
800.0
950.0
1100.
1250.
1400.
1550.
1700.
1850.
2000.
doba (SEKUNDY)

Obr. 22

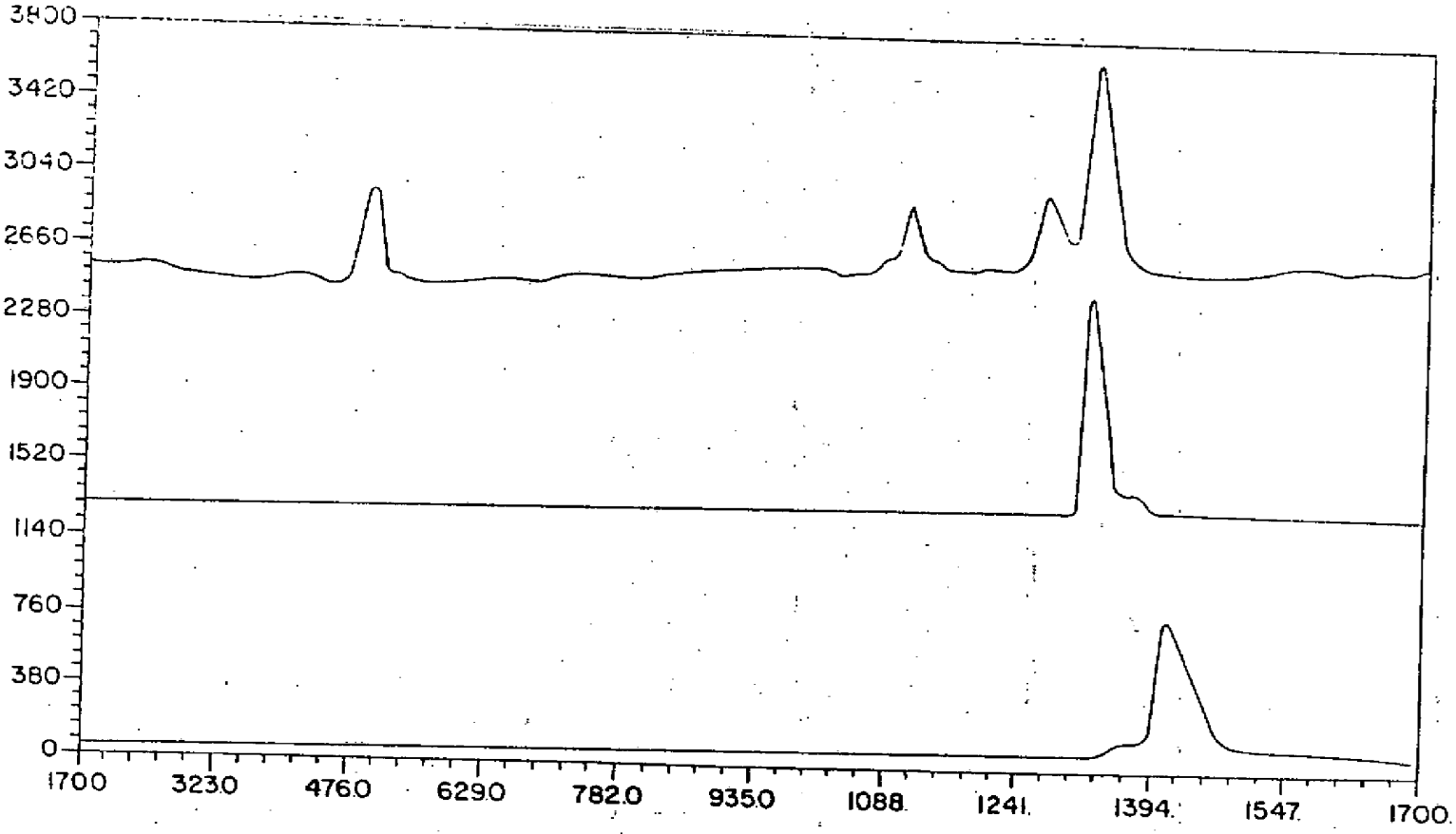


Obr. 23

Ej. 0 6 5 0 8 0
Došlo 19. XI. 92
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

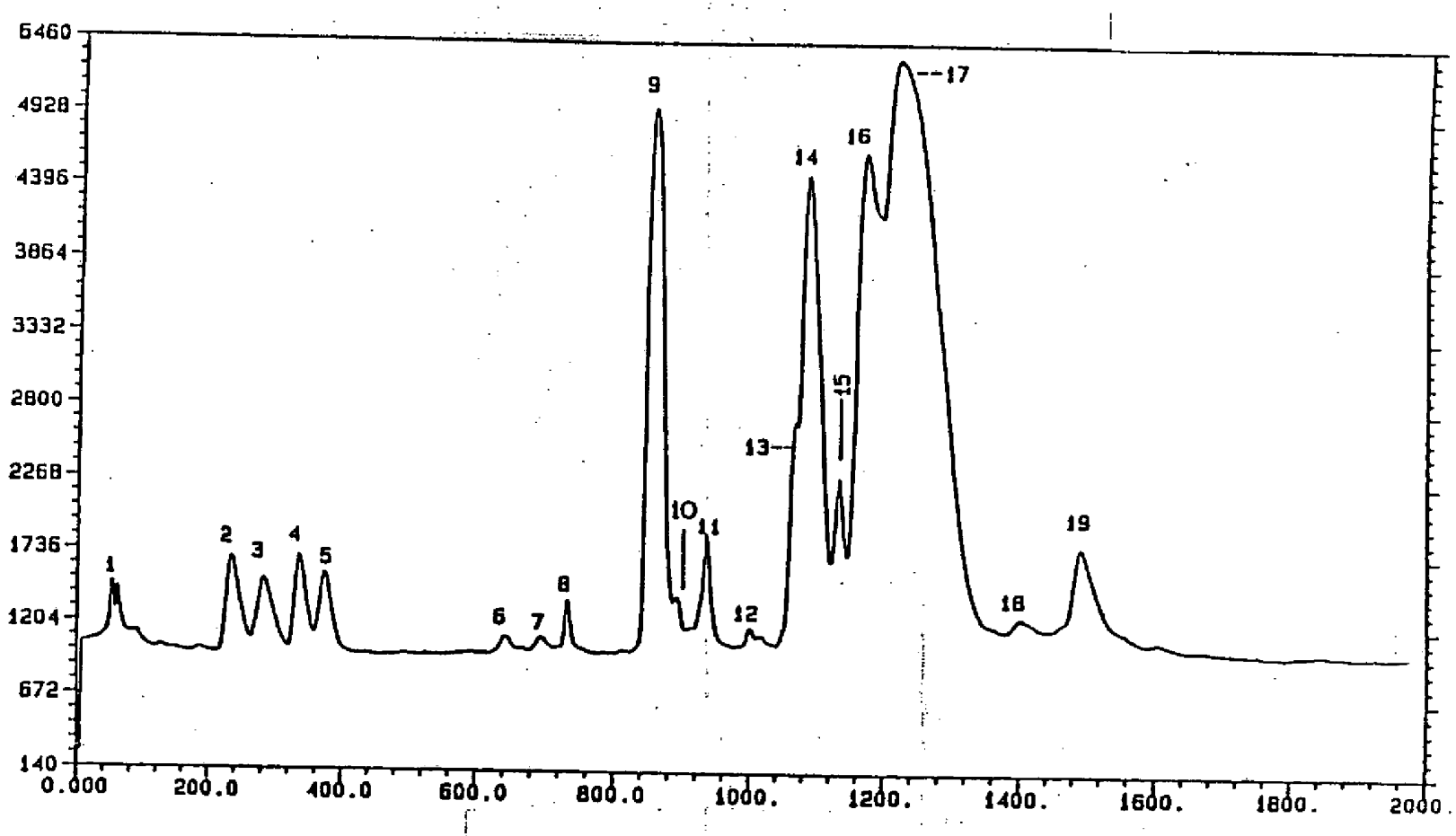

IGF-I receptorové vázání
○ = Insolin
▲ = ACB proinsolin
□ = met ACB proinsolin
■ = proinsolin přírodní
● = IGF-I
100
80
60
40
20
0
.01
.1
1
10
100
1000
10000
100000
Analog (nM)
(^{125}I)IGF-I vázání (% kontroly)

Obr. 24



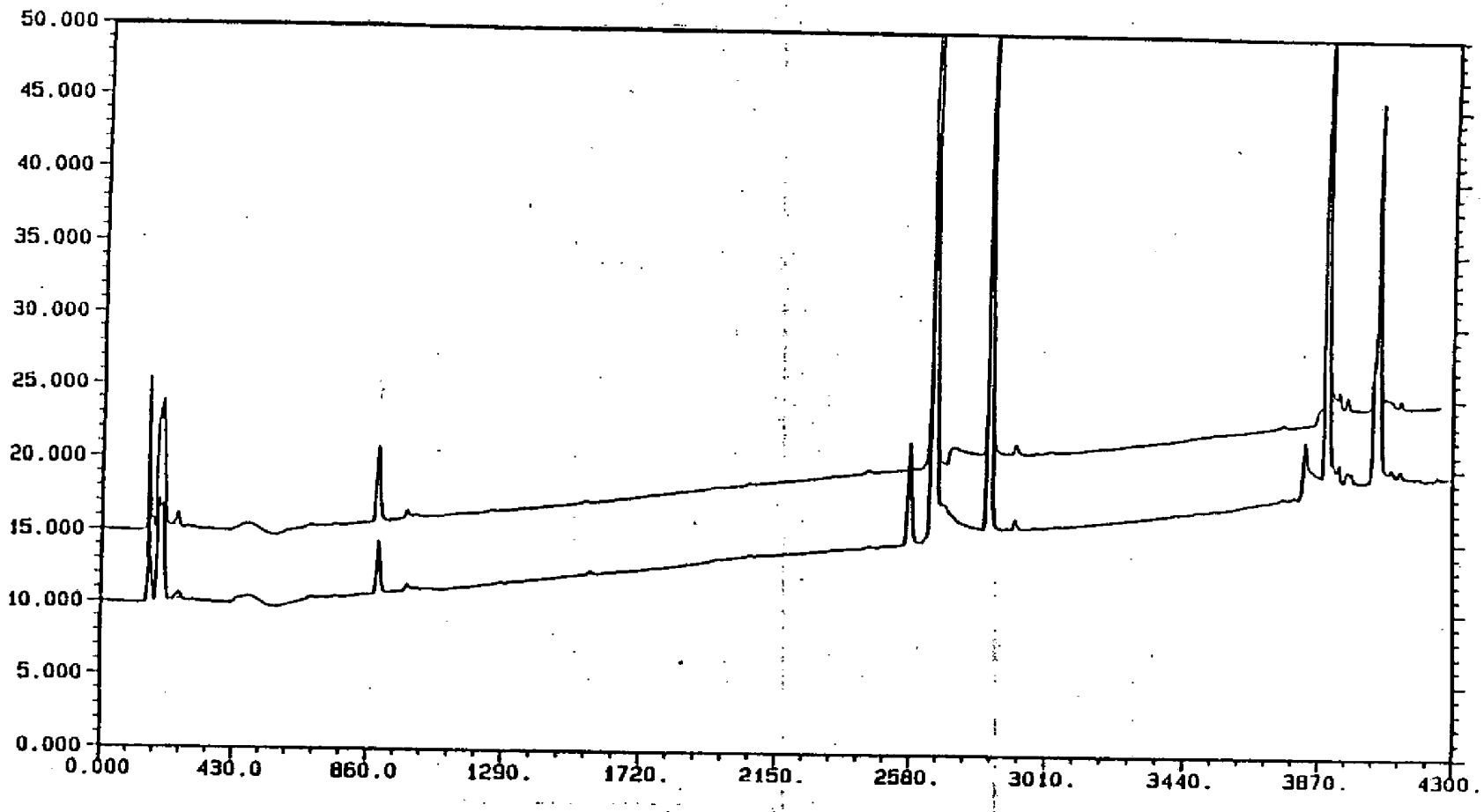
Obr. 25

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
9 XI 92
DOSLO
650 80



5460
4928
4396
3864
3332
2800
2268
1736
1204
672
140
0.000
200.0
400.0
600.0
800.0
1000.
1200.
1400.
1600.
1800.
2000.
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

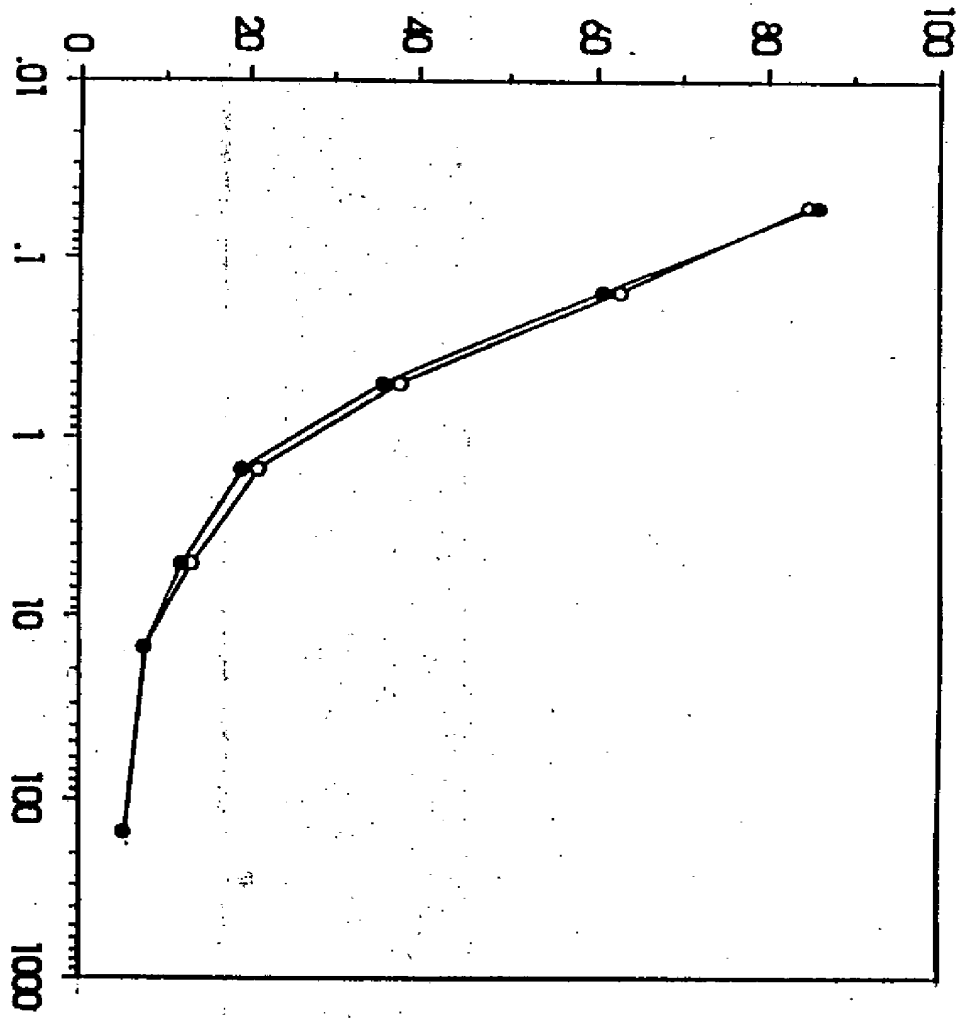
Obr. 26



Obr. 27

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘÍL.
DOŠLO
19. XI. 92
Č.j.
065080

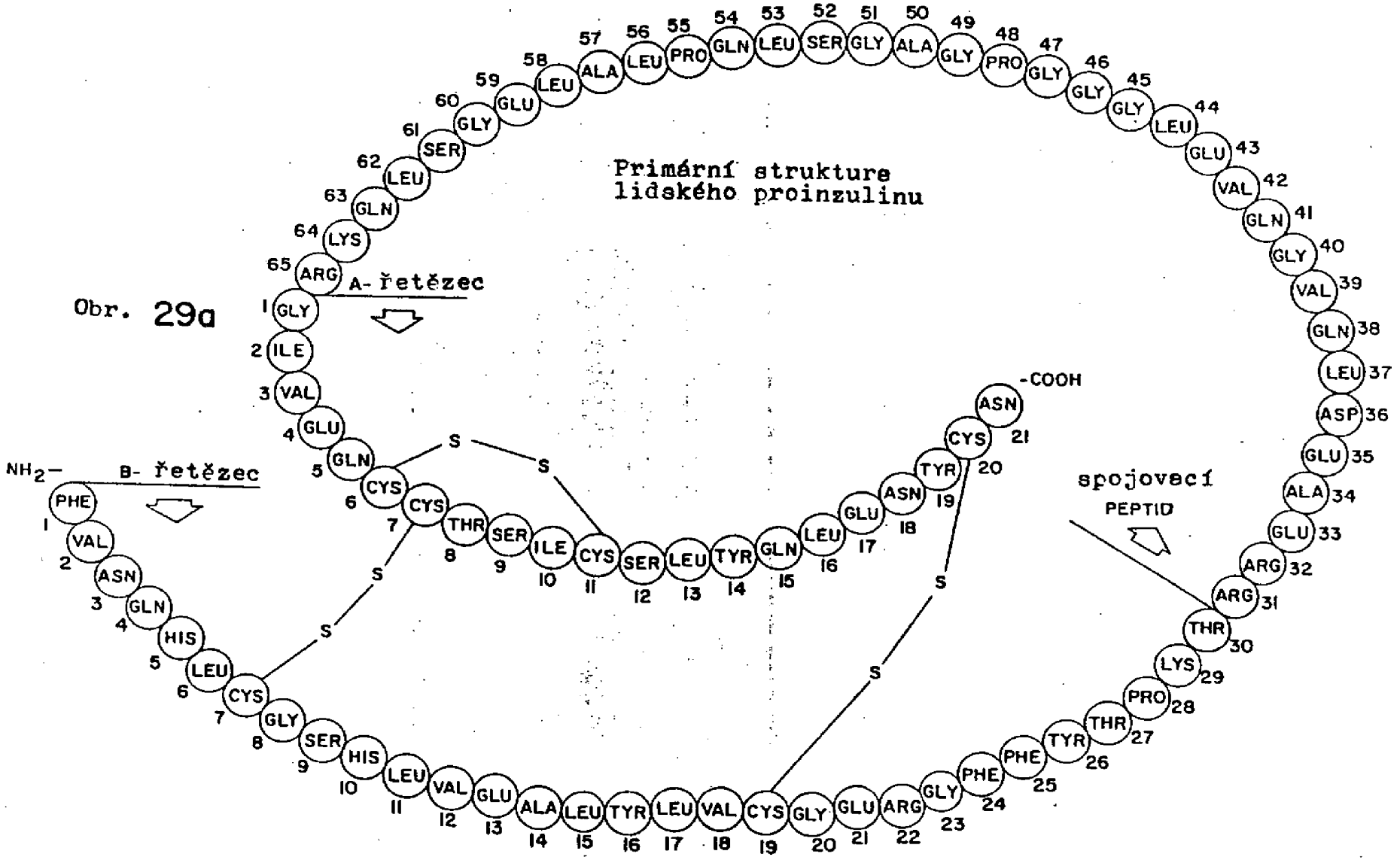
č.j.
0 6 5 0 8 0
DOŠLO
19. XI 92
ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
PŘIL.

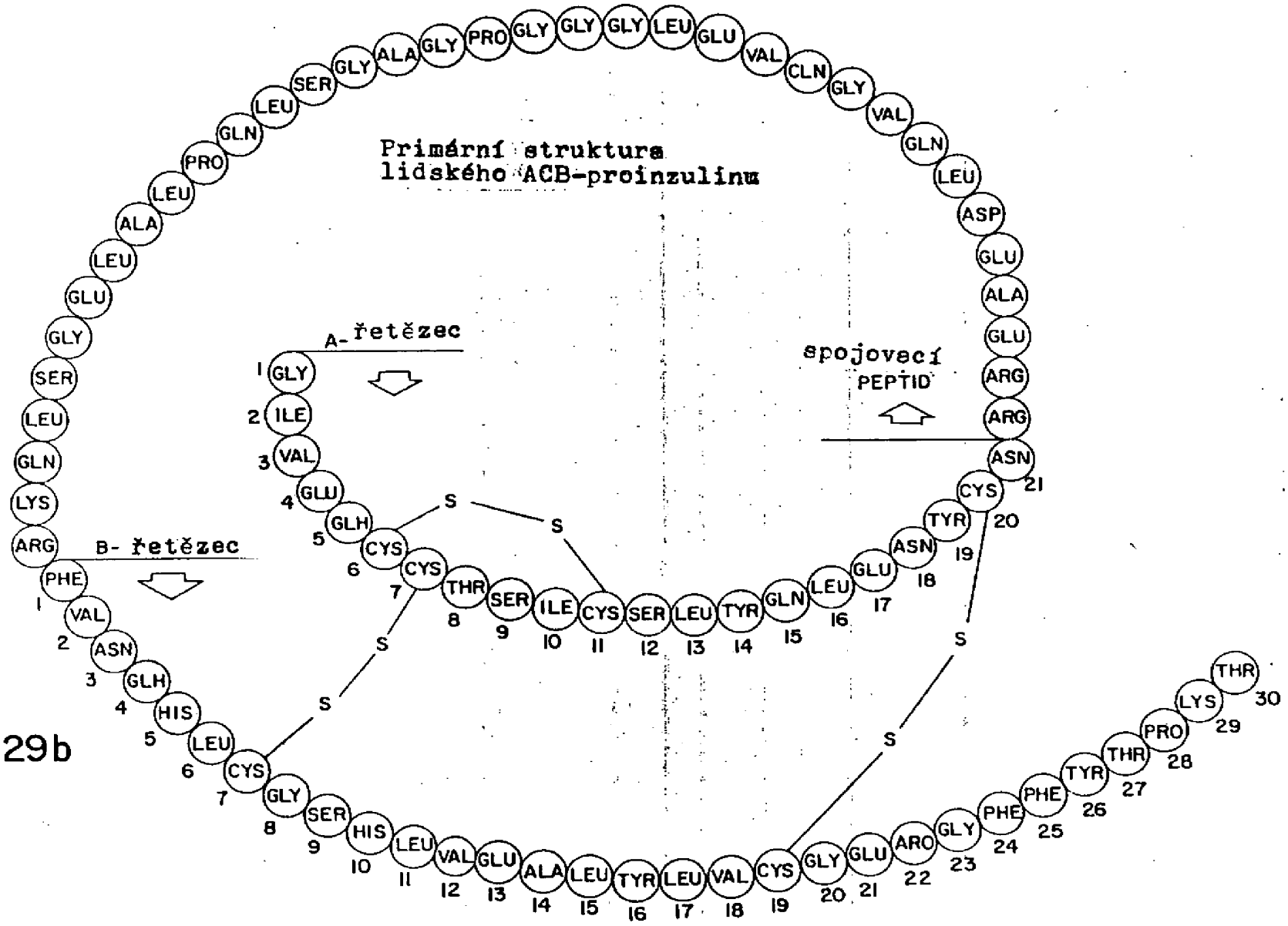


Obr. 28

č.j.
95080
XI 92
ÚŘAD
NÁLEZY
OBJEVY

Obr. 29a





Obr. 29b

ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY
19. XI. 92
0 6 5 0 8 0