

(19)



(10) **LT 3367 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3367**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 39/29,
C12N 15/51**

(21) Paraiškos numeris: **IP462**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 03 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 08 25**

(72) Išradėjas:
**Peter J. Kniskern, US
Arpi Hagopian, US**

(73) Patento savininkas:
MERCK & CO., INC., 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Ljudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Hepatitis B viruso paviršiaus baltymai, pasižymintieji mažesniu šeiminingo organizmo karbohidratų kiekiu

(57) Referatas:

Siekiant pagaminti hepatitis B viruso (HBV) paviršiaus baltymus kaip daleles, kuriose yra žymiai mažesnis įterptų angliavandenių kiekis, rekombinantiniame mielininiame šeimininke, negalinčiame glikozilinti baltymų, buvo ekspresuojama HBV paviršiaus baltymų DNR. Šie paviršiaus baltymai turi antigeninius saitus, kuriuos genetiškai koduoja HBV viriono apvalkalo atviro skaitymo rėmelio S domenas, ir pasižymi sumažintu įterptų angliavandenių kiekiu, lyginant su HBsAg dalelėmis, pagamintomis "laukinio" tipo mielių ląstelėse. Šios dalelės yra naudingos kaip vakcina tiek aktyviam, tiek pasyviam gydymui arba profilaktikai ligos ir/arba infekcijos, kurią sukelia HBV arba kiti agentai, serologiniu atžvilgiu giminingi HBV.

Hepatito B virusas (HBV) yra užkrečiamas agentas, sukeliantis kelias žmogaus kepenų ligas. Po ūmios ligos fazės daugelis individų, užkrėstų HBV, pasveiksta. Deja, dalis užkrėstų individų neišveikia infekcijos ir tampa lėtiniais infekcijos nešiotojais. Daugelyje pasaulio šalių HBV infekcija yra endeminė, yra daug perinatalinės infekcijos atvejų, kai motinos su lėtine infekcija perduoda ligą savo naujagimiams, kurie dažnai ir lieka su lėtine infekcija. Manoma, kad pasaulyje yra daugiau kaip trys šimtai milijonų infekuotų asmenų. Šioje nešiotojų grupėje šimtai tūkstančių kiekvienais metais miršta nuo ilgalaikių lėtinio hepatito B pasekmių (cirozė ir/arba hepatoceliuliarinė karcinoma).

Hepatito B delta virusas yra toks virusas, kuris, užkrėsdamas kartu su HBV, sukelia ūmų, greitaeigių susirgimą, paprastai pasibaigiantį paciento mirtimi. Delta virusas nekoduoja (iš savo genetinės medžiagos) baltymų, iš kurių sudarytas viriono apvalkalas, o pasidengia apvalkalo baltymais, kuriuos koduoja užkrėtime kartu dalyvaujantis HBV, taigi atsiranda artimas struktūrinis ir imunologinis ryšys su žemiau aprašytais HBV baltymais. Šiuo metu nežinoma, ar koks nors kitas užkrečiamas agentas turi analogiškų ryšių su HBV. Akivaizdu, kad baltymai, pasižymintys plačiu serologiniu reakingumu arba padidinta imunogenine potencija, būtų naudingi sistemoms, skirtoms susirgimų diagnozei arba profilaktikai (arba gydymui), panašiai kaip grupė agentų, turinčių mažą ar dalinį krosreaktingumą HBV atžvilgiu.

HB virionas yra sudarytas iš dviejų grupių struktūrinių baltymų ir paviršiaus baltymų. Apvalkalo baltymai yra ne tik pagrindiniai viriono paviršiaus baltymai, t.y. Dane dalelė, bet ir pagrindiniai Australijos antigeno, arba 22 nm dalelių komponentai. Šie apvalkalo baltymai yra didelio virusinio atviro skaitymo rėmelio (ASR),

koduojančio mažiausiai 389 amino rūgštis, transliacijos produktai. Šiame ASR galima išskirti tris domenų, kiekvienas iš jų prasideda ATG kodonu, kuris funkcionuoja kaip transliacijos inicijavimo saitas in vivo. Šie domenai žymimi preS1 (108 ar), preS2 (55 ar) ir S (226 ar) pagal juos atitinkančią 5'-3' kryptį gene. Taigi šie domenai apibrėžia tris polipeptidus, kurie žymimi S arba HBsAg (226 ar), preS2+S (281 ar) ir preS1+preS2+S (389 ar), arba atitinkamai p24/gp27, p30/gp33/gp36 ir p39/gp42 (jie dar vadinami pagrindinis, vidutinis ir didysis baltymas).

HBV apvalkalo baltymai yra glikoproteinai, kurių šoninės angliavandenių grandinės (glikanai) per N-glikozidines jungtis prijungtos prie tam tikrų peptido atpažinimo saitų. [Heermann et al., J. Virol. 52, 396 (1984) and Stibbe et al., J. Virol. 46, 626 (1983)]. Taigi HBV polipeptidai, susintetinti natūralios infekcijos metu, apima baltymus p24/gp27 (S polipeptidą ir jo glikozilintą darinį), gp33/gp36 (preS2+S polipeptidą, kuriame glikozilintas tik preS2 domenas, ir tas pats polipeptidas, kuriame glikozilintas ir S, ir preS2 domenas) ir p39/gp42 (preS1+preS2+S peptidas ir jo darinys, kuriame glikozilintas preS1 domenas). Dabar prieinamos iš plazmos pagamintos vakcinos, kurių sudėtyje iš esmės yra tik S domeno baltymai (p24 monomeras ir jo glikozilintas darinys gp27), šiuo metu sėkmingai kuriamos vakcinos, sintetinės mielėse ir sudarytos tik iš S polipeptido (į jo sudėtį įeina tik neglikozilinti p24 baltymai) apvalkalo baltymų.

HBsAg 22nm dalelės buvo išskirtos iš chroniškų nešiotųjų plazmos. Kadangi šių individų plazma teigiama dalelių atžvilgiu, šie chroniški nešiotojai apibūdinami HBs⁺. Jei užkrėsti individai pademonstruoja pakankamą imuninį atsaką, jie gali iverkti infekciją ir tapti

HBs⁻. Apibūdinant juos pagal besiformuojančius anti-kūnus prieš HBs, šie individai žymimi anti-HBs⁺. Todėl anti-HBs⁺ reikšmė siejama su pagijimu nuo šios ligos, su imunitetu pakartotinam užkrėtimui šia liga ir su
5 imunitetu pakartotinam užkrėtimui HBV. Taigi tikimasi, kad skatinant anti-HBs susidarymą arba juos sudarant HB vakcinų pagalba, galima apsisaugoti nuo HBV infekcijos.

Ši hipotezė buvo patikrinta eksperimentiškai. Greta
10 žmonių, šimpanzės yra viena iš nedaugelio rūšių, kurios visiškai jautrios užkrėtimui HBV; tai galima parodyti kiekybiniais markeriais, pavyzdžiui, HBs⁺, ir padidėjusių kepenų fermento kiekiu serume. Šimpanzės buvo
15 vakcinuojamos trimis dozėmis valytų HBsAg dalelių ir pakartotinai užkrėstos intraveniniu būdu infekciniu HBV. Visiems kontrolinės grupės gyvūnams pasireiškė ūmios HBV infekcijos požymiai, o gyvūnai, vakcinuoti HBsAg, pasirodė visiškai apsaugoti nuo infekcijos. Taigi šioje eksperimentinėje sistemoje HBsAg dalelės,
20 sudarytos iš p24 (arba p24 ir p27), sukėlė pakankamą imunitetą. Šių stebėjimų paskatinti kai kurie gamintojai pradėjo gaminti HB vakcinas, kurios sudarytos iš HBsAg dalelių.

25 Siekdami padaryti HB vakcinas prieinamomis, gamintojai panaudojo DNR technologijas viruso apvalkalo baltymų ekspresijai. Iš mikrobinių sistemų rekombinantinių baltymų ekspresijai dažniausiai buvo naudojamos Escherichia coli ir S. cerevisiae. Daugkartiniai
30 bandymai ekspresuoti imunologiškai aktyvias HBsAg daleles E. coli buvo nesėkmingi. Tačiau S. cerevisiae sistema gana universali, ekspresuojanti imunologiškai aktyvias HBsAg daleles. Pasirodė, kad vakcina, paruošta iš šių dalelių (sudarytų vien tik iš p24), visiškai
35 apsaugo šimpanzes nuo užkrėtimo gyvu įvairių serotipų HBV. Be to, ir mielėse susintetintos S dalelės yra imunologiškai aktyvios; kaip parodė klinikiniai

bandymai su žmonėmis, jos taip pat efektyviai apsaugo nuo susirgimo arba infekcijos, kaip ir iš plazmos pagamintas HBsAg [Stevens et al., JAMA, 257:2612-2616 (1987)]. Taigi buvo nustatyta, kad S. cerevisiae sistema yra tinkamas šeimininkas rekombinantinio HBsAg sintezei. Be to, kadangi mielėse nėra endotoksinų, jos nepatogeniškos žmogui, fermentacija galima pramoniniu mastu ir nereikalauja daugumos saugumo priemonių, būdingų žinduolių ląstelių kultivavimui (dauguma jų yra transformuojamos virusais, gali sukelti auglius pelėms ir visos turi protoonkogenus), terapinių agentų ir vakcinų, skirtų žmonėms, ekspresija mielėse gali būti labai naudinga produktų kūrimui.

S. cerevisiae (kepimo mielės) yra eukariotas, galintis sintetinti glikoproteinus. Baltymų glikozilinimas mielėse aprašytas daugybėje pastaruoju metu pasirodžiusių apžvalgų [pvz., Kukuruzinska et al., Ann. Rev. Biochem., (1987) 56, 915-44; Tannen et al., BBA, (1987) 906, 81-99]. Toks glikozilinimas arba glikanų prijungimas vyksta prie atitinkamų receptorinių amino rūgščių (ar), esančių polipeptido sudėtyje, jungiamasi prie serino (Ser) arba treonino (Thr) liekanos (O-glikozilinimas), arba prie asparagino (Asn) (N-glikozilinimas) liekanos. O-Glikozilinimo specifiškumas per Ser ar Thr dar nėra išsamiai ištyrinėtas ir kiekvienu atveju nustatomas empiriniu būdu.

N-Glikozilinimo signalinė seka yra patikimai nustatyta: tai gali būti amino rūgščių seka Asn-X-Thr arba Asn-X-Ser (kai X yra bet kokia amino rūgštis). Mielės ne tik sintetina daugybę autologinių, natyvių, glikozilintų baltymų (tarp jų tokie, kurie vadinami manoproteinais arba manopeptidais), bet ir sugeba glikozilinti heterologinius arba svetimus baltymus, kuriuos jos ekspresuoja taikant rekombinantinę technologiją (jei

heterologinis baltymas turi savo sudėtyje atitinkamą glikozilinimo signalinę seką N- arba O-glikozilinimui).

5 Į preS2+S polipeptidų, kurie sintetinami natūralios infekcijos metu, sudėtyje įeina ne daugiau kaip du "šerdis" glikanai [maždaug 3 kilodaltonų (3 kD) dydžio], prijungti per azotą: vienas S regione, o antras prie ketvirto Asn liekanos preS2 domene. Atpažinimo saitas S domene nėra glikozilintas nei 10 Recombivax HB[®], nei rekombinantiniame preS2+S, kuris susintetintas mielėse. Tačiau preS2 domene esantis ketvirtos amino rūgšties saitas mielėse yra atpažįstamas ir glikozilinamas.

15 preS1 Domene yra N-glikozilinimo saitas, esantis prie ketvirtos amino rūgšties liekanos preS1 regione ir, serotipo adw atveju, yra potencialus saitas prie 26 amino rūgšties liekanos. Specialistams suprantama, kad teiginius, išdėstytus kalbant apie preS2 20 glikozilinimą, galima pritaikyti ir įvairioms sekoms, esančioms preS2 regione, o taip pat preS1 ir S domenuose.

Mielės, sintetindamos rekombinantinį preS2+S, prijungia 25 "šerdinį" glikaną, kuris yra panašus į glikaną, prijungiamą prie natyvaus polipeptido virusinio užkrėtimo metu. Tačiau tuo atveju, kai mielių-šeimininkų kamienas yra "laukinio" tipo glikozilinimo atžvilgiu (t.y., turi pilną komplektą fermentų, kurie reikalingi 30 natyviame glikozilinimui - faktiškai tuo pasižymi visi dažniausiai naudojami mielių kamienai), dauguma šių glikanų turi prisijungę didelį kiekį papildomų manozės liekanų - pavyzdžiui, tai vyksta mielėse, kai sintetinami jų struktūriniai manoproteinai. Toks 35 papildomas glikanų prijungimas, kai jis vyksta su svetimo geno produktu, pavyzdžiui, preS2+S polipeptidu, vadinamas hiperglikozilinimu. Specialistams suprantama,

kad teiginius, išdėstytus kalbant apie mieles, galima pateikti aptariant ir kitų šeimininkų ląsteles (pavyzdžiui, vabzdžių, grybų ir pan.), kuriose galimi skirtingi glikozilinimo variantai.

5

Be to, buvo parodyta, kad HBV paviršiaus baltymų 22 nm rekombinantinės formos dalelės, ekspresuotos "laukinio" tipo mielių ląstelėse, turi 22 nm dalelių viduje didelį kiekį įterptų angliavandenių iš mielių ląstelių, kurių dalis kilę iš mielių ląstelės struktūrinių manoproteinų ir manopeptidų. Dėl šių įterptų angliavandenių gali kilti problemų, nes įterpti angliavandeniai gali sukelti antikūnų atsiradimą prieš mielių angliavandenių fragmentus, esančius glikozilinto baltymo sudėtyje, ir vakcininis imunogenas su įterptu mielinium angliavandenių reaguos su antimieliniais antikūnais, kuriuos turi dauguma žinduolių rūšių, ir tokiu būdu potencialiai sumažins jo, kaip imunogeno ir vakcinės, efektyvumą.

20

Galima išvengti hiperglikozilinimo arba ištisu manoproteinų ir manopeptidų įsiterpimo, arba apriboti glikozilinimą HB viruso preS ir S polipeptiduose bei atitinkamose dalelėse, taikant vieną iš žemiau pateiktų metodų.

25

Pirma, N-hiperglikozilinimo galima išvengti arba jį apriboti rekombinantinio šeimininko auginimo metu, pridėjus į auginimo terpę egzogeninį agentą (pavyzdžiui, tunikamiciną). Antra, rekombinantinės ar natūralios kilmės polipeptidai gali būti deglikozilinti arba cheminiu būdu (pavyzdžiui, veikiant bevandene trifluormetansulfonine rūgštimi arba bevandeniu fluoro vandeniliu), arba fermentiniu būdu (pavyzdžiui, veikiant N-glikanaze, endo-F arba Endo-H), arba fizikiniais metodais (pavyzdžiui, veikiant ultragarsu). Trečia, glikozilinimo atpažinimo saitas gali būti

35

pakeistas arba deletuotas mutagenezės būdu DNR lygyje, šitaip išvengiant šerdies glikozilinimo ir taip pat hiperglikozilinimo. Tokie modifikuoti preS+S sekos ASR, kuriuose atpažinimo seka pakeista (valdomi tinkamais 5 promotoriais, kurie yra aktyvūs mielėse) buvo transformuoti į mielių šeimininkų ląsteles. Gauti preS+S polipeptidai yra neglikozilinti. Ketvirta, galima rasti tokias šeimininko ląsteles, kuriuose nėra būtinų glikozilinimui fermentų - tai pademonstruota ir 10 šiame išradime, neapribojant jo apimties. Yra identifikuotas vienas tokio tipo mielių kamienas (mnn9-mutantas) [Ballou, L. et al., (1980) J.Biol.Chem. 255, pp 5986-5991], kuris glikozilinimo schemoje neturi būtino fermento, reikalingo N-prijungtų glikanų prailginimui (hiperglikozilinimui); cheminiai tyrimais 15 parodė, kad šis mutantas gamina monoproteinus be išorinės grandinės manozės liekanų, turinčius tik "šerdinius" angliavandenius [Ballou, C.E. et al., (1986), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 83, pp 3081-3085; 20 Tsai, P. et al., (1984) J.Biol.Chem. 259, pp 3805-3811]. S arba preS+S atviras skaitymo rėmelis (transkripcija valdoma tinkamais promotoriais, kurie aktyvūs mielėse) buvo panaudotas siekiant transformuoti tokias mnn9- mutantines mieles. Gautas preS+S 25 polipeptidas turi tik "šerdinius" angliavandenius ir nėra hiperglikozilintas.

Nors S polipeptidai, ekspresuojami mielėse, nėra nei glikozilinti, nei hiperglikozilinti, iš jų sudarytose 30 dalelėse yra daug įterptų angliavandenių, kilusių iš mielių manopeptidų. Todėl mielių ląstelėse, kurios negali hiperglikozilinti, ekspresuojant S polipeptidus ir preS turinčius polipeptidus, gaunamos 22nm dalelės, turinčios mažesni kiekį angliavandenių.

35

S. cerevisiae sistema pasirodė gana universali ekspresuojant imunologiškai aktyvias 22nm daleles. Šios

dalelės vakcinos pavidalu pasirodė galinčios visiškai apsaugoti šimpanzes nuo užkrėtimo gyvu HBV. Be to, klinikiniai tyrimai žmonėms parodė, kad mielėse sintetintas HBsAg toks pat efektyvus, kaip ir iš plazmos pagamintas HBsAg. Taigi galimybė panaudoti S. cerevisiae sistemą rekombinantiniam HBsAg sintetinti yra įrodyta.

Daugelyje rekombinantinių mikrobinių ekspresijos sistemų daugelio įvairių polipeptidų sintezė pasirodė esanti kenksminga šeimininko ląstelei. Dėl to egzistuoja pastovus selekcinis spaudimas prieš tokių polipeptidų ekspresiją, pasireiškiantis tuo, kad didinant rekombinantines kultūros auginimo mastą terpėje kaupiasi tik tos ląstelės, kurios nustoja gaminti svetimą baltymą arba gamina jo taip mažai, jog kultūros kultivavimas tampa ekonomiškai nenaudingas. Kai kuriais atvejais ląstelės taip stipriai pakenkiamos, kad ekspresuojant su stipriu konstitutyviu promotoriumi, transformuotos ląstelės selekcijos lėkštelėse nesugeba daugintis ir sudaryti kolonijų. Šių žalingų efektų galima išvengti naudojant indukuojamus promotorius, valdančius tokių polipeptidų sintezę. S. cerevisiae mielėse yra nemažai indukuojamų genų. Keturios gerai ištyrinėtos indukuojamų genų sistemos yra galaktozės įsisavinimo genai (GAL), alkoholdehidrogenazės 2 genas (ADH2), alfa poravimosi faktoriaus genas ir pho5 genas.

S. cerevisiae mielės turi 5 genus, kurie koduoja fermentus, atsakingus už galaktozės, kaip anglies šaltinio, reikalingo augimui, įsisavinimą. Genai GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 ir GAL10 atitinkamai koduoja galaktokinazę, galaktopermeazę, pagrindinį fosfoglutamutazės izozimą, alfa-D-galaktoz-1-fosfatidiltransferazę ir uridindifosfogalaktoz-4-epimerazę. Kai terpėje nėra galaktozės, šių fermentų ekspresuojama labai mažai. Jei

ląstelės auginamos ant gliukozės ir po to į terpę pridedama galaktozės, šie trys fermentai koordinuotai indukuojami mažiausiai 1000 kartų daugiau (išskyrus GAL5, kurio indukuojama 5 kartus daugiau) negu RNA transkripcijos lygis. Genai GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 ir GAL10 buvo klonuoti ir sekvenuoti. Reguliatorinės ir promotorinės sekos iš atitinkamų koduojančių regionų 5' pusės buvo patalpintos šalia lacZ geno koduojančio regiono. Šiais eksperimentais buvo nustatytos reguliatorinės ir promotorinės sekos, kurios reikalingos ir kurių pakanka indukcijai galaktoze.

S. cerevisiae mielės taip pat turi 3 genus, kurių kiekvienas koduoja alkoholdehidrogenazės (ADH) izozimą. Vienas iš šių fermentų, ADHII, atsako už S. cerevisiae mielių sugebėjimą įsisavinti etanolį kaip anglies šaltinį oksidatyvinio augimo metu. ADHII geno, kuris koduoja ADHII izozimą, ekspresiją kataboliškai represuoja gliukozė taip, kad fermentinio augimo metu, esant 0.1% (svoris/tūris) gliukozės, faktiškai nevyksta ADH2 geno transkripcija. Pasibaigus gliukozei ir esant terpėje nerepresuojantiems anglies šaltiniams, ADH2 geno transkripcija indukuojama nuo 100 iki 1000 kartų. Šis genas buvo klonuotas bei sekventuotas ir buvo nustatytos reguliatorinės bei promotorinės sekos, būtinos ir pakankamos transkripcijos derepresijai.

Alfa poravimosi faktorius yra S. cerevisiae lytinis feromonas, kuris reikalingas MATalfa ir MATa lastelių poravimui. Šis tridekapeptidas ekspresuojamas kaip preproferomonas, nukreipiamas į grubų endoplazminį retikulumą, glikozilinimas ir proteolizės būdu procesuojamas iki galutinio brandaus baltymo, kuri sekretuoja ląstelės. Šis biocheminis kelias yra naudojamas kaip svetimų polipeptidų ekspresavimo strategija. Alfa poravimosi faktoriaus genas buvo klonuotas ir jo promotorius su pre-pro-lyderine seka

buvo panaudotas įvairių polipeptidų ekspresijai ir sekrecijai. Analogiškai, pasirodė, kad *pho5* geno promotorių galima indukuoti, esant žemoms fosfato koncentracijoms - tai irgi buvo panaudota fiziologiniu būdu reguliuojamai svetimų baltymų ekspresijai mielėse.

Kaip ir buvo galima numatyti, svetimi baltymai, pereidami grubų endoplazminį retikulumą ir Golgi aparatą, gali patirti N- ir O-glikozilinimą. Alfa poravimosi faktoriaus promotorius yra aktyvus tik alfa fenotipo ląstelėse. *S. cerevisiae* yra 4 genetiniai lokusai, vadinami SIR, kurie sintetina baltymus, reikalingus paprastai tylinčių a ir alfa informacinių kopijų represijai.

Bent vienas iš šių lokusų turi tokius genų produktus, kurie pasižymi temperatūrai jautriom mutacijom ir trukdo tokiai represijai. Tokiame mutante augimas, esant 35°C, pašalina represiją, dėl to ląstelių fenotipas pasidaro a/alfa ir alfa poravimosi faktoriaus promotorius tampa neaktyvus. Sumažinus temperatūrą iki 23°C, ląstelių fenotipas pasikeičia į alfa ir promotorius tampa aktyvus. Buvo parodytas kamienų su temperatūrai jautria SIR mutacija panaudojimas keleto svetimų baltymų kontroliuojamai ekspresijai.

Šio išradimo tikslas yra pateikti HBV paviršiaus baltymą, sudarantį daleles, kuriose yra žymiai sumažintas įterptų angliavandenių kiekis. Kitas šio išradimo tikslas - pateikti būdą, kaip mielėse susintetinti HBV paviršiaus baltymą, kuris sudaro daleles, ir kuriame yra žymiai sumažintas įterptų angliavandenių kiekis. Papildomas šio išradimo tikslas - pateikti vakciną prieš HBV, į kurios sudėtį įeina HBV paviršiaus baltymas, sudarantis daleles, kuriose yra žymiai sumažintas įterptų angliavandenių kiekis ir kuri skirta tiek aktyviam, tiek pasyviam susirgimo ir/arba

infekcijos, kilusios dėl HBV ar kito agento, serologiškai artimo HBV, gydymui arba profilaktikai. Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti sąlygas rekombinantinių ląstelių kultivavimui dideliu mastu ir rekombinantinių HBV paviršiaus baltymų valymui. Šie ir kiti šio išradimo tikslai taps aiškūs iš žemiau pateikiamo aprašymo.

HBV paviršiaus baltymai buvo ekspresuoti su didele išeiga rekombinantinėse mielėse, kurios genetiškai negali glikozilinti baltymų. HBV paviršiaus baltymų ekspresija mielėse sąlygoja charakteringų dalelių susidarymą. Tokioms dalelėms susidarant mielių ląstelėse, į jas įsiterpia mielių ląstelių medžiagos. Naudojant kaip šeimininką "laukinio" tipo mieles, į HBsAg daleles įsiterpia didelis kiekis mielių ląstelių angliavandenių. Siekiant išvengti HBV vakcinose, kurią sudarančiose dalelėse yra didelis angliavandenių kiekis, HBV paviršiaus baltymai buvo gaminami ir valomi iš rekombinantinių mielių šeimininko, kuris genetiškai negali glikozilinti baltymų. HBV paviršiaus baltymai, kuriuos gamina toks šeimininkas, turi žymiai mažiau angliavandenių negu dalelės, pagamintos "laukinio" tipo mielių ląstelėse. Šie HBV paviršiaus baltymai yra naudingi kaip vakcina, skirta su HBV susijusių infekcijų gydymui ir/arba profilaktikai, ir kaip antigenas imunologinei diagnostikai, pasižymintis sumažintu reaktingumu gamtoje sutinkamų antimielinių antikūnų atžvilgiu.

30

TRUMPAS FIGŪROS APRAŠYMAS

Fig.1 schematiškai parodyta plazmidė pC1/1pGAL10HBsAg-tADH-1, į kurios sudėtį įeina pGAL10 promotorius, valdantis HBsAg ASR transkripciją, po to seka tADH1 terminatorius ir selektyvus markeris LEU2+.

35

Šis išradimas aprašo metodą, skirtą gaminti HBV paviršiaus baltymų daleles, į kurių sudėtį įeina žymiai sumažintas įterptų angliavandenių kiekis, ir kurios skirtos naudoti kaip vakcina prieš HBV.

5

Dane dalelės (stereotipas adw) buvo panaudotos HBV nukleino rūgščių išskyrimui iš virusinio ASR. Specialistams akivaizdu, kad šis išradimas apima taip pat nukleino rūgštis iš HBV kamienų giminingų virusų, pasižyminčių kitokiu serologiniu reaktingumu, kuris sąlygojamas virusų genetikos įvairovės. Siekiant pagaminti kovalentiškai sujungtas žiedines dvigrandes HBV genomo DNR iš sutrūkinėjusių ir turinčių tarpus nukleino rūgščių, kurios natyvioje formoje aptinkamos HB virione, buvo panaudota endogeninė polimerazinė reakcija. DNR buvo išskirta, visiškai suskaldyta naudojant EcoRI ir klonuota į pBR322 EcoRI saitą, tokiu būdu buvo gauta pHBV/ADW-1. Buvo atrinktos rekombinantinės plazmidės, į kurių sudėtį įeina HBV genomai, cirkuliariai sukeista forma PreS regiono EcoRI saite. Pilnas ACR, koduojantis 55 amino rūgštis iš preS2 regiono, ir 226 amino rūgštis iš S regiono, iš pradžių buvo sukonstruotas išgryninus 0.8 kilobazių porų (kbp) fragmentą, gautą suskaldžius pHBV/ADW-1 su EcoRI ir AccI; šis fragmentas koduoja preS2+S polipeptidą, kuriame tetrahidrofurane trūksta tik iniciacijos kodono, trijų N-galo amino rūgščių, trijų C-galo amino rūgščių ir transliacijos terminavimo kodono.

30

Buvo susintetinti oligonukleotidai, kurie buvo liguoti su šiuo fragmentu, paversdami jį į HindIII fragmentą, turintį 10 bp mielinę netransliuojamą 5' supančią seką, ir pilnas preS2+S ASR buvo parinktas taip, kad terminavimo kodonas būtų prijungtas tiesiog prie natūralaus HindIII saito ADH1 transkripcijos terminatoriuje, tuo būdu sukuriama ištiesi natyvi

35

mielinė jungtis, kurioje nėra jokių papildomų įterptų bazių. Specialistams akivaizdu, kad, norint ekspresuoti HBV paviršiaus ir jam giminingus baltymus, ADH1 gali pakeisti bet koks tinkamas aktyvus mielėse transkripcijos terminatorius.

5' supanti seka konstrukcijai ACAAACAAA (SEKOS NR:1)

1 10

10 buvo parinkta taip, kad atitiktų mielių geno GAP63 (GAP) netransliuojamą lyderinę seką (NLS) [Holland, J. Biol. Chem., 225, 2596 (1980)], ji taip pat turi tikti visai GAP geno šeimai. Konstrukcija buvo atlikta taip, kad NLS galima būtų prijungti tiesiai
15 prie preS2+S ASR inicijavimo kodono ir tokiu būdu išvengti įterptų papildomų bazių. Todėl specialistams akivaizdu, kad, siekiant ekspresuoti HBV paviršiaus baltymus, NLS galima pasirinkti ir iš kitų sekų, kurios salygoja tinkamus ekspresijos lygius.

20

DNR sekos analizė atskleidė du bazių pakeitimus, kurie salygoja amino rūgščių skirtumus sekoje, kurią koduoja pHBpreSGAP347/19T DNR, lyginant preS2+S seka [Valenzuela et al., Biotechnology, 3(4), 317-
25 320 (1985)]. Siekiant, kad abiejose konstrukcijose polipeptidai būtų identiški, šie nukleotidų pakeitimai, būtent, T vietoj C HBV preS2+S ASR 64-oje bazėje iš 846 bp (koduojanti Phe vietoj Leu) ir C vietoj A bazėje 352 (koduojanti His vietoj Gln), buvo padaryti sait-
30 mutagenėzės būdu [Zoller et al., Nucleic Acids Research 10:6487-6500 (1982)]. Po to ši optimizuota koduojanti amino rūgščių seka buvo patikrinta. Specialistams akivaizdu, kad šis išradimas neapsiriboja šia seka ir apima bet kurią seką, kai DNR koduoja polipeptidus,
35 pasižyminčius HBV giminingu antigeniškumu.

Didelis 3.3 kpb DNR fragmentas, į kurio sudėtyje įeina pUC19 ir HBsAg koduojantis regionas, buvo atskirtas nuo preS2 koduojančio DNR fragmento suskaldžius jį restriktazėmis EcoRI ir StyI ir išgryninus preparatyvine agarozės gel elektroforeze. Sintetinis DNR oligonukleotidas po to buvo liguotas su pUC19-HBsAg fragmentu. Sintetinis DNR oligonukleotidas turi 5' EcoRI ir 3' StyI lipnius galus, taip pat HindIII saitą, kuris yra čia pat už 5' EcoRI saito. Be to, sintetinio DNR oligonukleotido sudėtyje yra HBsAg ATG kodonas, 9 nukleotidai aukščiau ir 21 nukleotidas žemiau, įskaitant StyI saitą.

Šis oligonukleotidas rekonstruoja pilną HBsAg koduojantį regioną ir įgalina jį po to nepažeista pašalinti iš vektoriaus, sukonstruoto pUC19 pagrindu, skaldant HindIII.

pUC19-HBsAg DNR fragmentas su liguotu sintetiniu DNR oligonukleotidu, aprašytu aukščiau, buvo panaudotas E. coli transformacijai. Buvo parinktos rekombinantinės plazmidės, turinčios visiškai rekonstruotą HBsAg koduojantį regioną. Pilnas HBsAg atviras skaitymo rėmelis (ASR) buvo pašalintas iš rekombinantinės plazmidės, skaldant HindIII, po to buvo išskirtas ir preparatyvine agarozės gel-elektroforeze išvalytas 0.7 kpb HBsAg DNR, skirtas klonavimui į GAL10 promotoriaus ekspresijos vektorių.

Ekspresijos kasetė (pGAL10-tADH1) valdo svetimų genų, įterptų ties unikaliu HindIII saitu, žemiau už galaktoze indukuojamo GAL10 promotoriaus, ekspresiją. Aukščiau aprašytas HBsAg ASR (turintis gale HindIII) buvo liguotas į vektoriaus HindIII saitą. Ši ekspresijos kasetė buvo įterpta tarp E. coli šaudyklinio vektoriaus pCl/1 (Beggs, supra) SphI saitu,

o pats vektorius buvo įterptas į S. cerevisiae kamienus CF52 arba CF54 ir buvo atrinkti transformuoti klonai.

Po mutagenezės fragmentas, koduojantis S arba preS+S, 5
aprašytas aukščiau, buvo panaudotas ekspresijos kasetei
konstruoti, kaip tai jau aprašyta anksčiau [Kniskern et
al., Gene, 46:135-141 (1986)], kuri sudaryta iš: (a)
maždaug 1.1 kbp GAP491 promotoriaus, (b) 10 bp mielinės
supančios sekos, (c) 1230 bp preS1+preS2+S virusinio
10 ASR arba 846bp preS2+S virusinio ASR arba 681 bp S
virusinio ASR, ir (d) maždaug 0.4 kbp mielinio ADH1
terminatoriaus.

Trys skirtingi ekspresijos vektoriai buvo panaudoti
15 konstruojant HBsAg ekspresijos kasetes. GAP 491
promotoriaus ekspresijos kasetė, kuri buvo aprašyta
anksčiau [Kniskern et al., Gene, 46:135-141 (1986)],
sudaryta iš maždaug 1.1 kbp gliceraldehid-3-fosfat-
dehidrogenazės (GAPDH) promotoriaus ir maždaug 350 bp
20 mielių alkoholdehidrogenazės I (ADH1) terminatoriaus
pBR322 grandinėje, ir kuri turi unikalų HindIII saitą
tarp promotoriaus ir terminatoriaus. HBsAg ASR iš
pav.2 buvo liguotas į unikalų HindIII saitą, o analizė
restrikcijos endonukleazėmis ir Southern blotas
25 patvirtino jo buvimą ir orientaciją.

Naudojant kitą variantą, (0.5 kbp) GAL10 promotorius
[Schultz et al., Gene, 54:113-123 (1987)] buvo
pakeistas 1.1 kbp GAP promotoriumi iš aukščiau
30 nurodytos konstrukcijos, arba (1.25 kbp) ADH2
promotorius [Kniskern et al., Hepatology, 8:82-
87 (1988)] buvo pakeistas GAP promotoriumi (žr. pav.1).

Kiekvienu atveju ekspresijos kasetė, kurios sudėtyje
35 yra specifinis promotorius, HBsAgASR ir
ADH1 terminatorius, buvo klonuota į šaudyklinį vektorių
pC1/1 (Beggs, supra; Rosenberg, et al., supra),

siekiant sukurti mielinį ekspresijos vektorių, kuris buvo panaudotas S. cerevisiae transformacijai, kaip tai aprašyta žemiau. Šie transformantai buvo pateikti kaip užšaldyti pavyzdžiai analizei ir vėlesniems eksperimentams. Parentalinis kamienas CF52 buvo gautas tokiu būdu: alfa poravimo tipo kamienas CZ5/LB347-1C (mnn9-, .SUCZ-) buvo suporuotas su a tipo kamieniu 2150-2-3 (leu2-, adel-), maišant kamienus lėkštelėje su YEHD pilna terpe. Siekiant atrinkti diploidus, suporuoti kamienai buvo replikuoti į leu- minimalią terpę, turinčią 2% sukrozės, kaip vienintelį anglies šaltinį. Atskiros kolonijos buvo atskirtos, diploidai sporuliavo ir ascitai buvo suardyti standartiniais būdais. KHY-107 kamienas buvo išskirtas kaip spora ir apibūdintas kaip cir⁺, adel⁺, leu2⁻ ir mnn9⁻ (naudojant Šifo dažymo techniką).

KHY107 (cir 0) yra kamieno KHY107 (cir⁺) darinys, kaip tai aprašyta Broach darbe [Methods in Enzymology, 101, Part C, 307-325 (1983)]. Pagydytas kamienas buvo padarytas ura3⁻ integruojant suskaldytą ura3 geną. Gautas kamienas KHY-107ura3Δ buvo auginamas turtingoje terpėje, siekiant akumuliuoti spontanines mutacijas. Buvo atrinktas kanavaninui atsparus mutantas. Komplementariais testais parodyta, kad mutantinis kamienas CF55 yra can1⁻. Siekiant gauti galutinį šeimininko kamieną CF52 (Mata leu2-2, 112 ura3Δcan1 his3Δ::GAL10pGAL4-URA3, cir⁰), GAL10pGAL4 ekspresijos kasetė buvo integruota į CF55 HIS3 geną [Methods in Enzymology, 185, 297-309 (1990)]. Šie transformantai buvo pateikti kaip užšaldyti pavyzdžiai analizei ir vėlesniems eksperimentams.

Rekombinantinės mielės iš užšaldytų pavyzdžių buvo auginamos YEHD terpėje [Carty et al., J. Industrial Microb., 2:117-121 (1987)]. Po auginimo stacionarioje fazėje mielių ląstelės buvo surinktos. Buvo paruošti

lizatai, kurie frakcionuoti natrio dodecilsulfato poliakrilamidino gelio elektroforeze (SDS-PAGE) ir atliktas imunoblotingas su antikūnais prieš HBsAg. Buvo rastas vienas polipeptidas, kurio molekulinis svoris yra maždaug 24 kD, o tai atitinka prognozuojamą S ASR transliacijos produkto molekulinį svorį. Be to, rekombinantinių (o ne parentalinių) mielių lizatai buvo teigiami S atžvilgiu pagal radioimuninę analizę (Ausria®). Dalinai valytų mielių lizatų tyrimas elektroninės mikroskopijos metodais parodė dideles tipiškų HBsAg dalelių sankaupas.

Mielinis promotorius inicijuoja HBsAg ir jam giminingų genų transkripciją. Todėl specialistams akivaizdu, kad bet kuri mielėse aktyvi promotorinė seka (pavyzdžiui, į kurios sudėtį įeina GAL1, GAL10, ADH2, Pho5 ir kt., tačiau vien tik jais neapsiribojant) gali pakeisti GAP491 promotorių. Taip pat specialistams akivaizdu, kad tinkama analizės sistema, pavyzdžiui, imunoblotingas arba EIA, turi būti panaudota HBsAg arba giminingų polipeptidų ekspresijos analizei šioje sistemoje, optimizuojant kultūros kultivavimo laiką, kad būtų gauta maksimali išeiga.

GAP491 promotorius pasirodė labai tinkantis svetimų baltymų, tarp jų HBsAg, ekspresijai mielėse [Bitter et al., Gene, 32:263-274 (1984); Wampler et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 82: 6830-6834 (1985)]. Remiantis mūsų ankstesniais rezultatais, kurių metu HBsAg ekspresija sudarė beveik 40% nuo tirpių mielių baltymų (Kniskern et al., supra), mes panaudojome šį promotorių HBsAg ir panašių baltymų ekspresijos valdymui tinkamose mielinio šeimininko ląstelėse.

Specialistams akivaizdu, kad mielių kamienas, tinkamas HBV paviršiaus baltymo ekspresijai, parenkamas iš daugybės kandidatų. Tarp tinkamų mielių kamienų galima

paminėti, tuo neapsiribojant, mieles, pasižyminčias tokiomis genotipinėmis ir fenotipinėmis charakteristikomis, kaip proteazių deficitas ir pakeistas sugebėjimas glikozilinti.

5

Siekiant kontroliuoti ir charakterizuoti rekombinantinių mielėse ekspresuojamų HBV baltymų glikozilinimą, buvo sukonstruotas, kaip tai parodyta aukščiau, S. cerevisiae kamienas CF52 (Mata leu2-2, 10 ura3Δcan1 his3Δ::GAL10pGAL4-ura3, cir⁰).

Kamieno CF52 (Mata leu2-2, 15 ura3Δcan1 his3Δ::GAL10pGAL4-ura3, cir⁰) transformacijai buvo panaudota plazmidė pC1/1pGAL10HBsAg-tADH-1. Transformuoti klonai buvo atrinkti minimalioje (leu⁻) terpėje, kurios sudėtyje yra 1M sorbitolis. Klonuotų transformantų pavyzdžiai buvo užšaldyti 17% glicerine tolesniems tyrimams ir eksperimentams.

20 Siekiant gauti kontrolinį kamieną "laukinio" tipo glikozilinimui, ta pati ekspresijos plazmidė buvo panaudota transformuoti mielių kamieną CF54, kuris žinomais metodais buvo išskirtas iš kamieno CF52, ir yra savaiminis revertantas į MNN9+ (taigi pagal 25 glikozilinimą šis kamienas yra "laukinio" tipo, o visais kitais atžvilgiais jo genotipas identiškas kamienui CF52). Transformuoti klonų izoliatų pavyzdžiai buvo užšaldyti 17% glicerine tolesniems tyrimams ir eksperimentams.

30

Transformuotų mielių, turinčių ekspresijos plazmidės, klonai buvo patalpinti į leu- selektyvias agarų lėkštes (kuriose mnn9-transformantams įdėta 1M sorbitolio) ir inkubuoti 2-3 dienas, esant 30°C. Šios 35 mielės buvo inokuluotos į kompleksines YEHD (Carty et al., supra) terpes, turinčios 0.1-1M sorbitolio, kultūras (5-7 ml), kartu pridodant 2% galaktozės

GAL10 plazmidėms. Kultūros inkubuojamos esant aeracijai ir 30°C 12-18 val. Kolbos, turinčios 50 ml kompleksinės YEHD terpės su 1M sorbitoliu (toliau vadinamos YEHDS), buvo inokuliuotos aukščiau minėtomis kultūromis (iki pradinio $A_{600}=0.1$) ir buvo inkubuojamos esant 30°C purtant (350 rpm) 48-72 valandas iki galutinio $A_{600}=10-16$. Pavyzdžiai, turintys 10 A_{600} vienetų, buvo padalinti į mėgintuvėlius ir mielių ląstelės buvo tabletuotos centrifuguojant 10 minučių esant 2000 g. Pavyzdžiai buvo analizuojami iš karto arba saugomi užšaldyti esant -70°C. Analizei tabletės resuspenduojamos 0.4 ml fosfatiname druskos buferyje (PBS), turinčiame 2mM fenilmetilsulfonilo fluorida (PMSF), ir perkeliamos į 1.5 ml Ependorfo mėgintuvėlius. Mielių ląstelės homogenizuojamos taip: 1) pridėti 200-300 g plautų stiklinių karoliukų (0.45 nm) ir maišyti 15 min. Vortex tipo maišikliu, 2) pridėti TRITON X-100 iki 0.5%, 3) maišyti 2 min. Vortex tipo maišikliu, 4) inkubuoti 10 min. esant 4°C. Ląstelių nuolaužos ir stiklo karoliukai buvo atskirti ir supernante nustatomas baltymo kiekis [pagal Lowry et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)] ir atliekama pre2S+S specifinė RIA [Hansson et al., *Infect. Immunol.*, 26: 125-130, (1979), Machida et al., *Gastroenterology* 86: 910-918 (1984)] arba S specifinė RIA (AUSRIA®).

Transformuotų mielių mnn9, turinčių ekspresijos plazmidės, klonai buvo patalpinti į leu- selektyvias agarą lėkšteles, kuriose yra 1M sorbitolio, ir inkubuoti 2-3 dienas, esant 30°C. Šios mielės buvo inokuliuotos į kompleksinės YEHDS terpės kultūras (5-7 ml), kartu pridėdant 2% galaktozės GAL10 promotoriaus plazmidėms. Kultūros inokuliuojamos iš aukščiau nurodytų kultūrų (iki pradinio $A_{600}=0.1$) ir inkubuojamos esant 30°C 48-72 val. purtant (350 rpm) iki galutinio $A_{600}=10-16$. Trys rinkiniai pavyzdžių iš 10 A_{600} vienetų buvo padalinti į mėgintuvėlius ir mielių ląstelės buvo

tabletuotos centrifuguojant 10 minučių esant 2000 g. Pavyzdžiai buvo analizuojami iš karto, kaip aprašyta aukščiau, arba saugomi užšaldyti esant -70°C .

- 5 Polipeptido, gauto šeimininko ląstelėse su mnn9-fenotipu iš visų rekombinantinių klonų, aprašytų aukščiau, imunoblotingas rodė vieną juostelę, kuri atitinka maždaug 24 kD molekulinį svorį.
- 10 Rekombinantinių baltymų kiekybinis ir kokybinis glikozilinimo profilis labai priklauso nuo šeimininko ląstelės rūšies, o rūšies viduje - nuo ląstelių linijos. Specialistams akivaizdu, kad šeimininko kamieną galima pasirinkti ne tik iš S. cerevisiae, bet
- 15 ir iš kitų rūšių ir ląstelių linijų, kuriose gali būti identifiкуotos fermentų ir glikozilinimo metabolinių kelių mutacijos. Specialistams taip pat akivaizdu, kad šeimininko kamieną pasirenkant iš S. cerevisiae, galima rinktis iš visų kamienų, kuriuose gali būti
- 20 identifiкуotos fermentų ir glikozilinimo metabolinių kelių mutacijos.

Transformuoti klonai buvo patikrinti ar turi HBsAg DNR ir ar ekspresuoja p24 HBsAg. Ląstelės buvo auginamos

25 YEHDS terpėje (į jos sudėtį taip pat įeina galaktozė, skirta GAL10 promotoriaus plazmidai, siekiant indukuoti ekspresiją po gliukozės suskaldymo). Buvo paruošti lizatai, kurie buvo frakcionuoti natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforeze (SDS-PAGE), ir

30 atliktas Western blotas ant nitroceliuliozės. Remiantis tuo, kad p24 produktas rastas tik indukuotuose transformantuose bei jo reakcija su anti-p24 serumu, buvo nustatyta, kad p24 produktas yra specifiškas S baltymui. Vienas iš šių klonų buvo parinktas tolesnei

35 analizei. Be to, transformantų lizatai (bet ne parentalinės S. cerevisiae lizatai) buvo tegiami HBsAg atžvilgiu, analizuojant RIA metodu.

Tuo pabrėžiamas ekspresijos vektorius, naudojančio GAL10 promotorių, tinkamumas valdyti HBsAg ir jam artimų paviršiaus baltymų ekspresiją S. cerevisiae mielėse. Specialistams akivaizdu, kad reguliuojamas GAL10 promotorius, arba GAL1, GAL2, GAL7 arba MEL1 promotoriai, kurie veikia identiškai, įgalina auginti rekombinantinę S. cerevisiae kultūrą pramoniniais tūriais prieš inicijuojant rekombinantinio baltymo sintezę, taip sumažinami neigiami efektai, kuriuos patiria šeimininko ląstelė. Be to, specialistams akivaizdu, kad ekspresijos vektorius, kurio sudėtyje yra kitas reguliatorinis promotorius, tarp jų ADH2 ir alfa poravimosi faktorius (tačiau vien jais neapsiribojant), kurie indukuojami fiziologiškai arba derepresuojami kitomis priemonėmis, gali būti panaudotas tiesioginei S ir preS turinčių peptidų ekspresijai. Specialistams taip pat akivaizdu, kad silpnesnis nei GAPDH konstitutyvnis promotorius, tarp jų, bet neapsiribojant juo, CYC1, sąlygoja žemesnę S ir preS turinčių polipeptidų ekspresiją, taigi taip pat galima išvengti neigiamų superekspresijos fiziologinių efektų. Specialistams akivaizdu, kad turi būti naudojama tinkama analizės sistema, pavyzdžiui, Western blotas arba RIA, norint sekti šioje sistemoje S ir preS turinčių polipeptidų ekspresiją ir optimizuoti kultivavimo laiką, siekiant gauti maksimalią išėigą.

S ir S giminingų baltymų iš transformuotų S. cerevisiae valymui buvo panaudota imunoafininė kolonėlė, prie kurios prijungti ožkos antikūnai, atpažįstantys HBsAg dalelių formą. Eliuojamas produktas yra teigiamas HBsAg atžvilgiu, analizuojant RIA, ir sudaro daleles, stebimas per elektroninį mikroskopą. Tokia dalelių forma, į kurios sudėtį įeina HBsAg ir preS antigenai, arba vien tik HBsAg antigenas, yra efektyvi kaip vakcina prieš HBV ir kaip diagnostinis reagentas.

Mielių ląstelės, transformuotos ekspresijos vektoriais, koduojančiais hepatito B viruso paviršiaus baltymą arba jo variantus, kultivuojamos ir surenkamos. Kai to
5 reikia, ląstelės saugomos praplovus jas buferio tirpalu, pavyzdžiui, PBS, ir paruošiant ląstelių pasta, kuri paprastai laikoma užšaldyta prie -70°C .

HBsAg ir jam artimų baltymų valymas aprašytas žemiau.
10 Šviežios arba užšaldytos ląstelių pastos partija suspenduojama buferyje, labiau tinka TRIS'as, esant dideliame pH nuo maždaug 8.5 maždaug 11.0, labiau tinka pH 10.5 (buferyje taip pat gali būti tinkamų proteazių inhibitorių). Ląstelės suardomos, tam labiau tinka
15 mechaninės priemonės. Švelnus ląstelių ardymo metodas, panaudojant stiklo karoliukus, pasirodė netinkamas dirbant dideliais mastais. Labiau tinka ardymas, naudojant didelio slėgio homogenizatorių (maždaug nuo 10000 iki 20000 psi, naudojant Gaulin'o arba Stansted'o
20 homogenizatorių) - procesą galima vykdyti greitai ir efektyviai.

Suardžius mielių ląsteles, gaunamas grubus ekstraktas. Toliau šio ekstrakto pH koreguojamas taip, kad pH
25 reikšmė būtų nuo 8.0 iki 11.0 labiau tinka reikšmė 10.5.

Šioje stadijoje gali prireikti pridėti į grubų ekstraktą detergento. Pridėjus detergento lengviau
30 atskirti mielių ląstelių membranas nuo nepageidaujamų ląstelių nuolaužų. Parodyta, kad preS2+S baltymas, taip pat ir kitos paviršiaus baltymų formos, gali asocijuotis su mielių ląstelių membranomis. Gali būti panaudota daugybė neutralių arba nejoninių detergentų,
35 tarp jų, bet vien jais neapsiribojant, TRITON-N serijos, TRITON-X serijos, BRIJ serijos, arba EMASOL serijos detergentai, deoksicholatas, oktilglukopirano-

zidas arba NONIDET-Np-40. Cviterjoniniai detergentai, tokie kaip CHARPS arba CHARPSO, yra naudingi ir tinkami agentai.

- 5 Jei detergentas naudojamas, labiau tinka detergentas TRITON X-100, kurio koncentracija yra maždaug 0.5%. Reikia pabrėžti, kad dirbant pagal šio išradimo metodą, detergento naudojimas šioje stadijoje nėra būtinas.
- 10 Toliau ekstraktas gali būti apdorojamas termiškai, jei lizuojant nebuvo įdėta proteazių inhibitorių. Terminis apdorojimas yra efektyvus plačiose temperatūros ir apdorojimo trukmės ribose. Dažniausiai naudojama temperatūra nuo 45 iki 60°C, labiau tinka 50°C. Terminio
- 15 apdorojimo trukmė paprastai yra nuo 20 iki 40 min. labiau tinka 30 min. Ekstraktas apdorojamas termiškai tinkamame inde, kuris panardinamas į šildomą vonią, arba naudojamas šilumokaitis. Medžiaga po to atšaldoma iki 10°C, labiau tinka atšaldyti panardinant į ledinio
- 20 vandens vonią arba naudojant šilumokaitį. Specialistams akivaizdu, kad pagal šio išradimo metodą terminio apdorojimo stadija ir nuolaužų pašalinimo stadija gali būti sukeistos vietomis be pastebimų šios operacijos pasekmių. Antai: sveikos mielių ląstelės šildomos
- 25 neutralaus pH buferyje, suardomos ir pridedamas detergentas, kaip tai aprašyta aukščiau.

- Ląstelių nuolaužų pašalinimas iš termiškai apdoroto grubaus ekstrakto yra būtinas norint išvengti fizinės
- 30 okliuzijos tolimesnių valymo stadijų metu. Nuolaužos pašalinamos centrifuguojant, mikrofiltruojant arba filtruojant - taip gaunamas skaidrus ekstraktas. Centrifugavimas ir mikrofiltravimas yra labiausiai tinkami metodai. Centrifugavimo trukmė ir kiti
- 35 parametrai gali būti labai įvairūs. Buvo nustatyta, kad tinkami centrifugavimo parametrai yra tokie: 3000 g 15 min esant 4°C. Gali būti naudinga prieš centri-

fugavimą ekstraktą praskiesti, siekiant sumažinti grubaus mielių ląstelių ekstrakto klampumą. Praskiedimas neturi įtakos tolimesnėms šios procedūros stadijoms.

5

Mikrofiltravimo pranašumai yra tokie, kad filtravimas ir dializė vyksta tuo pačiu metu. Šioje stadijoje tinka keli mikrofiltracijos aparatų tipai, pavyzdžiui, KROSFLO (Microgon Inc.) arba įvairios AMICON arba A/G Technology tuščiavidurio pluošto kasetės. Labiau tinkamas mikrofiltravimo metodas yra praleisti ekstraktą per Prostak Durapore (Millipore) membraninį mikrofiltracijos aparatą, kur porų dydis yra maždaug nuo 0.1 mikrono iki 0.2 mikrono, įvado slėgimas maždaug nuo 2 iki 7 psi, naudojant buferį, į kurio sudėtį įeina 0.1M TRIS'o, kurio pH yra apie 10.4, ir maždaug 0.1% TRITON X-100.

Centrifugavimo supernatantas arba mikrofiltravimo filtratas gali būti sukonzentruoti prieš tolimesnę šios procedūros stadiją. Konkcentruoti galima keliais metodais, tarp jų, bet neapsiribojant vien paminėtais, dializė, filtracija, liofilizacija, ultrafiltracija ir diafiltracija. Pagal šią išradimą labiau tinkamas koncentravimo metodas yra praleisti nuskaidrintą ekstraktą per tuščiavidurio pluošto ultrafiltracinę sistemą su 10^5 kD riba. Nuskaidrinto ekstrakto tūris paprastai sumažėja maždaug 6.5 karto, koncentruojant mikrofiltracijos produktą, ir maždaug 2 kartus, koncentruojant praskiestą centrifugavimo produktą. Gautas koncentratas retentatas diafiltruojamas norint pašalinti žemo molekulinio svorio priemaišas. Diafiltruojama per tuščiavidurio pluošto sistemą su 10^5 kD riba.

35

Jeigu buvo pridėta TRITON X-100, jis gali būti pašalintas keliais žinomais metodais, tarp jų (neapsiribojant vien

jais) dialize, veikiant kai kuriais organiniais tirpikliais, iššaldymu, atskiriant chromatiškai ir naudojant gelį arba dervą, kuri specifiškai suriša detergentus, tokią kaip Extractogel (Pierce) ir XAD 5 dervą (Romicon). Pagal šį išradimą labiau tinkamas metodas pašalinti TRITON X-100 leisti termiškai apdorotą ekstraktą su TRITON X-100 per XAD-2 arba XAD-4 dervos kasetę (polistirolo divinilbenzola). Termiškai apdorotas ekstraktas cirkuliuoja per XAD 10 kasetę maždaug 10 valandų 4°C, ir po to surenkamas tinkamame inde, pavyzdžiui, stikliniame butelyje su prišlifuo tu kamščiu.

Jei ląstelės buvo ardomos buferyje su dideliu pH, 15 termiškai apdoroto ekstrakto pH arba ekstrakto su proteazių inhibitoriais pH koreguojamas maždaug iki 7.0 - 7.9, labiau tinkama pH reikšmė maždaug 7.7. Pakėlus pH maždaug iki 7.7, o po to termiškai apdorojus, esant dideliame pH pagal šį išradimą, žymiai 20 palengvėja apvalkalo baltymų adsorbpcija ant silikagelio su plačiomis poromis, kuris naudojamas tolimesnėje stadijoje. Koreguoti termiškai apdoroto ekstrakto pH galima ir prieš TRITON X-100 pašalinimo stadiją - procedūros išėigai tai neturi jokios įtakos. Todėl 25 specialistams suprantama, kad pagal šio išradimo metodą, pH koregavimo stadiją ir TRITON X-100 pašalinimo stadiją galima sukeisti vietomis ir tai neturės įtakos šios procedūros rezultatams.

Po to HBsAg lengvai atskiriamas nuo priemaišų ir 30 gaunamas gana švarus HGsAg. Labiau tinkamas priemaišų pašalinimo metodas yra HBsAg adsorbpcija ant silikagelio su didelėmis poromis. Labiausiai tinkamas metodas pagal šį išradimą yra HBsAg adsorbpcija ant silikagelio su 35 poromis, kurių dydis siekia nuo 1000 iki 1500 angstromų, o silikagelio dalelių dydis yra nuo 30 iki 130 mikronų (Amicon). Paviršiaus baltymas

lengvai pakliūva į silikagelio poras ir jose sulaikomas. Mielių ląstelinių baltymų priemaišos tokiu atveju lengvai išplaunamos.

5 Paviršiaus baltymą sorbuoti ant didelių porų silikagelio galima chromatografiškai arba nechromatografiniu, batch-metodu. Chromatografinė adsorbicija atliekama leidžiant ekstraktą, kurio pH pakoreguotas, per sluoksnį didelių porų silikagelio koloninės
10 chromatografijos aparate. Paprastai per 5 cm kolonėlę su marškiniais, kurioje telpa apie 300 ml (apie 100 g sauso svorio) didelių porų silikagelio sorbento, esant tekėjimo greičiui apie 200 ml/val, leidžiama maždaug 1 litras termiškai apdoroto ekstrakto.

15 Nechromatografinė adsorbicija ant didelių porų silikagelio paprastai atliekama maišant termiškai apdorotą ekstraktą su silikageliu tinkamame inde, pavyzdžiui, uždaromame stikliniame butelyje. Labiau tinkamas
20 metodas yra pridėti 300 ml didelių porų silikagelio į maždaug vieną litrą termiškai apdoroto ekstrakto stikliniame butelyje ir inkubuoti nuolat maišant. Labiau tinkamos sąlygos adsorbicijai yra maždaug 1.5 valandos esant 4-8⁰C, tačiau tinka ir kitokie
25 laikai bei temperatūros.

Išplauti silikagelį, adsorbuojant paviršiaus baltymą, nuo neadsorbuotų medžiagų galima nechromatografiniu būdu, arba silikagelis supilamas į kolonėlę, kaip tai
30 aukščiau aprašyta, skirtą chromatografinėi adsorbicijai. Plaunant batch-metodu, termiškai apdorotas ekstraktas nupilamas nuo didelių porų silikagelio ir pridodama keli tūriai buferio, kuris neatpalaiduoja HBsAg, adsorbuoto ant silikagelio. Tinkamesnis yra PBS
35 buferis. Buferis nupilamas nuo silikagelio ir plovimo operacija pakartojama 3-5 kartus.

Silikagelis, ant kurio adsorbuotas paviršiaus baltymas, plaunamas chromatografiškai leidžiant per jį PBS, esant tekėjimo greičiui 200 ml/val tol, kol ekstinacija prie 280 nm nebekinta.

5

HBsAg eliuuojamas nuo nuplauto didelių porų silikagelio, naudojant buferinį tirpalą, kurio pH yra tarp 8.5 ir 9.0. Paviršiaus baltymas geriau desorbuoti naudojant buferio tirpalą, kuriame yra maždaug 0.05 M borato, esant pH apie 8.7. HBsAg desorbicija vyksta lengviau, esant aukštesnei temperatūrai, kurios diapazonas gali būti labai platus. Labiau tinka vykdyti desorbiciją esant 55^oC temperatūrai.

15

Nechromatografinė desorbicija atliekama maišant 1200 ml 0.05 M boratinio buferio (pH 8.7) su maždaug ml plauto didelių porų silikagelio, ant kurio adsorbuotas HBsAg. Desorbicija trunka maždaug 25 minutes. Po to eliuatas surenkamas, desorbicijos stadija pakartojama du kartus ir eliuatas atšaldomas.

20

Chromatografinė desorbicija atliekama šildant plauto silikagelio kolonėlę su marškiniais iki 55^oC. Boratinis buferis (0.05 M, pH 8.7) šildomas iki 55^oC ir po to leidžiamas per kolonėlę, esant tekėjimo greičiui 500 ml/val. Po to eliuatas surenkamas ir atvėsinaamas. Eliuato tūris paprastai yra maždaug toks pat, kaip ir termiškai apdoroto ekstrakto tūris, kuris buvo leidžiamas per kolonėlę.

30

Eliuata HBsAg paprastai reikia sukonzentruoti. Labiau tinka koncentravimo metodas, kai eliuatas leidžiamas per tuščiavidurio pluošto diafiltracinę sistemą su 10⁵ molekulinio svorio riba, naudojant 0.05 M boratinį buferį, pH 8.7. Naudojant šią sistemą, eliuoto paviršiaus baltymo tūris paprastai gali būti sumažintas

35

maždaug 16 kartų. Diafiltracijos retentatas gali būti, jei to reikia, sterilizuojamas mikrofiltracijos būdu.

5 Angliavandenių kiekis HBsAg nustatomas Dubois metodu: Dubois, M. et al., Anal. Chem., 28, pp. 350, 1956. Ši procedūra grindžiama tuo, kad paprasti sacharidai, olisacharidai, polisacharidai ir jų dariniai, tarp jų metilo eteriai, turintys laisvas arba potencialiai laisvas redukuojančias grupes, paveikti fenoliu arba
10 koncentruota sieros rūgštimi, nusidažo oranžiniai geltona spalva. Spalvos intensyvumas, esant vienodai fenolio koncentracijai, yra proporcingas esančio cukraus kiekiui.

15 Norint nustatyti angliavandenių kiekį HBV paviršiaus baltymo pavyzdyje, 1 ml tirpalo, kuriame yra nuo 10 iki 70 mikrogramų baltymo, talpinamas į mėgintuvėlį. Ruošiami angliavandenių standartai ir kontroliniai pavyzdžiai. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama po 1 ml
20 5% fenolio tirpalo, mėgintuvėlių turinys išmaišomas, pridedant 5 ml 96% sieros rūgšties ir išmaišoma. Mėgintuvėliai inkubuojami kambario temperatūroje 10 min, maišoma, po to inkubuojama dar 20 min, esant 25-30°C. Pavyzdžiai matuojami spektrofotometru (A_{490}
25 heksozėms ir metilintoms heksozėms, A_{480} pentozėms, uroninei rūgščiai bei jų metilintiems dariniams) ir angliavandenių kiekis HBsAg pavyzdžiuose nustatomas lyginant su angliavandenių standartais.

30 Angliavandenių kiekis HBsAg, sintetinio "laukinio" tipo rekombinatinėse mielių ląstelėse (CF54) ir HBsAg, sintetinio CF52 rekombinatinėse mielių ląstelėse, buvo analizuotas aukščiau nurodytu metodu. Remiantis šiais rezultatais, buvo apskaičiuotas angliavandenių ir
35 baltymo santykis kiekviename pavyzdyje, dalinant angliavandenių mikrogramus iš pavyzdyje esančio baltymo kiekio. Šis santykio skaičiavimas parodė, kad HBsAg,

gautas mnn9-rekombinatinėse mielių ląstelėse, nuolat turėdavo dešimtadalį angliavandenių kiekio, lyginant su HBsAg, gautu iš "laukinio" tipo rekombinantinių ląstelių. Šie rezultatai rodo, kad HBsAg, pagamintas

5 mnn9⁻ mutantinių rekombinantinių mielių ląstelėse, turi žymiai mažesnę kiekį angliavandenių lyginant su HBsAg, gautu iš "laukinio" tipo mielių ląstelių.

Tolesni pavyzdžiai iliustruoja šį išradimą, tačiau jo

10 neapriboja. Kiekviena nuoroda, esanti pavyzdžiuose, atskleidžiama pačia nuoroda.

1 PAVYZDYS

15 HBV DNR klonavimas į pBR322

Iš žmogaus (nešiotojų) plazmos buvo išskirtos ir išvalytos Dane dalelės (serotipas adw), o dvigrandė DNR buvo susintetinta Dane dalelėse su endogenine

20 polimeraze remiantis metodais, aprašytais Landers, et. al., [J. Virology, 23, 368-376, (1977)] ir Hruska et al., [J. Virology, 21, (1977)]. DNR buvo išskirta po skaldymo SDS su Proteinaze K, ekstrakcijos fenoliu/chloroformu ir išsodinimo etanoliu. HBV

25 genomine DNR buvo suskaldyta EcoRI, gautas vienas 32kpb fragmentas buvo klonuotas į EcoRI saitą pBR322, sudarydamas pHBV/ADW-1. HBV DNR buvimas buvo patvirtintas skaldant EcoRI, Southern blotu ant nitroceliuliozės ir hibridizacija su [³²P] žymėta

30 oligonukleotidine proba.

2 PAVYZDYS

35 preS2+S Geno klonavimas į pGAP-tADH-2 ekspresijos vektorių

Plazmidė pHBV/ADW-1 (aprašyta 1 pav.) skaldoma EcoRI ir AccI ir 0.8 kbp fragmentas gryninamas preparatyvine agarozės gel-elektroforeze. Taip pat pUC plazmide skaldoma EcoRI ir BamHI ir linijinis vektorius gryninamas preparatyvine agarozės gel-elektroforeze.

Siekiant rekonstruoti preS2+S ASR 5' dalį, buvo susintetinta oligonukleotidų pora, kuri atstato ASR nuo EcoRI saito aukštyn iki ATG per 10 bp netransliuojamos lyderinės sekos per HindIII saitą iki EcoRI galo. Šių oligonukleotidų seka yra tokia:

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGCATGG (SEKOS NR: 2)
 1 10 20 30

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC GTCACCTTAA (SEKOS NR: 3)
 1 10 20 30

Siekiant rekonstruoti preS2+S ASR 3' dalį, buvo susintetinta antra oligonukleotidų pora, kuri atstato ASR nuo AccI saito per transliacijos terminatorių per HindIII saitą iki BamHI galo. Šių oligonukleotidų seka yra tokia:

ATACATTTA AGCTTG (SEKOS NR: 4)
 1 10 15

TGTAAATTTT GAACCTAG (SEKOS NR: 5)
 1 10 18

Nukleotidų poros buvo sulydytos, po to liguotas su pUC vektoriumi, skaldytu EcoRI-BamHI. Gautas vektorius (2.8 kbp) gryninamas preparatyvine agarozės gel-elektroforeze. EcoRI-AcoRI fragmentas (0.8 bp), aprašytas ankščiau, liguojamas šiuo vektoriumi. PreS2+S ASR atitikimas ir orientacija patvirtinama analizuojant restrikcijos endonukleazėmis ir Southern blotu. DNR

sekos analizė [Sanger et al., 1977] parodė, kad pakeistos dvi bazės, o tai sąlygojo skirtingą amino rūgščių seką, lyginant su seka, kurią koduoja plazmidės HBpreSGAP347/19T. Siekiant gauti abiejų konstrukcijų
 5 identiškus polipeptidus, šie pakeitimai, būtent, T vietoj C (bazė 64, koduojanti Phe vietoj Leu) ir C vietoj A (bazė 352, koduojanti His vietoj Gln, buvo atstatyti sait-mutagenezės būdu. [Zoller et al., Nucleic Acids Research, 10:6487-6500 (1982)].

10

Plazmidė, į kurios sudėtį įeina HBsAg koduojantis regionas be preS2 koduojančio regiono, buvo sukonstruota taip: pUCHBpreS2+S plazmidė (aprašyta aukščiau) skaldoma EcoRI ir StyI restrikcijos
 15 endonukleazėmis. Didelis DNR fragmentas (3.3 kbp), kurio sudėtyje yra pUC ir HBsAg koduojantis regionas, buvo atskirtas nuo preS2 koduojančio DNR fragmento ir išgrynintas preparatyvine agarozės gel-elektroforeze. Sintetinių DNR oligonukleotidų pora:

20

AATCAAGCT TACAAAACAA AATGGAGAAC ATCACATCAG GATTC (SEKOS NR: 6)
 1 10 20 30 40 45

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC CTCTGTAGT GTAGTCCTAA GGAT (SEKOS NR: 7)
 1 10 20 30 40 45

po to liguojama su pUCHBsAg fragmentu. Ši sintetinė oligonukleotidų pora turi 5' EcoRI ir 3' StyI lipnius
 25 galus, o už 5' EcoRI saito yra HindIII saitas. Be to, sintetinė DNR oligonukleotidų pora turi HBsAg ATG kodoną, aukščiau esančią 10 bp netransliuojamą lyderinę seką ir 21 žemiau esantį nukleotidą, kur yra StyI saitas.

30

Ši oligonukleotidų pora atstato pilną HBsAg koduojanti regioną ir įgalina jį pašalinti, jo nepažeidžiant, iš vektoriaus pUC pagrindu, skaldant HindIII.

pUC-HBsAg DNR vektoriaus liguotas su aukščiau aprašyta DNR oligonukleotidų pora buvo panaudotas E. coli transformacijai. Buvo parinktos plazmidės, turinčios
5 visiškai rekonstruotą HBsAg koduojantį regioną. Pilnas HBsAg atvirus skaitymo rėmelis (ASR) buvo pašalintas iš rekombinantinės plazmidės skaldant HindIII, po to preparatyvine agarozės gel-elektroforeze buvo išskirtas ir išgrynintas HBsAg DNR (0.7 kpb), skirtas klonavimui
10 į ekspresijos vektorių.

3 PAVYZDYS

15 HBsAg ASR klonavimas į tris skirtingus ekspresijos vektorius

Trys skirtingi ekspresijos vektoriai buvo panaudoti konstruojant HBsAg ekspresijos kasetes. GAP 491 promotoriaus ekspresijos kasetė, aprašyta ankščiau
20 [Kniskern et al., Gene, 46:135-141 (1986)], kuri sudaryta iš maždaug 1.1 kbp gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazės (GAPDH) promotoriaus ir maždaug 350 bp mielių alkoholdehidrogenazės I (ADHI) terminatoriaus pBR322 sekoje, turinčio unikalų HindIII saitą tarp
25 promotoriaus ir terminatoriaus. HBsAg ASR iš Pav. 2 buvo liguotas į unikalų HindIII saitą ir jo atitikimas bei orientacija patvirtinama analizuojant restrikcijos endonukleazėmis ir Southern blotu.

30 Kitu atveju, GAL10 promotorius (0.5 kbp) [Schultz et al., Gene, 54:113-123 (1987)] buvo pakeistas 1.1 kbp GAP promotoriumi aukščiau nurodytoje konstrukcijoje, ir (1,25 kbp) ADH2 promotorius [Kniskern et al., Hepatology, 8:82-87 (1988)] buvo pakeistas GAP
35 promotoriumi (žr. pav.1).

Kiekvienu atveju ekspresijos kasetė, kurios sudėtyje yra specifinis promotorius, HBsAg ASR ir ADH1 terminatorius, buvo klonuota į šaudyklinį vektorių pC1/1 (Beggs, supra; Rosenberg, et al., supra),
 5 siekiant sukurti mielinį ekspresijos vektorių, kuris buvo panaudotas S. cerevisiae transformacijai, kaip tai aprašyta žemiau.

4 PAVYZDYS

10

Mielių S. cerevisiae CF52 (mnn9⁻) mutantinio kamieno konstravimas

15

Mielių S. cerevisiae kamienas KHY 107 (cir⁺, adel⁺,
leu2⁻ ir mnn9⁻) buvo konstruojamas taip: alfa-poravimosi tipo kamienas CZ5/LB347-1C (mnn9⁻, SUCZ⁻) buvo poruojama su a tipo kamienu lėkštelėje su YEHD pilna terpe. Siekiant atrinkti diploidus, suporuoti kamienai buvo replikuojami į leu⁻ minimalią terpę, kurios sudėtyje
 20 kaip vienintelis anglies šaltinis yra 2% sukrozės. Atskyrus kolonijas, diploidai buvo sporuliuojami ir ascitas buvo suardytas naudojantis žinomais metodais. Kamienas KHY-107 buvo išskirtas kaip spora ir apibūdintas kaip cir⁺, adel⁺, leu2⁻ ir mnn9⁻ (naudojami
 25 šifo dažymo būdai).

30

KHY-107 (cir⁰) buvo išvestas iš kamieno KHY107 (cir⁺), aprašyta Broach darbe [Methods in Enzymology, 101, Part C, 307-325 (1983)]. Pagydytas kamienas tapo ura3⁻ integravus suskaldytą ura3 geną. Gautas kamienas KHY-107 ura3Δ, buvo auginamas turtingoje terpėje siekiant akumuliuoti spontanines mutacijas. Atrinktas kanavaninui atsparus mutanas. Komplementariais testais buvo parodyta, kad mutantinis kamienas CF55 yra can1⁻.
 35 Siekiant gauti galutinį šeimininko kamieną CF52 (Mata leu2-2, 112 ura3Δcan1 his3Δ ::GAL10pGAL4-URA3, cir⁰), GAL10pGAL4 ekspresijos kasetė buvo integruota į

CF55 HIS3 gena [Methods in Enzymology, 185, 297-309 (1990)] .

5 PAVYZDYS

5

Mielių transformavimas ir loto pagaminimas HBsAg mutantinėms CF52 mnn9⁻ mielėms, ekspresuojančioms HBsAg.

10

Plazmidė pC1/1 pGAL10HBsAg-tADH-1, aprašyta 3 pav., buvo panaudota S. cerevisiae CF52 kamieno transformacijai. Klonai buvo atrinkti ant minimalios terpės (leu⁻ su 1M sorbitoliu), pagamintas ir užšaldytas lotas (pavyzdžiai 17% glicerine). Toliau apdorojami kaip tai aprašyta žemiau.

15

6 PAVYZDYS

Mielių klonai, turintys ekspresijos plazmidę, aprašyta 5 pav., buvo patalpinti į leu⁻ selektyvias agaro lėkšteles, kuriose įdėta 1M sorbitalio, ir inkubuoti 2-3 dienas, esant 30°C. Šios mielės buvo inokuliuotos 5-7 ml kompleksinėje YENDS (YEHD +1M sorbitalio) terpėje. Kultūra inkubuojama esant aeracijai ir 30°C 12-18 val.

25 Kolbos, turinčios 50 ml kompleksinės YEHDS + 2% galaktozės terpės, buvo inokuliuotos aukščiau minėtomis kultūromis (iki pradinio A₆₀₀ = 0.1) ir inkubuojamas esant 30°C purtant (350 rpm) 72 valandas iki galutinio A₆₀₀ = 10-16. Pavyzdžiai, turintys 10 A₆₀₀ vienetų, buvo

30 padalinti į mėgintuvėlius ir mielių ląstelės tabletuotos centrifuguojant 10 minučių esant 2000 g. Pavyzdžiai buvo analizuojami iš karto arba saugomi užšaldyti esant -70°C. Analizei tabletės resuspenduojamos 0.4 ml fosfatiniame druskos buferyje

35 (PBS), turinčiame 2mM (PMSF). Mielių ląstelės homogenizuojamos taip: 1) pridėti 200-300 g plautų stiklinių karoliukų (0.45 nm), 2) maišyti 15 min.

Vortex tipo maišikliu, 3) pridėti TRITON X-100 iki 0.5% (tūris/tūris), 4) maišyti 2 min. Vortex tipo maišikliu, 5) inkubuoti 10-15 min. esant 4⁰C. Ląstelių nuolaužos ir stiklo karoliukai buvo atskirti centrifuguojant 13000 g 10 min. Supernatantas atskirtas ir nustatomas baltymo kiekis [pagal Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)] bei HBsAg kiekis (AUSRIA[®]) metodu (Abbott). Žemiau pateikti būdingi analizės rezultatai.

10

LENTELĖ I

Pavyzdys	AUSRIA, ug/mg baltymo	Homogenizavimas	P24 lygis Imunoblotas
<u>Purtomos kolbos</u>			
<u>mnn9⁻</u> mutantas	(0.55, 0.61, 0.53)	Stiklo karoliukai	+++
"laukinio" tipo (<u>mnn9⁺</u>)	(1.8)	Stiklo karoliukai	+

7 PAVYZDYS

15

S. cerevisiae (mnn9⁻), gaminančių HBsAg, auginimas dideliais kiekiais fermentatoriuje.

20

Užšaldyta rekombinantinių mielių kultūra buvo inokuluota į leu⁻ lėkštelės su 1M sorbitoliu. Apverstos lėkštelės inkubuojamos 2-3 dienas esant 28⁰C. Auginimas lėkštelėse buvo perkeltas į YEHDS terpę ir po to perkeltas į 2 l Erlenmejerio kolbą, kurioje yra 500 ml YEHDS ir 2% galaktozės. Kolba laikoma 18-22 val esant 28⁰C ir 350 rpm purtyklėje-inkubatoriuje su

25

kontroliuojama aplinka. Ši sėjamoji kultūra naudojama inokuliacijai gamybinio mastelio induose.

Inokuliatas (1-5% t/t) iš vienos ir daugiau kolbų
 5 perkeliamas į 16 l arba 250 l fermentatorių su
 atitinkamai 10 l arba 200 l YEHDS. Procesas 16 l
 fermentatoriuje vykdomas esant 500 rpm, 5 l/min
 aeracijai ir 28°C. Procesas 250 l fermentatoriuje
 vykdomas esant 160 rpm, 60 l/min aeracijai ir 28°C.
 10 Fermentacija baigiama praėjus 40-46 val po
 inokuliacijos sėjamoja kultūra. Optinis tankis
 dažniausiai būdavo 15.0 A₆₆₀ vienetų. Ląstelės
 koncentruojamos tuščiaavidurio pluošto filtravimo
 aparatu ir plaunamos buferiniais druskos tirpalais.
 15 Biomasa analizuojama kaip aprašyta žemiau arba laikoma
 užšaldyta esant -70°C iki tolesnio apdoravimo ir
 analizės.

Maži 20%-inės plautos biomasės pavyzdžiai buvo homoge-
 20 nizuojami 1.5 ml Ependorfo mėgintuvėliuose naudojant
 stiklo karoliukus (0.45-0.52 mm). Proteazėms inhibuoti
 buvo idėta PMSF (6.5 ul iš 200 mM koncentruoto
 tirpalo). Po homogenizavimo iš mėgintuvėlių buvo paim-
 tos ir užšaldytos alikvotos, skirtos imunoblotingui. Į
 25 mėgintuvėliuose likusį pavyzdį buvo pridėta iki 0.5%
 koncentracijos TRITON X-100, pavyzdžiai trumpai maišomi
 ir inkubuojami 20-40 min esant 4°C. Ląstelių nuolaužos
 pašalinamos centrifuguojant ir nuskaidrintame ląstelių
 ekstrakte analizuojamas antigeno (Ausria®) ir baltymo
 30 kiekis (Lowry).

8 PAVYZDYS

S Baltymo, esančio dalelių formoje, valymas imuninės
 35 afininės chromatografijos metodais.

Rekombinatinės S. cerevisiae mielės, sukonstruotos kaip aprašyta Pav. 5, buvo auginamos kolbose arba fermentatoriuose. Mielių ląstelės buvo koncentruojamos mikrofiltruojant aparatu Amicon DC-10, suspenduojamos 5 30 ml buferio A [0.1M Na₂HPO₄, pH 7.2, 0.5 M NaCl], homogenizuojamos Stanstedo presu, praleidžiant 7 kartus esant slėgiui 75-85 psi. Homogenizuota ląstelių suspensija (31 g drėgnos biomasės) praskiedžiama 120 ml buferio A, pridedama Tritono X-100, kol jo 10 koncentracija pasiekia 0.5 % (s/t), nuskaidrinama centrifuguojant 10 000 g 20 min esant 4⁰C. Skaidri terpė dekantuojama ir inkubuojama su Sepharose 4B, kuri konjuguota su antikūnais prieš HBsAg [McAleer et al., Nature 307: 178 (1984)], 19 valandų esant 4⁰C, siekiant 15 absorbuoti antigoną ant sorbento. Po inkubacijos sorbento tyrė atšildoma iki kambario temperatūros (šioje temperatūroje vykdomos visos tolesnės stadijos) ir 15 min vakuume šalinamos ištirpusios dujos. Nudujinta tyrė supilama į 2.5 x 40 cm kolonėlę. Kai 20 kolonėlė visiškai užpildoma, nesurištas baltymas nuplaunamas buferiu A. Antigenas eliuuojamas buferiu A, kurio sudėtyje yra 3 M KSCN. Frakcijos, turinčios antigeną, dializuojamos prieš 0.007 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 0.15 M NaCl esant 4⁰C ir sujungiamos į Dializuotą 25 afininį tirpalą, kurio 20 ml yra 1.08 mg baltymo. 16 ml Dializuoto afininio tirpalo praskiedžiama iki 40 ug/ml su 5.6 ml 0.006 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 0.15 M NaCl. Produktas sterilinamas filtruojant per Millex-GV 0.22 mikronų membraną. Produkto identiškumas diali- 30 zuotame afininiame tirpale buvo patvirtintas testuojant HBsAg Ausria[®] testu.

Lentelė 2

PAVYZDŽIO APRAŠYMAS	AUSRIA, ug/mg/baltymo	HOMOGENIZAVIMO METODAS
Fermentatoriai		
<u>mnn</u> 9 ⁻	(1.13, 1.10, 1.06)	Stiklo karoliukai
<u>mnn</u> 9 ⁻	(3.1, 4.4)	Manton-Gaulin
"laukinio" tipo	(3.3)	Manton-Gaulin

9 PAVYZDYS

5

Didelio kiekio rekombinantinio HBsAg valymas

Maždaug 250 g užšaldytų ląstelių (gaminančių rekombinantinį S baltymą) pastos resuspenduojama iki 17% (šlapias svoris/tūris, maždaug 1500 ml) koncentracijos fosfatiname druskos buferyje (PBS). Ląstelės šildomos vandens vonioje iki 45⁰C. Ląstelės išlaikomos 15 min esant 45⁰C ir atšaldomos ledu iki maždaug 10⁰C. Po to ląstelės homogenizuojamos, praleidžiant du kartus per Gaulin homogenizatorių.

Po homogenizacijos pridedama 10% Tritono X-100 iki galutinės 0.3% koncentracijos ir maišoma maždaug 15 minučių. Ląstelių ekstraktas centrifuguojamas prie 3600 g 20 minučių esant 4⁰C ir surenkamas supernatantas.

Supernatantas praleidžiamas per kolonėlę, kurioje yra maždaug 200 g XAD-2 dervos, siekiant pašalinti Triton X-100. Eliuentas leidžiamas tiesiai per kolonėlę, kurioje yra apie 150 g didelių porų silikagelio (porų dydis maždaug 1500 angstromų, dalelių dydis maždaug 50 mikronų). Naudojamų kolonėlių skersmuo yra 5 cm (Pharmacia), tekėjimo greitis maždaug 200 ml per valandą.

30

Silikagelio kolonėlė plaunama PBS, kol A_{280} grįžta iki bazinės linijos.

5 S Baltymas eliuuojamas iš silikagelio kolonėlės, naudojant iš pradžių šaltą boratinį buferį (50 mM, pH 8.7, 4°C, tekėjimo greitis maždaug 500 ml, per valandą), tol kol pastebimas A_{280} padidėjimas. Kai tik A_{280} pradeda kilti, kolonėlė pašildoma iki 55°C ir pradedamas leisti pašildytas iki 55°C boratinis buferis
10 (tekėjimo greitis 500 ml per valandą). Eliuatas (maždaug 1 l), kuriame yra S baltymas, surenkamas ant ledo. Po to eliuatas koncentruojamas maždaug iki 200 ml diafiltruojant prieš 50 mM boratinį buferį esant pH 8.7, naudojant tuščiavidurio pluošto diafiltracinį
15 aparatą, kurio molekulinio svorio riba yra 10^5 . Po to S baltymas filtruojamas per 0.2 mikrono filtrą ir saugomas. Produktas pasirodė stabilus: Western blot analizė nerodo jokio žymesnio skilimo.

20 10 PAVYZDYS

Angliavandenių kiekio analizė rekombinantiniuose HBV paviršiaus baltymuose.

25 Angliavandenių kiekis rekombinantiniuose HBV paviršiaus baltymuose buvo nustatytas Dubois metodu [Dubois, M. et al., Anal. Chem., 28, pp. 350, 1956]. Ši procedūra grindžiama tuo, kad paprasti sacharidai, oligosacharidai, polisacharidai ir jų dariniai, tarp jų
30 metilo eteriai, turintys laisvas arba potencialiai laisvas redukuojančias grupes, paveikti fenoliu arba koncentruota sieros rūgštimi, nusidažo oranžiniai geltona spalva. Spalvos intensyvumas, esant vienodai fenolio koncentracijai, yra proporcingas esančio
35 cukraus kiekiui.

Norint nustatyti HBsAg baltymo, susintetinto "laukinio" tipo mielėse ir mnn9⁻ mielėse, angliavandenių kiekį, į mėgintuvėlius talpinama po 1 ml tirpalo, kuriame yra nuo 10 iki 70 mikrogramų baltymo. Ruošiami angliavandenių standartai ir kontroliniai pavyzdžiai, kuriuose yra įvairūs kiekiai angliavandenių. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama po 1 ml 5% fenolio tirpalo, mėgintuvėlių turinys išmaišomas, pridedama 5 ml 96% sieros rūgšties ir išmaišoma. Mėgintuvėliai inkubuojami kambario temperatūroje 10 min, maišoma, po to inkubuojama dar 20 min, esant 25-30°C. Pavyzdžiai matuojami spektrofotometru (A₄₉₀ heksozėms ir metilintoms heksozėms, A₄₈₀ pentozėms, uroninei rūgščiai bei jų metilintiems dariniams) ir angliavandenių kiekis HBV paviršiaus baltymų pavyzdžiuose nustatomas lyginant su angliavandenių standartais.

Remiantis šiais rezultatais, buvo apskaičiuotas angliavandenių ir baltymo santykis kiekviename pavyzdyje, dalinant angliavandenių mikrogramus iš pavyzdyje esančio baltymo kiekio, kaip parodyta žemiau.

Angliavandenių - baltymo santykis HBsAg baltyme

<u>Mielių kamienas</u>	<u>Angliavandeniai/baltymas</u>
<u>mnn9⁻</u>	0.05
"laukinio" tipo glikozilinimo atžvilgiu	0.56

Šis santykio skaičiavimas parodė, kad HBsAg, gautas mnn9⁻ rekombinantinėse mielių ląstelėse, nuolat turėdavo dešimtadalį angliavandenių kiekio, lyginant su HBsAg, gautu iš "laukinio" tipo rekombinantinių mielių ląstelių. Šie rezultatai rodo, kad HBsAg, pagamintas mnn9⁻ mutantinių rekombinantinių mielių ląstelėse, turi

daug mažesni kiekį angliavandenių lyginant su HBsAg, gautu iš "laukinio" tipo rekombinantinių mielių ląstelių.

5 Sekų sąrašas

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 1:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

10

(A) ILGIS: 10 bp

(B) TIPAS: nukleininė rūgštis

15

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA: tiesinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

20

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 1;

ACAAAACAAA

25 (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 2:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 30 bp

30

(B) TIPAS: nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

35

(D) TOPOLOGIJA: tiesinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 2;

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGCAGTGG

5

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 3:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

10

(A) ILGIS: 30 bp

(B) TIPAS: nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

15

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

20

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 3;

GTTCGAATGT TTTGTTTTAC GTCACCTTAA

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 4:

25

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 15 bp

30

(B) TIPAS : nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

35

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 4;

ATACATTTAA GCTTG

5 (2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 5:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 18 bp

10

(B) TIPAS : nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

15

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 5;

20

TGTAAATTTTC GAACCTAG

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 6:

25 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 45 bp

30

(B) TIPAS : nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

35 (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 6;

AATTCAAGCT TACAAAACAA AATGGAGAAC ATCACATCAG GATTC

INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 7:

5

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 45 bp

10

(B) TIPAS : nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

15

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 7;

20

GTTCGAATGT TTTGTTTAC CTCTTGTAGT GTAGTCCTAA GGATC

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 8;

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

25

(A) ILGIS: 29 bp

(B) TIPAS : nukleininė rūgštis

30

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

35

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 8;

AATTGTCGAC AGCTAGCTGA ATTCCCGGG

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ NR. 9:

5 (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 29 bp

10 (B) TIPAS : nukleininė rūgštis

(C) GRANDŽIŲ KIEKIS: viena grandis

(D) TOPOLOGIJA : tiesinė

15 (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA NR. 9;

AGCTCCCGGG AATTCAGCTA GCTGTCGAC

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Hepatito B viruso paviršiaus baltymas, kuris sudaro daleles, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi žymiai mažesni, įsiterpusių angliavandenių arba glikoproteinų kiekį. 5
2. Hepatito B viruso paviršiaus baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį gamina rekombinantinėse mielių ląstelėse, kurios genetiškai negali glikozilinti baltymų. 10
3. Hepatito B viruso paviršiaus baltymas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad genetinis mielių ląstelių trūkumas yra mnn9 gene. 15
4. Hepatito B viruso paviršiaus baltymas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad angliavandenių ir baltymo santykis išvalytame paviršiaus baltyme yra mažesnis nei 0.5. 20
5. Vakcina prieš hepatito B virusą, skirta naudoti žmonėms, kurios sudėtyje yra hepatito B paviršiaus baltymas, sudarantis daleles, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad dalelės turi žymiai mažesni, įsiterpusių angliavandenių arba glikoproteinų kiekį. 25
6. Vakcina pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ją sintetina rekombinantinėse mielių ląstelėse, kurios genetiškai negali glikozilinti baltymų. 30
7. Vakcina pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad genetinis mielių ląstelių trūkumas yra mnn9 gene. 35

8. Vakcina pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i
tuo, kad angliavandenių ir baltymo santykis išvalytame
paviršiaus baltyme yra mažesnis nei 0.5.
- 5 9. Imunologinis diagnostinis reagentas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad į jo sudėtį įeina hepatito B
viruso baltymas, sudarantis daleles, kuris turi daug
mažesni, išiterpusių angliavandenių arba glikoproteinų
kieki ir pasižymi sumažintu reaktingumu gamtoje
10 sutinkamų antimielinų antikūnų atžvilgiu.
10. Imunologinis diagnostinis reagentas pagal 9 punktą,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad angliavandenių ir
baltymo santykis išvalytame paviršiaus baltyme yra
15 mažesnis nei 0.5.

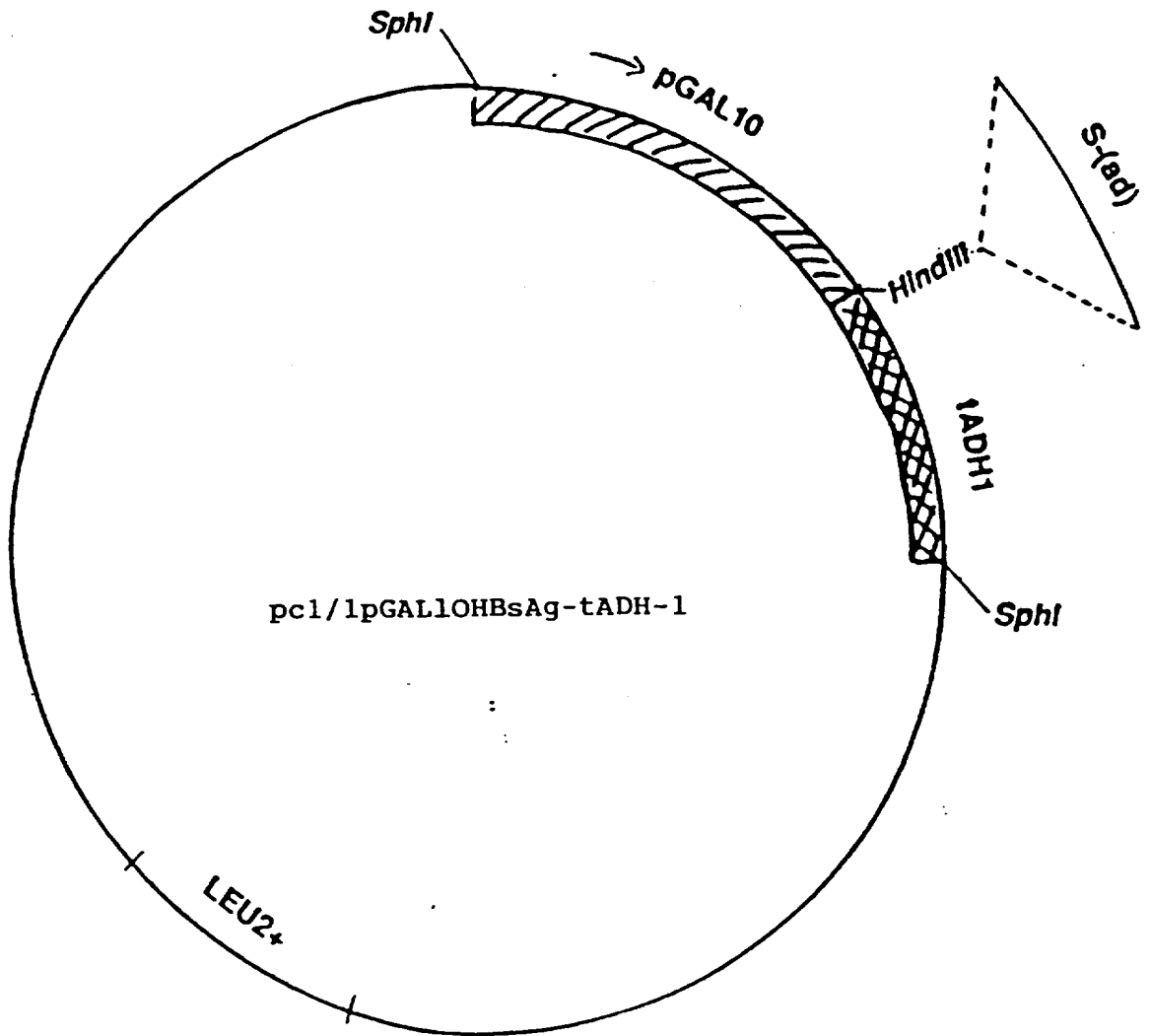


Fig. 1