

(11) Patento numeris: **3916**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/18**

(21) Paraiškos numeris: **IP1819**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 04 25**

(60) SU duomenys: **SU 4830848, 1990 08 20**

(31,32,33) Prioritetas: **704362, 1985 02 22, US 824202, 1986 02 04, US**

(72) Išradėjas:
Gwen Grabowski Krivi, US

(73) Patento savininkas:
MONSANTO COMPANY, 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, US

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Kiaulės augimo hormono gavimo būdas

(57) Referatas:

Pasiūlytas kiaulės augimo hormono gavimo būdas, apimantis kDNR, koduojančios kiaulės augimo hormoną, gavimą, kDNR įterpimą į bakterinę plazmidę, *Escherichia coli* kamienų transformaciją gauta rekombinantine plazmide, klonų, kuriuose yra rekombinantinės plazmidės, atranką ir kDNR iš šių plazmidžių įterpimą į ekspresijos vektorių po to sekančia *Escherichia coli* kamienų transformaciją gauta rekombinantine plazmide, transformuotų kamienų atranką, kultivuojant terpėje, galutinio produkto išskyrimą ir gryninimą.

Šis išradimas - tai kiaulės augimo hormono gavimo būdas, apimantis kDNR, koduojančios kiaulės augimo hormoną, gavimą, kDNR įterpimą į bakterinę plazmidę, *Escherichia coli* kamienų transformacija gauta rekombinantine plazmide, klonų, kuriuose yra rekombinantinės plazmidės, atranką ir kDNR iš šių plazmidžių įterpimą į ekspresijos vektorių po to sekančia *Escherichia coli* kamienų transformacija gauta rekombinantine, plazmide, transformuotų kamienų atranką, kultivavimą tikslinio produkto išskyrimą ir gryninimą.

Genų ekspresija eukariotuose ir prokariotuose, nors ir naudojamos vienos ir tos pačios pagrindinės genų transkripcijos ir informacinę RNR (iRNR) stadijos ir po to sekančios šios iRNR transliavimas į baltymus, naudoja šiose stadijose įvairius viduląstelinis reguliatorių derinius.

Be to, eukariotuose dauguma tikslinių baltymų iš pradžių transliuojami kaip probaltymai, tai yra, kaip polipeptidai, kuriuose be tikslinio baltymo sekos yra lyderinė arba signalinė seka. Eukariotinė iRNR koduoja pilną probaltymą, kuris po transliacijos pakeičiamas taip, kad pašalinama lyderinė seka ir gaunamas tikslinis baltymas. Eukariotų ląstelėse yra procesingo sistema, kurios pagalba probaltymai paverčiami į tikslinius baltymus, prokariotų ląstelės nesugeba atpažinti eukariotiniuose baltymuose esančių procesingo signalų. Tokiu būdu, jei pilna komplementarios eukariotų DNR (kDNR) transkriptai, iRNR, kuri naudojama kaip DNR seka ekspresijai prokariotuose, tai gaunamas probaltymas, o ne tikslinis baltymas, po to laboratorinėmis sąlygomis galima gauti tikslinius baltymus, bet toks būdas labai imlus.

Tuo atveju, kai tikslinio baltymo ekspresijai prokariotuose naudojama DNR seka, koduojanti pilną baltymą,

šioje sekoje nėra eukariotų transliacijos ir potransliacinių signalų, kurie bendru atveju yra pagrindinės DNR sekos viduje. Todėl tam, kad ekspresuoti klonuotus eukariotų genus arba kitas heterologines DNR sekas prokariotuose, kaip buvo nustatyta, pageidautina naudoti prokariotinius kontrolės signalus, nes jie yra efektyvesni, o eukariotiniai signalai neatpažistami prokariotinių recipientų.

Terminas "heterologinė DNR", naudojamas šiame išradime, reiškia tokia DNR, kurios bent dalies nėra recipiento ląstelės genome. Heterologinės DNR pavyzdžiai yra virusiniai ir eukariotiniai genai, genų fragmentai, alelinės ir sintetinės DNR sekos. Terminas "heterologinis baltymas" arba "heterologinis polipeptidas" šiame išradime reiškia baltymą arba polipeptidą, kurių bent dalis nėra koduojama recipiento genome.

Prokariotiniai valdymo signalai yra promotorius, kurio pagalba nurodomas transkripcijos iniciavimas, transliacijos valdymo signalai, kuriuose yra ribosomos surišimo sritis, transliacijos pradžios ir pabaigos signalai. Visi šie signalai, išskyrus transliacijos pabaigos signalą, turi būti prieš eukariotinį geną arba kitą DNR, kuriuos norima ekspresuoti.

Žinomi keli heterologinės DNR (pavyzdžiui, eukariotinių genų) ekspresijos prokariotuose būdai. Pagal vieną iš jų, DNR segmentas, koduojantis norimą baltymą, liguojamas su DNR, koduojančia visą bakterinį baltymą arba jo dalį, su bakteriniu promotoriumi. Endogeninėje prokariotinėje DNR būtina būti ribosomos surišimo sritis ir transliacijos pradžios signalas. Tokios liguotos DNR ekspresijos produktas yra sulietas baltymas, kuriame yra eukariotinis polipeptidas sujungtas arba sulietas su visu arba dalimi bakterinio baltymo. Eukariotinį baltymą galima gauti selektyviu fermentiniu

arba cheminiu skaldymu eukariotinio ir endogeninio baltymo suliejimo srityje arba selektyviai suskaldant prokariotines sekas.

- 5 Darbu, kuriuose aprašyta eukariotinių baltymų ekspresija bakterijose, pavyzdžiai yra paraiška Europos patentui Nr. 47 600 (publikuota 1982 m. kovo 17 d.), joje aprašomas sulietų baltymų ir "vientisų" baltymų, kuriuose yra jaučio augimo prohormonas arba jaučio
- 10 augimo hormonas ("jAH") baltymo C gale ir prokariotinio baltymo dalis N baltymo gale gavimas, paraiška Didžiosios Britanijos patentui Nr. 2073 245A (publikuota 1981 m. spalio 14 d.), joje aprašomas sulieto baltymo jAH ir *E. coli* β -laktamazės gavimas; E. Kešet ir kt.
- 15 Nucleic acid Research, 9: 19-30 (1981) aprašomas sulieto baltymo jAH ir *E. coli* β -laktamazės gavimas; paraiškoje Europos patentui Nr. 95361 (publikuota 1988 m. lapkričio 30 d.) aprašomas sulieto baltymo, kurio N gale yra endogeninis baltymas, amino rūgšties liekana -
- 20 transkripcijos pradžios signalas - enterokinazės skėlimo sritis ir egzogeninis baltymas (pavyzdžiui, augimo hormonas) C baltymo gale. Toks būdas nėra tinkamas, nes, išgryninus sulietą baltymą, reikia jį laboratorinėmis sąlygomis perskelti fermentu, o šio fermento
- 25 kaina, tai darant pramoniniu būdu, gali būti limituojanti.

- Vis dėlto, sulietų baltymų sistema tapo patrauklia sistema kai kurių eukariotinių genų arba kitų heterologinių DNR ekspresijai prokariotų ląstelėse, nes sulietas baltymas nėra veikiamas proteinazių ir heterologinis baltymas lieka nepažeistas. Bakterijų ląstelės "atpažįsta" kai kuriuos eukariotinius baltymus, produkuojamus ląstelėje kaip "svetimus" ir tokiu būdu
- 30 stengiasi suskaldyti šiuos baltymus iš karto po jų sintezės arba po tam tikro trumpo intervalo. Sulietuose baltymuose, sudarytuose, norint išvengti tikslinio bal-
 - 35

tymo proteinolizės, gali būti endogeninės polipeptidų sekos N gale arba C heterologinio baltymo gale. Tokios konstrukcijos pavyzdys aprašomas paraiškoje Europos patentui Nr. 111814 (publikuota 1984 m. birželio 27 d.);
5 aprašomas sulieto baltymo, kuriame yra tam tikra jAH forma, turinti sintetinę baltymo pradžią (N galas), ir *E. coli* β -galaktozidazę C baltymo gale. Bet visi privalumai vėl sumenkėja, nes reikia sulietą baltymą atskelti nuo endogeninio baltymo, aukščiau aprašytu būdu.

10 Pagal kitą būdą transliacijos pradžios signalas ATG, esant reguliuojamam bakteriniam promotoriui, yra prieš pat DNR seką, koduojančią heterologinį (pavyzdžiui, eukariotinį) baltymą, kurio nei N, nei C gale nėra endogeninio baltymo. Nors tokių baltymų ir nereikia po išskyrimo skaldyti, bet šiuo būdu gauti baltymai turi N gale metioniną (atskirais atvejais - formilmetioniną), nes startinis kodonas ATG yra ir metionino kodonas. Jei tikslinis baltymas prasideda ne metioninu, tai tokiu
15 būdu gauto baltymo N gale bus papildoma amino/rūgšties liekana - metioninas.

Tokios konstrukcijos pavyzdys yra: Harent ir kt., Cell, (1980), t. 20, p. 543-553, kur triušio β -globino genas,
25 kurio N gale yra valino liekana, ekspresuojamas *E. coli* ląstelėse, naudojant tik ką aprašytą konstrukciją. Ištyrus, buvo nustatyta, kad triušio β -globino N gale nėra metionino liekanos, o leucino liekanos yra 3, 14, 28, 31, 32 ... padėtyse. Žymėtam baltyme leucino liekanos buvo nustatytos 4, 15, 29, 32 ir 33 padėtyse, o metionino liekana nustatyta 1 padėtyje. Tai demonst-
30 ruoja, kad šis baltymas yra triušio β -globinas plus metionino liekana N baltymo gale, kuri nėra nuskeliama *E. coli* ląstelėje, žiūr. ten pat p. 546-547.

35 Kitas pavyzdys yra augimo hormono gavimas bakterijose, naudojant aukščiau aprašytą konstrukciją. Šoter ir kt.,

- Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1984), t. 81, p. 5403-5407, kur aprašoma jAH aukštos ekspresijos bakterijose sistema, kurios pagalba gaunamas N-metioninis jAH, t.y., junginys, kurio amino rūgščių liekanų seka yra tokia
- 5 pat kaip ir vieno iš gamtoje sutinkamų jAH formų plus metionino liekana N baltymo gale. Metionino liekanos prijungimas įvairių augimo hormono formų N gale, sintetinamų bakterijose, buvo nagrinėjamas paraiškoje Europos patentui Nr. 103395 (publikuota 1984 m. kovo
- 10 30 d.) ir paraiškoje Europos patentui Nr. 74 444 (publikuota 1983 kovo 30 d.) jAH atveju ir Siburg ir kt., DNA (1983), t. 2, p. 37-45 jAH ir kiaulės augimo hormono ("kAH") atvejais.
- 15 Metionino liekanos prijungimas natyvaus baltymo N gale gali būti nepageidautinas dėl kelių priežasčių. Pirmiausia, gali būti (nors šiuo metu tai mažai tikėtina), kad baltymas su papildoma metionino liekana yra antigenas tame organizme, kur šis baltymas be metionino
- 20 liekanos baltymo N gale yra endogeninis. Antra, papildoma metionino liekana N baltymo gale gali sumažinti šio baltymo biologinį aktyvumą arba pakeisti jo fizikines savybes. Trečia, ši modifikuota baltymo forma gali būti netinkama natyvaus baltymo funkcijos pri-
- 25 klausomybės nuo jo struktūros tyrimams. Be to, pageidautina medicininiams ir veterinariniams tikslams naudoti biosintetinį baltymą, kuris yra labiausiai artimas gamtiniam.
- 30 Pastaruoju metu didelis dėmesys skiriamas prokariotų, tokių kaip bakterijos, sugebėjimui pašalinti metionino liekaną baltymo N gale sintezės metu ir po jos. Pavyzdžiui, Waller, J. Mol. Biol., (1963), t. 7, p. 483-496 ištyrė *E. coli* belastelinio ekstrakto "tirpių"
- 35 ir ribosominių baltymų amino liekanas N baltymų galuose, paraiškoje Europos patentui Nr. 103 395 (publikuota 1984 m. kovo 21 d.) pateikiamas metionino lie-

kanos eukariotinio baltymo, sintetinamo *E. coli*, N gale pašalinimo būdas. Metionino liekana pašalinama iš dviejų minimų jAH, susintetintų bakterijose, šiuose abiejuose baltymuose po metionino liekanos N baltymų 5 gale yra serino liekana. Geno konstrukcija, kuri buvo naudojama šiuose tyrimuose, buvo sudaryta iš sintetinės startinės sekos, kuri kodavo 5'-metioninas-serinas-leucinas-3', ir kuri buvo įterpiama prie 5'-galo sekos, koduojančios jAH, iš kurios buvo iš anksto pašalinamos pirmosios 4 arba 9 gamtinio baltymo aminorūgščių liekanos. Tokiu būdu, sintetinamas *E. coli* ląstelėse baltymas, nebuvo natyvus. Paraiškoje Didžiosios Britanijos patentui Nr. 2073245A (publikuota 1981 m. spalio 14 d.) nurodoma, kad jei Met ir Pro, tiksliniame jAH baltyme 15 yra pakeisti Ala, tai "Met nuskeliamas bakterijose, ir gaunamas modifikuotas jAH, prasidedantis aminorūgščių liekanų seka Pro-Phe-Ala-Pro".

Tokiu būdu, reikalingas ekonomiškai ir aprašomas heterologinių (pavyzdžiui, eukariotų) baltymų, kuriuose nebūtų pirmos aminorūgšties liekanos - metionino - tokiuose mikroorganizmuose, kaip bakterijos, gavimo būdas. Ypatingai pageidaujamas toks būdas, kurio pagalba tokie baltymai gaunami bakterijose, kurias naudojant nereikėtų papildomo baltymo apdorojimo po fermentacijos ir gaunamas baltymas neturėtų papildomos metionino liekanos baltymo N gale. 20

Augimo hormonai (taip pat vadinami somatotropiniais) yra polipeptidai, produkuojami ir sekretuojami hipofizio ląstelėse, jie pasižymi rūšiniu specifiškumu. Be skeleto augimo padidėjimo, augimo hormonai įtakoja daugumą metabolizmo procesų: stimuliuoja pieno išsiskyrimą, padidina insulino ir gliukagono išsiskyrimą; jų pagalba pasireiškia lipidų mobilizacijos efektas. Naudojant jAH stambiams raguočiams, pavyzdžiui, padidėdavo primelžto pieno kiekis, efektyviau buvo naudojami pašarai ir/arba 30 35

padidėdavo prieaugis, trumpėdavo penėjimo laikas ir padidėdavo liesos mėsos kiekis palyginus su riebalais. Bet iki šiol pilnai neaišku, kokių būdu šis hormonas iššaukia šiuos efektus.

5

Platus tyrimai, atlikti su žmogaus augimo hormonu (žAH), parodė, kad hipofizyje yra sekretuojamas ne vienas augimo baltymas, o polipeptidų mišinys. Frakcionuojant šias įvairias žAH formas, buvo gautos žAH frakcijos, kurios nepasižymėjo diabetogeniniu aktyvumu ir frakcijos, kurios nepasižymėjo lipolitiniu aktyvumu.

10

Taip pat jAH sutinkamas stambiuose raguočiuose yra kelių formų. Sintetinės keturios jAH formos, kuriose yra skirtingos aminorūgščių liekanos dvejose padėtyse. Baltymo N gale aminorūgšties liekana gali varijuoti dėl nepilno signalinės sekos pašalinimo, todėl subrendęs baltymas prasideda $\text{NH}_2\text{-Phe-Pro}$ arba $\text{NH}_2\text{-Ala-Phe-Pro}$. Be to, gali būti skirtingos aminorūgščių liekanos 126 padėtyje: tai gali būti arba Leu, arba Val. Tai, matyt, apspręsta alelinėmis populiacijos variacijomis. Willis (1969) FEBS Letters, 3, p. 118-120; Fellous ir Rogol (1969) J. Biol. Chem. 224, p. 1567-1575; Feriades ir kt. (1971) FEBS Letters, 18, p. 53-54, Felloys (1973) personalus komentaras, pateikiamas Recent Progress in Hormone Research, 29, p. 404; Santoyne (1973) Eur. J. Biochem., 37, p. 164-170; Graf ir Li (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm., 56, p. 168-176. Šiuose darbuose išskiriamos keturios molekulinės hipofizinio jAH formos:

25

30

Sutrumpinimas

Seka

jAH(L)	$\text{NH}_2\text{-Phe(1)-Pro(2)...Leu(126)...COOH}$
jAH(A, L)	$\text{NH}_2\text{-Ala(-1)-Phe(1)-Pro(2)...Leu(126)...COOH}$
jAH(V)	$\text{NH}_2\text{-Phe(1)-Pro(2)...Val(126)...COOH}$
jAH(A, V)	$\text{NH}_2\text{-Ala(-1)-Phe(1)-Pro(2)...Val(126)...COOH}$

- Formos jAH(A, V) ir jAH(V) kartais vadinamos bendru pavadinimu "Valininės alelinės jAH formos" arba "Valininės jAH formos". Lygiai taip pat jAH(A, L) ir jAH(L) formos kartais vadinamos bendru pavadinimu "Leucininės alelinės jAH formos" arba "Leucininės jAH formos". Skaičiai prie aminorūgščių liekanų aukščiau nurodytose jAH baltymų sekose, naudojami tik identifikacijai ir nuorodų patogumui.
- 10 Mills ir kt. (1970) J. Biol. Chem. 245, p. 3407-3415, taip pat identifikavo du bromciano pagalba perskeltus kiaulės augimo hormono (kAH) fragmentus, kurių N galai buvo skirtingi. Viename fragmento N gale buvo fenilalaninas, kitame - papildomas N gale alaninas. Šios kAH
- 15 molekulinės formos toliau, atitinkamai, trumpinamos kAH(F) ir kAH(A).
- 20 Pilnos DNR sekos, koduojančios atitinkamas jAH(L) ir kAH(F) amino-rūgščių liekanų sekas buvo paskelbtos Si-burgo ir kt. DNA (1983), 2, p. 37-45, šis darbas naudojamas šiame išradime nuoroda.
- 25 Atskirų rūšių stambių raguočių hipofizio ląstelės, kaip buvo nustatyta bendru atveju, produkuoja augimo hormonų mišinį: jAH(A, L) ir jAH(L) arba jAH(A, V) ir jAH(V). Analizuojant jAH, gautų, kultivuojant hipofizio ląsteles baltymų N galus, buvo nustatyta, kad preparatuose yra molekulių mišinys santykiu 50:50; vienose N baltymo gale yra fenilalaninas (Phe), kitose - alaninas (Ala).
- 30 Preparatuose, pagamintuose pramoniniu būdu iš surenkamų daugelio gyvūnų hipofizių, yra visos keturios jAH formos. Be to, žinoma, kad jAH preparatuose, gautuose iš surenkamų hipofizių, maždaug 30% molekulių yra leucinas 126 pozicijoje pakeistas valinu (Fernandes ir
- 35 kt., (1971) FEBS Letters, t. 18, p. 53-54). Standartiniais biocheminiais metodais negalima atskirti arba išskirti šias keturias formas pramoniniu būdu.

Pageidautina ištirti ir pagaminti augimo hormono preparatus pramoniniais kiekiais, kuriuose būtų paminėtos atskiros jAH formos, besiskiriančios savo biologiniu aktyvumu, naudojant vieną iš keturių paminėtų hormono formų, kurių preparatuose nebūtų vienos formos arba kitų iš likusių trijų, ir/arba kad šiuose preparatuose nebūtų kitų jaučio baltymų priemaišų. Terminas "pagrindinai švarus" šiame išradime naudojamas, charakterizuojant specialaus baltymo arba baltymų; reiškia, kad baltymo preparate nėra baltymų ir/arba kitų medžiagų, su kuriomis baltymas (baltymai) yra susirišę natyviomis sąlygomis arba jo šaltinyje. Dėl šios ir kitų priežasčių, šio išradimo tikslas yra kiaulės augimo hormono gavimas, išskiriant kDNR, koduojančią kiaulės augimo hormoną, įterpiant kDNR į bakterinę plazmidę, transformuojant *E. coli* kamienus gauta rekombinantine plazmide, atrenkant klonus, kuriuose yra rekombinantinė plazmidė, ir įterpiant kDNR iš šių plazmidžių į ekspresijos vektorių ir po to sekančia transformacija gauta rekombinantine plazmide, tam kad ekspresuoti baltymą *E. coli* kamienuose, atrenkant transformuotus kamienus, kultivuojant kultūrinėje terpėje, išskiriant ir išgryninant tikslinį produktą.

25 Konkrečiai šio išradimo tikslas yra kAH(A) gavimas.

kAH polipeptidai, gauti pagal šio išradimo būdą, pasižymi tokiomis somatotropinėmis savybėmis, kaip pieno išsiskyrimo padidėjimas, augimo padidėjimas ir/arba efektyvesnis pašarų panaudojimas.

Pateikiamuose brėžiniuose diagramose punktyriniu kontūru pavaizduota DNR seka, koduojanti bakterinį promotorių, ištušutas kontūras yra heterologinės DNR koduojanti seka, brūkšneliais pavaizduota papildomos koduojančios DNR sekos (jos konkrečiai pavaizduotos piešinėliuose) rodykle parodoma koduojančių DNR sekų

orientacija 5' ir 3'. Taip pat nurodomos atitinkamos skėlimo sritys. Pažymėtos DNR sritys yra pateikiamos vaizdumui ir jos nesusietos su realiais šių sričių dydžiais.

5

Fig. 1 pavaizduota konstrukcija M13mp8/XbaI, kurioje yra vektorius M13mp8, kuriame SmaI restrikcijos srityje įterptas XbaI fragmentas.

10

Fig. 2 pavaizduota konstrukcija M13mp8/BGH_{ex-1}, kurioje yra M13mp8/XbaI, koduojanti jAH(L) DNR seka.

15

Fig. 3 pavaizduota konstrukcija DNR, koduojančios jAH(A, L), naudojant kryptingą oligonukleotidų mutagenę specialioje srityje.

20

Fig. 4 pavaizduota konstrukcija DNR, koduojančios jAH(A, V), naudojant kryptingą oligonukleotidų mutagenę specialioje srityje.

25

Fig. 5 pavaizduota ekspresijos vektoriaus pMON3209 konstrukcija su pBGH_{ex-1}, kurioje yra koduojanti jAH(A, L) DNR seka vietoje koduojančios jAH(L) DNR sekos.

30

Fig. 6 pavaizduota ekspresijos vektoriaus pMON3215 konstrukcija su pBGH_{ex-1}, kurioje yra koduojanti jAH(A, V) DNR seka vietoje koduojančios jAH DNR sekos.

Fig. 7 pavaizduota konstrukcija M13mp9/PGH_{ex-1}, kurioje yra M13mp9, kurioje yra koduojanti kAH(F) DNR seka.

35

Fig. 8 pavaizduota konstrukcija DNR, koduojančios kAH, gauta naudojant kryptingą oligonukleotidų mutagenę specialioje srityje.

Fig. 9 pavaizduota konstrukcija $pBGH_{ex-1^*}$ su $pBGH_{ex-1}$ kurioje EcoRI skėlimo sritis, esanti į viršų, nuo 5' galo, koduojančio ptro, buvo iš anksto pašalinta.

5 Fig. 10 pavaizduota ekspresijos vektoriaus pMON3213, kuriame yra $pBGH_{ex-1^*}$, konstrukcija, kurioje yra DNR seka, koduojanti kAH(A), vietoje DNR sekos, koduojančios jAH(L).

10 Pagal šį išradimą pateikiamas heterologinio polipeptido, tokio kaip eukariotinis (pavyzdžiui, žinduolio arba paukščio) baltymas, kurio N gale yra alaninas, gavimo prokariotuose būdas. Tokiu būdu, gaunamas polipeptidas be papildomo metionino jo N gale. Pastovus
15 tokio polipeptido, kurio N gale nėra metionino, kuris yra gene, koduojančiame polipeptidą, gavimas yra naujas ir nelauktas rezultatas.

Pagal šį išradimą pateikiamas efektyvus pagrindinai
20 švarių baltymų, kurių N gale yra alaninas, gavimo būdas. Tokie baltymai gali būti, be kokių nors apribojimų, minėti jaučio ir kiaulės somatotropinai ir jų variantai, augalų baltymai, konkrečiai, nedidelis subvienetas riboz-1,5-bisfosfatkarboksilazė, gliutatio-
25 S-transferazė ir termo šoko baltymas 70. Be to, šis išradimas gali būti efektyviai panaudotas, norint gauti kitus polipeptidus, kai pageidaujama, kad N gale būtų alaninas, o ne metioninas. Gali būti naudinga, kad N gale būtų alaninas, o ne metioninas, pavyzdžiui, nes
30 alanino forma gali būti mažiau imunogeniška, arba pasižymėti kitomis fizikinėmis savybėmis arba modifikuotu biologiniu aktyvumu.

Šio išradimo realizavimo pavyzdžiai, kai gaunamos at-
35 skiros jAH arba kAH formos, kultivuojant bakterijų ląsteles, kai šių baltymų N gale nėra metionino todėl nereikalingas jo pašalinimas. Visuose jAH, homologiško

gamtiniam, ekspresijos bakterijose darbuose gaunami baltymai su metioninu baltymo N gale. Straipsnyje Siburgo ir kt., DNR, (1983), t. 2, p. 37-45, 44 puslapyje nurodyta, kad jAH, kurių N gale yra fenilalaninas, pavyzdžiui, jAH(L), sąmoningai pasirenkama jo ekspresija *E. coli* ląstelėse, kad išvengti antros hidrofobinės aminorūgšties liekanos (metionino) prisijungimo prie hidrofobinio alanino, esančio baltymo N gale, pavyzdžiui jAH(A, L). Tokiu būdu, prieinami iki
10 šiol atlikti tyrimai rodo, kad išlieka baltymo, sintetinamo bakterijose, N gale metioninas. Nežiūrint į tai, pareiškėjai nustatė, kad dėl priežasčių, nurodytų aukščiau, būtina gauti kiekvieną iš dviejų formų jAH, jAH(A, L) ir jAH(A, V) ir kiaulės augimo hormono formą
15 kAH(A). Šių somatotropinų gavimo bandymai bakterijose buvo atlikti, laukiant, kad bus sintetinami baltymai, kurių N gale bus metioninas.

Šio išradimo realizavimo pavyzdžiuose detaliai aprašytas pareiškėjų metodas, kurio pagalba bakterijose gaunami jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH. Trumpiau, šis metodas gali būti aprašomas sekančiais. DNR sekos, koduojančios minėtus baltymus, sudaromos kryptingos mutagenezės tam tikroje DNR sekoje, kuri koduoja jaučio ir kiaulės somatotropinus, kurių N baltymų gale yra fenilalaninas, nukleotidų srityje, tai parodyta Fig. 3, 4 ir 8. Po to sekos, koduojančios jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH, įterpiamos į ekspresijos vektorius, tokiu būdu, kad galutinė geno seka yra: promotorius, surišimo su
25 ribosomomis sritis, ATG pradžios kodonas (metioninas, esantis prie DNR sekos, koduojančios arba jAH(A, L), arba jAH(A, V), arba kAH(A), ir transliacijos pabaigos kodonas. *E. coli* kultūra transfekuojama gautu ekspresijos vektoriumi, kuriame yra norimas genas, kultivuojama tokiose sąlygose, kad būtų ekspresuojamas tikslinis heterologinis baltymas. Gauti baltymai analizuojami, nustatant jų seką ir biologinį aktyvumą.

Tokiu būdu, pagal šią išradimą, gaunama, kai DNR seka, kurioje yra transliacijos kodonas (metioninas) po to iš kart heterologinio polipeptido, kurio N gale yra alaninas, kodonai, tai išskirtame iš prokariotinio mikro-
5 organizmo baltyme, iš tikrųjų, N gale yra alaninas, o ne metioninas. Panašu, kad analogiškas rezultatas gali būti gaunamas, jei alanino kodonas yra po apytikriai trijų vienas po kito einančių metionino kodonų, kurie apima iRNR transliavimo pradžią į tikslinį polipeptidą.
10 Pavyzdžiui, DNR, kurios sudėtyje yra transliacijos pradžios signalas ir tikslinio polipeptido kodonai, gali būti bet kokia seka, kuri atitinkamai koduoja Met-Ala, Met-Met-Ala, Met-Met-Met-Ala arba bet kokią jo funkcinių ekvivalentą.

15 N-alanininis polipeptidas apibrėžiamas, kaip polipeptidas, kurio N gale yra alaninas. Pareiškėjas nenorėtų apsiriboti žemiau pateikiama mechanizmo teorija, bet jis įsitikinęs, kad po transliacijos N baltymo gale esantis metioninas fermentų pagalba pašalinamas prokariotuose, jei sekanti po metionino aminorūgšties liekana yra alaninas arba kita aminorūgšties liekana, pasižyminti tokiomis pat charakteristikomis (pavyzdžiui, poliaringumas arba hidrofobiškumas), kurios įga-
20 lina pašalinti N gale esantį metioniną. Be to, taip pat įtikėtina, kad dauguma prokariotų sugeba pašalinti N gale esantį heterologinių ir/arba endogeninių polipeptidų metioniną, jei po metionino, esančio N gale, iš kart seka alaninas.

30 Šie prokariotai (pavyzdžiui, įvairios bakterijos, žinomos ir prieinamos dėka mikroorganizmų deponavimo institutų, tokių, kaip ATCC ir kitų) tai *E. coli* ir įvairūs jų kamienai (matyt sąrašas neapsiriboja jais). Iš
35 tikrųjų, tikėtina, kad bet koks prokariotas, sugebantis sintetinti polipeptidą, kurio N gale yra alaninas, koduojančioje DNR, kuri prasideda nuo vieno iki trijų

gretimų metionino kodonų, po kurių iš kart seka alanino kodonas, potencialiai gali būti efektyvus šio išradimo realizacijai. Naudojami pramonėje ir kiti prieinami prokariotai gali būti patikrinti, ar sugeba jie produkuoti tokius N-alanininius polipeptidus, įterpiant į šių mikroorganizmų genomą geną, kuriame yra promotorius, funkcionuojantis pasirinktame mikroorganizme, DNR, koduojančią surišimo su ribosomomis sritį, nuo vieno iki trijų, sekančių vienas po kito metionino kodonų, kurie yra ir transliacijos pradžios kodonas ir po to iš kart sekančius N-alanino polipeptido kodonus ir transliacijos pabaigos kodoną, po atliekama minėto geno ekspresija ir nustatoma tokiu būdu gauto heterologinio polipeptido N galinė aminorūgšties liekana. Jei nustatoma, kad prokariotinis organizmas produkuoja tokį heterologinį N-alanininių polipeptidą, tai toks mikroorganizmas yra klasės, vadinamos "išrinkta" patento ir Apibrėžties punktu aprašymui.

Šio išradimo palankiausiame variante buvo naudojami trys *E. coli* K12 kamienai, kurie deponuoti Amerikos Kultūrų Kolekcijoje, Rocvilles, Meryland, jų kolekcinis numeris ATCC 39986, 53010 ir 53009, šie kamienai pasižymėjo sugebėjimu pašalinti metioniną N baltymų gale, kai po šio metionino sekė iškart alaninas.

Šis išradimas yra reikšmingas, nes įgalina gauti heterologinius polipeptidus, kurių N gale yra alanino liekana.

Viename pageidaujamame išradimo būdo realizavime, kuris yra šio išradimo objektas, jis buvo naudojamas gaunant dvi jAH formas: jAH(A, L) ir jAH(A, V) ir vieną kAH formą - kAH(A), šių preparatų sudėtyje nėra kitų jaučio arba kiaulės baltymų ir/arba kitų jAH arba kAH formų. Šis būdas įgalina gauti jAH(A, L), jAH(A, V) arba kAH(A), kaip vieną formą. Sugebėjimas produkuoti vie-

nintelę jAH arba kAH formą, kurių aminorūgščių liekanų sekos, homologinės gamtoje sutinkamiems somatotropinams, labai svarbus, norint įvertinti tikslų jAH arba kAH formų biologinį aktyvumą, nustatant daugumą sustiprinančių jAH ir kAH efektų, bendru atveju, kaip buvo aprašyta aukščiau. Iš tikrųjų, buvo nustatyta, kad naudojant vieną iš dviejų N-alanininių jAH formų, pasireiškia jAH funkcijos sustiprėjimas - pieno išsiskyrimas. Be to, buvo nustatyta, kad naudojant pieno išsiskyrimo sustiprinančią jAH formą, jAH(A, V), gautą pagal šį išradimą, pieno primilžis žymiai padidėja (statistiniu požiūriu, pavyzdžiui, $p < 0.05$) palyginus, kai naudojamas jAH(A, L). Iki šiol nebuvo tirta įvairių jAH formų santykinis efektyvumas, norint pakelti pieno primilžius. Be to, nebuvo atlikti tyrimai *in vivo* arba laboratorinėmis sąlygomis įvertinant įvairių jAH formų biologinio aktyvumo skirtumus. Galima padaryti išvadą, kad jAH valininės alelinės formos įtakoja didesnę pieno išsiskyrimą, nei jAH leucino alelinės formos. Ši išvada yra labai svarbi ir nelaukta. Šios išvados dėka galima padaryti prielaidą, kad galima tokiu pat būdu įvertinti skirtumus tarp jAH formų, tokius kaip pašarų efektyvesnis sunaudojimas ir augimo stimuliavimas. Tokiu būdu, panaudojant šį išradimą, kurio pagalba galima gauti bakterijose bent dvi atskiras molekulinės hipofizinio jAH formas ir/arba panaudojant kitus žinomus metodus, galima gauti jAH formas, kurios efektyvesnės specialioms reakcijoms, iššauktoms augimo hormono. Kiti žinomi būdai yra (bet jais apsiriboja visas jų sąrašas) pilno jAH baltymo arba jo fragmentų cheminė sintezė, ir/arba jų ekspresija kituose mikroorganizmuose tokiuose, kaip mielės arba žinduolių ląstelės, panaudojant žinomus rekombinantinės DNR metodus.

Be to, nustatius visų gamtoje sutinkamų formų biologinius aktyvumus, galima gauti polipeptidinius kiekvienos formos variantus, kurie turėtų dar daugiau padidinti

dinti jų somatotropinių aktyvumą. Galima numatyti, kad sudarant somatotropinių variantus, pašalinant nukleotidus arba aminorūgščių liekanas, pakeičiant ir/arba pridėdant nukleotidus arba aminorūgščių liekanas, galima gauti įvairias naudingas ekvivalentines kompozicijas, pateikiamas šiame išradime. Tokie jAH variantai yra pakeista jAH(V) forma, kurioje N baltymo gale yra metionino liekana. Šis jAH variantas, sintetinamas genetškai transformuotoje bakterijoje, kaip buvo nustatyta, padidina pieno išsiskyrimą iki labai didelių dydžių, naudojant jį tokiais kiekiais, kad padidėtų laktacija. Be to, laktacijos padidėjimas, naudojant šį jAH(V) variantą, kaip buvo nustatyta, žymiai didesnis, nei naudojant identiškus variantus, kuriuose vietoje 126 aminorūgšties liekanos yra leucinas.

Nežiūrint į tai, kad pareiškėjas nenorėtų apriboti save žemiau aprašyta mechanizmo teorija, pasirodė, kad pakeičiant leuciną 126 pozicijoje valinu, žymiai padidina tokių somatotropinių baltymų bioįsisavinimą ir/arba biologinį aktyvumą. Somatotropinių baltymų rentgeno kristalografinė analizė parodė, kad minėtų baltymų sritys, apytikriai nuo 90 iki 136 aminorūgšties liekanos, sudaro santykinai labilią sritį. Tiriant kitus baltymus, buvo nustatyta, kad šiose labiliose srityse daugeliu atvejų yra biologiškai aktyvi sritys (pavyzdžiui, sritys, kuri sąveikauja su biologiniu receptoriu ir/arba su kitomis to paties baltymo dalimis, įgaudamas biologiškai aktyvią formą). Tokiu būdu, galima tikėtis, kad papildomi jAH(A, V) variantai, kuriuose yra pakeitimai, pašalinimai, papildymai ir/arba aminorūgščių liekanų inversijos šioje labilioje srityje ir/arba ne šioje srityje, gali būti gaunami, juos naudojant žymiai padidėja pieno išsiskyrimas, nei naudojant identiškus kitais požiūriais jAH arba jAH(A, L) leucino formas. Pavyzdžiui, pakeičiant 126 pozicijoje arba aplink šią aminorūgšties liekaną hidrofiliškes-

nėmis ir/arba mažesnėmis aminorūgšties liekanomis (palyginus su leucinu), tokiu būdu, kad pieno išsiškyrimas nesumažėtų iki minimumo.

- 5 Be to, galima tikėtis, kad jAH valino tipai, kurių N gale yra Phe(1) arba Ala(-1), gali užtikrinti aprašytą primilžio padidėjimą, naudojant kartu su pašarais. Taip pat galima tikėtis, kad pakeitus N galą (pavyzdžiui Met(-1)), taip kad jis žymiai nesiskirtų nuo gamtoje
- 10 sutinkamų jAH baltymų N galo, jAH valininės formos nepadidins primilžių taip, kaip identiški visais kitais atžvilgiais jAH leucino formos ir jAH(A, L). Be to, taip pat galima tikėtis, kad jAH kompozicija, kurioje jAH valininių formų koncentracija, perskaičiavus visų
- 15 jAH formų svoriui, žymiai didesnė, nei jAH valininių formų, išskirtų iš jaučio hipofizio, taip pat įgalintų pasiekti reikalingą rezultatą.

- Pagal vieną plačiausią šio išradimo realizaciją šis
- 20 išradimas yra rekombinantinės DNR technologijos išplėtimas, norint prokariotuose gauti heterologinius polipeptidus. Tokiu būdu, šio išradimo aprašymas susietas su pagrindiniais metodais, kurie naudojami rekombinantinėje DNR technologijoje, norint išskirti ir klonuoti DNR sekas, koduojančias polipeptidus, pergru-
- 25 puojant arba pakeičiant klonuotas DNR sekas ir ekspresuojant klonuotas arba modifikuotas DNR sekas transformuotuose mikroorganizmuose. Su šiais metodais yra susipažinęs kiekvienas šios srities specialistas.
- 30 (žiūr., pavyzdžiui Maniatis, Fritsch ir Sambrook, 1982).

Heterologinės DNR izoliavimas ir/arba konstravimas

- Pagal vieną šio išradimo realizaciją DNR seka, koduo-
- 35 janti tikslinį heterologinį polipeptidą, kuri norima ekspresuoti prokariote, pasirenkama ir išskiriama, arba DNR seka, kuri ją koduoja, konstruojama arba sinte-

tinama cheminiu būdu. Daugumoje svarbių realizacijų toks polipeptidas yra eukariotų baltymas. Jei polipeptidas yra nedidelis ir žinoma jo aminorūgščių liekanų seka, tai galima sukonstruoti sintetinę DNR molekulę arba seką, kuri koduotų šį polipeptidą. Jei polipeptido aminorūgščių liekanų seka nėra žinoma arba jis yra labai didelis, kad būtų galima DNR seką susintetinti, tai atvirkštinės transkripcijos pagalba galima gauti atatinkamą kDNR iš iRNR, kuri gaunama iš audinių arba ląstelių, kurie ekspresuoja šį polipeptidą. Pavyzdžiui, viename šio išradimo realizavimame tokia jAH seka žinomais metodais, kurie yra aprašyti Gudmano ir kt., *Methods in Enzymology*, t. 68, p. 75-90 (1979), buvo gauta iš jaučio hipofizio. Kaip alternatyva kDNR gali būti gaunama iš iRNR, išskirtos iš ląstelių transformuotų genomine DNR, kuri išskiriama iš natyvaus genų banko specialaus zondo pagalba. Genominė DNR gali būti taip pat modifikuojama įvairiuose vektorių sistemose tokiu būdu, kad DNR gali būti ekspresuojama prokariotuose. Šie metodai yra žinomi kiekvienam šios srities specialistui.

Po to, kai gaunama heterologinė DNR seka, kurioje yra tikslinio polipeptido kodonai, gali būti naudinga atlikti kai kurias modifikacijas šios molekulės nukleotidų sekoje. Pavyzdžiui, jei ši molekulė buvo gauta atvirkštinės transkripcijos iš iRNR matricos, tai joje daugeliu atvejų bus bent dalis DNR, koduojančios lyderinę probaltymo seką. Todėl būtina pašalinti lyderinę seką, esančią prieš pirmą tikslinio baltymo kodoną. Kai kuriais atvejais būtina papildyti arba įterpti valino kodoną vietoje kito kodono sekos, koduojančios tikslinį baltymą, pradžioje, jei šiame baltyme nėra baltymo N gale valino kodono. Po to įterpiamas transliacijos pradžios kodonas (jis taip pat yra ir metionino kodonas), prieš ir prie pat alanino kodono. Nežiūrint į tai, kad yra kompleksas transliacijos pradžios signalų (metio-

nino kodonas bendru atveju) palankiausiame variante (nukleotidų seka ATG, seka GTG taip pat kartais gali būti transliacijos pradžios signalu) naudojamas metionino kodonas. Be to, tuo atveju, kai yra keli metionino kodonai, pavyzdžiui, du, trys, gali būti ir daugiau gretimų metionino kodonų, reikia vertinti, kaip nežymią šio išradimo būdo modifikaciją.

Bent vienas transliacijos pabaigos kodonas turi būti interpretas po baltymo C galo aminorūgšties liekanos kodono, jei jo nebuvo iki tol. Transliacijos kodonų pavyzdžiai yra: deoksinukleotidiniai tripletai TAA, TGA ir TAG. Iš esmės, naudojami rekombinantinės DNR metodai tam, kad sukonstruoti rekombinantinės DNR seką, kurioje būtų, eilės tvarka, transliacijos pradžios signalas (metionino kodonas), tikslinio polipeptido kodonai (N gale turi būti alanino kodonas, kuris yra prie pat transliacijos pradžios signalo) ir bent vienas transliacijos pabaigos kodonas, esantis iš kart po polipeptido C galo aminorūgšties kodono.

Buvo nustatyta, kad efektyviai iRNR ekspresijai gali trukdyti antrinės struktūros, susidarančios vandenilinių ryšių, kurie sujungia dvi komplementarias sekas iRNR viduje, pagalba. Šių komplementarių sekų pašalinimas toje molekulės dalyje, kuri koduoja polipeptido N galą, palengvina iRNR susirišimą su ribosoma, ir to pasekoje, padidėja ekspresijos lygis. Gali būti pakeidautina pakeisti kodonus, kurie dalyvauja susidarant tokioms antrinėms struktūroms, tos pačios aminorūgšties liekanos kodonais, bet iš kitų nukleotidinių tripletų. Žiūr. Europos patentą Nr. 75 444 (publikuota 1988 m. kovo 30 d.); Siburg ir kt., (1983) DNR, 2, p. 37-45 ir Šoier ir kt., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, p. 5403-5407.

- Kiti heterologinės DNR sekos konstravimo būdai su-
prantami kiekvienam šios srities specialistui. Pavyz-
džiui, jei turima DNR molekulė, kuri koduoja polipep-
tidą, kuri norima ekspresuoti, kurio N gale yra seka
5 $\text{NH}_2\text{-Met-X-Y-...}$, kur X yra bet kokia aminorūgšties
liekana, išskyrus alaniną, tai alanino kodonas gali
būti įterptas tarp metionino kodono (transliacijos
pradžios kodono) ir X aminorūgšties liekanos kodono.
Kaip alternatyva, X aminorūgšties liekanos kodonas gali
10 būti pašalinamas, o alanino kodonas įterptas vietoje
jo. Tokiu būdu, šio išradimo būdo pagalba būtų gaunamas
baltymas, kurio N gale būtų seka $\text{NH}_2\text{-Ala-X-Y-...}$ arba
 $\text{NH}_2\text{-Ala-Y-...}$.
- 15 Tokiu pat būdu galima pašalinti, pridėti ir/arba pa-
keisti bet kuri aminorūgšties liekanos kodoną, esanti
gene ir šio išradimo būdo pagalba galima ekspresuoti
variantinius polipeptidus. "Variantinis" polipeptidas
pagal šį išradimą yra polipeptidas, kuriame yra pa-
20 šalintos viena arba kelios amino rūgščių liekanos, pa-
keičiant ir/arba papildant kitomis, palyginus su gam-
toje sutinkamo polipeptido seka. Tokių variantų pa-
vyzdžiai (bet tai ne visi), kuriuose aminorūgščių lie-
kanų seka šių variantinių jAH formų identiška jAH(L) ir
25 jAH(V), išskirtiems iš jaučio hipofizio ląstelių, iš-
skyrus, kad yra papildomas metioninas baltymo N gale.
Šie variantiniai polipeptidai konstruojami taip, kad jų
aminorūgščių liekanų seka būtų pagrinde tokia pat kaip
ir gamtinių polipeptidų ir kad šie polipeptidai turėtų
30 biologinį aktyvumą. Variantinių polipeptidų konstravimas
ir ekspresija gali būti naudinga tam, kad pa-
siekti didesnę ekspresijos lygį, padidinti baltymo sta-
bilitumą, tam, kad supaprastinti polipeptido išgryninimą
ir/arba optimizuoti jo biologinį aktyvumą.
- 35 Aprašytos aukščiau DNR molekulės, koduojančios tikslinį
polipeptidą, modifikacijos gali būti atliktos naudojant

restriktazes, egzonukleazes, endonukleazes ir kt., naudojant žinomus metodus. Taip pat galima naudoti bendrus kryptingos oligonukleotidų mutagenezės metodus specialioje nukleotidų sekos srityje tam, kad atlikti nurodytas struktūros arba DNR molekulės sekos modifikacijas; šie metodai taip pat yra žinomi šios srities specialistams. Žiūr., pavyzdžiui, Zoller ir Smit (1982) Nuc. Acids Res., t. 10, p. 6487-6500; Zoller ir Smit (1983), Meth. Enzymol., 10, p. 468-500; Norris ir kt. (1983), Nucl. acids res., t. 11, p. 5103-5112.

Pagal žinomus rekombinantinės DNR metodus, po to, kai gaunama tikslinė heterologinė DNR seka, toliau ši seka įterpiama į atitinkamą klonavimo vektorių, kurio pagalba atliekama DNR sekos replikacija. Tam galima panaudoti bet kokią tinkamą klonavimo vektorių, palankiausiam variante - vektorių, kuriame yra selektyvumo markeris, pavyzdžiui, *E. coli* plazmidės vektoriai, kuriuose yra CoI EI, Xerifild ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1974), t. 71, p. 3455; pBR322, Bolivar ir kt., Gene, (1977), t. 2, p. 95; pBR325, Sobers ir kt., Gene (1978), t. 4, p. 122 ir pKC7, Rao ir kt., Gene (1979), t. 7, p. 79; ir *E. coli* bakterofago vektoriai, kuriuose yra λ L 47.1, Šaron, Loenen ir kt., Gene, (1980), t. 10, p. 249; ir M13mp8 ir M13mp9, Šessing ir kt., Gene, (1982), t. 19, p. 269. Bendri minėtos DNR sekos įterpimo metodai į klonavimo vektorių, konstruojant rekombinantinį vektorių, žinomi kiekvienam šios srities specialistui. Žiūr., pavyzdžiui knygą "Molekulinis klonavimas; Laboratorinis vadovas" red. Maniatis, Fritsch ir Sambrook, 1982.

Po to, kai gaunamos kelios tikslinės DNR sekos kopijos, šias sekas galima išskirti iš rekombinantinių vektorių ir įterpti į ekspresijos sistemą tam, kad gauti ir išskirti tikslinį heterologinį baltymą pagal aprašymą, kuris žemiau detaliam pateikiamas. Prieš įterpiant šias

DNR sekas į ekspresijos vektorių, galima atlikti įvairias heterologinės DNR sekos modifikacijas, naudojant žinomus kiekvienam šios srities specialistui būdus; žinomais metodais modifikaciją galima atlikti ir po minėto įterpimo.

Šio išradimo realizavimo pavyzdžiuose be M13mp9, kuris aprašytas Mesingo ir kt., Gene, (1982), t. 19, p. 269, taip pat buvo pasirinktas klonavimo vektorius M13mp8, aprašytas ten pat, modifikuotas taip, kad jame būtų XbaI skėlimo sritis, tai parodyta Fig. 1. Vektoriai M13mp8 ir M13mp9, kurie kartu vadinami "vektoriai M13", įgalina išskirti rekombinantinius vektorius dvigrandžių (ds) arba replikacinėje formoje (RF), taip pat ir viengrandžių (ss) DNR formoje. RF rekombinantinių DNR vektorių išskyrimas supaprastina tikslinių DNR sekų įterpimą po ekspresijos vektorių replikacijos, tai parodyta Fig. 5, 6 ir 10. Kaip alternatyva, išskiriant šių rekombinantinių vektorių viengrandę formą, kurioje yra tikslinė DNR seka su teisinga 5'-3' orientacija, ekspresijai, taip pat ir atliekant bet kokias DNR sekos modifikacijas, tokiais metodais, kaip kryptinga oligonukleotidų mutagenezė specialioje srityje, tai parodyta Fig. 3, 4 ir 8. Be to, šie M13 vektoriai gali "suderinti" DNR fragmentus arba genus, kurių ilgis yra iki 4 kilobazių (kb), kurių pagalba galima klonuoti tipinę, pilną, eukariotinę geno seką.

Markerinė funkcija, naudojama M13 vektoriuose, kaip aprašyta Mesing ir kt., Gene, (1982), t. 19, p. 269, pasižymi fermentas β -galaktozidazė. Konkrečiu atveju tikslinė heterologinė DNR seka įterpiama į geno lacZ fragmentą, kuris yra M13 vektoriuje, tai pažeidžia normalią fragmento lacZ komplektaciją, kuri yra vektoriuje M13, daliniu geno fragmentu lacZ, kuri yra recipiento chromosominėje DNR (pavyzdžiui, JM101 *E. coli*), taip, kad recipientas nesugeba įsisavinti laktozės, kuri yra

bakterijų auginimo terpėje. *E. coli* po transfekcijos vektoriais M13, kuriuose nėra svetimo geno sekos, įterptos į vektorių, kuriame yra lacZ geno fragmentas, gali išsisavinti laktozę, kuri yra auginimo terpėje, sudarydamos charakteringas mėlynas dėmes, jei šios bakterijos auginamos ant agarų, kuriame yra terpė 1xYT, jos sudėtis - 0.8% (m/t) triptono, 0.5% (m/t) mielių ekstrakto, 0.5% (m/t) NaCl, spalvinis β -galaktozidazės indikatorius. Kai bakterijos auginamos nurodytoje terpėje, *E. coli* dėmės po transfekcijos rekombinantiniais vektoriais, kuriuose yra įterpta heterologinės DNR seka į vektoriaus M13 fragmento genomą, yra skaidrios ir bespalvės. Todėl, kai įterpiama heterologinė DNR seka į šiuos klonavimo vektorius, tai stebimos bespalvės dėmės po recipientų *E. coli* transfekcijos rekombinantiniais vektoriais. Įterpimas DNR sekos, koduojančios jAH(L) ir kAH(F), į vektorius M13 pateiktas Fig. 2 ir 9.

Palankiausiame šio išradimo realizavimo variante DNR sekos, koduojančios jAH(L) ir kAH(F), yra plazmidėse pBGH_{ex-1} ir pPGH_{ex-1}, atitinkamai, tai aprašyta Siburgo ir kt., DNR, (1983) 2 (1), p. 37-45, išskiriamos iš šių plazmidžių endonukleazų pagalba specifinėje srityje. Reikia pažymėti, kad po transfekcijos plazmidėmis pBGH_{ex-1} arba pPGH_{ex-1} ir po kultivavimo tokiose sąlygose, kuriose vyksta ekspresija sekų, koduojančių jAH(L) ir kAH(F), bakterijos produkuoja somatotropinus, kurių baltymo N gale yra metioninas (pavyzdžiui, Met-jAH(L) arba Met-kAH(F), atitinkamai). Atitinkamos sekos po to įterpiamos į RF DNR modifikuotą vektorių M13mp8 M13mp8/XbaI) ir vektorių M13mp9, tai parodyta Fig. 2 ir 7, atitinkamai. Tikslinės DNR sekos, koduojančios jAH(L) arba kAH intarpas RF DNR M13mp8/XbaI ir M13mp9 buvo patvirtinamas naudojant endonukleazes, tai parodyta Fig. 2 ir 7, atitinkamai. *E. coli* JM101 po to transfekuojamos vienu iš rekombinantinių vektoriumi, kaip aprašyta Messingo ir kt., Methods in Enzymology,

(1983), t. 101, p. 20 ir rekombinantinių vektorių ss DNR, išskiriama pagal metodą, pateiktą Messingo ir kt., Gene, (1982), t. 19, p. 269. Atitinkami Messingo ir kt. darbai čia pateikiami kaip nuorodos.

5

Po šių rekombinantinių vektorių ss DNR išskyrimo atliekama modifikacija kryptingos oligonukleotidų mutagenezės pagalba specialioje srityje, norint gauti koduojančias jAH(A, V), jAH(A, L), jAH(V) ir kAH(A) sekas. Konkrečiu atveju, jAH(L) buvo modifikuojamas papildant seką alanino kodonu, pavyzdžiui GCC sekos, koduojančios jAH(L), 5' gale, kaip parodyta Fig. 3. Galima tikėtis, kad tokiu būdu galima papildyti bet kuriuo iš keturių alanino kodonu. Pageidautinas alanino kodonas, norint pasiekti ekspresijos sistemoje, pagal šį išradimo būdą, optimalią somatotropino išėigą, yra GCC. Alanino prisijungimas, konstruojant koduojančią jAH(A, L) seką, patvirtinamas analizuojant pilnos koduojančios jAH(A, L) DNR seką, arba jos 5' galą, naudojant metodą: Zanger ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1977), t. 74, p. 5468.

Seka, koduojanti jAH(A, V), konstruojama kryptingos oligonukleotidų mutagenezės pagalba specialioje srityje, koduojančioje jAH(A, V), tai parodyta Fig. 4, pakeičiant leucino kodoną 127 pozicijoje (jAH(A, L)) į valino kodoną, pavyzdžiui į GTG. Vėl galima tikėtis, kad atliekant tokius pakeitimus, galima naudoti bet kurią valino kodoną. Sekos, koduojančios jAH(A, V), konstrukcijos teisingumas tikrinamas, analizuojant gautos DNR seką.

Seka, koduojanti jAH(V), kurios pagalba sintetinamas po bakterijų transfekcijos vektoriais, kuriuose yra koduojanti jAH(V) seka, baltymas Met-jAH(V), analogiškai konstruojama kryptingos mutagenezės pagalba, pakeičiant

leucino kodoną 126 padėtyje [jAH(L)] į valino kodoną, pavyzdžiui, GTG.

5 Seka, koduojanti kAH(A), konstruojama kryptingos mutagenezės pagalba specialioje kAH(F) srityje taip pat, kaip parodyta Fig. 8 ir konstravimas detalai yra aprašomas žemiau, konstrukcijos teisingumas tikrinamas analizuojant DNR seką.

10 Po tikslinės heterologinės DNR sekos, išskyrimo ir konstravimo, analogiškai kaip ir jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH(A) atvejais, šios sekos gali būti replikuojamos ir gaunama daug jos kopijų, dauginant atitinkamus rekombinantinius vektorius, naudojant metodus, žinomus
15 kiekvienam šios srities specialistui, šie metodai buvo aprašyti aukščiau. Šios heterologinės DNR sekos gali būti įterptos į bet kokius tinkamus ekspresijos vektorius, norint produkuoti prokariotuose heterologinius polipeptidus.

20

Polipeptidų, kurių N gale yra alaninas, gavimas

Kaip buvo nurodyta aukščiau, tinkamame ekspresijos vektoriuje turi būti reikalingi transkripcijos ir translacijos signalai tam, kad būtų galima gauti heterologinį baltymą pasirinktame recipiente, taip pat turi būti markeris tam, kad identifikuoti tuos ekspresijos vektorius, kuriuose yra įterpta tikslinė heterologinė DNR seka. Panaudojant prokariotinį ekspresijos vektorių, rekombinantinės DNR sekos gali būti įterpiamos transdukcijos, transformacijos arba transfekcijos pagalba (visi šie metodai toliau vadinami vienu terminu - "transfekcija") ir po to minėtas mikroorganizmas kultivuojamas tokiose sąlygose (šios sąlygos priklauso nuo
30 pasirinkto promotoriaus ir recipiento), kuriose yra simuliuojama tikslinio polipeptido produkcija. Tokiu būdu, mikroorganizmų, naudojamų pagal šį išradimą, "ge-

35

nominės" DNR yra kaip chromosominė, taip ir episominė DNR.

5 Žinoma keletas heterologinio geno ekspresijos ir pro-
dukavimo prokariotiniame recipiente vektorių, šie vek-
toriai dabar yra žinomi kiekvienam šios srities spe-
cialistui.

10 Palankiausiame šio išradimo realizavimo variante buvo
naudojami ekspresijos vektoriai pBGH_{ex-1}, žiūr. Siburg
ir kt., DNA (1983), 2 (1), p. 37-45 ir pBGH_{ex-1*}, kuris
yra vektoriaus pBGH_{ex-1} modifikacija.

15 Ekspresijos vektoriai pBGH_{ex-1} yra bakterinė plazmidė
pBR322, kurioje yra jAH(L) genas. Šis genas sudarytas
iš triptofano promotoriaus (ptrp), Shine-Dalgarno se-
kos, transliacijos pradžios signalo ATG (metionino ko-
donas, kuris yra prie pat koduojančios sekos N gale
20 esančio fenilalanino, pirmos jAH(L) amino rūgšties lie-
kanos), sekos, koduojančios jAH(L) ir transliacijos pa-
baigos kodono.

Ekspresijos vektoriaus pBGH_{ex-1} markeris yra atsparumas
antibiotikui. Konkrečiu atveju pBGH_{ex-1} yra du atsparumo
25 antibiotikams genai: vienas - atsparumo ampicilinui
(amp^r) ir kitas - atsparumo tetraciklinui (tet^r), kurie
suteikia stabiliai transformuotiems ekspresijos vekto-
riais recipientams atsparumą antibiotikams. Tokiu būdu,
stabiliai transformuotos ląstelės gali būti atrenkamos
30 pagal sugebėjimą augti terpėje, kurioje yra arba tet-
raciklinas, arba ampicilinas, arba abu šie antibio-
tikai.

Šio išradimo realizavimo pavyzdžiuose ekspresijos vek-
35 toriai pMON3209 ir pMON3215, kuriuose yra pBGH_{ex-1}, ku-
riuose yra sekos, koduojančios jAH(A, L) ir jAH(A, V),
atitinkamai, vietoje sekos, koduojančios jAH(L), buvo

gaunami pagal Fig. 5 ir 6 pateiktą schemą. Po to tokios bakterijos buvo stabiliai transformuojamos ekspresijos vektoriais, transformuotos ląstelės atrenkamos auginant terpėje, kurioje yra atitinkami antibiotikai. Ekspresijos plazmidės, esančios transformuotose bakterijose, buvo restriktazių pagalba analizuojamos, norint patikrinti, ar sekos, koduojančios jAH(A, L) ir jAH(A, V), yra teisinga 5'-3' orientacija.

Šio išradimo realizavimo pavyzdyje, konstruojant ekspresijos vektorių pMON3213, kuriame yra seka, koduojanti kAH(A), vietoje sekos, koduojančios jAH(L), buvo panaudotas pBGH_{ex-1}*, kuriame yra vektorius pBGH_{ex-1}, modifikuotas, pašalinant EcoRI skėlimo sritį, kuri yra prieš 5' galą sekos, kuri koduoja ptrp. Gautame vektoriuje pBGH_{ex-1}* yra tik viena EcoRI skėlimo vieta, tai parodyta Fig. 9. Sekos, koduojančios jAH(L) pakeitimas seka, koduojančia kAH(A), vektoriuje pBGH_{ex-1}*, konstruojant ekspresijos vektorių pMON3213, pavaizduotas Fig. 10. Toliau *E. coli* kultūra buvo transformuojama aukščiau minėtu vektoriumi ir transformuotos ląstelės buvo atrenkamos auginant terpėje, kurioje buvo antibiotikas. Ekspresijos plazmidėse, esančiose transformuotose bakterijose, buvo tikrinama, ar yra seka, koduojanti kAH(A), restriktazių pagalba.

jAH(A, L), jAH(A, V) arba kAH(A) produkavimas buvo vykdomas *E. coli* bakterijose, transformuojant kamienus arba *E. coli* W3110, arba *E. coli* LK892, arba *E. coli* 294, kurie yra deponuoti, jų katalogo numeriai yra ATCC 39936, 53010 ir 53009, vektoriais pMON3209, pMON3215 arba pMON3213, metodais, kurie buvo aukščiau detalčiai aprašyti. Transformuotos *E. coli* W3110 ląstelės buvo auginamos tokiomis sąlygomis, kuriose vyksta somatotropino genų ekspresija, ir produkuojami tiksliniai heterologiniai polipeptidai.

Heterologinio polipeptido išgryninimas priklausys kaip nuo polipeptido prigimties taip ir nuo pasirinkto recipiente. Pavyzdžiui, buvo pastebėta, kad heterologiniai baltymai, gaunami tokiose bakterijose, kaip *E. coli*, dažnai būna viduj ląstelės netirpioje formoje kaip "intarpiniai kūneliai". Čia naudojamas terminas "intarpiniai kūneliai", nes šiuos kūnelius galima matyti fazinio kontrasto mikroskopu. Būdas, kuris naudojamas heterologinių baltymų išgryninimui, išsaugant jų biologinį aktyvumą, aprašytas paraiškoje Europos patentui Nr. 114506 (publikuota 1984 m. rugpjūčio 1 d.), šiame išradime šis būdas vartojamas kaip nuoroda. Trumpai aprašant šį būdą, tai producento ląstelių koncentravimas, šių ląstelių lizavimas, gaunant ekstraktą arba ląstelių homogenizatą ir intarpinių kūnelių išsiskyrimas, naudojant diferencinį centrifūgavimą, visos šios stadijos yra gerai žinomos šios srities specialistams. Išskirti intarpiniai kūneliai ištirpinami stipriame denatūruojančiame agente tokia, kaip guanidino hidrokloridas, ir ištirpintas baltymas toliau dializuojamas tinkamame tirpiklyje (pavyzdžiui, urėjoje), gryninamas chromatografijos pagalba ir pagaliau biologiškai aktyvuojamas, t.y., atstatoma aktyvi baltymo konformacija, išsaugant disulfidinius ryšius tarp cisteino liekanų pagal paraišką Europos patentui Nr. 114506. Detalesnis heterologinių baltymų išgryninimo aprašymas pateikiamas pateiktose nagrinėjimui paraiškose JAV patentui, viena pateikta S.B. Storros, kurios pavadinimas - "Somatotropinų soliubilizacijos būdas", ir antra pateikta L.E. Benti, S.B. Storros ir J.Y. Mitchell, kurios pavadinimas - "Somatotropinų renatūravimo būdas", šios paraiškos naudojamos kaip nuorodos. Dvi paminėtos nagrinėjamos paraiškos JAV patentui ir šis patentas pateiktos Monsanto kompanijos vardu. Tolesnis heterologinio baltymo išgryninimas, atskiriant nuo bakterinių baltymų, gali būti atliekamas žinomais chromatografiniais metodais tokiais, kaip gelfiltracija arba jonų

mainų chromatografija. Bendru atveju, gautame preparate yra apytikriai nuo 90% iki 99.5% polipeptido, kurio N gale yra alaninas ir nuo 0.5% iki 10% bakterijų arba kito prokarioto baltymų, kuriame buvo sintetinamas baltymas.

Buvo nustatyta, kad, bendru atveju, bent 80% heterologinio baltymo, ekspresuoto pagal šio išradimo būdą, N gale yra $\text{NH}_2\text{-Ala-...}$ tipo struktūra. Likusi polipeptidų dalis, paprastai, turi N gale metioniną, jų N gale yra $\text{NH}_2\text{-Met-Ala-...}$ tipo struktūra. Visdėlto, keičiant auginimo sąlygas ir/arba indukcijos trukmę, galima padidinti polipeptido išeigą, kurio N gale yra alaninas bent iki 95% ir daugiau.

Palankiausiame šio išradimo realizavimo variante somatotropiniai polipeptidai, produkuojami ir išskiriami pagal šį aprašymą, pateiktą aukščiau, buvo pademonstruota, kad jie pasižymi biologiniu aktyvumu artimu somatotropino aktyvumui; tai buvo nustatyta analizuojant triušio kepenų receptorių reakciją, atliekant pagal Pišim ir Frizen, J. Cin. Endocrinol. Metab. (1973), t. 37, p. 334-337 ir analizuojant žiurkių priaugimą. Pagal paskutinį somatotropinų, gaunamų *E. coli* ląstelėse, biologinio aktyvumo analizės metodą biologinis aktyvumas buvo nustatomas pagal žinomą somatotropino partiją (pavyzdžiui, jaučio arba kiaulės hipofizarinį somatotropiną), palyginant žiurkių, kurioms buvo pašalintas hipofizis, priaugimą, įvedant skirtingus junginio kiekius. Konkrečiai, dienos dozės (nuo 0 iki 60 mikrogramų) žinomo arba iš standartinio šaltinio somatotropino buvo injekcijomis įvedamos žiurkėms (95-135 g) su pašalintais hipofiziais 7 ir daugiau dienas. Panaudojant regresinę analizę, buvo nustatoma gyvūnų, kuriems buvo įvedamas žinomas ir tiriamas kiekis augimo hormono, svorio priaugimo regresijos lygtis priklausomai nuo įvesto hormono kiekio logaritmo. Tiesės lyg-

ties tgα buvo kontroliuojamas, norint išvengti lygiagretumo ir persidengimo. Biologinis aktyvumas buvo išreiškiamas kaip tgα santykis padaugintas iš standarto aktyvumo.

5

N-alanininių jAH panaudojimas, kuris yra šio išradimo objektas, padidina karvių primilžį ir, matomai, sumažėja pašarų, reikalingų norimam primilžiui pasiekti, sunaudojimas. Duodant karvėms, kurios auginamos pienui, jAH tas formas, kuriose yra valinas 126 arba artimoje pozicijoje, ypatingai tinkamos pieno primilžiui padidinti. Šie preparatai, kurie yra šio išradimo objektas, gali būti naudojami injekcijomis, įvedant į veną arba implantuojant ant polimerų arba kitų nešėjų, kurie užtikrina reikalingo augimo hormono kiekio išsiskyrimą į kraują. Galima naudoti farmaciškai tinkamas formas, kaip tirpalai, emulsijos arba gėliai, kurie yra apvalkale arba be jo. Šiose formose gali būti tik atskiros jAH formos arba jų variantai, o taip pat bet kokia kombinacija natyvaus ir/arba variantinio polipeptido [pavyzdžiui, mišinys jAH(A, V) ir jAH(A, L), ir/arba mišinys jAH(A, V) ir Met-jAH(A)]. Dozės gali kisti nuo 0,005 mg iki 200 mg vienam gyvūnui per dieną, palankiausiame variante - apytikriai nuo 5 mg iki 40 mg vienam gyvūnui per dieną. Labiausiai efektyvus kiekis, norint padidinti primilžius ir/arba padidinti pašarų sunaudojimo efektyvumą, gaunant pieną, galima nustatyti eksperimentu. Realiai pageidautinos jAH dozės priklauso nuo tokių parametrų, kaip gyvūno kūno svoris, bendra gyvūno sveikatos būklė ir šėrimo statusas. Nors jAH poveikį karvėms galima naudoti primilžio rodiklį, šiam tikslui galima naudoti ir kitus karvių produktyvumo rodiklius - bendras augimo dydis ir gyvo svorio padidėjimas. Jeigu tai būtina, tai jAH gali būti naudojamas kartu su kitais stimuliuojančiais agentais, tokiais, kaip biologiškai aktyvūs baltymai, antigenai ir kt., tuo atveju pasiekiamas žymesnis efektas.

- Kaip buvo minėta aukščiau, šiuo išradimu pateikiamas jAH variantų, kurių N gale yra alaninas, kuriuose yra pašalintos, papildytos, sukeistos ir/arba pakeistos aminorūgščių liekanos polipeptidinėje grandinėje, gavimo būdas. Įvairios modifikacijos, kurių dėka pasiekiami tokie efektai, kaip laktacijos ir/arba augimo greičio padidėjimas, gali būti identifikuoti bandymuose su karvėmis.
- Žemiau pateikiami pavyzdžiai yra šio išradimo palankiausio realizavimo iliustracija ir jie nėra šio išradimo apribojimas. Nežiūrint į tai, kad pateikiamas išradimas buvo aprašomas palankiausiais šio išradimo realizavimo pavyzdžiais, kiekvienam šios srities specialistui suprantama, kad pagal šio išradimo aprašymą galima atlikti įvairias modifikacijas, neperžengiant šio išradimo Apibrėžties.

Mikroorganizmai ir Plazmidės

- Išvardinti mikroorganizmai gali būti gauti iš Amerikos Kultūrų Tipų Kolekcijos (ATCC), 12301 Parklawn Drive, rockville, Maryland, 20852 - 1776, JAV.

ATCC 39936-	<i>E. coli</i> W3110
ATCC 53010-	<i>E. coli</i> LK392
ATCC 53009-	<i>E. coli</i> kamienas 294
ATCC 53024-	<i>E. coli</i> W3110/pMON3209/
ATCC 53022-	<i>E. coli</i> W3110/pMON3215/
ATCC 53023-	<i>E. coli</i> W3110/pMON3213/

- Šie deponuoti mikroorganizmai gali būti išduoti po šios paraiškos JAV patento išdavimo firmoje Monsanto Company. Šie deponuoti mikroorganizmai bus prieinami po bet kokio JAV patento, kurio prioritetą bus nustatytas

pagal pateikimo datą, išdavimo. Bet reikia turėti ome-
ny, kad galimybė pasinaudoti deponuotais mikroorganiz-
mais nesuteikia licenzijos šio išradimo naudojimui, pa-
žeidžiant teisėtas pareiškėjo teises. Be to, šis išra-
5 dimas neapsiriboja deponuotais mikroorganizmais, nes
deponuoti mikroorganizmai tik iliustruoja šio išradimo
objektą.

Pavyzdys 1

10 Visi oligonukleotidai buvo susintetinti firmoje Monsanto
Botanikos skyriuje, sintezė buvo atliekama DNR sinte-
zatoriumi (Applied Biosystems) pagal procedūrą, pa-
teiktą gamintojo - Applied Biosystems Inc., Foster city,
15 Kalifornija. Restriktazės ir DNR modifikavimo fermentai
buvo gauti iš firmos New England Biolabs, Inc.
(Beverly, MA), iš firmos New England Nuclea (Bostonas,
MA) ir iš firmos Bethesda Reseach Laboratories (BRL)
(Gavtensburg, Meryland), linkeris XbaI buvo gautas iš
20 firmos Colaborative Reseach, Inc., (Leksington, MA).
DNR ligazė T4 buvo gauta iš firmos BRL (Gavtensburg,
Meryland), DNR kinazė T4 buvo gauta iš firmos New
England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Žymėti ³²P nukleo-
tidai buvo gauti iš firmos American (Arlington, IL).
25 Klenovo fragmentas DNR polimerazė I buvo gauta iš fir-
mos New England Nuclea (Bostonas, MA). *E. coli* JM101
buvo gautas iš dr. Joe Mesing, Minesotos Universitetas
(Sant Paul, Minesota).

30 Skaldymas restriktazėmis, ligavimas DNR ligaze T4 ir
Klenovo fragmentu DNR polimeraze I *E. coli* gali būti
atliekami pagal gamintojų rekomendacijas. Tinkamiausi
buferiniai tirpalai aprašytiems žemiau fermentams gali
būti sekantys: XbaI:100 mM NaCl, 50 mM TRIS, pH 7.5, 10 mM
35 MgSO₄; EcoRI, HindIII ir SmaI:50 mM NaCl, 10 mM TRIS,
pH 7.5, 10 mM MgSO₄. DNR ligaze T4 reakcija vykdoma bu-
feriniuose tirpaluose, kurių sudėtyje yra: 25 mM TRIS,

pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotrietolio (DTT), 2 mM spermidino ir 0.2 mM ATF, Klenovo fragmentas DNR polimerazė I *E. coli* buvo naudojama buferiniame tirpale, kuriame yra: 20 mM TRIS, pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotrietolio (DTT), 1 mM ATF ir po 1 mM kiekvieno dATF, dGTF, dDTF, dCTF. Jei būtina gauti sintetinamą DNR seką pažymėtą, tai vykdant reakciją su Klenovo fragmentu buvo pridedama α -³²P-ATF (400 Ci/mol).

Žymėti oligonukleotidai buvo gaunami naudojant γ -³²P-ATF (specifinis aktyvumas didesnis, nei 5000 Ci/mol) ir DNR kinazę T4 su 100 mM TRIS, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT.

Plazmidės, kuriose yra DNR sekos, koduojančios jAH(L) ir kAH(F) (pBGH_{ex-1} ir pPGH_{ex-1}, atitinkamai), buvo gautos iš firmos Genentex, Inc., SanFrancisko, Kalifornija. Šios plazmidės gali būti gaunamos pagal aprašymą, pateiktą paraiškoje Europos patentui Nr. 75444 (publikuota 1983 m. kovo 30 d.); Siburg ir kt., DNR (1983), 2 (1), p. 37-45; Geddel ir kt., Nature (1979), t. 281, p. 544-548; Debber ir kt., knygoje "Promotoriai: Struktūra ir funkcijos" (1982); redaktoriai: M.J. Čemberlin ir R. Rodrigues, Sk. 293; Mioccari ir Janothski, J. Bacteriol (1978), t. 133, p. 1457-1466; ir Rozenbegr ir Kurt, Annual Review of Genetic t. 13, p. 319-353. Pirmieji transliuojami DNR, koduojančios jAH(L), kodonai pateikti paraiškoje Europos patentui Nr. 75444 (DeBoer ir kt.) yra ATG TTC CCA GCT ATG TCT GGT CTA TTC GCT AAC GCT GTT CTT CGT GCT CAG CAT CTT arba jų funkciniai ekvivalentai. (Kaip alternatyva, suprantama, galima panaudoti funkcinis šių kodonų ekvivalentus). Kita, susijusi su nagrinėjamais klausimais, medžiaga pateikiama publikacijose taip pat naudojama čia kaip nuorodos.

35

M13mp8 ir M13mp9 buvo gauti iš daktaro Joe Mesing iš Minesotos Universiteto (St. Paul, Minesota).

Visos terpės bakterijų auginimui ir antibiotikai buvo gaunami arba iš firmos Sigma (St. Louis, MO), arba iš firmos Difco Laboratories (Detroitas, Mičiganas).

5 Pavyzdys 2

Pateikiamuose žemiau pavyzdžiuose iliustruojamas trijų koduojančių DNR sekų, kurias ekspresavus, pasiekiamas tiesioginė produkcija bakterijose polipeptidų, kurių N gale yra alaninas, konstravimas. Konkrečiu atveju, koduojančios DNR sekos buvo konstruojamos tokiu būdu, kad transliacijos pradžios signalas (metionino kodonas ATG) buvo prie pat alanino kodono (pavyzdžiui, GCC). Šios trys koduojančios DNR sekos, koduojančios jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH(A), buvo konstruojamos kryptingos mutagenezės pagalba, naudojant anksčiau išskirtas somatotropiną koduojančias DNR sekas. Šis pavyzdys iliustruoja taip pat ir DNR sekos, koduojančios jAH(V), kurią ekspresuojant bakterijose, sintetinamas Met-jAH(V).

A. DNR sekos, koduojančios jAH(A, L) konstravimas

DNR seka, koduojanti somatotropiną, jAH(L), buvo išskiriama iš pBGH_{ex-1}, kaip XbaI fragmentas ir klonuojama į XbaI skėlimo sritį vektoriuje M13mp8 (M13mp8/XbaI). Vektorius M13mp8/XbaI, kuriame yra XbaI linkeris pradinėje SmaI skėlimo srityje, konstravimas pateiktas Fig. 1. Kaip parodyta Fig. 2, XbaI skelia viename DNR sekos, koduojančios jAH(L), "išspjaudama" pilną DNR seką, koduojančią jAH(L). Plazmidė pBGH_{ex-1}, perskelta XbaI restriktaze buvo sumaišoma, esant DNR ligazei T4, su RF DNR M13mp8/XbaI, linerizuota restriktazės XbaI pagalba, ir paveikiama šarmine fosfataze, išskirta iš jaučio žarnyno. Po to mišinys buvo inkubuojamas per naktį 14°C temperatūroje. Paveikus šarmine fosfataze, išvengiama vektoriaus M13mp8/XbaI recirkuliacijos. DNR sekos, koduojančios jAH(L), įterpimas į vektorių

M13mp8/XbaI, konstruojant rekombinantinį vektorių M13mp8/BGH_{ex-1}, iš pradžių buvo kontroliuojamas pagal bespalvių dėmių susidarymą, auginant *E. coli* JM101 bakterijas 1xYT terpėje, naudojant minkšto agaro paruošimo procedūrą, aprašytą knygoje "Molekulinis klonavimas: Laboratorinis vadovas" red. Maniatis, Fritš ir Sembruk (1982), p. 64, šiame agare yra 10 µl 100 mM IPTGP (izopropil-β-G-tiogalaktopiranozidas) ir 50 µl 2% (m/v) X-GAL (5-brom-4-chlor-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas) 3 ml viršutinio agaro, ir buvo atliekama transfekcija minėtu rekombinantiniu vektoriumi, aprašytu aukščiau būdu. Sekos, koduojančios jAH(L), įjungimas buvo patvirtintas analizuojant restrikcine analize išskirtą rekombinantinio vektoriaus RF DNR restriktaze XbaI, buvo gaunamas 590 bazių porų fragmentas, kuriame buvo įterpta seka ("Molekulinis klonavimas: Laboratorinis vadovas" red. Maniatis, Fritsch ir Sambrook (1982), skyrius 3). 590 bazių porų fragmentas buvo identifikuojamas elektroforėzės 1% (m/t) agarozėje pagal aprašytą knygoje "Molekulinis klonavimas: Laboratorinis vadovas" red. Maniatis, Fritsch ir Sambrook (1982) metodiką. Visi kiti restrikciniai fragmentai buvo identifikuojami šios procedūros pagalba. Įterptų sekų, koduojančių jAH(L), orientacija buvo kontroliuojama skaldant rekombinantinį RF vektorių fermentais SmaI ir HindIII. Jei koduojančios sekos yra teisingos 5'-3' orientacijos, tai po skaldymo šiais fermentais turi būti gaunamas 207 bazių porų fragmentas. Fago ssDNR išskyrimas buvo atliekamas pagal metodiką, aprašytą Missing ir kt., Gene, (1982), t. 19, p. 269. Po to vektorius M13mp8/BGH_{ex-1} buvo naudojamas kaip matrica atliekant kryptingą mutagenezę iš esmės pagal aprašymą, pateiktą Zoller ir Smith, Nuc. Acids Res., (1982), t. 10, p. 6487-6500, Zoller ir Smith, Methods in Enzymology (1983), t. 100, p. 468-500, Norriss ir kt., Nuc. Acids Res., (1983), t. 11, p. 5103-5112, šie aprašymai čia pateikiami kaip nuorodos.

Fig. 3 pateikiama mutagenezės diagrama, konstruojant DNR seką, koduojančią jAH(A, L) iš sekos, koduojančios jAH(L). Trumpai, tai oligonukleotidų pradmenį (žiūr. Lentelę 1, žemiau), kuriame yra norimos mutacijos seka, naudojamas ciklizuotos DNR matricos M13mp8/BGH_{ex-1} iš ssDNR, pradmens sintezei. Tokiu būdu gautos uždaros žiedinės dsDNR molekulės buvo atskiriamos nuo nepilnų ir vienspiralių DNR žiedų, naudojant ultracentrifugavimą pašarmintame sacharozės gradiente, pagal metodiką, aprašytą Zoller ir Smith, *Methods in Enzymology* (1983), t. 100, p. 468-500. Žiedinės dsDNR molekulės toliau buvo naudojamos *E. coli* JM101 transformavimui, kuris buvo atliekamas pagal metodiką, aprašytą Messing ir kt., *Gene*, (1982), t. 19, p. 269-276, gautos bespalvės dėmės buvo pernešamos ant Pall filtrų, gautų iš firmos Pall Ultrafine Filtration Corp. (Glen Kown, New York), ir buvo tikrinamos hibridizuojant su žymėtu ³²P oligonukleotidiniu pradmeniu, kuris buvo naudojamas kryptingai mutagenzei. Minėtų dėmių surinkimas buvo atliekamas pagal filtrų gamintojo Pall pateikiamą metodiką. Išsėjimas hibridizuojant buvo atliekamas naudojant nailoninius Biodine filtrus, kurie yra aprašyti Pall Ultrafine Filtration Corp. (Glen Kown, New-York) publikacijoje "Vadovas DNR pernešimui ant nailoninių Pall BiodineTM filtrų" (1983). Filtrai buvo praplovami, didinant temperatūrą, iki tol, kol atsiplaudavo radioaktyvi žymė iš kontrolinio filtro, kuris buvo paruošiamas naudojant fagą M13mp8/BGH_{ex-1}. Bendras atplovimo protokolas: praplovimas kambario temperatūroje su 6xSSC (0.9 N NaCl ir 0.09 M natrio citratas) 10 minučių, po to praplovimas 50°C temperatūroje su 6xSSC 5 minutes ir po to sekantys praplovimai, pakeliant temperatūrą kas 5°C. Dėmės, kurios hibridizavosi su žymėtu oligonukleotidiniu pradmeniu aukštesnėse temperatūrose, nei kontroliniai fagai, buvo įvertinamos, kaip turinčios naujai sudarytą seką, koduojančią jAH(A, L), ir jos buvo toliau vadinamos potencialiai tei-

giamomis. Kaip alternatyva, atskiros bespalvės dėmės buvo atrenkamos iš transformuotų *E. coli* JM101 ląstelių ir buvo auginamos 5 ml terpėje 2xYT (1.6% (m/t) triptono, 1,0% (m/t) mielių ekstrakto, 0.5% (m/t) NaCl) per naktį aeruojant 37°C temperatūroje. Fago DNR, gauta pagal aprašymą, pateiktą Messing ir kt., Gene (1982), t. 19, p. 269, dėmėmis buvo užnešama ant nitroceliuliozės membranos, atliekama hibridizacija su žymėtu pradmeniu ir atplaunama, keliant temperatūrą tokiu pat būdu, kaip buvo aprašyta aukščiau. Fago DNR, kurios hibridizavosi aukštesnėje temperatūroje, nei kontrolinės M13mp8/BGH_{ex-1} dėmės, buvo įvertinamos kaip teigiamos. Potencialiai teigiamos dėmės, atrinktos abiejų metodų metu, buvo auginamos pagal aprašymą, pateiktą anksčiau, ir buvo naudojamos fago ssDNR išskyrimui, šios DNR seka buvo analizuojama pagal metodiką, pateiktą Zanger ir kt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1977), t. 74, p. 5463, tam, kad patvirtinti, kad jos koduoja jAH(A, L). RF DNR iš M13mp8/BGH_{ex-1} (Ala) taip pat buvo tikrinama, skeliant restriktaze HaeIII, norint įsitikinti, kad yra Ala kodonas po transliacijos pradžios signalo (metionino kodono ATG), nes įvedus Ala kodoną, gaunama papildoma HaeIII skėlimo sritis. Alanino kodono prisijungimo išėiga prie DNR sekos, koduojančios jAH(L), yra apytikriai 2%.

B. DNR sekos, koduojančios kAH(A), konstravimas

Šiuo atveju taip pat buvo naudojama kryptinga mutagenėzė, norint prijungti alanino kodoną prie DNR sekos, koduojančios kAH(F), pagal metodiką, aprašytą Siburg ir kt. DNR, (1983), 2 (1), p. 37-45. Mutagenėzė, pagal diagramą, pateiktą Fig. 8, buvo atliekama sekančiai:

DNR seka, koduojanti kAH(F), kurios ilgis 590 bazių porų, esanti plazmidėje pPGH_{ex-1}, buvo išskiriama restriktazėmis EcoRI ir HindIII, kurios skelia plazmidę 5'-3'

galuose, tai parodyta Fig. 7. Perkirpta plazmidė pPGH_{ex-1} buvo sumaišoma su RF DNR M13mp9 po skėlimo EcoRI ir HindIII, bet iš anksto paveikta šarmine fosfataze iš jaučio žarnyno tam, kad išvengtų pakartotino M13mp9 ligavimosi. Po to į šį mišinį buvo pridedama DNR ligazė T4. Esant lipniems galams fago RF DNR sekoje ir DNR sekoje, koduojančioje kAH(F), kurios gaunamos, panaudojant dvi skirtingas restriktazes, kAH(F) DNR seka gali būti selektyviai įterpta į fago RF DNR ir gali būti įterpiama teisinga 5'-3' orientacija, tai pavaizduota Fig. 7. Po to buvo atliekama *E. coli* JM101 transformacija tokiu pat būdu, kaip ir aprašytu aukščiau M13mp8/BGH_{ex-1} atveju, gaunamame rekombinantiniame vektoriuje M13mp8/PGH_{ex-1} yra DNR seka, koduojanti jAH(F). Po to transformuotos *E. coli* JM101 ląstelės buvo auginamos 1xYT terpėje, kurioje buvo chomogeninės medžiagos, ir atranka buvo atliekama pagal bespalvių dėmių susidarymą, tai aprašyta aukščiau. DNR sekos, koduojančios kAH(F), įterpimas buvo patikrinamas sekančiais. Buvo atrenkamos bespalvės dėmės, o RF DNR iš M13mp8/PGH_{ex-1}, išskirta pagal aprašytą aukščiau būdą, buvo skaldoma restriktazėmis EcoRI ir HindIII ir, analizuojant elektroforezės agarozėje pagalba, buvo gaunamas 590 bazių porų dydžio fragmentas, kuriame buvo įterpta kAH(F) DNR seka. Po to fagas M13mp8/PGH_{ex-1} buvo padauginamas naudojant *E. coli* JM101, o fago ssDNR buvo išskiriama pagal aprašytą aukščiau būdą.

DNR iš M13mp8/PGH_{ex-1} buvo naudojama matrica kryptingai mutagenezei, tai pavaizduota Fig. 8, mutagenezė buvo atliekama taip pat kaip ir konstruojant seką, koduojančią jAH(A, L), panaudojant specialų pradmenį (žiūr. Lentelę 1, kuri pateikiama žemiau). Alanino kodono, šiuo atveju GCC, prijungimo prie DNR sekos, koduojančios kAH(A), tikimybė yra apie 12%. Gauta seka, koduojanti kAH(A), buvo analizuojama sekvenuojant.

Pavyzdys 3

Šis pavyzdys tai ekspresijos vektorių, kurių pagalba pasiekiami tiesioginė heterologinių polipeptidų, kurių N gale yra alaninas, produkcija bakterijose, konstravimo ir ekspresijos iliustracija. Gaunami trys polipeptidai, somatotropinų formos jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH(A). Šis pavyzdys yra jAH(V) konstravimo ir ekspresijos ir jAH(L) konstravimo ir ekspresijos iliustracija. Gaunami polipeptidai, atitinkamai, yra Met-jAH(V) ir Met-jAH(L).

LENTELĖ 1

15 Sekų, koduojančių somatotropinus, kurių N gale yra alaninas, konstravimas

Baltymas	Pradmens seka ¹	Matrica	Plazmidė ²
Met-jAH(V)	5'-GGT GCC ATC TTC CAC CTC CCG CAT CAG	M13mp8/BGH _{ex-1}	pMON3214
jAH(A, L)	5'-CAC ATA GCT GGG AAG GCC ATA GAA TTC	M13mp8/BGH _{ex-1}	pMON3209
jAH(A, V)	5'-GGT GCC ATC TTC CAC CTC CCG CAT CAG	M13mp8/BGH _{ex-1}	pMON3215
kAH(A)	5'-CCA GTG AAT TCT ATG GCC TTC CCA GCT ATG	M13mp8/PGH _{ex-1}	pMON3213

¹ Pabrauktos bazės pradmenų sekoje koduoja norimą prijungimą arba mutaciją.

² Taip žymimos galutinės plazmidės, kurios buvo naudojamos polipeptidų, kurių N gale yra alaninas, gavimui kultivuojant *E. coli*.

A. jAH(A, L), jAH(A, V), jAH(L) ir jAH(V) ekspresija

DNR sekos, koduojančios jAH(A, L), jAH(A, V) ir jAH(V), kurios yra rekombinantiniuose vektoriuose M13mp8/BGH_{ex-1} /Ala/, M13mp8/BGH_{ex-1} /Ala, Val/ ir M13mp8/BGH_{ex-1} /Val/, atitinkamai, buvo panaudotos pakeičiant DNR seką, koduojančią jAH(L), kuri yra ekspresijos plazmidėje pBGH_{ex-1} (žiūr. Fig. 5 ir 6). Tai buvo atliekama skeliant RF DNR iš M13 restriktaze XbaI. Ekspresijos plazmidė pBGH_{ex-1} taip pat buvo skeliama restriktaze XbaI, po to paveikiama šarmine fosfataze iš jaučio žarnyno, norint išvengti pakartotinio ligavimosi. Kiekviena perskelta RF DNR atskirai buvo sumaišoma su perskelta plazmidės pBGH_{ex-1} DNR ir buvo atliekamas ligavimas pagal aukščiau aprašytą metodiką, per naktį 14°C temperatūroje. Gautuose rekombinantiniuose ekspresijos vektoriuose, žymimuose pMON3209, pMON3215 ir pMON3214, yra DNR sekos, koduojančios jAH(A, L), jAH(A, V) ir jAH(V), atitinkamai. Po to buvo transformuojamos *E. coli* W3110 ląstelės ligavimo mišiniu, kuriame buvo arba pMON3209, arba pMON3215, arba pMON3214, arba pBGH_{ex-1}, po transformacijos bakterijos buvo auginamos Lauria buljone (LB), kuriame buvo 1% (m/t) triptono, 0.5% (m/t) mielių ekstrakto ir 0.5% (m/t) NaCl ir 12.5 µg/ml tetraciklino ir 200 µg/ml ampicilino. *E. coli* W3110 kamieno, kuriame yra pMON3209, deponavimo kodas yra ATTC 53024, *E. coli* W3110 kamieno, kuriame yra pMON3215, deponavimo kodas yra ATTC 53022. Ląstelių transformacija trumpai gali būti aprašoma sekančiai: *E. coli* W3110 kultūra buvo auginama apie 50 ml LB terpės iki OD₆₀₀=0.60. Po to ląstelės surenkamos ir suspenduojamos 10 ml buferinio tirpalo A:25 mM TRIS, pH 7.6 ir 10 mM NaCl. Suspensija centrifuguojama, ląstelės vėl suspenduojamos 1 ml buferinio tirpalo A į kurią buvo pridedama 14 ml buferinio tirpalo B:25 mM TRIS, pH 7.6, 10 mM NaCl, 50 mM CaCl₂ ir ląstelių suspensija buvo išlaikoma lede 30 minučių. Po to ląstelės buvo nucentrifuguojamos ir suspenduo-

jamos 3 ml buferinio tirpalo B. 0.2 ml ląstelių su-
 spensijos buvo sumaišoma su 0.1 ml buferinio tirpalo B
 ir su 0.1-0.5 μ g tikslinio ekspresijos vektoriumi
 (pMON3209, pMON3215, pMON3214 arba su pBGH_{ex-1}) ir iš-
 5 laikomos lede 60 minučių. Mišinys per 1 minutę buvo
 pašildomas iki 37°C temperatūros ir pridedama 3 ml LB
 terpės; gautas mišinys buvo inkubuojamas 60 minučių
 37°C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės buvo nu-
 centrifūguojamos ir vėl suspenduojamos 300 ml LB terpės
 10 ir auginamos lėkštelėse su LB, pridėjus antibiotikus,
 kaip aprašyta aukščiau. Buvo atrenkamos atsparios an-
 tibiotikams bakterijų kolonijos ir iš ekspresijos vek-
 torių pMON3209, pMON3215, pBGH_{ex-1} ir pMON3214 buvo iš-
 skiriama DNR pagal metodą, aprašytą knygoje "Moleku-
 15 linis klonavimas: Laboratorinis vadovas", Maniatis,
 Fritsch, Sambrook (red.), (1982). DNR iš pMON3209,
 pMON3215, pMON3214 ir pBGH_{ex-1} buvo patikrinama ar yra
 590 bazių porų XbaI fragmentas ir 200 bazių porų
 HindIII/SmaI fragmentas, jei šie fragmentai yra, tai DNR
 20 seka, koduojanti jAH(A, L), jAH(V) ir jAH(A, V), yra
 teisingai orientuota. Plazmidės pMON3209 ir pMON3215
 buvo analizuojamos, skaldant restriktaze HaeIII, norint
 įsitikinti, kad yra nauja HaeIII skėlimo sritis, kuri
 susidaro prijungus kodoną GCC (alanino). Pagaliau, buvo
 25 dalinai analizuojama, pagal pateiktą aukščiau aprašymą,
 XbaI fragmento, kurio ilgis 590 bazių porų, iš vektorių
 pMON3209, pMON3214 ir pMON3215, seka tam, kad patvir-
 tinti, kad yra ekspresijos vektoriuose DNR sekos, ko-
 duojančios jAH(A, L), jAH(V) ir jAH(A, V).
 30

Kiekviena *E. coli* W3110 kolonija, kuriose buvo vek-
 toriai pMON3209, pMON3214, pBGH_{ex-1} ir pMON3215, buvo
 persėjamos atskirai į 5 ml LB, kurioje buvo 12.5 μ g/ml
 tetraciklino, ir buvo auginamos aeruojant per naktį
 35 37°C temperatūroje. Po išauginimo kiekvienos kultūros
 0.5 ml buvo persėjami atskirai į 250 ml mikrobangines
 kolbas po 25 ml M9 terpės, jos sudėtis: (litrai terpės)

100 ml 10x druskų mišinio tirpalas [70 g Na_2HPO_4 , 30 g KH_2PO_4 , 5 g NaCl , 10 g NH_4Cl iki bendro 100 ml tūrio], 1.2 ml 1M MgSO_4 tirpalo, 0.25 ml 0.1% vitamino B_1 , 12.5 ml 20% (m/t) gliukozės tirpalo, 0.025 ml 1M CaCl_2 tirpalo, ši terpė buvo papildoma 0.5% (m/t) casamino rūgštimis ir 6.25 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklinu. Kiekviena kultūra buvo auginama aeruojant 37°C temperatūroje tol, kol OD_{600} (optinis tankis 600 nm ilgio bangoje) pasiekdavo 1.0. Iš kiekvienos kolbos buvo paimama 0.2 ml kultūrinio skysčio ir ląstelės lizuojamos buferiniame tirpale su natrio dodecilsulfatu (SDS) ir lizatas buvo analizuojamas SDS PAGE (elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis) pagal metodiką, aprašytą Lemli, Nature (1970), t. 227, p. 680-685. Elektroforegramoje visų *E. coli* W3110 ląstelių lizatuose buvo matomi dominuojantys baltymai, kurių molekulinė masė 22 000 D. Šie dominuojantys 22 000 D baltymai rišosi su antikūnais F 11-A1-86 (žiūr. Krivy ir Royold, Hibridoma, (1984), t. 3, p. 252-262), kurie yra prieš jaučio hipofizio somatotropiną, analizuojant Western Blot (žiūr. Krivy ir Royold, Hibridoma, (1984), t. 3, p. 252-262), tai patvirtina, kad gauti polipeptidai yra tokie pat, kaip ir hipofizinis somatotropinas. Kontrolinės *E. coli* W3110 kultūros ląstelės, kuriose yra tik tėvinė plazmidė pBR322, neprodukavo 22 000 D baltymų, kurie susirištų su antikūnais prieš somatotropiną.

Bakterijos, kuriose buvo ekspresijos plazmidės pMON3209, pMON3214, pBGH_{ex-1} ir pMON3215, buvo saugomos sekančiai. Kiekviena *E. coli* W3110 kultūros kolonija, transformuota viena plazmide arba pMON3209, arba pMON3215, arba pMON3214, arba pBGH_{ex-1} buvo auginamos aeruojant per naktį 37°C temperatūroje 5 ml LB, pridėjus 12.5 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklino. Kiekvienos išaugintos kultūros 1 ml buvo įpilamas į atskiras kolbas, kuriose buvo 25 ml LB ir 12.5 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklino, ląstelės buvo auginamos kol OD_{600} pasiekdavo 1.0. Ląstelės buvo surenkamos 5 mi-

5 nutes centrifūguojant 6 000 xg, esant 4°C temperatūrai. Ląstelės buvo atskirai suspenduojamos 12 ml LB, pridėjus 7.5% (m/t) DMSO ir greitai užšaldomos sausame lede porcijomis po 1 ml. Ląstelės buvo saugomos skystame azote. Be to apie 10 mikrogramų išgrynintos plazmidės DNR buvo saugoma minus 80°C temperatūroje.

10 *E. coli* W3110 kultūra, kurioje yra pMON3213, buvo deponuota Amerikos mikroorganizmų muziejuje (ATCC), jos kodas - ATCC 53023. Sekos, koduojančios kAH(L), pakeitimas seka, koduojančia kAH(A), ekspresijos vektoriuje pBGH_{ex-1}* buvo patvirtintas išskiriant DNR pMON3213 ir skaldant šią ekspresijos vektorių fermentais EcoRI ir HindIII, norint patikrinti, ar susidaro 590 bazių porų fragmentas, o skeliant restriktaze HaeIII, turi būti gaunamas papildomas fragmentas, kuris susidaro DNR sekoje, koduojančioje kAH(A), papildomai įvedus alanino kodoną. Galutinis įrodymas, kad tikrai ekspresijos vektoriuje pMON3213 yra DNR seka, koduojanti kAH(A), buvo gaunamas dalinai nustatant 590 bazių porų EcoRI/HindIII fragmento nukleotidų seką, naudojant būdą, aprašytą aukščiau.

25 DNR sekos, koduojančios kAH(A), ekspresija ir kAH(A) produkcija *E. coli* W3110 kultūroje buvo atliekama taip pat kaip jAH(A, L) ir jAH(A, V) atveju, kuris yra aprašytas aukščiau. Taip pat buvo stebima dominuojančio 22000 D baltymo produkcija, analizuojant SDS PAGE, šis analizės metodas buvo aprašytas aukščiau.

30 *E. coli* W3110 ląstelės, transformuotos ekspresijos vektoriumi pMON3212, buvo saugomos taip pat, kaip buvo aprašyta aukščiau, jos buvo naudojamos gaunant didelius kAH(A) kiekius (fermentacijos buvo vykdomos nuo 10 iki 100 l) auginimas buvo atliekamas taip pat, kaip buvo aprašyta aukščiau. kAH(A) išėiga auginant 100 l fermentatoriuje apytikriai buvo 1 g tikslinio baltymo 1 litre

kultūrinio skysčio; tai buvo nustatyta, analizuojant radioimuninės analizės pagalba (Rozner ir kt., J. Immunol. Methods, (1982), t. 52, p. 175-181.

5 Pavyzdys 4

Šis pavyzdys buvo atliktas, norint nustatyti heterologinių baltymų jAH(A, L), jAH(A, V), Met-jAH(V), Met-jAH(L) ir kAH(A), produkuotų bakterijose, būdu, aprašytu šio išradimo realizavimo pavyzdžiuose, kuris yra šio išradimo objektas, N baltymų galų aminorūgščių liekanų sekas.

Somatotropiniai polipeptidai, produkuojami *E. coli* ląstelėse, buvo gryninami iš ištirpintų intarpinių kūnelių, kuriuose buvo vienas iš baltymų arba jAH(A, L), arba jAH(A, V), arba Met-jAH(V), arba Met-jAH(L), arba kAH(A), panaudojant imunoafininę chromatografiją, šis gryninimo metodas aprašytas Krivy ir Rould, Hibridoma, (1984), t. 3, p. 151-161. Visi trijų formų somatotropinai buvo išgryninami imunoafininės chromatografijos pagalba iki 95%; tai buvo nustatoma SDS PAGE, naudojant gradientinį poliakrilamido gėlį nuo 7.5 iki 15%, užnešant 1 µg išgryninto baltymo, tai buvo atliekama pagal Lemli, Nature (1970), t. 227, p. 680-685. Išgrynintų jAH formų baltymų koncentracija buvo nustatoma, naudojant aukšto efektyvumo skysčių chromatografiją. Baltymai, prieš nustatant aminorūgščių liekanų sekas N gale, išgryninti imunoafininės chromatografijos pagalba, buvo dializuojami prieš vandenį ir po to buvo liofilizuoti. Prieš analizuojant N galų sekas, išgryninti baltymai buvo ištirpinami 50 mM amonio bikarbonato buferiniame tirpale su 0.1% (m/t) SDS (natrio dodecilsulfato) ir dializuojami šiame buferiniame tirpale tam, kad pašalinti TRIS (tris-oksimetilaminometaną) ir gliciną. Po to N galo sekos buvo nustatomos, panaudojant Baltymų aminorūgščių liekanų sekų Analizatorių,

modelis 470A, firma Applied Biosystems (firma Applied Biosystems, Inc., Foster Sity, Kalifornija), pagal metodiką, aprašytą Chankapiller ir kt., (1983), Methods in Enzymology, t. 91, p. 399-413 ir Chankapiller ir kt., (1983), Methods in Enzymology, t. 91, p. 486-493.

Lentelėje 2 pateikiami jAH(A, L), jAH(A, V), Met-jAH(V), Met-jAH(L) ir kAH(A) kelių preparatų sekų analizės duomenys. Baltymo, kurio N gale yra metioninas, kiekis lentelėje 2 pateikiamas procentais nuo bendro somatotropino kiekio bandinyje. Metionino nustatymui buvo naudojami du metodai. Naudojant netiesioginį metodą, NH₂-Met-Ala-Phe-... kiekis dominuojančioje populiacijoje NH₂-Ala-Phe-... buvo skaičiuojamas pagal lag-signalų skirtumą. Kadangi ši procedūra priklauso nuo "normalios" sekos lag įvertinimo, kuris kinta ciklas nuo ciklo, tai šis metodas tinka tik grubiam NH₂-Ala-Phe-... sekos įvertinimui. Tiesioginis metodas, kurio metu baltymas skaldomas Edmano reakcijos pagalba, paremtas PTH-Met signalų dydžių sulyginimu su PTH-Ala, atskyrus PTH-Met signalą nuo triukšmų, naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (HPLC). "PTH" - pažymėta feniltiochidantoinas. Konkrečiai, Edmano degradacijos principas yra reaktyvo, kuris nuskelia N gale esančią aminorūgšties liekaną, sąveika su šia aminorūgšties liekana, susidarant laisvam PTH ir aminorūgšties liekanos junginiui. Šio metodo pagalba galima gana tiksliai nustatyti seką Met-Ala-Phe-... tuo atveju, kai yra nežymus užterštumas laisva aminorūgštimi.

Iš duomenų, pateiktų lentelėje 2, kuri yra pateikiama žemiau, matome, kad metioninas nėra nuskeliamas, jei po jo seka fenilalaninas. Bet, virš 80% molekulių, kurios produkuojamos, naudojant genetines konstrukcijas MBS(A, L) ir MBS(A, V), N gale yra alaninas. Metionino, esančio baltymo gale, nuskėlimo laipsnis kinta įvairiose fermentacijose, bet visada yra didesnis, nei 80% nuo visu

somatotropino molekulių. Somatotropinų, produktojamų transformuotuose mikroorganizmuose, ekspresijos lygis buvo pasiektas 10-15% nuo bendro bakterijų baltymo kiekio.

5

Lentelė 2

Met-jAH(L), jAH(A, L), jAH(A, V) ir kAH(A) baltymų N galo aminorūgščių liekanų analizė

10

Baltymas	Metioninas N gale, % ¹	
	Netiesioginis	Tiesioginis
Met-jAH(L)	92.0	100.0
jAH(A, L)	20.3 ²	18.4 ²
	10.8	6.0
jAH(A, V)	7.5 ²	3.0 ²
	16.7	9.0
kAH(A)	16.7	17.0
Met-jAH(V)	neanalizuota	100.0

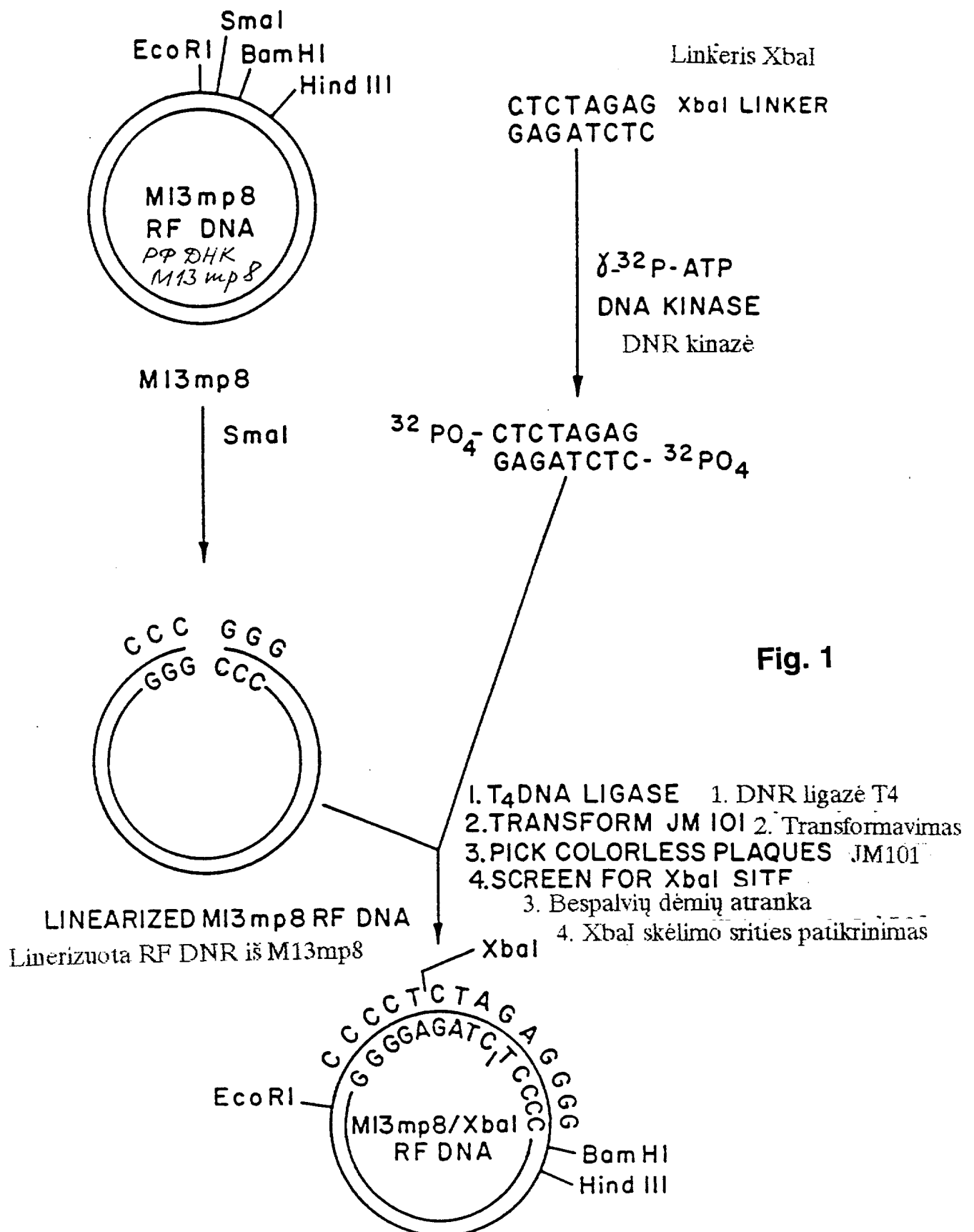
¹ Baltymo, kurio N gale yra metioninas, kiekis procentais, nuo bendro somatotropino kiekio mėginyje.

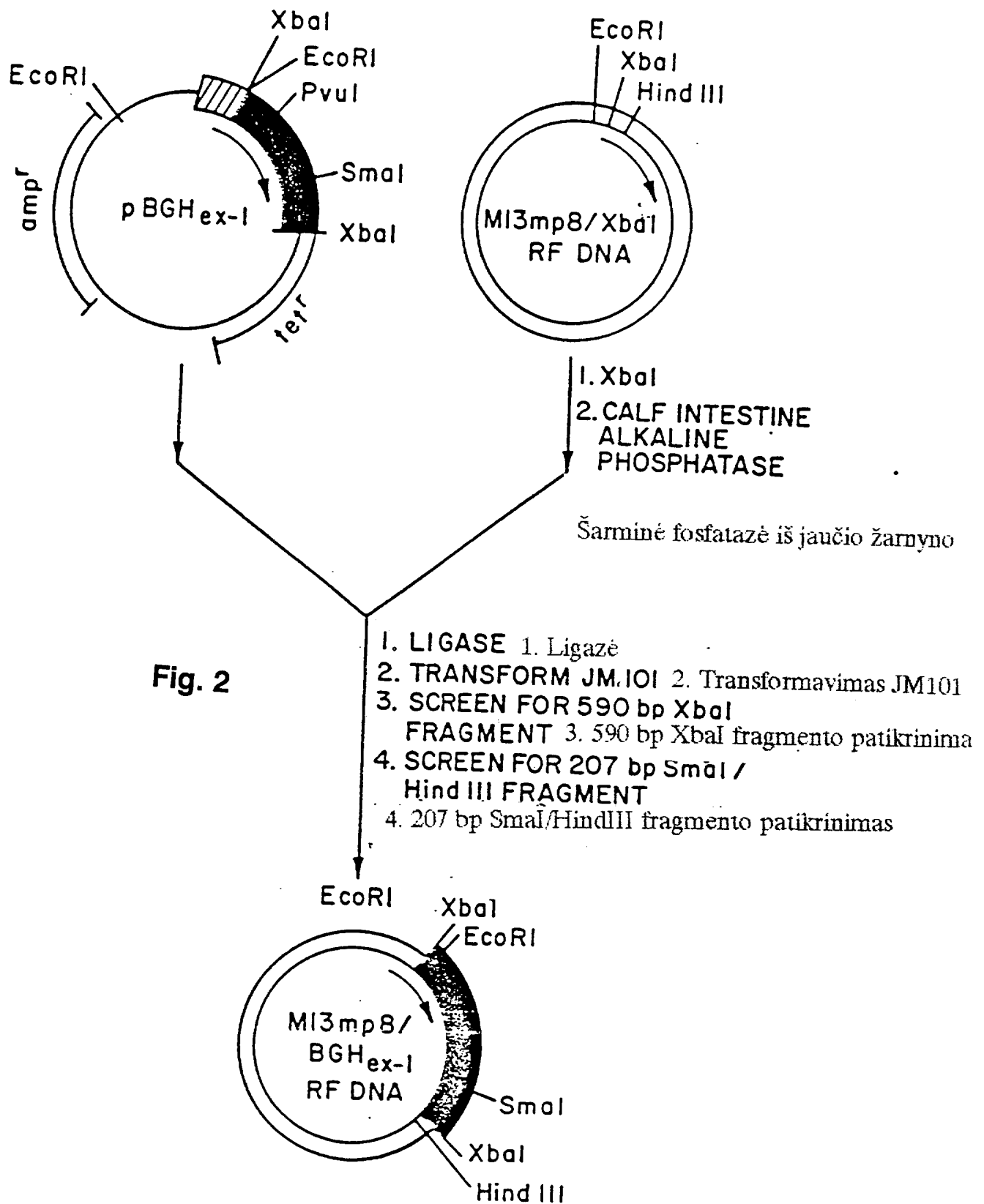
15 ² Duomenys gauti analizuojant baltymus iš skirtingų fermentacijų.

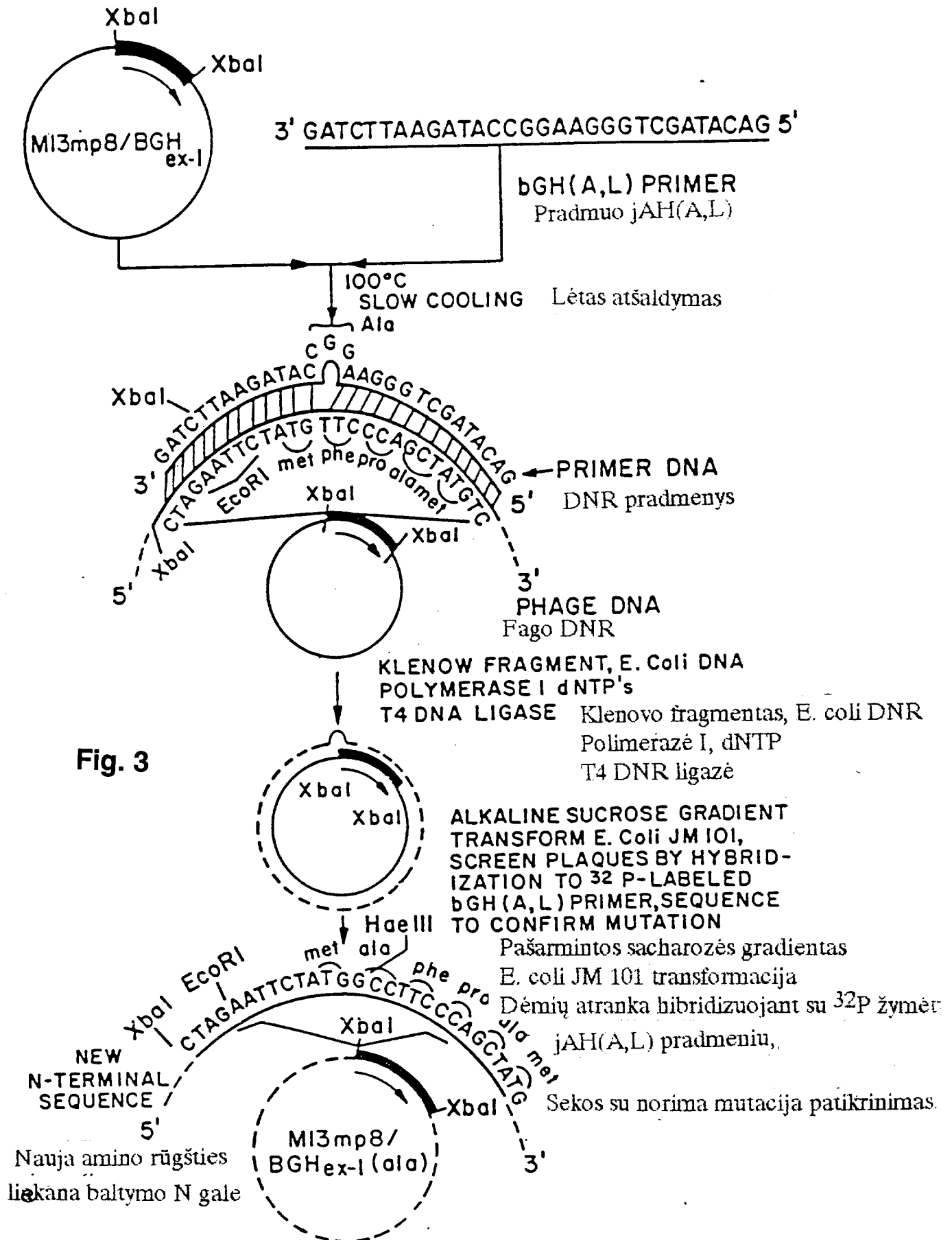
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kiaulės augimo hormono gavimo būdas, apimantis kDNR, koduojančios kiaulės augimo hormoną, gavimą, kDNR įterpimą į bakterinę plazmidę, *Escherichia coli* kamienų transformaciją gauta rekombinantine plazmide, klonų, kuriuose yra rekombinantinės plazmidės, atranką ir kDNR iš šių plazmidžių įterpimą į ekspresijos vektorių, po to sekančią *Escherichia coli* kamienų transformaciją gauta rekombinantine plazmide, transformuotų kamienų atranką, kultivuojant terpėje, galutinio produkto išskyrimą ir gryninimą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad siekiant gauti kiaulės augimo hormoną, kurio N-gale yra alaninas, į kDNR fragmentą, išskirtą iš rekombinantinės plazmidės pPGH_{ex-1}, vietoje DNR sekos, koduojančios kAH(F), įterpia alanino kodoną prie pat vieno arba kelių, esančių greta, ATG kodonų.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kiaulės augimo hormonas yra kAH(A).
3. Heterologinio polipeptido, kurio N gale yra alaninas, gavimo bakterijose būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad vykdo genominės DNR ekspresiją pasirinktose bakterijose, paminėtoje DNR aukščiau minėto polipeptido kodonai yra iškart po vieno - trijų, greta esančių, metionino kodonų, ir išskiria sintetinamą minėtų bakterijų viduje polipeptidą, kurio N gale yra alaninas.
4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ne mažiau 80 % (pagal svorį) susintetinto aukščiau minėtoje bakterijoje po aukščiau minėtos DNR ekspresijos polipeptido sudaro polipeptidas, kurio N gale yra alaninas.

5. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad naudoja *E. coli* bakterijas.
- 5 6. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad aukščiau minėto, gauto polipeptido amino rūgš-
čių liekanų seka iš esmės yra tokia pat, kaip sutinkamo
gamtoje eukariotinio polipeptido.
- 10 7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad eukariotinis polipeptidas turi somatotropinį
aktyvumą.







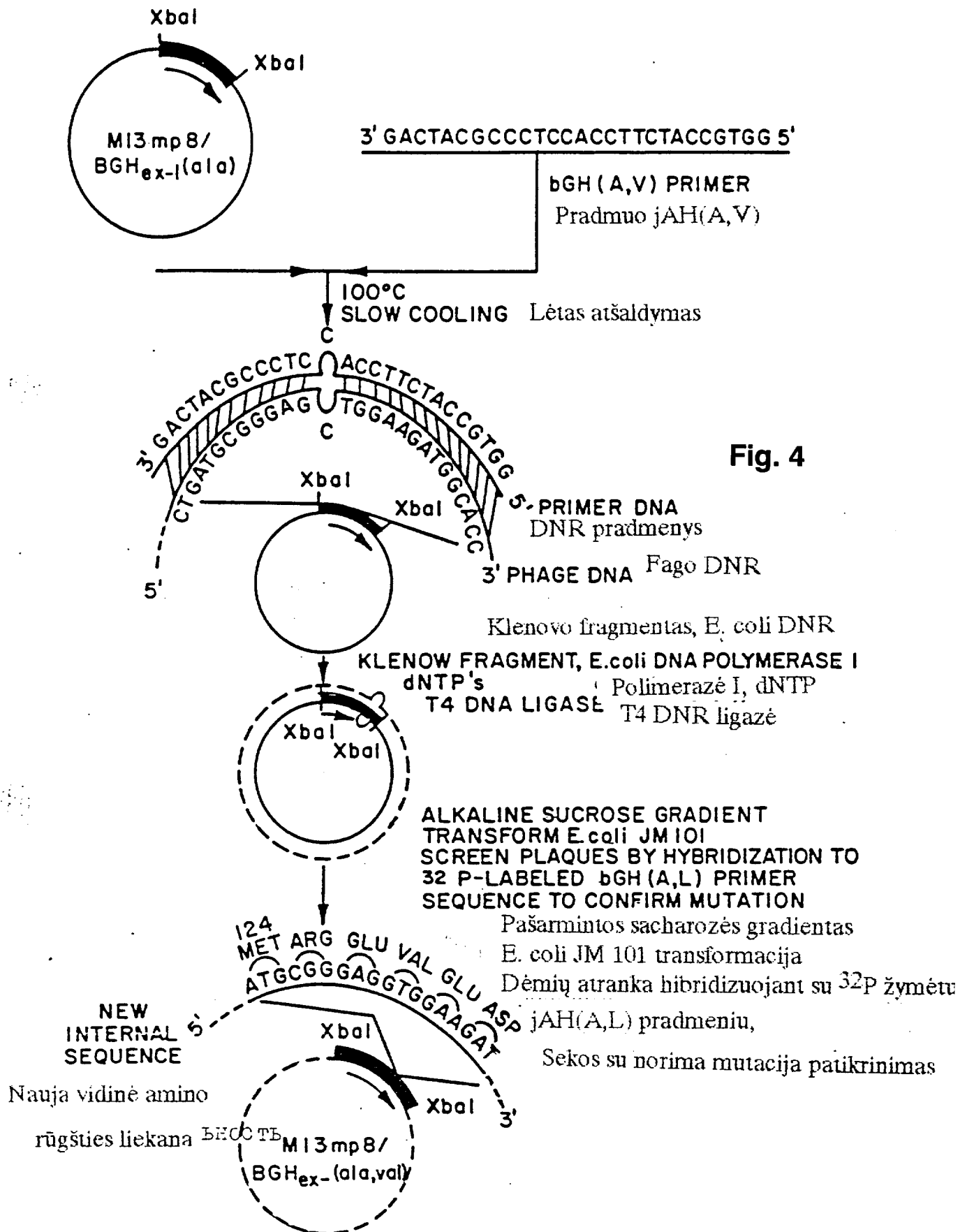


Fig. 4

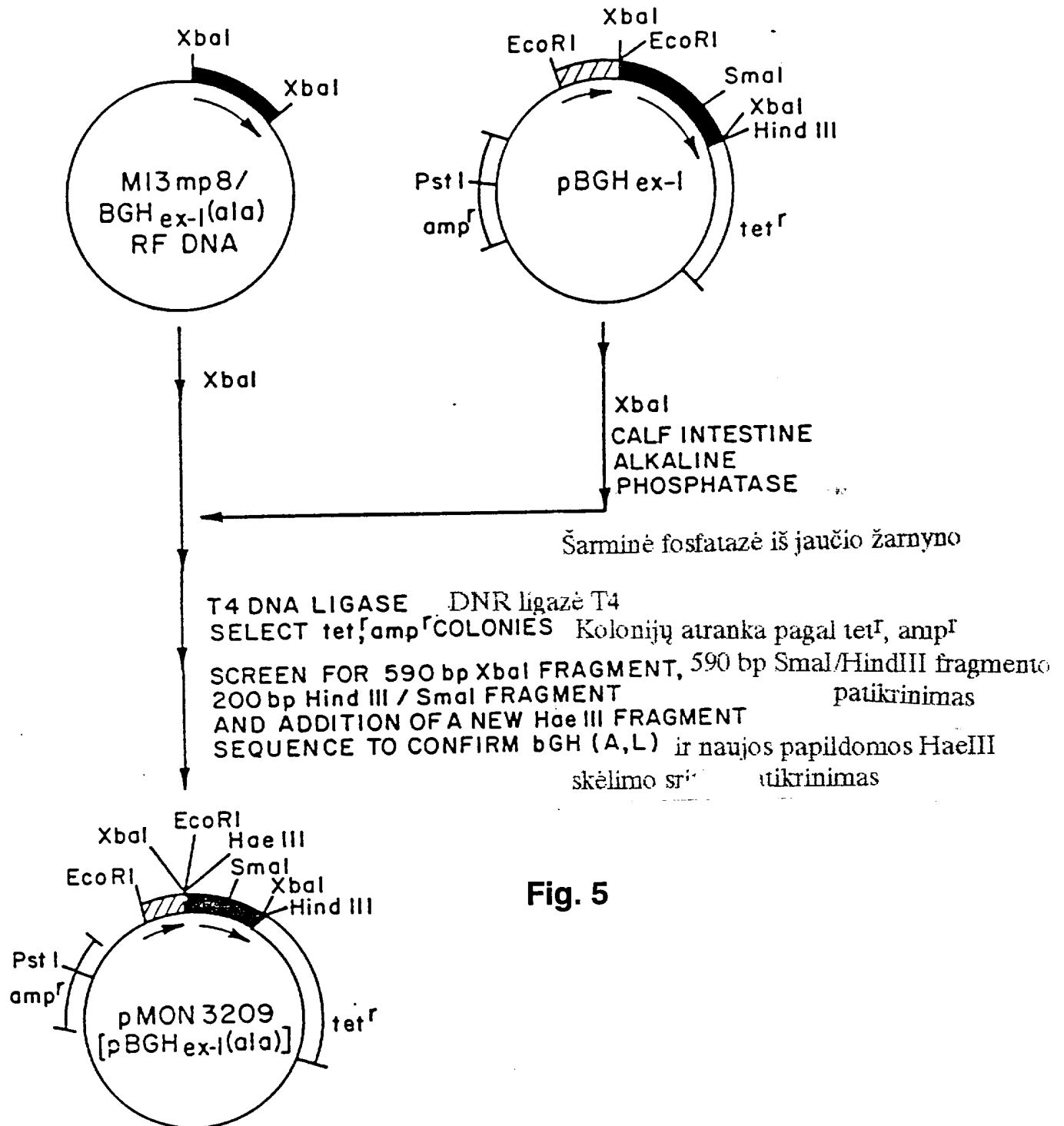


Fig. 5

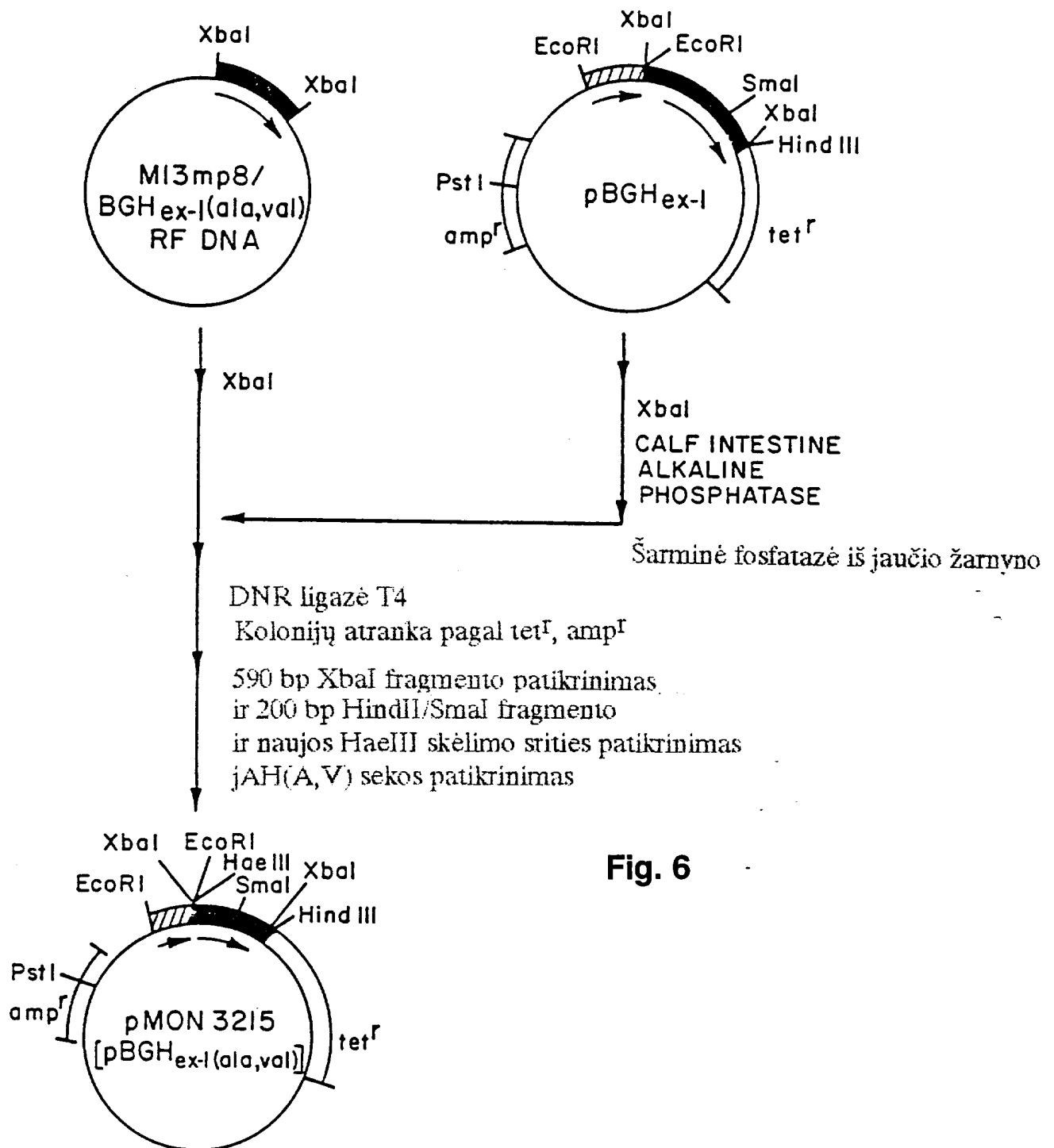


Fig. 6

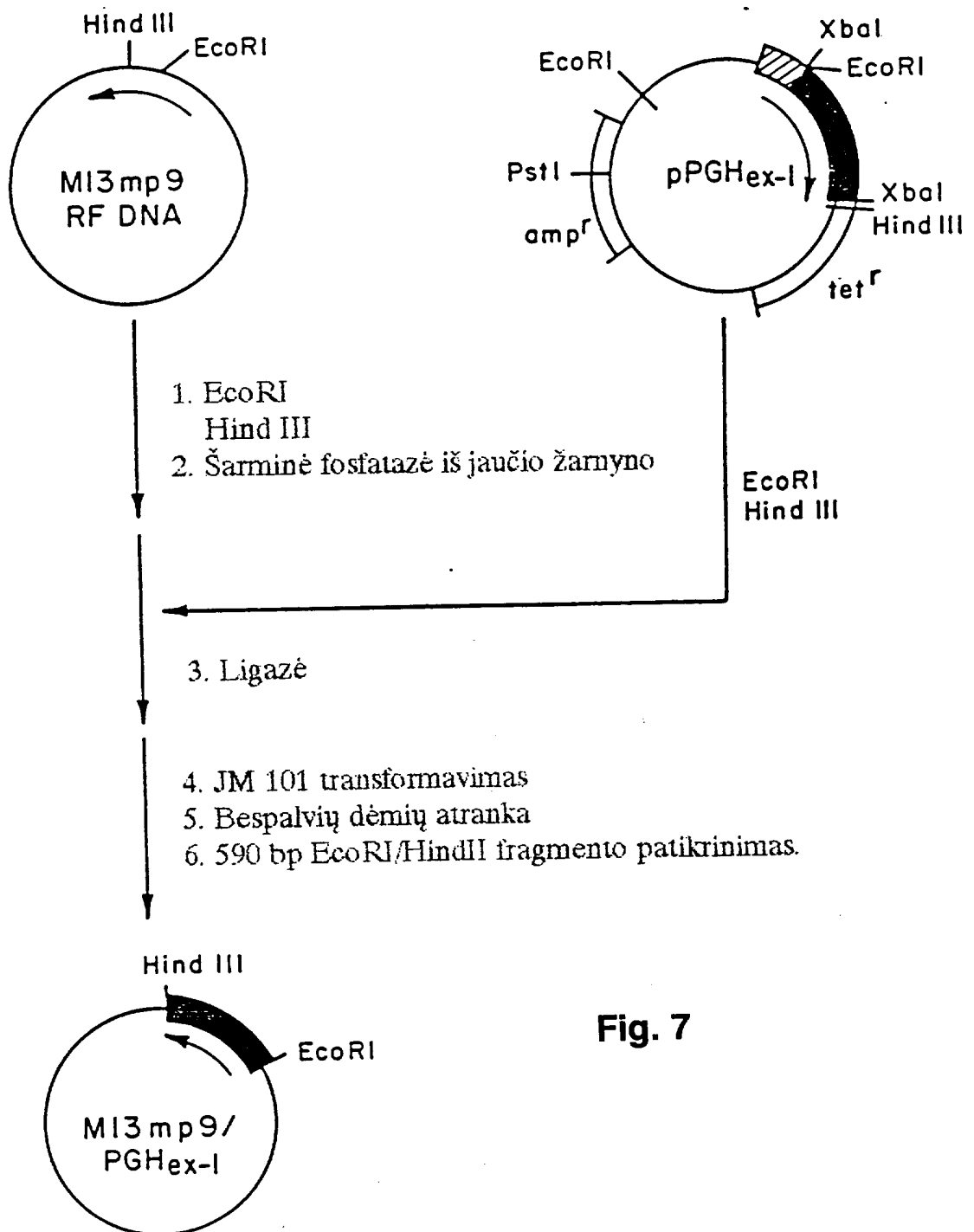


Fig. 7

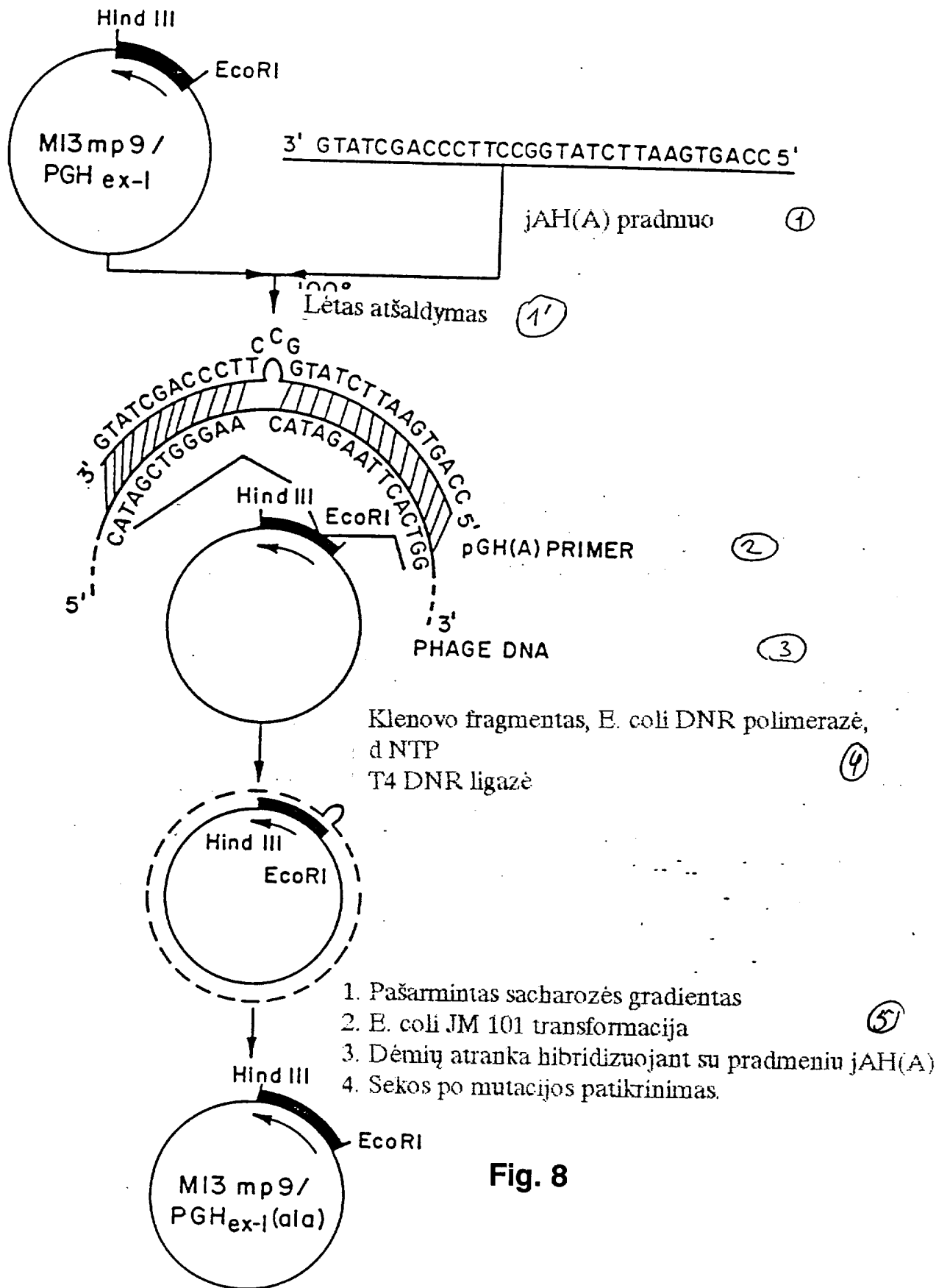
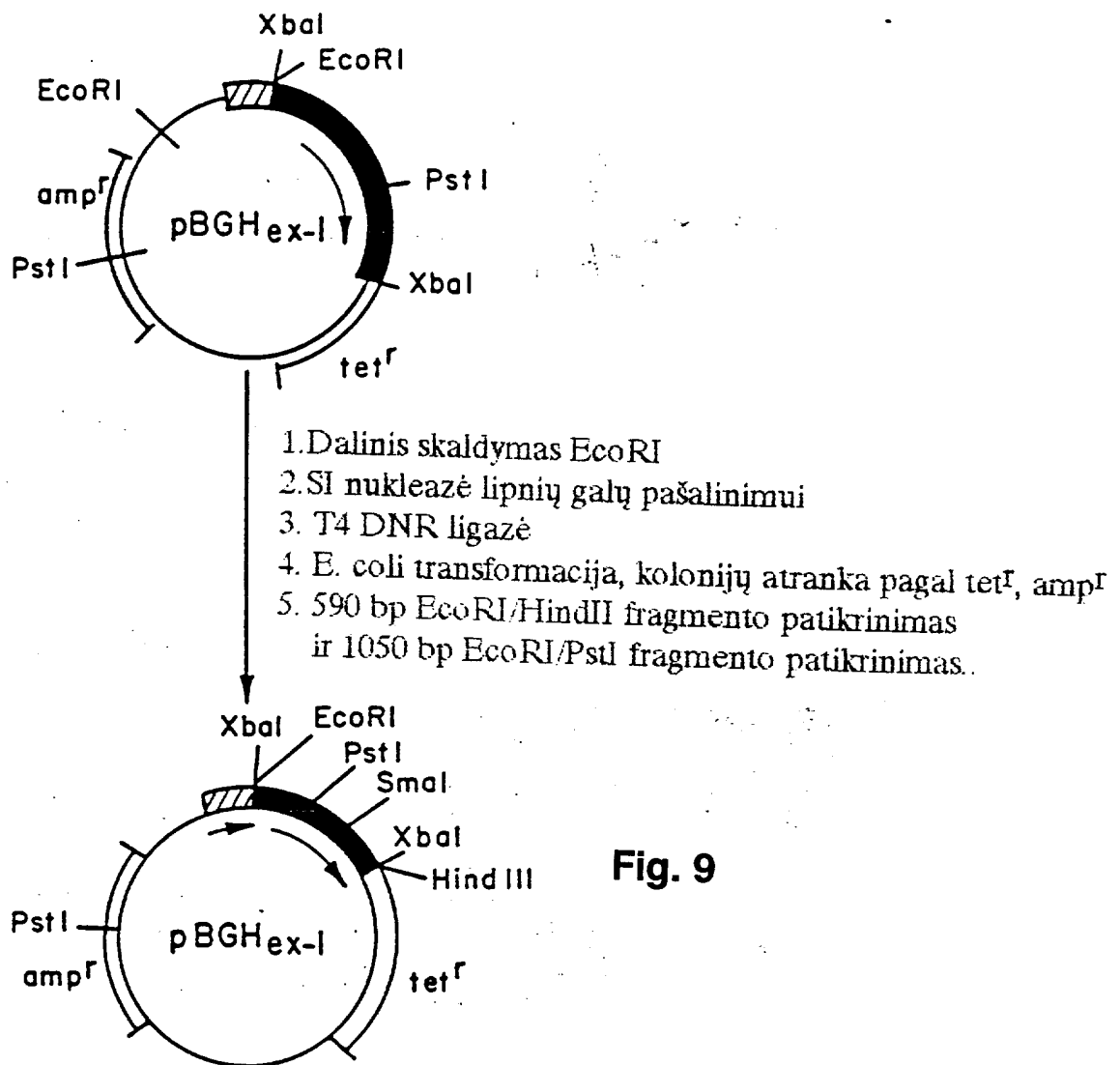


Fig. 8



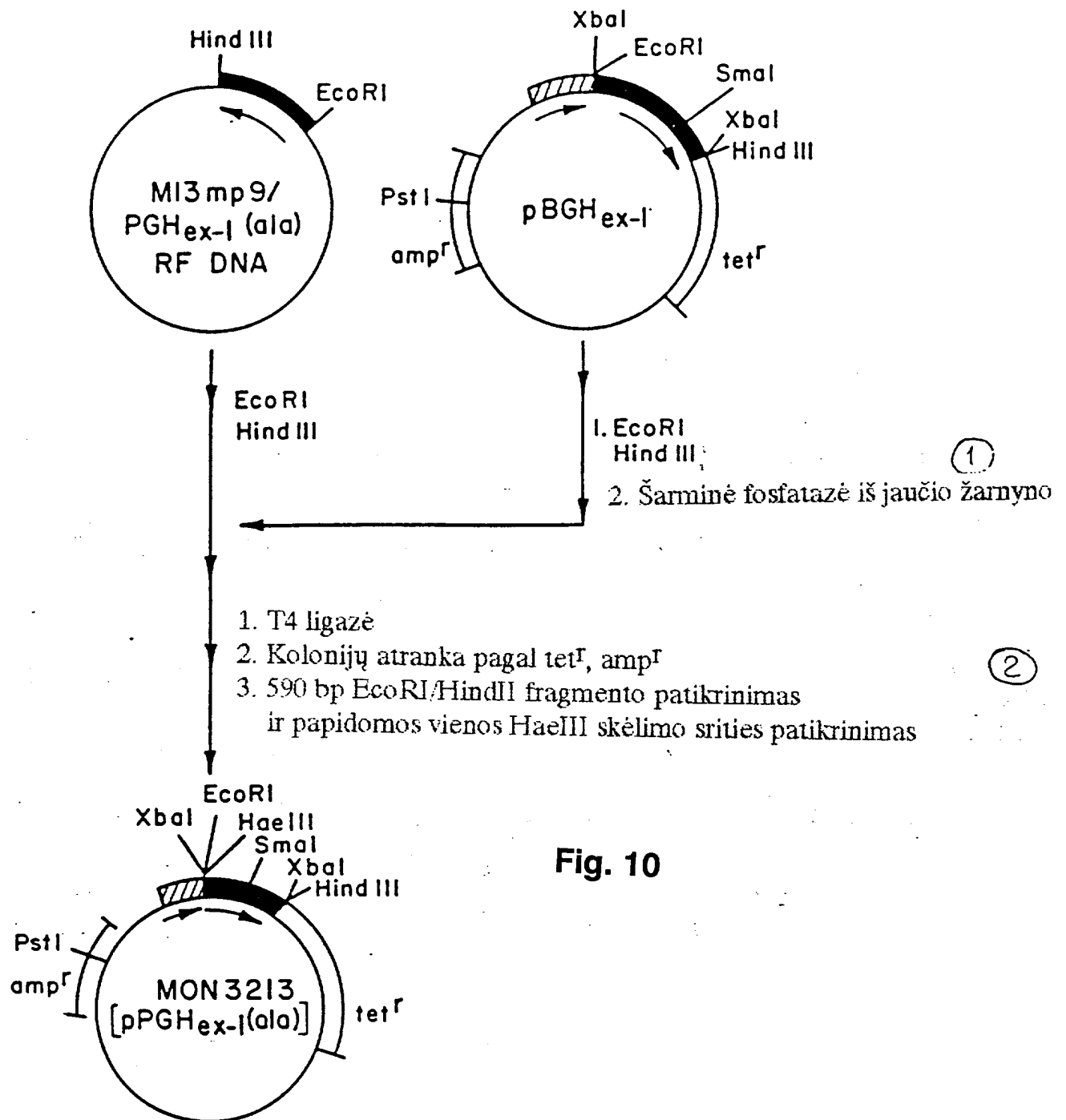


Fig. 10