

(19)



(10) **LT IP1734 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP1734** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 7/00**
C07K 14/195
C07K 14/435
C12N 15/16
C12N 15/70
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 30**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: **538927, 1990 06 15, US**
9101057, 1991 01 17, GB
PCT/SE91/00424, 1991 06 12, SE
- (71) Pareiškėjas:
Astra AB, S-151 85 Soedertaelje, SE
- (72) Išradėjas:
Tanjore S. BALGANESH, IN
Goutam DAS, IN
Sandhya Srikant VISWESWARIAH, IN
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Naujas vektorius biologiškai svarbių peptidų gamybai
- (57) Referatas:
—

NAUJAS VEKTORIUS BIOLOGIŠKAI SVARBIŲ PEPTIDŲ GAMYBAI

Šioje išradimo paraiškoje aprašome naujo sekrecijos vektoriaus, kurio pagrindą sudaro E. Coli enterotoksino koduojanti seka, sukūrimą. Parodome, kad toksino geno pre ir pro rajonas yra besalygiai būtinas stabilaus toksino ekstraląstelinei sekrecijai. Mes taip pat specialiais pavyzdžiais parodome, kad kuomet į heterologinį peptidą koduojanti nukleotidinė seka įliejama į rėmelį st gene pro rajono gale, tuomet gautas vektorius E. Coli kaip šeimininke sekretuoja į ląstelės išorę teisingai pagamintą heterologinį peptidą. Ši paraiška taip pat apima ir tinkamų vektorių, kur toks genų susiliejimas gali būti pasiektas, konstravimą. Taip pat aprašomi bendri metodai, naudojami tokiems suliejimams gauti, kaip antai: a) rekombinantinių DNR technologija ir b) saitui-specifinė in vitro mutagenėzė. Šioje paraiškoje taip pat aprašomas bendras heterologinių peptidų valymo būdas. Ši naujo vektoriaus sistema gali būti naudojama biologiškai svarbių peptidų hiperprodukcijai ir ekstraląstelinei sekrecijai.

Sekretuojami baltymai, kaip ir daugelis kitų membraninių baltymų pradžioje sintezuojami kaip pradiniai intraląsteliniai preproteinai, turintys N- gale signalinį peptidą. Signalinis peptidas įgalina baltymą perkirsti vidinių ląstelės membranų barjerą. Šio proceso metu baltymas suskyla, virsdamas subrendusiu baltymu, kuris įprastai būna išsidėstęs periplazminėje erdvėje. Kaip išimtis šiam mechanizmui yra tam tikri membraniniai baltymai, kurių signaliniai peptidai lieka neatskelti (S. Letenhardt ir kt. Kn. "Baltymų konstravimas, pritaikymas mokslui, medicinai ir pramonei", red. M. Inouye ir R. Sharma, 1986 Academic Press. Inc., 157-171). Kai kurie prokariotiniai baltymai ar peptidai sintezuojami kaip dideli pirmtakai, turintys signalinius peptidus pre- ir pro rajone. Abiems segmentams atskylus, gaunami subrendę baltymai ar peptidai. Pavyzdžiais gali būti Bacillus subtilis (C. Nishio ir kt., 1983, Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 751-758) arba Eserichia coli stabilus toksinas (P. Dwarakanacht ir kt., 1989, Gene 81, 219-226). Ententerotoksigeniški

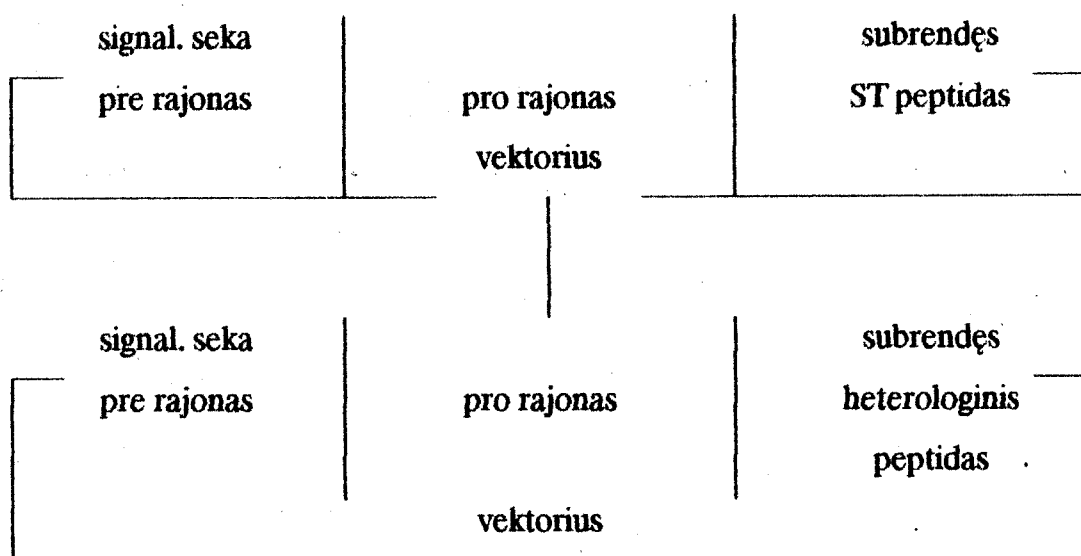
E. coli kamienai (ETEC) sukelia žmonėms viduriavimą, išskirdami ekstraląstelinius toksinus, kurie klasifikuojami kaip toksinų termolabili (LT) ir termostabili (ST) šeimos (R. N. Greenberg ir R. L. Guerrant (1981). Pharmacol Ther. II, 507-537, M.D. Gill ir M. Woolkalis 1985, Kn. "Mikrobų toksinai ir viduriavimas", Ciba Foundation simpoziumas 112, Pitman, London, 57-73). ST toksinai yra dviejų tipų: metanolyje tirpūs toksinai (STI) ir metanolyje netirpūs toksinai (STII). STI toliau skirstomi į 3 grupes, priklausomai nuo kilmės, pvz.: STh (žmogaus), STp (kiaulės) ir STb (jaučio). Ir LT, ir ST genai koduoti plazmidėje. st geno nukleotidų seka parodyta 1 pav. (P. Dwarakanacht ir kt., 1989, Gene 81, 219-226). Sprendžiant tiek pagal nukleotidų seka, tiek pagal transliuotų amino rūgščių seka, nustatyta, kad 72 aminorūgščių peptidas yra ST pirmtakas, kuris po transliacijos procesingo metu pertvarkomas atskeliant 19 aminorūgščių peptidą nuo nuo karboksilinio galo ir tampa biologiškai aktyviu toksinu. (P. Dwarakanacht ir kt., 1989, Gene 81, 219-226). Daugelis grupių bandė panaudoti gamtinių sekretuojamų baltymų "signalinės sekos dalį" tam, kad būtų sukurtas rekombinantinis vektorius, išskiriantis heterologinius baltymus. Daugeliu atvejų taip pat naudotos ir sintetinės signalinės sekos. Visais šiais atvejais rekombinantiniai produktai yra išsidėstę subląstelinuose kompartmentuose. Specifiniai pavyzdžiai yra : Gray ir kt. patentas (US patent 4, 755, 4 465 July 5, 1988), kuriame išradėjai paskelbė sukonstravę vektorių, padedantį teisingai suformuoto žmogaus augimo hormono (hGH) sekrecijai iš E. coli ir Pseudomonas. "Signalinė seka", kuri taip pat užpatentuota, labai skiriasi nuo E. coli stabilaus toksino "signalinės sekos".

II. Antrajame patente (US patent No. 4, 704, 362 dated Nov. 3, 1987) Itakura ir kt. aprašo rekombinantinį klonuojamą vektorių, skirtą mikrobinio polipeptido ekspresijai, kuomet b- gal ir somatostatino suliejimo produktas gaminamas ir po jo procesingo in vitro gaunamas galutinis produktas.

Pavyzdžiu, kur specifiškai panaudota enterotoksino signalinė seka, gali būti Gray ir kt. (US patent, 4, 680, 262, 1985) darbas, kuriame išradėjai sujungė metanolyje

netirpaus stabilaus toksino (STII) "signalinę seką" su žmogaus augimo hormono (hGH) genu ir lokalizavo produktą šeimininko ląstelės periplazminėje dalyje. Įdomu pažymėti, kad išradėjai specifiškai ieškojo ekspresijos vektoriaus, kuris lokalizuotų ekspresuojamą rekombinantinį baltymą intraceliuliariai. st II signalinė seka nepanaši į st I signalinę seką ir todėl manoma, kad ji yra skirtingos sandaros.

Šio patento paraiškoje išradėjai pasinaudojo STI pre ir pro rajono teikiamais pranašumais tam, kad sukurtų rekombinantinį vektorių, kuriame nukleotidų seka, koduojanti peptidą, įliejama į rėmelį pro rajono gale. Viso geno ekspresijos išdavoje gaunamas teisingai subrandintas rekombinantinis peptidas, sekretuojamas į ląstelės išorę. Principinė seka parodoma žemiau.



Šios sistemos pranašumas yra tai, kad rekombinantinio produkto valymas tampa žymiai paprastesnis, kadangi ląstelės turinčios šį rekombinantinį vektorių, gali būti auginamos sintetinėje terpėje ir todėl sekretuojamas peptidas yra pagrindinis peptidas, kultūros supernatante. Čia aprašomas tokio rekombinantinio peptido (Angiotenzinas I) bendras valymo būdas.

REFERATAS:

Panaudojus iš žmogaus išskirto E.coli st I geno pre ir pro rajoną, sukurtas naujas rekombinantinis vektorius, galintis tinkamai subrandinti ir sekretuoti bet kokią peptidą. Tai pasiekama, suliejus koduojančią seką su pro rajono galu. Šioje paraiškoje aprašytas bendras tokio rekombinantinio peptido išvalymo būdas.

Pateikiamas išradimas apibendrintas sekančiuose punktuose:

1. E.coli st pre-pro sekos, koduojančios (vienos raidės kodas) **M K K S I L F I F L S V L S F S P F A Q D A K P V E S S K E K I T K K E S K K C N I A K K S N K S G P E S M**, panaudojimas vektoriaus heterologinių baltymų sekrecijos sukūrimui.
2. Vektorius pARC 0101, depozit. nr. NCIB 40115.
3. E. coli- šeimininkas, turintis vektorių pARC 0101 pagal 2 punktą.
4. pARC 0101 pagal 2 punktą panaudojimas heterologinių baltymų ekspresijos vektoriaus sukūrimui.
5. Vektorius, turintis E. coli st pre- pro seką, kaip aprašyta 1 punkte.
6. Vektorius pagal 5 punktą, turintis E. coli st pre-pro sekos, apibrėžtos 1 punkte, Bam HI-Hind III seką.
7. E. coli kaip šeimininkas, turintis vektorių, apibrėžtą bet kuriame iš 5 ir 6 punktų.
8. Heterologinių baltymų gamybos E. coli būdas, auginant įprastais būdais E. coli kaip šeimininką, apibrėžtą 7 punkte, ir išskiriant įprastais būdais norimą baltyminį produktą.
9. Būdas pagal 8 punktą, kuomet baltyminis produktas išskiriamas į ląstelės išorę.
10. pARC 0726 darinys, turintis E. coli st pre-pro seką, sulietą su Angiotenziną I koduojančia seka rėmelyje.
11. pARC 0726 darinio pagal 10 punktą panaudojimas Angiotenzino I ekspresijai.
12. E. coli kaip šeimininkas, turintis pARC 0726 darinį pagal 10 punktą.
13. Angiotenzino I gamybos būdas, auginant E. coli kaip šeimininką pagal 12 punktą ir išskiriant norimą baltyminį produktą.
14. Būdas pagal 13 punktą, kuomet baltyminis produktas išskiriamas į ląstelės išorę.

15. pARC 0801 darinys, turintis vidinį Eco RI saitą, kuris buvo sukurtas, panaudojus subrendusio ST peptido Ser 55 kodoną.
16. Pirmojo pARC 0801 darinio pagal 15 punktą panaudojimas kaip pradinės medžiagos, kuriant antrąjį darinį, gaunamą, suliejant heterologinio ar homologinio seką su pARC 0801 dariniu ties jo Eco RI saitu.
17. Vektorius, galintis palengvinti heterologinio baltymo, ekspresuojamo šeimininko ląstelėje, sekreciją, pastarasis vektorius turi DNR koduojančią E. coli st pre-pro seką MKKSILMIFLSVLSFSPFAQDAKPVESSKEKEKITKESKKNIAKKSNGSGPESM.
18. Darinys, turintis vektorių pagal 5, 6 ar 17 punktus, įlietą į skaitymo rėmelį prie DNR, koduojančios norimą baltymą.
19. Darinys pagal 18 punktą, kuriame yra DNR, koduojanti Angiotenziną I.
20. Darinys pagal 18 punktą, kuriame yra DNR, koduoja insulino A grandinę.
21. Darinys pagal 18 punktą, kuriame yra DNR, koduoja insulino B grandinę.
22. pARC 0726 darinys, turintis E. coli st pre-pro seką, sulietą su insulino A grandinę koduojančia seka rėmelyje.
23. pARC 0726 darinys, turintis E. coli st pre-pro seką, sulietą su insulino B grandinę koduojančia seka rėmelyje.
24. E. coli kaip šeimininkas, turintis vektorių ar darinį pagal prieš tai išvardintus punktus.
25. Baltymo, heterologiško E. coli, gamybos būdas, auginant E. coli kaip šeimininką, kaip apibrėžta 24 punkte, ir išskiriant ekspresuotą baltymą.
26. Būdas pagal 25 punktą, kuomet baltymas išskiriamas į ląstelės išorę.
27. Būdas pagal 25 ir 26 punktus, kuomet išskiriamas Angiotenzinas I.
28. Būdas pagal 25 ir 26 punktus, kuomet išskiriama insulino A grandinė.
29. Būdas pagal 25 ir 26 punktus, kuomet išskiriama insulino B grandinė.
30. Būdas, palengvinantis ekspresuojamo šeimininko ląstelėje baltymo sekreciją iš šeimininko ląstelės, apimantis norimo ekspresuoti baltymą koduojančios DNR

89

suliejimą rėmelyje su *E. coli* st pre-pro seka, kaip tai nurodyta bet kuriame iš 1-11 punktų.

31. Darinio, sukonstruoto įliejus norimą seką pARC 0801 darinio Eco RI saite, gavybos būdas.

Detalus išradimo aprašymas

Iš žmogaus išskirtos *E. coli* stI geno apibūdinimas ir klonavimas aprašyti detalai P. Dwarakanath ir kt. darbe (1989, Gene, 81, 219-226). Trumpai, 100 MDa plazmidė identifikuota *E. coli* kamiene 86 cal kuris turėjo st geną. 100 MDa plazmidės iš *E. coli* 86 cal BamHI biblioteka sukonstruota panaudojus pBR ir st geną turintis klonas identifikuotas hibridizuojant su DNR probe. Šis st genas buvo subklonuotas M13mp19 kaip BamHI - Hind III fragmentas ir pilnas fragmentas sekvenuotas Sanger's metodu.

1 pav. parodyta dalis st geno sekos, turinčios atvirą skaitymo rėmelį (ASR). ASR koduojamo peptido karboksi- galo 19 amino rūgščių atitinka St_n peptido sekai (Aimoto ir kt. 1982 Eur. J. Biochem. 129, 257-263). Manoma, kad 4 nukleotidai, einantys prieš startinį kodoną, gali būti spėjamo ribosomą jungiančio saito vieta. Už koduojančios sekos seka pora stop kodonų (TTA) ir dvigubos simetrijos 15 nukleotidų pailginimas, spėjamas, galintis rodyti transkripcijos terminacijos signalą. ASR koduoja 72 aminorūgščių peptidą, kuriame karboksi -gale išsidėsčiusios 19 aminorūgščių sudaro biologiškai aktyvų peptidą. N- galo 19 ar 20 aminorūgščių pailginimas sudaro signalinį peptidą, turintį 2 bazines liekanas (Lys2, Lys3), sekančias iniciatorinį metioniną, hidrofobinį aminorūgščių pailginimą ir atitinkamą seką skaldymo signalui prisijungti. Tikslī vieta, kur prisijungia signalinis peptidas iš pro- ST rajono nėra žinoma. pro ST rajonas driekiasi imtinai iki Met 53, kur vėliau jis suskyla į biologiškai aktyvų peptidą, sekretuojamą į ląstelės išorę, ir Asn54, kaip subrendusio peptido, N-galinę dalį.

Panaudojus konkurencinį ELISA metodą, išmatuota St_h koncentracija kultūros supernatante. Viso tyrimo metu naudotas šis ELISA metodas, nustatant St_h koncentraciją kultūros supernatante. Subklonavus geno fragmentą T7 promotorių turinčiame vektoriuje, pasiekta st geno hiperekspresija. Tokioje hiperekspresinėje sistemoje hiperekspresija indukuojama pridėjus induktoriaus (izopropiltiogalaktozido) IPTG. ST peptido (laukinis tipas/ mutantas) valymo schema panaudota pagal P. Dwarakananth ir kt. aprašytą būdą (1989, Gene 81 219-226). Peptido aminorūgščių sekų analizė atlikta panaudojus Applied Biosystem Aminorūgščių sekų analizatorių (477 A modelis). Tam, kad būtų gautos mutacijos tiek pro rajone, tiek ir toksino peptido subrendusią dalį koduojančios sekos dalyje, panaudotas saito-specifinės mutagenizės in vitro metodas (Das ir kt., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 496-499). Panašiai panaudojus in vitro saito-specifinę mutagenizę, pilną subrendusį ST peptidą koduojantis rajonas buvo pakeistas Angiotenziną I (Ang I) koduojančia seka, ir Ang I sekrecija buvo vertinama radioimuniniu metodu (RIA). Gauti rezultatai aprašyti Eksperimentinių duomenų skyriuje.

Eksperimentiniai duomenys

I. Sekrecijos vektorių sukūrimas:

St_h nustatytas ETEC E. coli 86 cal, turinčios 100 MDa plazmidę, kultūros supernatante. E. coli 86 cal 100 MDa plazmidės BamHI biblioteka sukonstruota panaudojus pBR 322 ir rekombinantiniuose klonuose paieškota st geno. Aptiktas vienas rekombinantinis klonas, nešantis st geną 1.9 Kb BamHI fragmente (pARC 074). 1.1 Kb BamHI - HindIII fragmentas, gautas iš pARC 0.74, klonuotas pBR 322 ir to pasėkoje gauta plazmidė pARC 0101. Visuose tolimesniuose bandymuose ši plazmidė pARC 0101 naudota kaip pradinė medžiaga. Ši plazmidė deponuota Pramoninių bakterijų nacionalinėje kolekcijoje, Aberdeen, Scotland (NCIB 40115 kamienas), pagal Budapešto sutartį deponavimo data 1989 m. vasario 15 d. pARC

0101 turinčios *E. coli* HB 101 kultūros supernatantai žindomose pelėse sukelia . teigiamą ST biologinį atsaką.

II. M13mp19ss DNR fago, turinčio st intarpą, sukūrimas

1.1 Kb BamHI-HindIII fragmentas, turintis st geną, išskirtas iš pARC 0101. Jis subklonuotas M13mp19RF paveikus BamHI ir HindIII. Rekombinantinė replikacinė forma (RF) transformuota JM101 ir pasėta terpėje su X-gal ir IPTG. Atliktas st geno skринingas transformantų baltuose plotuose ir vienas toks fago klonas identifikuotas kaip 0192 (2 pav.). Pastarasis, besidaugindamas JM101, išskiria į kultūros supernatantą stabilų toksiną. 0192 yra pradinė medžiaga visiems aprašytiems in vitro mutagenizės eksperimentams.

III. Hiperekspresijos vektoriaus laukinio tipo ar mutantinio ST_n hiperekspresijai sukūrimas

0192 ar jo mutantai auginti JM101 ir po bakterijų augimo per naktį, išvalius įprastu būdu plazmidę, išskirtas RF (T. Maniatis ir kt. 1982. Molekulinis klonavimas. Laboratorinis vadovas. Cold Spring Harbour Laboratory, Code Spring Harbour, NY). Išskirtas 1.1 Kb dydžio BamHI-HindIII fragmentas ir subklonuotas T7 promotorių turinčiame vektoriuje kaip BamHI-HindIII fragmentas, kurio promotorius orientuotas ta pačia kryptimi kaip ir st geno transkripcijos promotoriaus. Hiperekspresijos plazmidė, turinti laukinio tipo st geną, pavaizduota kaip pARC 0601 (3 pav).

IV. Pavyzdžiai, rodantys pro rajono svarbą ekstraląstelinei sekrecijai.

Tam, kad būtų parodyta pro rajono svarba stabilaus toksino ekstraląstelinei sekrecijai, buvo sukurti st geno 2 mutantai, kuriuose mutacija buvo lokalizuota pro rajone. Pirmame pavyzdyje mutacija sukelta procesingo saite, kuriame Met53 pakeistas Ile 53, panaudojant 0192, augintą CJ236 kamiene kaip matricą (dut ung).

Mutageninis pradmuo, panaudotas, kuriant šį pakeitimą, turėjo šią seką: 5 C C T G A A A G C A T T A A T A G T A G C 3' (ATG → ATT). Šis pradmuo (GD21) prikabinamas prie matricos ir pridedama Sekvenazė ir 4 dNTP. Nusidriekusi grandinė liguojama, panaudojant T4 DNR ligazę, ir ši in vitro susintetinta dviguba dvisiūlė DNR panaudota transformuojant JM101. Transformantų plotai patikrinti, sekvestruojant DNR, ir identifikuoti mutantų klonai. Vienas tokių mutantinių klonų (0GD21) išvalytas ir subklonuotas į hiperekspresijos vektorių, panaudojus metodą, nurodytą Eksperimentinių duomenų III skyriuje. Gauta plazmidė pARC 0701 panaudota E. coli HB 101 transformacijai. Ekstraląstelinio ST produkcija naktinėje kultūroje palyginta (M53-153) su produkcija pARC 0601, augintoje E. coli HB 101. Rezultatai parodyti žemiau.

plazmidė, esanti HB101	ST produkcija ug/ml
pARC0601	7
pARC0701	1

Šis bandymas parodė, kad konservatyvus pakeitimas (Met53-Ile53) pro rajone sumažino stabilaus toksino sekrecijos lygį daugiau kaip 85%.

St_h sekrecijos sumažėjimas buvo dar didesnis, kuomet st delecinis mutantas buvo sukonstruotas, kuriame delecija pro rajone driekėsi nuo Ser 48 iki Ser52.

Eksperimento schema buvo ta pati, kokia aprašyta ankstesniame skyriuje, išskyrus tai, kad naudotas mutageninis pradmuo šios sekos 5' G C A A A A A A A G T A A T A A A A T G A A T A G T A G C A A T T A C 3' (GD-11). Turinti šį mutantą st (Del. Ser48-Ser52) hiperekspresijos plazmidė pažymėta kaip pARC 0702.

Padauginus šią plazmidę HB101, gautas klonas neprodukuojantis žymesnio kiekio ekstraląstelinio St_h. Šie pavyzdžiai (Met53-Ile53 ir Del. Ser48-Ser52) akivaizdžiai

parodė, kad intaktnio pro rajono buvimas yra būtinas ekstralastelinei St_h ekspresijai.

V. Pavyzdžiai, rodantys subrendusio peptido N-galo liekanų ne-specifiškumą teisingo procesingo ir St_h peptido ekstralastelinės sekrecijos atžvilgiu.

Tam, kad būtų išaiškinta ST peptido N-galo liekanos reikšmė procesingui ir peptido ekstralasteliniam išskyrimui, buvo sukurti st du mutantai. Pirmame pavyzdyje St_h Asn54 pakeistas į Gln54 tokiu pačiu būdu, kuris aprašytas Eksperimentinių duomenų III skyriuje. Mutageninis pradmuo turėjo šią seką 5' G A A A G C A T G C A G A G T A G C A A T 3' (ATT - - CAG). Turinti mutantą st Asn54 - - Gln54 hiperekspresijos plazmidė pažymėta kaip pARC 0732. Kuomet plazmidė buvo padauginta E. coli HB101 arba hiperekspresiniame kamiene BL21-DE3, ji produkavo ekstralastelinį toksiną ekvivalentiniu kiekiu tam kiekiui, kuris buvo stebimas turinčiuose pARC 0601 kamienuose HB101 arba BL21-DE3. Tam, kad būtų nustatytas ekstralasteliniai išskiriamo mutanto ST procesingo saitas (Asn54--Gln54), mutantinis genas buvo superekspresuotas ir peptidas išvalytas pagal metodą, aprašytą P. Dwarakanath ir kt. (1989, Gene 81, 219-226). Valymo aukšto slėgio skystine chromatografija profilis parodytas 4 pav. Šio peptido N-galo terminalinė seka yra Gln - Ser - Ser - Asn - Tyr.

Atliktas kitas panašus bandymas, kurio metu St_h Asn54 pakeista į His54. Gauta plazmidė, turinti st mutantą, pažymėta pARC 0716. Po st Asn54--Ile54 superekspresijos ir peptido išvalymo, nustatyta peptido N-galo terminalinė seka. Gauti duomenys parodė, kad yra du peptidai su N-galo terminalinėmis sekomis 1) His-Ser-Ser-Asn-Tyr... ir 2) Ser-Ser-Asn-Tyr... Šio peptido valymo aukšto slėgio skystine chromatografija profilis parodytas 5 pav.

Šie pavyzdžiai akivaizdžiai rodo, kad St_h peptido (Asn54) N-galas nėra lemiamas peptido posttransliaciniam brendimui ir sekrecijai.

VL. Pavyzdys, rodantis stabilaus toksino pagrindu sukurto sekrecijos vektoriaus universalumą

Tam, kad būtų išbandytas st pagrindu sukurto sekrecijos vektoriaus universalumas, koduojantis rajonas, atitinkantis subrendusį ST peptidą (t.y. Asn54 iki Tyr72), st genė pakeistas į Angiotenziną I koduojančią seką. Angiotenzinas I yra dekamerinis peptidas, gaunamas Reninproteazės pagalba iš didelio Angiotenzinogeno pirmtako. Angiotenziną konvertuojantis fermentas modifikuoja Angiotenziną I į Angiotenziną II, panaikindamas Angiotenzino I paskutines dvi karboksilines terminalines liekanas (His-Leu). Angiotenzinas II žinomas kaip stiprus kraujagyslių konstriktorius. St koduojančios sekos pakeitimas st gene į Ang I koduojančią seką atliktas pagal Kunkelio metodą (T. A. Kunkel, 1985 Proc. Natl. acad. Sci. USA 82, 488-492) su tam tikromis modifikacijomis. Susintetintas mutageninis pradmuo (GD9), turintis šią seką 5' GTGGTCCTGAAAGCATGGACCGGGTGTACATACACCCCTTCCACCTCTTAATAATATAAAGGG 3'. Šis 62 mer pradmuo prikabinamas prie ss 0192 DNR matricos, augintos CJ 236. Prikabinant prilydymo reakcijos temperatūra 55° C. Reakcijai naudojama 3 ng matricos ir 10 ng pradmens. Prilydžius reakcija tęsiama 37° C temperatūroje 4 val, pridėjus 8 vienetus Sekvenazės ir 4 dNTP (kiekvieno dNTP galutinė koncentracija 1mM). Pridedama 4 vienetai T4 DNR ligazės tam, kad būtų liguotas pailgintas pradmuo. Šis kompleksas panaudotas E. coli JM101 transformacijai. Įtariamieji klonai identifikuoti DNR sekvenavimu. st susijusi Ang I koduojanti seka subklonuota hiperekspresijos plazmidėje, ir tokia plazmidė pažymėta kaip pARC 0726. Ši plazmidė padauginta HB101 arba hiperekspresiniame kamienne BL21-DE3. Radioimuniniu metodu nustatyta, kad plazmidę turintys kamienai produkavo ekstraląsteliniai Ang I peptidą. Po pARC 0726 hiperekspresijos BL21-DE3) terpėje M9, peptidas išvalytas ir atliktas N-galo sekvenavimas. Išvalymo schema aprašyta žemiau. Manome, kad ši schema gali būti tinkama ir kitų peptidų išvalymui.

95

Turinčios pARC 0726 ląstelės BL21-DE3 augintos terpėje M9 (250 ml x 4). Kultūrai pasiekus tankį A600 nm - 0.86, ląstelės buvo indukuojamos pridodant IPTG (galutinė kon. 0.5 mM). Praėjus 20 val po indukcijos, ląstelės surenkamos ir 470 ml kultūros supernatanto sumaišoma su 30 g Amberlite XAD-4 ir paliekama stovėti kambario temperatūroje per naktį. Kruopščiai atplovus dervą vandeniu, prisirišęs peptidas eliuojamas 99% etanolium (1% acto rūgštimi ir po to 80% etanolium) 1% acto rūgštimi. Eliuatas sukonzentruotas staigiai išgarinant ir po to koncentratas terpiamas į SP Sephadex C-25 kolonėlę (10 ml), prieš tai ekvilibruojant 20 mM fosfatiniu buferiu, pH 6.4. Prieš eliaciją kolonėlė sudrėkinta vandeniu. Eliacijai panaudojamas 50 mM trietilaminas. Acto rūgštimi pasiekiamas eliuato pH iki 6.0. Eliuatas liofilizuojamas ir sausi milteliai ištirpinami 1 ml vandens. Po to atliekama šio preparato aukšto slėgio skystinė chromatografija RP-8 kolonėlėje su acetonitrilo gradientu (Tirpiklis A: 0.1% TFA, tirpiklis B: 0.1% TFA/95% acetonitrilo: lėtas greitis 1 ml/min. Gradientas 10-50% B per 40 min.). Ang I pikas rastas 29% B (6 pav.). Išvalytas peptidas sekvenuotas ir seka palyginta su gamtine seka.

Šis pavyzdys akivaizdžiai rodo, kad visai heterologinį peptidą koduojanti seka gali būti prijungta st pro rajone ir po tokio darinio padauginimo atitinkamame E. coli šeimininke, galima stebėti teisingai subrandinto peptido ekstraląstelinį išskyrimą.

VII. Bendro sekrecijos vektoriaus, turinčio tinkamą klonavimo saitą, sukūrimas.

Į subrendusį peptidą koduojantį rajoną įterpti tinkamą klonavimo saitą galima sekančiu būdu: įterpti restrikcijos saitą į arba labai arti subrendusį peptidą koduojantį rajoną, pasirenkama DNR atkarpa 5' A T G A A T A G T 3', atitinkanti aminorūgščių sekai nuo Met53 iki Ser55. Pakeitus Ser kodono (AGT) nukleotidų seką į alternatyvaus TCT kodono, galima būtų gauti EcoRI saitą nepakeitus aminorūgščių liekanos. Tai parodyta schemoje apačioje:

Met53	Asn54	Ser55
A T G	A A T	A G T
A T G	A A T	T C T
EcoRI saitas		

Vienasiūlė (ss) 0192 DNR matrica mutagenizuojama, panaudojus aukščiau aprašytą metodą. Mutagenезinis pradmuo (GDI3) turėjo šią nukleotidų seką: 5' A G C A T G A A T T C T A G C A A T T A C 3'. Bendra hiperekspresijos vektoriaus sistema gali būti sukurta, panaudojus šį EcoRI saitą kaip tinkamą vietą heterologinį baltymą ir peptidą koduojančios sekos įterpimui. Hiperekspresijos plazmidė pET7 paveikiama fermentais EcoRI ir BamHI ir išskiriamas didysis fragmentas. 0192 (GDI3) RF išskiriama ir paveikiama EcoRI ir BamHI. Paveikus CIP (versio intestinaline fosfataze), gaunamas produktas -620 bp fragmentas, išskiriamas. Šis fragmentas liguojamas su didžiuoju pET7 fragmentu. Gauta rekombinantinė plazmidė pavadinta pARC 0801.

pARC 0801 plazmidė deponuota pagal Budapešto sutartį Pramoninių ir jūros bakterijų Nacionalinėje kolekcijoje, Aberdeen, Škotija, nr. NCIMB 40417. Deponavimo data 1991 m. balandžio 29 d.

(7 pav.) Ši plazmidė gali būti naudojama kaip bendras sekrecijos vektorius. Betkokį heterologinį peptidą ar baltymą koduojanti seka gali būti įterpta EcoRI saite (insercijos saitas), pavyzdžiui tokie peptidai kaip Angiotenzinas I, jaučių fibroblastų augimo faktorius (bFGF), insulinas ir kt.

Šios plazmidės ekspresija *E. coli* kaip šeimininke sąlygoja peptido ar baltymo, kurį galima išvalyti, išskyrimą į terpę. Reikia pastebėti, kad šios rekombinantinės plazmidės produkuojamas peptidas turės vieną papildomą aminorūgščių liekaną, esančią aminoterminalė (Ser).

Angiotenzino I ir ypač, insulino produkcijos galimybė sudaro svarbų šio išradimo aspektą. Išvalyta insulino A grandinė ir insulino B grandinė gali būti panaudotos insulino gamybai.

VIII. Pavyzdžiai, rodantys insulino A ir B grandinių sekreciją iš stabilaus toksino pagrindu sukurto sekrecijos vektoriaus.

Sekantis pavyzdys rodo stabilaus toksino pagrindu sukurto sekrecijos vektoriaus universalumą. Žmogaus insulinas sudarytas iš 2 polipeptidinių grandinių A (21 aminorūgščių liekana) ir B (30 aminorūgščių liekanų), kurios tarpusavyje sujungtos SH ryšiais. Redukuojant *in vitro* šias grandines, galima išskirti ir gauti grynas A ir B grandinių formas. Tam tikromis sąlygomis išvalytos A ir B grandinės gali būti reoksiduotos tam, kad gautųsi imunoreaktyvus ir biologiškai aktyvus žmogaus insulinas. Žmogaus insulino A ir B grandinių geno sekos įlietos atskirai ST pre- ir pro sekos gale. Rekombinantinė plazmidė, esanti aktyviai augančioje *E. coli* kaip šeimininke, sekretavo į kultūros terpę medžiagas, kurios imuniškai reagavo su antikūniais žmogaus insulinui. Antikūnų žmogaus insulinui inkubacija su autentiško insulino A ir B grandinėmis slopino reakciją konkurenciniu būdu tais atvejais, kai buvo tikimasi, kad rekombinantinės A ir B grandinės bus produkuotos.

Rekombinantinės plazmidės sukurtos, panaudojus strategiją, panašią į aprašytą Eksperimentinių duomenų VI skyriuje. M13 mp pagrindu sukurta rekombinantinė fago DNR (0 GD24) panaudota kaip matrica pirmajam mutagenezės etapui. 0 GD 24 turėjo ST geną, įterptą kaip BamHI-HindIII fragmentą M13 mp 19 daugybinio klonavimo saite. Šis savotiškas ST intarpas turėjo beprasnę mutaciją subrendusio

toksino peptido N-galo liekanoje, kur Asn 54 buvo pakeista į Gly 54. Mutageninis pradmuo, panaudotas mutagenezės pirmajame etape, buvo šios nukleotidinės sekos

5' CCTGAAAGCATGGGTATCGTGGAG
CAGTGCTGTACATCTATCTGCTCA
CTGTATTAATAATATAAA3'

Šios mutagenezės pasekoje gautas fagas 0GD26, kuris turėjo DNR seką, atitinkančią insulino A grandinės N-galo 1-14 liekanoms, ir kuri buvo įlieta į rėmelį ST pre-pro rajone. Antrajame mutagenezės etape kaip matrica panaudota GD26 DNR. Mutagenezės pradmuo buvo šios sekos

5' TGCTCACTGTATCAGCTAGAGAAC
TACTGCAACTAATAATATAAA3'

Po mutagenezės GD28 identifikuotas kaip turintis pilną A grandinės geną, įlieta ST pre-pro rajono C terminalinėje dalyje. Visumoje, atlikus 2 mutagenezės etapus, visa insulino A grandinės geno nukleotidinė seka įlieta rėmelyje ST pre-pro sekos 3' gale, pilnai pakeičiant subrendusio toksino geno seką. Tačiau galutiniame darinyje buvo paliktas intaktinis ST geno 3' sekos likutis. Rekombinantinis GD28 fagas augintas JM101 ir išskirtas RF. RF paveiktas BamHI-HindIII ir 1.1 Kb fragmentas klonuotas pET7 kaip BamHI-HindIII fragmente tam, kad būtų gauta pARC 0750. Hiperekspresinis E. coli kamienas BL21-DE3 transformuotas su pARC 0750. Panašiu būdu insulino B grandinė sintezuota ir seka įlieta ST pre-pro rajono 3' gale. Pradinė matrica panaudota GD23, kuri turėjo ST intarpą N54F. Pirmosios mutagenezės pradmens seka buvo

5' GGTCCTGAAAGCATGTTTGTGAAT
CAGCATCTTTGCGGAAGTCATCTG

GTTGAGGCTCTTTATTAATAATAT
AAA3'

Po mutagenezės mutantinis klonas (OGD 32) identifikuotas kaip turintis DNR seką, atitinkančią insulino B grandinės 1-16 liekanoms, ir kuri buvo įlieta rėmelyje su ST pre-pro seka. 0 GD 32 ss DNR panaudota kaip matrica mutagenezės antrajam etapui. Mutageninio pradmens nukleotidų seka buvo:

5' GTTGAGGCTCTTTATCTTGATGT
GGTGAACGTGGTTTCTTCTATACA
CCTAAGACATAATAATATAAAGGG
3'

Po mutagenezės mutantinis fagas 0 GD33 išskirtas. Jis turėjo pilną B grandinės seką, įlietą ST pre-pro sekos 3' gale. Šis įlieto geno intarpas buvo išskirtas iš 0 GD33 kaip BamHI-HindIII fragmentas ir subklonuotas pET7 tam, kad būtų gauta plazmidė pARC 0759. *E. coli* hiperekspresinis kamienas BL21-DE3 transformuotas, panaudojus pARC 0759, ir transformuoti klonai skringuoti plazmidės atžvilgiu. ELISA metodu ištestuoti kultūrų supernatantai tam, kad būtų žinoma, ar klonai pARC0750 ir pARC0759 sekretuoja atitinkamai A ir B grandines. Pagrindiniai ELISA metodo momentai aprašomi žemiau:

Žmogaus insulinas įsigytas iš Novo Industries. Jis buvo labai išvalytas ir tai patvirtino aukšto slėgio skystinės chromatografijos analizės duomenys. Insulinas redukuotas, panaudojus DDT, ir karboksiamidintas, panaudojus jodacetamidą tam, kad būtų gautos patvarios A ir B grandinės. Tiesioginis ir netiesioginis ELISA metodai panaudoti A ir B grandinių detekcijai, panaudojant antikūnus žmogaus insulinui. pARC0750 ir pARC0759 augintos BL21-DE3 kaip šeimininke atskirai terpėje M9 ir indukuotos IPTG kaip aprašyta ankstesniuose pavyzdžiuose. Po indukcijos kultūros

nucentrifuguotos ir patikrinti supernatantai, ar juose yra A ir B grandinių.

Tiesioginiu ELISA metodu išmatuotas A ir B grandinių kiekis buvo 16 ug/ml ir 30 ug/ml atitinkamai. Netiesioginis ELISA metodas patvirtino duomenis apie A ir B grandinių sekrecijos lygį.

Medžiaga, išdėstyta sekančiuose punktuose, turi būti skaitoma kaip šio išradimo bendro aprašymo dalis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Vektorius, galintis palengvinti heterologinio baltymo, ekspresuojamo šeimininko ląstelėje, sekreciją, minėtas vektorius turi DNR, koduojančią E. coli st pre-pro seką MKKS·ILFIFLSVLSFSPFAQDAKPVESSKEKITKKE SKKCNIAKKSNKSGPESM.
2. Vektorius pagal 1 punktą, turintis E. coli st pre-pro sekos BamHI-HindIII segmentą, kaip apibrėžta 1 punkte.
3. Vektorius pARC 0101, deponavimo Nr. NCIB 40115.
4. Darinys, turintis vektorių pagal bet kurį iš aukščiau minėtų punktų, įlietą skaitymo rėmelyje prie DNR, koduojančios norimą baltymą.
5. Darinys pagal 4 punktą, kuriame DNR koduoja Angiotenziną I.
6. Darinys pagal 4 punktą, kuriame DNR koduoja insulino A grandinę.
7. Darinys pagal 4 punktą, kuriame DNR koduoja insulino B grandinę.
8. Darinys pARC 0726, turintis E. coli st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie sekos, koduojančios Angiotenziną I.
9. Darinys pARC 0726, turintis E. coli st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie sekos, koduojančios insulino A grandinę.

10. Darinys pARC 0726, turintis E. coli st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie sekos, koduojančios insulino B grandinę.
11. Vektorius arba darinys pagal bet kurį iš aukščiau minėtų punktų, esminiai, kaip čia, aprašytas, nurodant lydinčius bandymų duomenis ir schemas.
12. E. coli kaip šeimininkas, turintis vektorių ar darinį pagal bet kurį iš aukščiau paminėtų punktų.
13. Heterologinio E. coli baltymo gamybos būdas, auginant E. coli kaip šeimininką, kaip tai nurodyta 12 punkte, ir išskiriant ekspresuotą baltymą.
14. Būdas pagal 13 punktą, kuomet baltymas išskiriamas ekstraląsteliniai.
15. Būdas pagal 13 ar 14 punktą, kuomet išskiriamas Angiotenzinas I.
16. Būdas pagal 13 ar 14 punktą, kuomet išskiriama insulino A grandinė.
17. Būdas pagal 13 ar 14 punktą, kuomet išskiriama insulino B grandinė.
18. Būdas pagal bet kurį iš 13 - 17 punktų, esminiai kaip čia aprašytas, nurodant lydinčius bandymų duomenis ir schemas.
19. Būdas, palengvinantis baltymo, ekspresuoto šeimininko ląstelėje, turinčio sulietą skaitymo rėmelyje DNR, koduojančią norimą ekspresuoti baltymą, su E. coli st pre-pro seką, kaip tai apibrėžta bet kuriame iš 1-11 punktų, sekreciją iš šeimininko ląstelės.

20. Būdas pagal 19 punktą, esminiai kaip čia aprašytas, nurodant lydinčius bandymų duomenis ir schemas.
21. Darinys pARC 0801, turintis pilną *E. coli* st geno seką ir turintis vidinį Eco RI saitą, kuris buvo sukurtas panaudojant subrendusio ST peptido Ser 55 alternatyvų kodoną.
22. Būdas, pagal kurį sukurtas darinys, turintis įlietą norimą prie pARC 0801 darinio Eco RI saito.
23. Būdas pagal 22 punktą, esminiai kaip čia aprašytas, nurodant lydinčių bandymų duomenis ir schemas.
24. *E. coli* st pre-pro sekos, koduojančios MKKSILFIFLSVLSFSPFAQ DAKPVESSEKEITKKESKKCNIAKKSNKSGPESM, panaudojimas heterologinių baltymų sekrecijos vektoriaus sukūrimui.
25. Vektoriaus pARC 0101, deponavimo Nr. NCIB 40115, panaudojimas heterologinių baltymų ekspresijos vektoriaus sukūrimui.
26. Darinio pARC 0726, turinčio *E. coli* st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie Angiotenziną I koduojančios sekos, panaudojimas Angiotenzino I ekspresijai.
27. Pirmojo darinio pARC 0801, turinčio pilną *E. coli* st geno seką ir turinčio vidinį Eco RI saitą, kuris buvo sukurtas panaudojant subrendusio ST peptido Ser 55 alternatyvų kodoną, panaudojimas kaip pradinės medžiagos ruošiant antrąjį darinį, gautą įliejant heterologinio ar homologinio geno seką prie pARC 0801 darinio Eco RI saito.

28. Darinio pARC 0726, turinčio E. coli st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie insulino A grandinę koduojančios sekos, panaudojimas insulino A grandinės ekspresijai.
29. Darinio pARC 0726, turinčio E. coli st pre-pro seką, įlietą rėmelyje prie insulino B grandinę koduojančios sekos, panaudojimas insulino B grandinės ekspresijai.
30. Darinys pARC 0801, deponavimo Nr. NCIMB 40417.

t a a t a t t a c c t a t g t c t t c g t a c g g a g a g t a t a g t a t g a
 t g t t c a c c a a a a t a a a g t t c c g c c a a t t g t t c t g g
 t t t g a t t c a a a t g t t c g t g g a t g c c a t g t t c c g g a g g t
 a a t ATG AAG AAA TCA ATA TTA TTT ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT TTT TCA CCT TTC
 Met Lys Lys Ser Ile Leu Phe Ile Phe Leu Ser Val Leu Ser Phe Ser Pro Phe
 GCT CAG GAT GCT AAA CCA GTA GAG TCT TCA AAA GAA AAA ATC ACA CTA GAA TCA AAA AAA
 Ala Gln Asp Ala Lys Pro Val Glu Ser Ser Lys Glu Lys Ile Thr Lys Glu Ser Lys Lys
 TGT AAC ATT GCA AAA AAT AGT AAT AAA AGT GGT CCT GAA AGC ATG AAT AGT AGC AAT TAC
 Cys Asn Ile Ala Lys Lys Ser Asn Lys Ser Gly Ser Glu Ser Met Asn Ser Ser Asn Tyr
 TGC TGT GAA TIG TGT TGT AAT CCT CCT GCT TGT ACC GGG TGC TAT TAA t a a t a a a
 Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr ...
 g g g a a c t a a c a g t t c c c c t t a t a t t g t t c t g a t t c t g
 a t g a t g t c t g t a a c g t a t g t a c c t g t t g c t t t g t t g a a t
 a a a t c g a

Fig. 1.

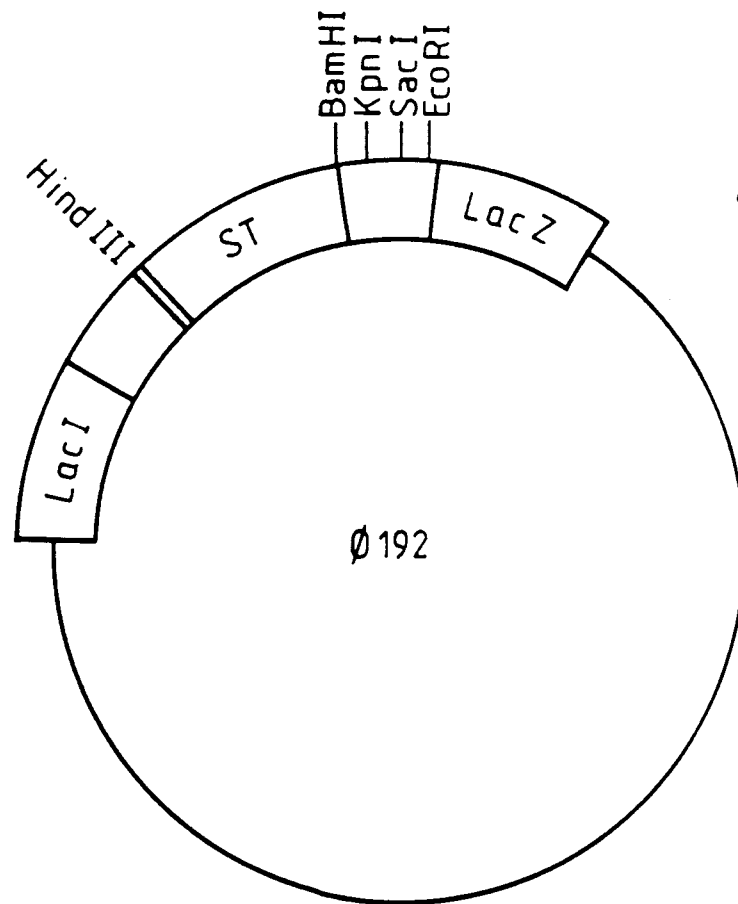


Fig. 2.

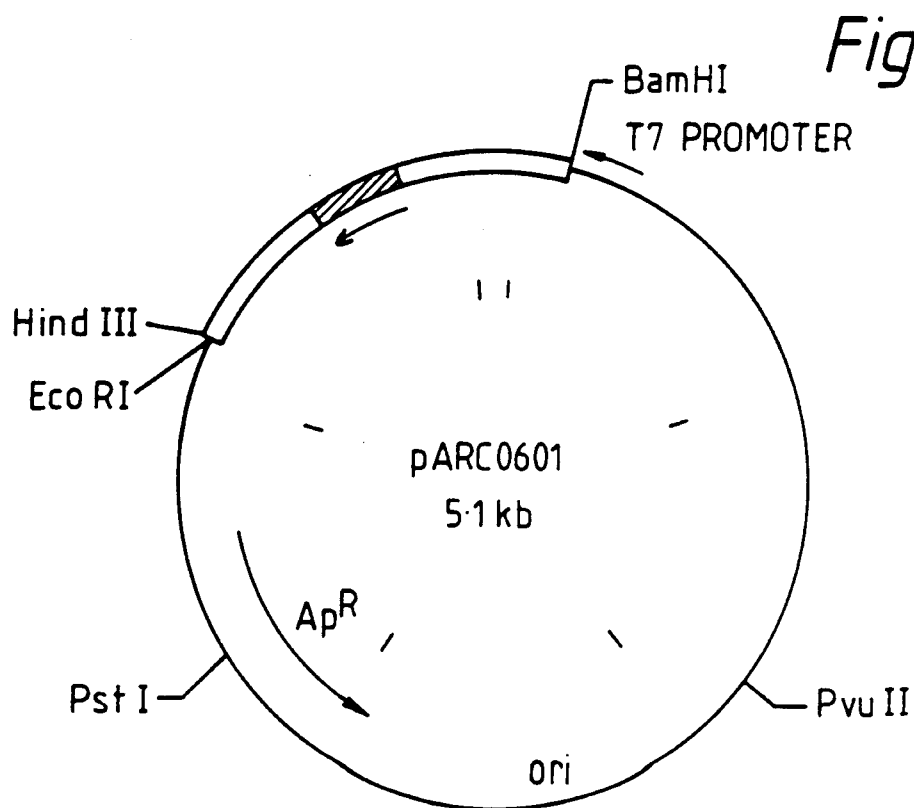


Fig. 3.

Fig. 4.

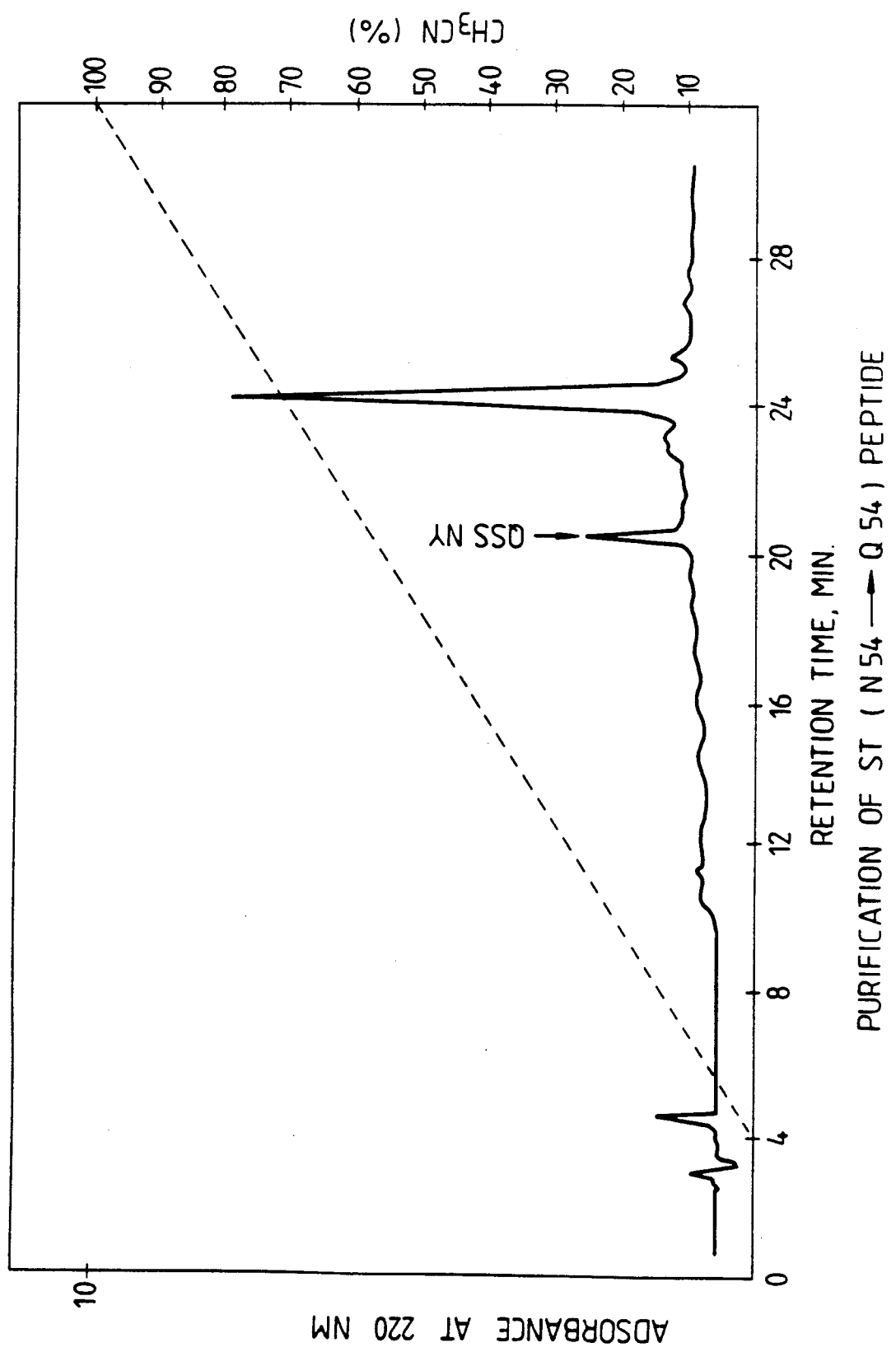
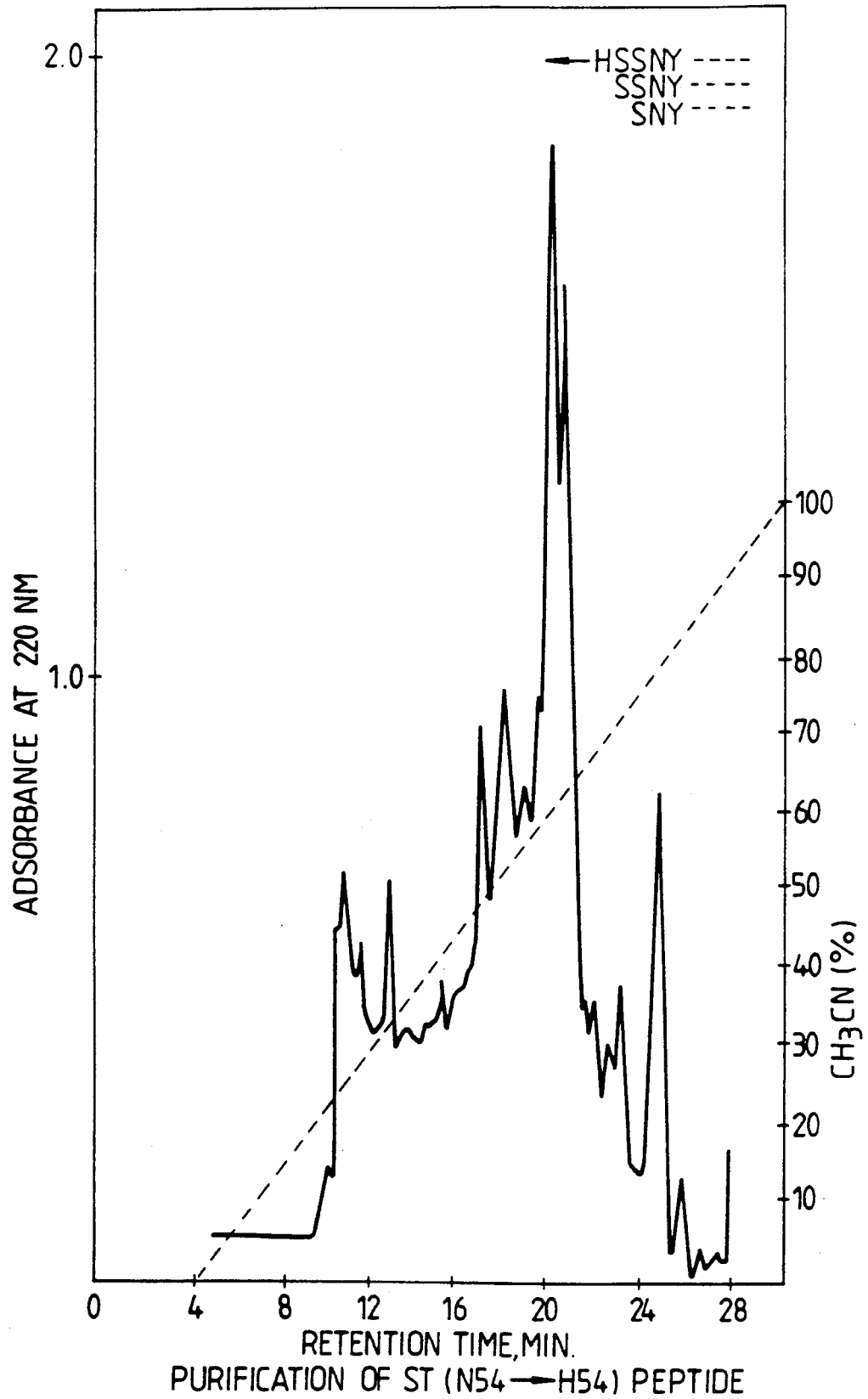


Fig. 5.



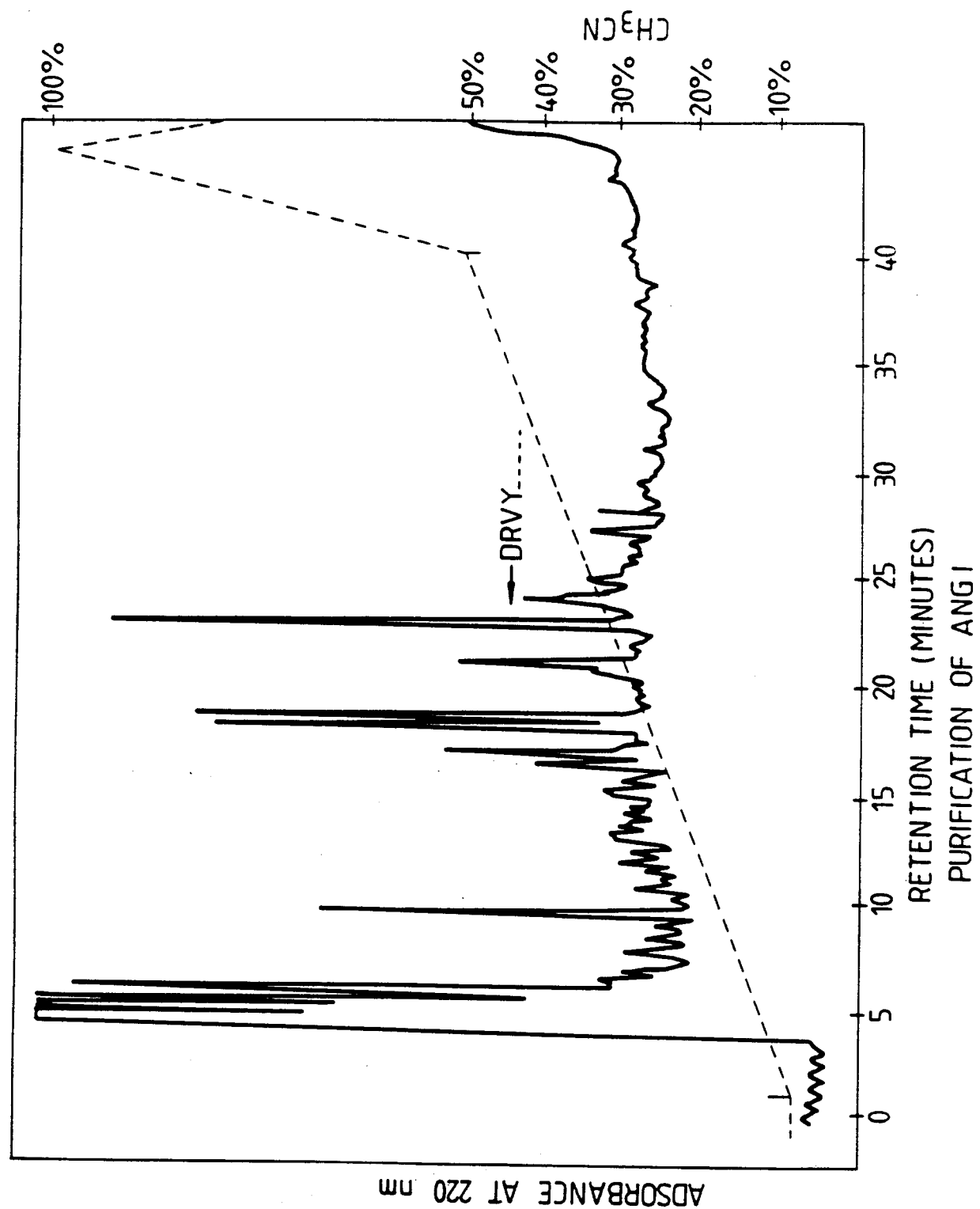


Fig. 6.

Fig. 7.

