

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3948**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 15/12,**
C07K 3/12,
C12N 9/48,
C12N 15/74,
A61K 37/02

(21) Paraiškos numeris: **IP1532**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 06**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 05 27**

(60) SU duomenys: **SU 5010518, 1992 01 09**

(31,32,33) Prioritetas: **41 01 736.6, 1991 01 22, DE**

(72) Išradėjas:

Gerd Josef Steffens, DE
Wolfgang Amandus Guenzler, DE
Leopold Flohe, DE
Regina Elfriede Brigelius-Flohe, DE
Bernhard Wolf, DE

(73) Patent savininkas:

Gruenenthal GmbH, Zieglerstrasse 6, D-52078 Aachen, DE

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

DSM 5018, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DE

(54) Pavadinimas:

Poli-peptidas, plazmidės, plazmidžių gavimo būdas, polipeptido gavimo būdas,
trombolitinė priemonė, polipeptido pritaikymas

(57) Referatas:

Aprašyti nauji, naudojami kaip plazminogeno aktyvatoriai, polipeptidai, kurių bendra formulė:

Ser- X_1 - X_2 -rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹

(I),

kurioje X_1 ir X_2 yra tam tikros aminorūgščių liekanos arba trumpi polipeptidai, X_2 vietoje gali būti vienguba jungtis ir rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ - neglikozilinta aminorūgščių sekos sritis nuo 143 (Glu) iki 411 (LeuOH) iš scu-PA 54 k. Šiems junginiams gauti buvo sukonstruotos naujos plazmidės, kurios pačios smulkiau aprašomos arba aprašomas jų konstravimas. Jos ekspresuoja aukštomis išeigomis tinkamuose bakterijų kamienuose nepasižymintį plazminogeno aktyvacija produktą. Po šių junginių modifikacijos gaunami nauji viengrandžiai junginiai, kurių formulė I, svarbūs, kaip plazminogeno aktyvatoriai.

Pagal šį aprašymą nauji polipeptidai yra efektyvūs plazminogeno aktyvatoriai, todėl jie su didele sėkme naudojami kaip trombolitinės medžiagos. Gydant fibrino sudarytus trombus kraujagyslėse, pavyzdžiui, miokardo infarktas, plaučių arterijos embolija, galūnių venų ir arterijų trombozė ir kt., didelę reikšmę turi plazminogeno aktyvatoriai. Apytikriai nuo 1950 m. pradžios žinoma, kad žmogaus šlapime yra mažiausia vienas proteolitinis fermentas, kuris paverčia plazminogeną į plazminą, tai yra, į fermentą, kuris suskaldo fibriną į tirpius polipeptidus ir tuo pačiu ištirpina fibrino trombus. Šis plazminogeno aktyvatorius buvo pavadintas urokinaze, po to pasirodė, kad faktiškai egzistuoja įvairios urokinazės formos, mažų mažiausia žinomas nuo 1970 metų urokinazės pirmtakas - prourokinazė. Ši prourokinazė turi vieną grandinę, taip pat yra vadinama scu-PA (urokinazės tipo vienos grandinės plazminogeno aktyvatorius). Šią scu-PA sudaro 441 aminorūgšties liekana, gamtinėje formoje yra glikozilinta 302 aminorūgšties liekanos. Šios scu-PA molekulinė masė (M_r) literatūroje yra nurodoma apytikriai 54 000 daltonų.

Po to, kai 1977 metais Nolan ir kiti (Biochim. Biophys. Acta 496, p. 384-400) nustatė žmonių audinių kultūroje, tarp kitko, urokinazės profermentą, kurio molekulinė masė atitiko žinomos mažos molekulinės masės formos urokinazės molekulinei masei (31 500 D), Wijngaards ir kiti (Thrombosis Res. 42 (1986), p. 749-760) ir Pijken ir kiti (Thrombosis Res. 42 (1986), p. 761-768) pranešė, kad egzistuoja prourokinazė, kurios dydis 30kD (30 kilodaltonų), beždžionių audinių kultūroje, apie jos gryninimą ir fibrinolitines savybes. Taip pat 1986 metais Strump ir kiti pranešė (J. Biol. Chem. 261 p. 17120-17126), kad žmonių auglio CALU-3 (ATCC, HTB 55) supernatente yra vienos grandinės prourokinazė, kurios molekulinė masė (M_r) yra apie 32 000 daltonų ir tam, kad skirti nuo didelės molekulinės masės prourokinazės

("scu-PA 54k") buvo pavadinta "scu-PA32k". Šis scu-PA 32k atitinka scu-PA 54k, kuriame nėra 143 aminorūgščių liekanų iš N-galo (nuo Ser¹ iki Glu¹⁴³), glikozilinta yra ta pati aminorūgšties liekana 302 (Asn.).

5

Publikuotoje Europos paraiškoje Nr. 247 674 A1 aprašomas scu-PA32k gavimas iš ląstelių linijos CALU-3 maitinimo terpės ir iš transfekuotų plazmidėmis pSVscu-PA-32k ir pSV5DHFR ląstelių CHO- (kinietišku žiurkėnu kiaušidžių ląstelės) maitinimo terpės. Nors ten minima galimybė panaudoti genetiškai pakeistus mikroorganizmus, norint gauti scu-PA 32k, bet papildomas aprašymas arba atitinkamas pavyzdys nepateikti.

15 Europos paraiškoje Nr. 92 182 A2 aprašoma, tarp kitko, DNR koduojančių mažos molekulinės masės urokinazę, kurios molekulinė masė apie 33 000 daltonų, ir atitinkamų plazmidžių gavimas, o taip pat jų ekspresija E. coli K12 294 (ATCC, 31 446) ląstelėse neglikozilinto baltymo, kurio molekulinė masė apie 33 000 daltonų, su nurodyta ten fig. 2A aminorūgščių liekanų seka, kuri atitinka srityje nuo 133 iki 411 scu-PA 54k baltymui.

25 Apie kai kurias neglikozilinto produkto, kuriame yra 136-411 aminorūgščių liekanos, aprašė 1987 Gunz-Iev ir kiti (Trombozė ir hemostazė, 58(1987) p. 216).

30 Publikuotame Europos patente Nr. 312 941 A2 aprašomi scu-PA 32k struktūros polipeptidai, turintys prourokinazės aktyvumą, kurie šiuo atveju turi papildomą sritį nuo 136 iki 143 aminorūgšties liekanų arba atskiras sritis, kuriose, esant būtinumui, (priklausomai nuo N-galo prigimties) 156 aminorūgšties liekana (Arg) pakeista, ir jų gavimas, ekspresuojant atitinkamoms plazmidėms E. coli K12 JM105 ląstelėse, kurios metu vyksta šių peptidų ekspresija, produktas kaupiasi viduląstelinuose intarpiniuose kūneliuose.

35

Pateikiamas išradimas yra naujų polipeptidų, kurių bendra formulė - I arba kurie atitinka struktūrinę schemą, pateiktai fig. 1, panaudojimas tepapijoje plazminogeno aktyvatoriais:

5

Ser- X_1 - X_2 -rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ (I),

kurioje

10 rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹-neglikozilinta aminorūgščių sekos sritis nuo 143 (Glu) iki 411(LeuOH) iš scu-PA 54k,

X_1 - viena iš šių aminorūgščių liekanų: Asn, Pro arba Ser ir

15

X_2 - vienguba jungtis arba Glu, Pro-Glu, Pro-Pro-Glu arba Glu-Leu-His-Leu-Leu-Gln-Val-Pro-Ser-Asn.

20

Geriausia, kai X_1 yra Asn arba ypatingai Ser. Geriausia, kai X_2 yra paprasta jungtis arba Glu, Pro-Glu arba Pro-Pro-Glu.

Teikiama pirmenybė tiems junginiams, kurių bendra (I) formulė yra:

25

Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ (Ia),

kurioje

30

rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹-turi tą pačią reikšmę, kuri nurodyta aukščiau, formulėje (I).

35

Nauji junginiai, kurių formulė yra (I), turi stipriai išreikštą specifiškumą lizuojant fibrino krešulius, t.y., jie aktyvuoja plazminogeną, esant fibrinui, bet neskelia arba labai silpnai skelia cirkuliuojantį plazminogeną, paversdami jį į plazminą. Tokiu būdu pasie-

kiamas fibrino krešulių ištirpimas, išvengiama nepageidautinų terapijoje krešėjimo faktorių ir kitų baltymų suardymo, nes, esant plazminui, tai vyksta ne taip stipriai, kai naudojami nespecifiniai plazminogeno aktyvatoriai. Nauji junginiai, kurių formulė yra (I), skirtingai nei scu-PA 54k arba jo neglikozilintai baltyminei daliai ("zaruplaze"), išsiskiria padidintu apytikriai 1.7 karto specifiniu amidolitiniu aktyvumu (matuojama naudojant chromogeninį substratą piro-Glu-Arg-p-nitroanilidą po pervedimo į dvigrandžius plazminogeninius aktyvatorius plazmino pagalba). Jei matuojama tiesiogiai fibrinolitinis aktyvumas fibrino-agaro plėvelėje, tai nauji junginiai, kurių formulė yra (I), lyginant su scu-PA 54k, turi 2,5-3 kartus didesnę efektyvumą (lizuotas plotas mm^2 miligramui baltymo). Be to, nauji junginiai, kurių formulė yra (I), priešingai nei scu-PA 54k arba "zaruplaze", negali susirišti su specifiniais ląstelių urokinazės receptoriais ir deaktyvuotis. Tokiu būdu, jie ilgesnį laiko tarpą cirkuliuoja ir sustiprina terapinį veikimą. Dėka stipresnio, palyginus su įprastomis fibrinolitinėmis priemonėmis, specifinio veikimo ir didesnės galimybės biosintzei veikimo vietoje, pasiekiamą patikimesnę lizavimo terapiją su mažesnėmis dozėmis ir mažesniais pašaliniais poveikiais, tokiais kaip kraujavimas.

Efektyviai ir patikimai trombolizei, specialiai esant arterijų trombams, ypatingai esant miokardo infarktui, terapiškai efektyvi vienkartinė dozė suaugusiam yra tik iki 15 mg junginio, kurio formulė yra (I). Palyginimui reikia pateikti darbo Bode ir kt. (Am. J. Cardiol. 61 (1988) p. 971-973) duomenis: įvedus 74 mg glikozilinto scu-PA 54k, sėkminga trombolizė vyksta tik 55% atvejų, ir reikia atkreipti dėmesį, kad šiam žinomam produktui pagal Bode ir kt. (Circulation 81 (1990) 907, p. 910), esant reikalingoms didelėms dozėms, beveik nespecifiškai lizuoja fibrininį krešulį ir, pagal daugelio tyri-

nėtojų duomenis, šios didelės dozės sukelia ryškų nei-
giamą poveikį hemostatinei sistemai.

5 Nauji junginiai, kurių formulė yra (I), gaunami rekombinantinės DNR technologijos pagalba. Tam, pagal šią išradimą, buvo sukurtos naujos plazmidės, jos ekspresuotos tinkamuose bakterijų šeimininkuose ir po produkto, gauto su didele išeiga, veikiančio ne kaip plazminogeno aktyvatoriai, procesingo, gauti nauji junginiai, kurių formulė yra (I).

15 Kaip ir daugumoje atvejų, ekspresuojant eukariotinius baltymus bakterijose, taip ir junginiai, kurių formulė yra (I), ląstelėje yra denatūruoti intarpų kūneliuose, kurie čia ir žemiau žymimi "probaltymu", kuris po tarpinio procesingo turi būti surinktas atgal su teisinga norimo produkto tretine struktūra. Tokiu būdu gautų junginių, kurių formulė yra (I), plazminogeninio aktyvatoriaus kiekį galima nustatyti, pav., pridėdant plazmino prie atitinkamo dvigrandžio neglikozilinto mažos molekulinės masės urokinazės darinio, kurio po to nustatomas fermentinis aktyvumas ir tai yra junginio, kurio formulė yra (I), kiekio matas. Bet, aišku, taip pat galima nustatyti probaltymo išeigą arba junginio, 25 kurio formulė yra (I) ir tuo pačiu ekspresijos lygį, pavyzdžiui, elektroforegramos, kurioje yra visi produkuojami baltymai, desitometrijos pagalba.

30 Pagal šią išradimą plazmidės išsiskiria tuo, kad jų operonas turi reguliuojamą, duotu atveju sintetinį, promotorių, veikiantį, kaip ribosominė ryšio vieta, Shine-Dalgarno- seką, startinį kodoną, sintetinį junginio, kurio formulė yra (I), struktūrinį geną ir 5'- kryptimi struktūriniam genui mažų mažiausia grandinės nutraukimo agentą. Geriausia, kad būtų du vienas po kito sekantys grandinės nutraukimo agentai, ypatingai trpA grandinę nutraukiantis agentas ir/arba tetA/orfL grandinę nu-

traukiantis agentas iš Th10 (pal. Schollmeier ir kiti Nucl. Acids Res. 13 (1985) p. 4227-4237).

5 Reguliuojamas promotorius - tai Trp⁻ promotorius arba Tac⁻ promotorius.

10 Kontroliuojamoje plazmidžių srityje, pagal išradimą, tarpas tarp Shine-Dalgarno-sekos ir startinio kodono yra 6 -12, geriau 8 -10 nukleotidų

15 Konstruojant pagal šį išradimą, į plazmidės struktūrinį geną įterpia koduojančias aminorūgštis-tripletus, kurių bazių seka pateikta lentelėje. Be to, struktūriniame gene gali būti pakeisti ne visi tripletai

<u>Aminorūgštis</u>	<u>Tripletas</u>
argininas	CGT
leucinas	CTG
valinas	GTT
glicinas	GGT

20 Iš kitos pusės, konstruojant struktūrinį geną tikslin-
ga, esant galimybei, vengti šių kodonų (taip pat ir
šiuo atveju struktūriniame gene gali būti pakeisti ne
visi tripletai):

<u>Kodonas, kurio reikia vengti</u>	<u>Aminorūgštis</u>
ATA	izoleucinas
GTC	valinas
CCC	prolinas
AAG	lizinas
AGG, AGA, CGG, CGA	argininas
GGA, GGG	glicinas

Dėka šio kodonų pasirinkimo struktūriniame gene ir dėka aukščiau nurodytų požymių kontroliuojančioje dalyje, stipriai sumažėja galimybė susidaryti antrinėms struktūroms tarp struktūrinio geno ir kontroliuojančios srities.

- 5
- Sintetinių struktūrinių genų, koduojančių junginius, kurių formulė yra (I), gavimui pirmiausia sintetina nukleotidus po 40 -80 bazių sekas. Tikslinga jas sintetinti po 1 μ M ant nešiklio pagal Adams ir kt. J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) p. 661 -663, naudojant DNR sintetatorių (Mode II Biosearch 8600 modelis, New Brunswick Scientific Co). Kaip monomeriniai sintonai naudojami prekybiniai reikalingų dezoksiribonukleozidų β -cianetil-apsaugoti diizopropilaminofosforamiditai. Po nešiklio nuskėlimo, galinės tritil-apsaugotos grandinės steriliomis sąlygomis nudruskinamos gelfiltracijos pagalba ir valomos, po to du kartus frakcionuojamos atvirkščios fazės pirmąją preparatyvine plonasluoksne chromatografija. Pagrindinis produktas detritilinamas ir po kitų dviejų valymų preparatyvine plonasluoksne chromatografija gaunamas reikalingas švarus oligonukleotidas, jo švarumas tikrinamas gelelektroforezės pagalba (PAGE).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- Iš 4-9 grupių šių atskirų nukleotidų grandinių gaunami fragmentai, kurių ilgis apie 200 nukleotidų, dėl to, kad galiniai oligonukleotidai su atskiromis grandinėmis 5'-gale fosforilinami ir atitinkamos papildomos grandinės kartu su galiniais oligonukletidais persidengia. Gautus po persiklojimo fragmentus, kuriuos galima klonuoti ir jie turi sudvigubintas grandines, įterpia į tinkamus linijinius nešiklius. Tolesnis veiklos principas išplaukia iš pateiktų pavyzdžių.
- Panaudoti šiame išradime sutrumpinimai turi sekančias reikšmes:

bp	bazių poros
DE52	anijonitas "Whatman" firmos
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
PA	plazminogeninis aktyvatorius
PAGE	elektroforėzė poliakrilamidiniame gėlyje
PU	Ploug vienetai
SDS	natrio dodecilsulfatas
S.D. - Seguenz	Shine-Dalgarno seka
tris-HCl	trishidroksimetilaminometano hidrochloridas
Tween-80	polietilenoksido (20) sorbitanmonooleatas
TMAC	tetrametilamonio chloridas

Pagal šią išradimą, konstruojant plazmides, pasirenkama prekybinė plazmidė pBR 332 (4363 bp). Dažniausia iš jos pašalinama nic/bom - sritis ir/arba tetraciklinui rezistentinis genas. Tam nebūtina pilnai pašalinti tetraciklino rezistentinį geną, pakanka tokių pakeitimų, kad plazmidė nesuteiktų atsparumo tetraciklinui transformuotiems jos pagalba bakterijų kamienams. Dėka šių priemonių (pašalinamas nic/bom - srities ir mažų mažiausia vienos srities iš tetraciklinui rezistentinio geno) gaunama taip vadinama "saugi plazmidė".

Pagal šią išradimą, pirmenybė teikiama plazmidės konstravimui iš modifikuotos, kaip aprašyta aukščiau, plazmidės pBR 332 (arba iš kitų, minimų toliau), sekanti operacija yra sintetinės polilinkerinės sekos įvedimas tarp EcoRI ir HindIII kirpimo vietos. Ši polilinkerinė seka (žiūr. fig. 3) turi nustatytas kirpimo vietas, esančias tarp jų bazes laisvai pasirenkant, išskyrus seką tarp XbaI ir NdeI, kuri turi ribosominę surišimo

vieta (Shine-Dalgarno seka) iš B. subtilis XyI operonas 5'-AAGGAG-3' (Wilheim ir kiti, Nucl. Acids Res. 13 (1985) p. 5717-5722) ir nustatytą fragmentą tarp S.D. - sekos ir startinio kodono ATG. Po S.D. - sekos esančios bazės GAAAT, gautos iš Wilheim ir kt. ir sujungtos su CATATG NdeI kirpimo vietoje. Tokiu būdu, tarpas tarp S.D. - sekos ir ATG yra 8 bazių poros. Atstumai tarp atskirų kirpimo vietų polilinkerinėje sekoje pagal klonavimo teoriją turėtų turėti 20 nukleotidų ilgį, ko pasekoje, palengvėja tarpinių fragmentų pašalinimas.

Polilinkerinės sekos pagalba į plazmidę įvedamos kirpimo vietos, kurios - tikslingos įvesti po grandinės nutraukimo agento transkripcijos, - palengvina įterpti einančias viena po kitos struktūrinio geno sekas junginiui I, geriausia, pradedant nuo baltymo C-galo, t.y., nuo gaunamo struktūrinio geno DNR grandinės 3'-galo, taip pat, pavyzdžiui, sintetinio, išskirto iš kitos plazmidės, arba prekybinio Trp⁻ arba Tac⁻ promotoriaus įterpimą.

Panašiu būdu galima pradėti plazmidžių konstravimą iš kitų žinomų komercinių plazmidžių, kurios turi vienintele EcoRI ir HindIII kirpimo vietas, tokių kaip: pHC9, pHC12, pHC13, pHC18, pHC19 ir kitos.

Taip, pavyzdžiui, gaunama plazmidė pGR Tac 06 (žiūr. pavyzdį ir fig. 8). Ši plazmidė koduoja junginį, kurio formulė I, kurioje X₁ reiškia Asn ir X₂ - seką: Glu-Leu-His-Leu-Leu-Gln-Val-Pro-Ser-Asn (žiūr. fig. 9). Šis junginys toliau žymimas "PA/06".

Šią seką koduoja nuo Nde I ir Xba I nukleotidų, kuriems laisvai buvo pasirinkti baltymo scu-PA 54k N-galo kodonai. Ši seka nutraukiama ties Leu-Leu, Pst I kirpimo vieta.

Šis ekspresuotas, pavyzdžiui į E. coli ląsteles, baltymas PA/06 po struktūros atstatymo, nelauktai pasižymėjo dideliu fibrinolitiniu aktyvumu, tikrinant ant fibrino-agarinės plėvelės.

5

Jei plazmidėje pGR Tac 06 pakeičiamas Tac⁻promotorius tarp Eco R I ir Xba I sintetiniu Trp⁻ promotoriumi (žiūr, fig. 10), tai gaunama pGR Trp 06 plazmidė.

10 Transformuotos pGR Trp 06 pagalba E. coli ląstelės K12JM 103 (ATCC 39 403) po indukcijos indolakrilo rūgštimi produkuoja intarpiniais kūneliais baltymą, kuris po ląstelių lizavimo ir baltymo struktūros atstatymo pasižymi fibrinolitiniu aktyvumu, tikrinant ant
15 fibrino-agarinės plėvelės.

Pagal šį išradimą, kitas plazmidės galima gauti iš sukonstruotų plazmidžių, aprašytų aukščiau, pavyzdžiui Eco R I ir Hind III pagalba gaunamas sintetinis struktūrinis genas su visais reguliacijos elementais ir
20 įterpiamas į kitą enterobacteriaceae šeimos bakteriją, ypačingai sugebančią autonomiškai daugintis. E. coli, plazmidę, kuri tam buvo linerizuota ir sutrumpinta pjūviai nuo Eco R I ir Hid III. Principe, tokiu pat
25 būdu, bet naudojant Eco R I ir Xba I, galima pakeisti bet kurioje šiame išradime esančių plazmidžių, pavyzdžiui, Trp⁻ promotorių Tac⁻ promotoriumi (ir atvirkščiai).

30 Pagal šį išradimą, plazmidės, prailgintas tarp Shine-Dalgarno sekos ir startinio kodono ATG, galima gauti, kaip aprašyta aukščiau, sukonstruota plazmidė, kur minimas tarpas yra, pavyzdžiui, 8 nukleotidai, kerpama su Nde I, užpildomos kirpimo vietos ir užciklinami nupjauti galai, taip gaunama pagal šį išradimą plazmidė,
35 kuroje atstumas tarp S.D. - sekos ir startinio kodono yra 10 nukleotidų.

Konstruojant struktūrinius genus, kurie koduoja junginius, kurių formulė I, pasirenkamos tokios nukleotidų sekos, kurių 5' gale yra metionino kodonas, po kurio seka serino kodonas. Ekspresuojant šį struktūrinį geną, dėl to kad ryšys tarp Met-Ser nestabilus, gaunami junginiai, kurių formulė I, su serinu aminorūgšties N-gale. Tinkami struktūriniai genai, kurie koduoja junginius, kurių formulė I, atitinkami 5'galai (baltymų, kurių formulė I, N-galų atitinka sritį Ser-X₁-X₂ ir koduojamas, bet baltyme nesantis metioninas nurodytas skliausteliuose):

(Met) Ser Asn-
ATG AGC AAT

(Met) Ser Asn Glu-
ATG AGC AAT GAA

(Met) Ser Pro Pro Glu-
ATG AGC CCA CCA GAA

(Met) Ser Ser Pro Pro Glu-
ATG AGC AGC CCA CCA GAA

(Met) Ser Asn Glu Leu His Leu Leu Gln Val Pro Ser ASn
ATG AGC AAT GAA CTT CAT CTG CAG CAA GTT CCA TGC AAC

Kaip buvo pažymėta, bakterijos, transformuotos šio išradimo plazmidėmis, pasižymi aukštu ekspresijos lygiu. Tinkamų transformavimui šeimininkų paieška atliekama žinomais būdais. Šio išradimo plazmidžių ekspresijai geriausia tinka E. coli arba giminingos Enterobacteriaceae šeimos bakterijoms, kaip Pseudomonas, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella arba Serratia kamienai.

Labiausia tinkami šeimininkai yra E. coli, pavyzdžiui, E. coli GRT-I kamienas ir ypatingai E. coli K12 pogrupio kamienai, tokie kaip: E. coli GRT-I kamienas ir ypatingai E. coli K12 pogrupio kamienai, tokie kaip:

E. coli K12 JM101 (ATCC 33876), E. coli K12 JM103 (ATCC 39403), E. coli K12 JM105 (DSM 4162), E. coli K12 MM294 (ATCC 33625), E. coli K12 (ATCC 31446) arba E. coli K12 DHI (ATCC 33849).

5

E. coli ekspresijos sistemose, kurios turi Tac^- promotorių, indukciją galima atlikti, pavyzdžiui, pridėjant laktozės arba pašalinant gliukozę, bet geriausia – β -D-tiogalaktopiranozidu (IPTG). Jei plazmidėje yra Trp^- promotorius, tai indukciją geriausia vykdyti indolakrilo, indolakrilacto arba indolakrilpropano rūgštimis. Taip pat suprantama, kad indukciją galima vykdyti ir su kitais žinomais induktoriais.

15 Po indukcijos ir pasiekus tam tikrą ląstelių tankį, ląstelės centrifuguojamos ir nuosėdos, suspenduotos druskos tirpale, homogenizuojamos ir ląstelės suardomos. Po pakartotino centrifugavimo, nuosėdose lieka probaltymas, kurio formulė yra I, kartu su ląstelių nuolaužomis. Probaltymas ištirpinamas gaunidinhidrochlorido tirpale ir paveikiamas redukcijos-oksidacijos sistema (pavyzdžiui, oksiduotu ir redukuotu glutatiniu), tam kad baltymas įgautų natyvią konformaciją, t.y., susidarytų junginiai, kurių formulė I. Šie junginiai lieka reakcijos mišinyje ištirpę ir galima juos išgryninti įprastinėmis operacijomis (pavyzdžiui, chromatografija ir po jos sekančia liofilizacija).

30 Analitiniams tikslams tikslinga dirbti taip: fermentuojamos transformuotos šio išradimo plazmidėmis E. coli, pasiekus reikiamą ląstelių suspensijos tankį, indukuojama baltymo ekspresija. Po reikiamo laiko fermentacijos, suspensija dalimis centrifuguojama, ląstelės liozuojamos lizocimu (1 mg lizocimo 1 ml 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo, pH 8.0, su 50 mM EDTA ir 15% sachrozės). Homogenizuotos ląstelės tirpinamos 4-5 M gaunidino hidrochlorido tirpale, praskiedus iki guanidino

hidrochlorido 1.2 M koncentracijos, pridedama reduktorių (glutathiono, merkaptoetanolio arba cisteino) su priėjimu orui paliekama kelioms valandoms, kad atsistatytų baltymo struktūra (palyg. taip pat Winkler ir kiti Bioche. 25, 1986, p. 4041-4045). Tokiu būdu gauti viengrandžiai junginiai, kurių formulė I, pridėjus plazmino, paverčiami į atitinkamus dvigrandžius polipeptidinius darinius, kurių aktyvumas nustatomas su chromogeniniu substratu piroGlu-Gly-Arg-p-nitroanilidu, kuris skaldomas tik dvigrandžių aktyvių urokinazių. Ši junginio, kurio formulė I, aktyvacija atliekama plazmino tirpalu 50mM Tris-HCL buferyje su 12 mM natrio chlorido, 0.02% Tween 80, kai pH 7.4 37°C temperatūroje keletą valandų. Junginio santykis su plazminu turi būti apytikriai nuo 100 iki 1500 vienam moliui plazmino, perskaičiavus moliais, arba nuo 8000 iki 36000 su 1, skaičiuojant pagal fermentų aktyvumo vienetus. Aktyvumo nustatymas atliekamas 50 mM Tris-HCl buferiniam tirpale su 0.36 mM natrio chlorido, kai pH 8.8, pridėjus 0.36 mM aprotinino (plazmino susilpninimui) ir 0.27 mM substrato 37°C temperatūroje. Priklausomai nuo junginio, kurio formulė I, kiekio, po 5-60 minučių inkubavimo reakcija stabdoma, pridedant 50% acto rūgšties ir optinis tankis matuojamas 405 nm bangoje. Taip nustatant aktyvumą, pagal substrato gamintoją (Kabi Vitrum, Švedija), 0.05 vienetais optinio tankio padidėjimas 405 nm bangoje per 1 minutę atitinka 25 Ploug urokinazės vienetams 1 ml standartinio tirpalo.

30 Išradimo figūrose pavaizduota:

Fig. 1: Junginių, kurių formulė I, struktūros schema, nurodant būtinus disulfidinius tiltelius

35

Fig. 2a ir 2b: Plazmidės pBF 158 konstravimas iš komercinės plazmidės pBR 332. Konstruojant,

vienas po kito pašalinami nic/bom sritys ir didesnė dalis atsparumo tetraciklinui geno.

5 Fig. 3: Sintetinė polilinkerinė seka.

Fig. 4: Plazmidės pBF 158-01 konstravimas. Pa-
teiktas intarpas sintetinės polilin-
kerinės sekos plazmidėje pBF 158 tarp
10 EcoR I ir Hind III kirpimo vietas.

Fig. 5: Plazmidės pBF 158-01 konstravimas. Frag-
mentas Cla I - Hind III pakeičiamas ati-
tinkamu fragmentu "T" iš plazmidės pRT
15 61 (žiūr. Jorgensen ir kiti J. Bacteriol.
138, 1978, p. 705-714), kuriame yra
tetA/orf L grandinės nutraukimo agentas
iš Tn10 (žiūr. Sohollmeier ir kiti Nucl.
Acids Res. 13, 1985, p. 4227-4237).

20 Fig. 6a-6e: Koduojančio geno sintetinių fragmentų
nukleotidų sekos (Jų įjungimas, sudarant
struktūrinį geną junginiams, kurių for-
mulė I, pagal šią išradimą, į plazmidę
25 pBF 158-01, T aprašomas I d pavyzdyje ir
pavaizduotas fig. 7a-7c)

Fig. 7a-7c: Plazmidžių pBF-02 T - pBF 158-06 konst-
ravimas, įterpiant oligonuleotidinius
30 fragmentus M4-M8, pradedant nuo plaz-
midės pBF 158-01 T nuo C-galo.

Fig. 8: Plazmidė pGR Tac 06, gauta iš pBF 158-06
T, įterpiant Tac⁻promotorių tarp EcoRI ir
35 XbaI (žiūr. pavyzdį 1)

- Fig. 9: Nukleotidų seka, įterpta tarp Nde I ir Sac I kirpimo vietų plazmidėje pGR Tac 06 ir atitinkanti aminorūgščių seka. Amino-
rūgščių numeravimas toks pats kaip fig. 1.
- 5 Fig. 10: Sintetinio Trp⁻ promotoriaus nukleotidų seka.
- 10 Fig. 11: Junginių, kurių formulė I, arba jų probaltymų, sukonstruotų pagal fig. 9, transformuotų pGR Tac 06 plazmide su Tac⁻ promotoriumi E. coli ląstelėse, ekspresijos lygio priklausomybė, indukuojant IPTG, kai laikas lygus 0. Nurodomi aktyvumai Ploug vienetais 1 ml kultūros skysčio, kurio optinis tankis lygus 1, matuojant 578 nm bangoje, nustatyti naudojant chromogeninį substratą (o----o) po nuskėlimo plazminogenu ir be skėlimo (●- - -●). Nurodyti aktyvumai yra vidurkiai iš 4 fermentacijų.
- 15
- 20
- 25 Fig. 12: Nukleotidų sekos ir atitinkanti aminorūgščių seka junginių, kurių formulė (Met)-Ser-X₁-X₂-rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹. Metioninas, nurodytas skliausteliuose, nukerpamas E. coli ląstelėje.
- 30 Fig. 13: Junginių, kurių formulė I, arba jų probaltymų, transformuotų pGR 318, pGR 319 arba pGR 327 tai yra su Trp⁻ promotoriumi E. coli K12 JM 103 ląstelėse, ekspresijos lygio priklausomybė. Indukcija buvo atliekama, kai laikas lygus 0 su indolakrilio rūgštimi. Nurodomi aktyvumai Ploug vienetais 1 ml kultūros skysčio, kurio optinis tankis lygus 1,
- 35

matuojant 578 nm bangoje, nustatyti naudojant chromogeninį substratą (o---o) po nuskėlimo plazminogenu ir be skėlimo (●- - -●).

5

Pateikiamuose pavyzdžiuose eksperimentuose naudojami komerciniai fermentai (palygink Nachr. Chem. Techn. Nab. 35, 1987, p. 939).

10 Naudojamos pavyzdžiuose mitybinės terpės taip pat komercinės.

Pavyzdys 1:

15 Ekspresinės plazmidės pGR Tac 06, kuriose koduojami junginiai, kurių formulė I, pagal fig. 9, su sintetiniu Tac⁻ promotoriumi, konstravimas.

A. Plazmidės pBF 158 konstravimas

20

i) Iš plazmidės pBR 322 (Farmacija, Nr. 27-4902, 4363 bp) pašalinama nic/bom sritis, kuri yra tarp 2207 ir 2263 bazių (žiūr. Winnacker, "Genai ir klonai", leidykla VCH, Vainhaim, 1985, p. 296), sekančiu būdu (žiūr. taip pat fig. 2): pBR 322 plazmidė perkerpama su Nde I ties 2998 baze ir tuo pačiu plazmidė linerizuojama. Lipnūs galai užpildymo reakcijos pagalba užbukinami (žiūr. Maniatis ir kiti, Molecular Cloning, Cold Spring Harborlab, 1982). Po to kerpama ties 2068 baze su PvuII ir abu plazmidės pBR 322 lipnius galus įprastu būdu sujungia ligaze T4. Po to transformuojama į kompetentines E. coli K12 JM 103 (ATCC 39403) ląsteles (žiūr. Hanahan, DNA Cloning, T.I, IRL Press, Oksford, 1985, p. 109-135). Transformuotos ląstelės kultivuojamos terpėje, kurioje yra 150 µg/ml ampicilino. Iš gautų klonų atrenkami tie, kurie savyje turi plazmidę pBF 157, kuri skiriasi nuo pradinės plazmidės pBR 322

25

30

35

230 nukleotidų: a-Pst-BspMII, b-PstI-BaII, c-PstI-AvaI fragmentais. Abiejų vienintelių PvuII ir NdeI kirpimo vietų, esančių plazmidėje pBR 332, plazmidėje pBF 157 nėra.

5

i) Iš plazmidės pBF 157 didesnioji tetraciklinui atsparumo geno dalis pašalinama, kerpant EcoPV-NruI ir sujungiant lipnius galus. Po transformacijos į E. coli K12 JM 103 ir kultivavimo terpėje, kurioje yra 150 µg/ml ampicilino, gaunami klonai, iš kurių atrenkami tokie, kurie turi sąvyje plazmidę pBF 158. Ši plazmidė mažesnė 787 nukleotidais, nei pBF 157 ir skiriasi tuo, kad joje nėra BamHI kirpimo vietos. Transformuoti kamienai plazmidė pBF 158 neįgyja atsparumo tetraciklinui.

15

B. pBF 158-01 plazmidės konstravimas, sintetinės polilinkerinės sekos įterpimas.

Iš plazmidės pBF 158 EcoPI ir HindIII iškerpamas 31 nukleotido fragmentas ir į tą vietą įterpiamas multiklonavimo saitas, kurio seka parodyta fig. 3. Po transformacijos į E. coli K12 JM 103 ląsteles ir kultivavimo terpėje, kurioje yra 150 µg/ml ampicilino, atrenkami klonai, kurie turi sąvyje plazmidę pBF 158-01. Ši plazmidė nuo pBF158 skiriasi tuo, kad ji turi papildomas vienintele kirpimo vietas XbaI, NdeI, EagI, KpnI, SpeI ir turi antrą PstI kirpimo vietą (fig. 4).

Tarp XbaI ir NdeI yra Shine-Dagarno seka iš XyI operon B. subtilis (žiūr. Ihelm ir kt, cituotoje vietoje).

30

C. pBF 158-01, T plazmidės konstravimas, transkripcijos grandinės nutraukimo agento įterpimas.

Iš plazmidės pBF 158-01 pašalinamas ClaI - HindIII polilinkerinės sekos fragmentas ir pakeičiamas ClaI -

35

HindIII fragmentu iš pRT 61 (žiūr. Jorgensen ir kiti, cituojamoje vietoje).

Po transformacijos į E. coli K12 JM 103 ląsteles ir
kutivavimo terpėje, kurioje yra 150 µg/ml ampicilino,
atrenkami tie klonai, kurie turi savyje plazmidę pBF
158-01 T. Ši plazmidė nuo pBF158-01 skiriasi tuo, kad
ji didesnė 297 nukleotidų ClaI - HindIII fragmentu
(fig. 5).

**D. Plazmidžių pBF 158-02 T-pBF 158-06 T konstravimas,
sintetinių fragmentų M4-M8 įterpimas į koduojantį geną.**

Visi sintetiniai fragmentai aprašyti fig. 6a-6e. Jie
įvedami 200 nukleotidų fragmentais į atitinkamus vek-
torius. Tam vektoriai su žinomomis kirpimo vietomis
fermentų pagalba užbukinami, perkerpami ir elektro-
forezės pagalba agarozėje, elektroeliucija ir valant
per DE 52 celiuliozę, atskiriami nuo pašalinamo frag-
mento. Po to vykdomas surišimas ligazės T4 pagalba su
atitinkamu sintetiniu dvispiraliu fragmentu, transfor-
muojami į E. coli K12 JM 103 (fig. 7a-7c) ir vykdoma
atranka terpėje su ampicilinu.

**i). Fragmento M8 įterpimas tarp BamHI ir ClaI plaz-
midėje pBF 158-01 T**

Gaunama plazmidė pBF 158-02 T.

Oligonukleotidas 019 turi junginio, kurio formulė I, C-
galo seką.

Už stop kodono TAA yra NdeI kirpimo vieta po kurios yra
papildomos transkripcijos galo trpA grandinės nutrau-
kimo agento sekos (žiūr. Shristie ir kiti, P.N.A.S. 78,
1981, p. 4180-4184) iki ClaI.

ii) Fragmento M7 įterpimas tarp SpeI ir BamHI plazmidėje pBF 158-02 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-03 T.

5

iii) Fragmento M8 įterpimas tarp KpnI ir SpeI plazmidėje pBF 158-04 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-04 T.

10

iv) Fragmento M5 įterpimas tarp EagI ir KpnI plazmidėje pBF 158-04 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-05 T.

15

v) Fragmento M4 įterpimas tarp SacI ir EagI plazmidėje pBF 158-05 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-06 T.

20

Iš gautų klonų i) - v) atrenkami tokie, kuriuose yra įterptas atitinkamas fragmentas su patikrinta taisyklinga seka.

25 **E. Plazmidės pGR Tac 06 konstravimas, Tac⁻ promotoriaus įterpimas**

Plazmidė PBF 158-06 T kerpama Eco I ir Xba I. 26 nukleotidų fragmentas pašalinamas preparatyvine elektroforeze agarozės gelyje, likusioji plazmidės dalis eliuojama elektroeliucija ir valoma per DE 52.

30

Iš plazmidės ptacSDT (DSM 5018) išskiriamas Eco I ir Xba I fragmentas, kuriame yra Tac⁻ promotorius. Tam plazmidė ptac SDT kerpama su EcoI ir Xba, ir atskiriamas fragmentas preparatyvinės elektroforezės agarozės gelyje. Fragmentas pašildomas iki 65°C amonio

35

acetato - SDS buferiniame tirpale, pH 8.0, eliuojamas iš mechaniškai susmulkinto poliakrilamido ir valomas kelis kartus ekstrahuojant fenoliu prisotintu 1M TRIS-HCl buferiu, pH 8.0.

5

Gauti abu fragmentai sujungiami įprastu būdu su ligaze T4 ir transformuojami į E. coli K12 JM 103. Po kultivavimo terpėje, kurioje yra 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie po IPTG indėjimo produkuoja probal-

10 tymą, "PA/06", kurio formulė I pagal fig. 9. Šie klonai turi savyje plazmidę pGR Tac 06.

f) Ekspresijos testas

15

i) Fermentacija

Transformuotos E. coli K12 JM 103 ląstelės plazmide pGR Tac 06 terpėje, kurioje yra: 38 mM amonio sulfato, 56 mM fosfatinio buferinio tirpalo, kurio pH 7.0, 1 mM magnio sulfato, 1% mielių ekstrakto, 1% gliukozės ir 150 mg/l

20 ampicilino. Probaltymo PA/06 indukcija atliekama 0.5 mM IPTG.

Prieš indukciją ir po kiekvienos valandos po induk-

25 cijos, viso 6 valandas, paimamas 1 ml ląstelių suspen-

sijos taip, kad optinis tankis (OD) 578 nm bangoje būtų lygus 1, ir nustatomas ekspresijos lygis.

ii) Probaltymo struktūros atstatymas, jo suskaldymas

30 iki atitinkamo dvigrandžio junginio PA/06 ir jo PA-

aktyvumo matavimas.

Atskirtos centrifuguojant, ląstelės tirpinamos lizo-

cime, po to ląstelių lizatas apdorojamas aukščiau

35 aprašytu būdu.

PA/06 arba jo probalavimo ekspresijos lygis nustatytas, matuojant dvigrandžio plazminogeninio aktyvatoriaus, gauto iš junginio PA/06 (gauto atstačius struktūrą probalavimui), aktyvumą. Gauti rezultatai pateikti fig. 11.

5 Ši aktyvumą turi tik po skėlimo plazminu (žiūr. fig. 11), todėl junginys PA/06 (arba jo probalavimas) yra su viena grandine.

Pavyzdys 2

10

Ekspresinės plazmidės pGR Trp 06 konstravimas

Aprašyta De Boer ir kitų PNAS, 80, 1983, p. 21-25 Trp⁻ promotoriaus seka yra iki XbaI kirpimo vietos prailginama 5' gale seka 5'-AATTCTGAAAT-3'.

15

Rezultate gaunama EcoRI kirpimo vieta (fig. 10, fragmentas M1). Atskiros grandinės 021 ir 021A surenkamos ir sujungiamos su EcoRI ir XbaI fragmentu iš plazmidės pGR tac 06. Po transformacijos į E. coli K12 JM 103 ląsteles ir kultivavimo terpėje, kurioje yra 150 mg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi plazmidę pGR Trp 06. Plazmidė pGR Trp 06 skiriasi nuo aukščiau minėtų pirmtakų tuo, kad ja transformuotos E. coli kamienų bakterijos, pridėjus indolakrilo rūgšties, produkuoja probalavimą junginio PA/06.

20

25

Pavyzdys 3

30

Ekspresinės plazmidės pGR 318 konstravimas

Plazmidė pGR Trp 06 kerpama NdeI ir SacI. Gautas 58 bp ilgio fragmentas, kuris yra polilinkerinė seka išskiriama preparatyvinės elektroforėzės pagalba agarozės gelyje, likusi plazmidės dalis pašalinama elektroeliucija ir fragmentas valomas per DE 52 celiuliozę.

35

Šis fragmentas su sintetiniu oligonukleotidu 18

5'-TATG	AGC	AAT	GAG	CT-3'
AC	TGG	TTA	C	

5 įprastu būdu sujungiamas ligaze T4 ir transformuojamas
 į E. coli K12, kultivuojamas ampicilino turinčioje ter-
 pėje. Atrenkami tie klonai, kurie, pridėjus indolakrilo
 rūgšties, produkuoja probaltymą junginio PA 318. Šie
 klonai turi plazmidę pGR 318, kuri koduoja junginius,
 kurių formulė I, "PA 318". Šių junginių aminorūgščių
 10 seka nurodyta fig. 12.

B. Ekspresijos testas

15 Po transformacijos E. coli K12 JM 103 plazmide pGR 318,
 fermentuojamos tokiu pat būdu, kaip aprašyta pavyzdyje 1.
 Indukcija vykdoma 62 mg indoilakrilo rūgštimi 1 litrui
 fermentinei terpei prie 578 nm, kai ląstelių suspen-
 sijos optinis tankis pasiekia 2-3 optinius vienetus.

20 Prieš indukciją ir po kiekvienos valandos po induk-
 cijos, viso 5 valandas, paimamas 1 ml ląstelių suspen-
 sijos taip, kad optinis tankis (OD) 578 nm bangoje būtų
 lygus 1, ir nustatomas ekspresijos lygis.

25 Po junginio PA 318 probaltymo (žiūr. pavyzdį 1) struk-
 tūros atstatymo, surinktuose mėginiuose nustatomas ami-
 dolitinis aktyvumas, paveikus plazminu, prieš indukciją
 ir 1-5 valandą po indukcijos. Rezultatai pateikti fig. 13.
 Iš šių duomenų seka, kad pasiektas toks pats ekspre-
 sijos lygis kaip ir su plazmide pGR Tac 06 (tiesa, tik
 30 kitam probaltymui) ir kad amidolitinis aktyvumas pasi-
 reiškia tik po apdorojimo plazminu. Todėl junginys
 PA 318, kurio formulė I, produkuojamas E. coli K12 su
 plazmide pGR 318 kaip probaltymas su viena grandine.

C. Išskyrimas, gryninimas ir charakterizavimas

Tam, kad išgrynintų baltymus, fermentuojama 1 litro tū-
 ryje, kontroliuojant pH ir temperatūrą (pH 7.0, 37°C).
 5 Šiomis sąlygomis galima išauginti ląsteles iki 20 opti-
 nių vienetų, matuojant 578 nm bangoje. Po ekspresijos
 pabaigos (apie 5-6 valandos) 50 ml ląstelių suspensijos
 centrifuguojama, nuosėdos suspenduojamos 40 ml vandens
 ir suardomos aukšto slėgio homogenizatoriuje. Po cent-
 10 rifugavimo nuosėdos, kuriose yra visas neaktyvus pro-
 baltymas, tirpinamos 100 ml 5 M guanidinhidrochlorido
 tirpale su 40mM cisteino, 1 mM EDTA (pH pasiektas 8.0)
 ir praskiedžiama 400 ml 25 mM TRIS-HCl buferinio
 15 tirpalo, pH 9.0. Prieinant orui arba prapučiant deguo-
 nimi, baltymo struktūros atstatymas trunka apie 12 va-
 landų.

Junginys PA 318 išskiriamas ir išgryninamas chroma-
 tografijos pagalba. Nustatant N-galus, buvo įrodyta,
 20 kad baltymas turi vieną grandinę ir kad N-gale yra no-
 rima seka.

Pavyzdys 4:

25 **Ekspresinės plazmidės pGR 319 konstravimas**

Plazmidė pGR Trp 06 kerpama kaip aprašyta pavyzdyje 3a,
 su NdeI ir SacI, išskiriamas didelis fragmentas.

30 Šis fragmentas su sintetiniu oligonukleotidu 19

5'-TATG	AGC	AAT	GAA	GAG	CT-3'
AC	TCG	TTA	CTT	C	

įprastu būdu sujungiamas ligaze T4 ir transformuojamas
 į E. coli K12, kultivuojamas ampicilino turinčioje
 35 terpėje. Atrenkami tie klonai, pridėjus indolakrilo

rūgšties, kurie produkuoja junginio PA 318 probaltymą. Šie klonai turi plazmidę pGR 318, kuri koduoja junginius, "PA 319", kurių formulė I. Šių junginių amino-rūgščių seka nurodyta fig. 12.

5

B. Ekspresijos testas

E. coli K12, transformuotos su plazmide pGR 319, fermentuojamos, vykdoma indukcija ir surenkami pavyzdžiai bandymams tokiu pat būdu, kaip aprašyta pavyzdyje 3b.

10

Junginys PA 319 išskiriamas, išgryninamas ir charakterizuojamas taip pat, kaip pavyzdyje 3C.

Junginio "PA 319" probaltymo struktūros atstatymas ir ekspresijos lygio įvertinimas atliekamas kaip pavyzdyje 3B. Rezultatai pateikti fig. 13. Iš šių duomenų seka, kad pasiektas toks pats ekspresijos lygis kaip ir su plazmide pGR Tac 06 ir kad amidolitinis aktyvumas pasireiškia tik po apdorojimo plazminu. Todėl junginys PA 319, kurio formulė I, produkuojamas E. coli K12 plazmide pGR 318 kaip probaltymas su viena grandine.

20

Pavyzdys 5:

25

Ekspresinės plazmidės pGR 327 konstravimas

Plazmidė pGR Trp 06 kerpama kaip aprašyta pavyzdyje 3a, su NdeI ir SacI, išskiriamas didelis fragmentas.

30

Šis fragmentas su sintetiniu oligonukleotidu 27

5'-TATG	AGC	AGT	CCA	CCA	GAG	CT-3'
AC	TCG	TCA	GGT	CCT	CTT	C

įprastu būdu sujungiamas ligaze T4 ir transformuojamas į E. coli K12. Selekcija ir klonų atranka atliekami

35

kaip aprašyta pavyzdyje 3A. Atrinkti klonai turi plazmidę pGR 327, kuri koduoja junginius, "PA 327", kurių formulė I. Šių junginių aminorūgščių seka nurodyta fig. 12.

5

B. Ekspresijos testas

E. coli K12, transformuotos su plazmide pGR 327, fermentuojamos ir tikrinamas ekspresijos lygis taip pat kaip pavyzdyje 3B. Rezultatai pateikti fig. 13.

10

Junginio "PA 319" probaltymo struktūros atstatymas ir ekspresijos lygio įvertinimas atliekamas kaip pavyzdyje 3B. Rezultatai pateikti fig. 13. Iš šių duomenų seka, kad pasiektas toks pats ekspresijos lygis kaip ir su plazmide pGR Tac 06 ir kad amidolitinis aktyvumas pasireiškia tik po apdorojimo plazminu. Todėl junginys PA 327, kurio formulė I, produkuojamas E. coli K12 plazmide pGR 327 kaip probaltymas su viena grandine. Išskyrimas, išgryninimas ir charakterizavimas buvo atliekami taip pat kaip pavyzdyje 3C.

15

20

Pavyzdys 6:

Plazmidė pGR Trp 06 kerpama kaip aprašyta pavyzdyje 3a, su NdeI ir SacI, išskiriamas didelis fragmentas.

25

Šis fragmentas su sintetiniu oligonukleotidu 36

5'-TATG	AGC	CCA	CCA	GAA	GAG	CT-3'
AC	TCG	GGT	CCT	CTT	C	

30

įprastu būdu sujungiamas ligaze T4 ir transformuojamas į E. coli K12 JM 105. Selekcija ir klonų atranka atliekami kaip aprašyta pavyzdyje 3A. Atrinkti klonai turi plazmidę pGR 336, kuri koduoja junginius, "PA

336", kurių formulė I. Šių junginių aminorūgščių seka nurodyta fig. 12.

5 E. coli K12 JM 105, transformuotos plazmide pGR 336, fermentuojamos ir po indukcijos tikrinamas ekspresijos lygis taip pat kaip pavyzdyje 3B. Iš pirminio probaltymo gaunamas vienos grandinės junginys PA 336 (aminorūgščių seka parodyta fig. 12). Pasiektas toks pats ekspresijos lygis kaip ir su plazmide pGR Tac 06.

10

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Nauji polipeptidai, kurių bendra formulė I:



5

kurioje

rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ - negliukozilinta aminorūgščių sekos sritis nuo 143 (Glu) iki 411 (LeuOH) iš scu-PA 54k,

10

X₁ - viena iš šių aminorūgščių liekanų: Asn, Pro arba Ser, ir

15

X₂ - vienguba jungtis arba Glu, Pro-Glu, Pro-Pro-Glu arba Glu-Leu-His-Leu-Leu-Gln-Val-Pro-Ser-Asn.

2. Polipeptidai pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad X₁ yra Asn arba Ser.

20

3. Polipeptidai pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad X₁ yra Ser.

25

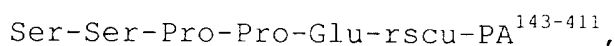
4. Polipeptidai pagal 1-3 punktus, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad X₂ yra vienguba jungtis arba Glu, Pro-Glu arba Pro-Pro-Glu.

30

5. Polipeptidai pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad X₁ yra Asn arba Ser, o X₂ yra vienguba jungtis arba Glu, Pro-Glu arba Pro-Pro-Glu ir rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ turi tą pačią reikšmę kaip 1 punkte.

6. Polipeptidas pagal 1 ir 3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo formulė yra (I a):

35



kurioje rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹ turi tą pačią reikšmę kaip ir 1 punkte.

- 5 7. Naujos plazmidės, naudojamos polipeptidams pagal 1-6
punktus gauti, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad
jų operonas turi reguliuojamą promotorių, pasireiškian-
tį kaip surišimo vieta su ribosomine Shine-Dalgarno
seka, startinį kodoną, sintetinį struktūrinį geną po-
10 lipeptidams pagal 1-6 punktus ir 5' kryptimi nuo
struktūrinio geno nuo vieno iki dviejų terminacijos
agentų, ir naudojami probalavimo ekspresijai Enterobac-
teriaceae šeimos bakterijose, geriausia Escherichia
coli kamienuose.
- 15 8. Plazmidės pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad atstumas tarp Shine-Dalgarno sekos ir
startinio kodono yra 6-12, geriausia 8-10 nukleotidų.
- 20 9. Plazmidės pagal 7 ir 8 punktus, b e s i s k i -
r i a n č i o s tuo, kad reguliuojamas promotorius yra
sintetinis Trp⁻ arba Tac⁻promotorius.
- 25 10. Plazmidės pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad reguliuojamas promotorius yra sinte-
tinis Trp⁻promotorius, kurio nukleotidų seka yra pa-
rodyta fig. 10, o fig. 10 yra šio punkto dalis.
- 30 11. Plazmidės pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad reguliuojamas promotorius yra plaz-
midės ptac SDT(DSM 5018) Tac⁻ promotorius.
- 35 12. Plazmidės pagal 7-11 punktus, b e s i s k i r i a n -
č i o s tuo, kad terminacijos agentais operone yra
einantys vienas po kito Trp A terminacijos agentas
ir/arba tet A/orf L terminacijos agentas iš Th 10.

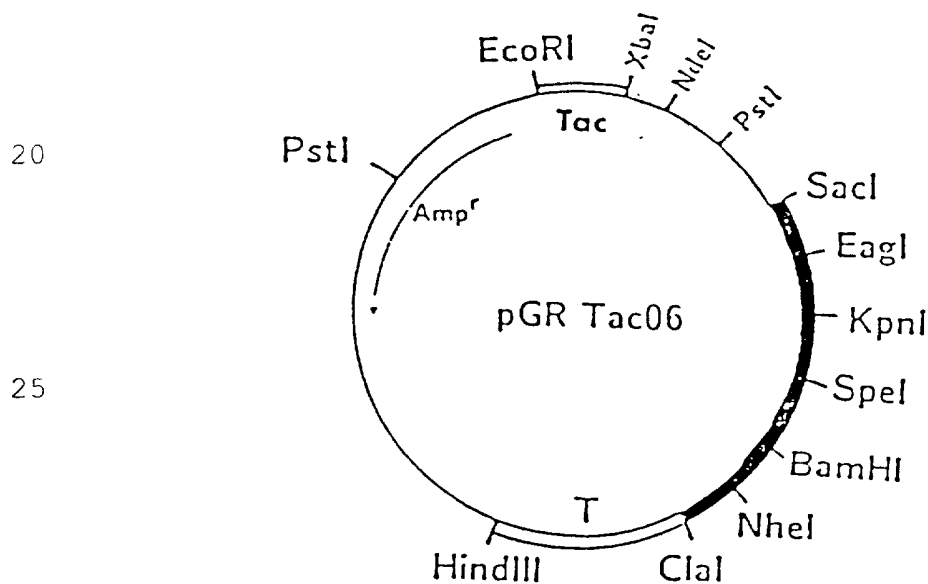
13. Plazmidės pagal 7-12 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad struktūriname gene argininas koduoja-
 mas tripletu CGT, leucinas - CTG, valinas - GTT ir/arba
 glicinas - GGT.
- 5 14. Plazmidės pagal 7-13 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad struktūrinis genas turi nukleotidų
 sekas, parodytas fig. 6a-6e, o fig. 6a-6e yra šio
 punkto dalis ir ypatingai vieną iš šių nukleotidų sekų:
- 10 ATGAGCAAT
 ATGAGCAATGAA
 ATGAGCAGTCCACCAGAA
 ATGAGCCCACCAGAA.
- 15 15. Plazmidės pagal 7-14 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad struktūrinis genas yra sudarytas iš
 šios nukleotidų sekos:
- ATGAGCAAT
 ATGAGCAATGAA
- 20 ATGAGCAGTCCACCAGAA
 ATGAGCCCACCAGAA.
- 25 16. Plazmidės pagal 7-15 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad struktūrinio geno nukleotidų sekos 5'
 gale yra metionino kodonas, po kurio eina serino ko-
 donas.
- 30 17. Plazmidės pagal 7-16 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad jose yra operonas plazmidėje pBR 322,
 iš kurio pašalinta nic/bom sritis.
18. Plazmidės pagal 7-16 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad jose yra operonas plazmidėje pBR 322,
 iš kurio pašalintas atsparumo tetraciklinui genas pil-

nai arba dalinai taip, kad plazmidė neturėtų atsparumo tetraciklinui.

19. Plazmidės pagal 7-18 punktus, b e s i s k i r i a n -
 5 č i o s tuo, kad jose yra operonas plazmidėje pBR 322, iš kurio pašalinta nic/bom sritis ir pašalinta tokia atsparumo tetraciklinui geno dalis, kad plazmidė neturėtų atsparumo tetraciklinui.

10 20. Plazmidės pagal 7-19 punktus, b e s i s k i r i a n -
 č i o s tuo, kad jos yra pGR, Trp 06, pGR 318, pGR 319, pGR 336 su sintetiniu struktūriniu genu, kontroliuojamu Trp⁻ promotoriumi.

15 21. Plazmidė pagal 7-19 punktus, b e s i s k i r i a n -
 t i tuo, kad ji yra tokia, kaip atvaizduota piešinyje:



22. Plazmidžių pagal 7 punktą gavimo būdas, b e s i -
 s k i r i a n t i s tuo, kad į plazmidę pBR 322, iš kurios pašalinta nic/bom sritis ir/arba rezistentinio tetraciklinui geno bent dalis tarp EcoRI ir HindIII kirpimo vietų, įterpia polilinkerinę seką, kurios nukleotidų seka parodyta fig. 3 (fig. 3 yra šio punkto dalis) ir kurios pagalba žinomais būdais įterpia

35

transkripcijos terminavimo agentą, atskiros sintetinės struktūrinio geno sekos I formulės junginiams, geriausia pradedant nuo struktūrinio geno 3' C galo, bei sintetinis Trp⁻ promotorius.

5

23. Plazmidžių pagal 7 punktą gavimo būdas, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad iš gautos pagal 22 punktą plazmidės EcoRI ir HindIII fragmentas kaip ekspresijos kasetė žinomais būdais įterpia į kitą, galinčią autonomiškai replikuotis enterobacteriaceae šeimos bakterijose, geriausia E. coli, plazmidę.

10

24. Polipeptido pagal 1-6 punktus gavimo būdas, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad žinomais būdais transformuoja plazmidėmis pagal 7-21 punktus enterobacteriaceae šeimos bakterijų kamienus, geriausia E. coli kamienus, indukuoja struktūrinio geno ekspresiją, išskiria iš terpės ir ląstelių nuolaužų junginį, kurio formulė I, probaltrymą, probaltrymą ištirpina ir po to, naudojant oksidacijos-redukcijos sistemą, gauna polipeptidą pagal 1-6 punktus.

15

20

25. Būdas pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad plazmide transformuoja E. coli kamieną, geriausia E. coli K12.

25

26. Trombolitinis preparatas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje yra vienas iš junginių pagal 1-6 punktus, kaip aktyvuojantis plazminogeną į aktyvų junginį.

30

27. Junginio pagal 1-6 punktus, kurio formulė I, panaudojimas trombolitinio preparato su plazminogeno aktyvatoriumi, kaip veikliąja medžiaga, gamybai.

35

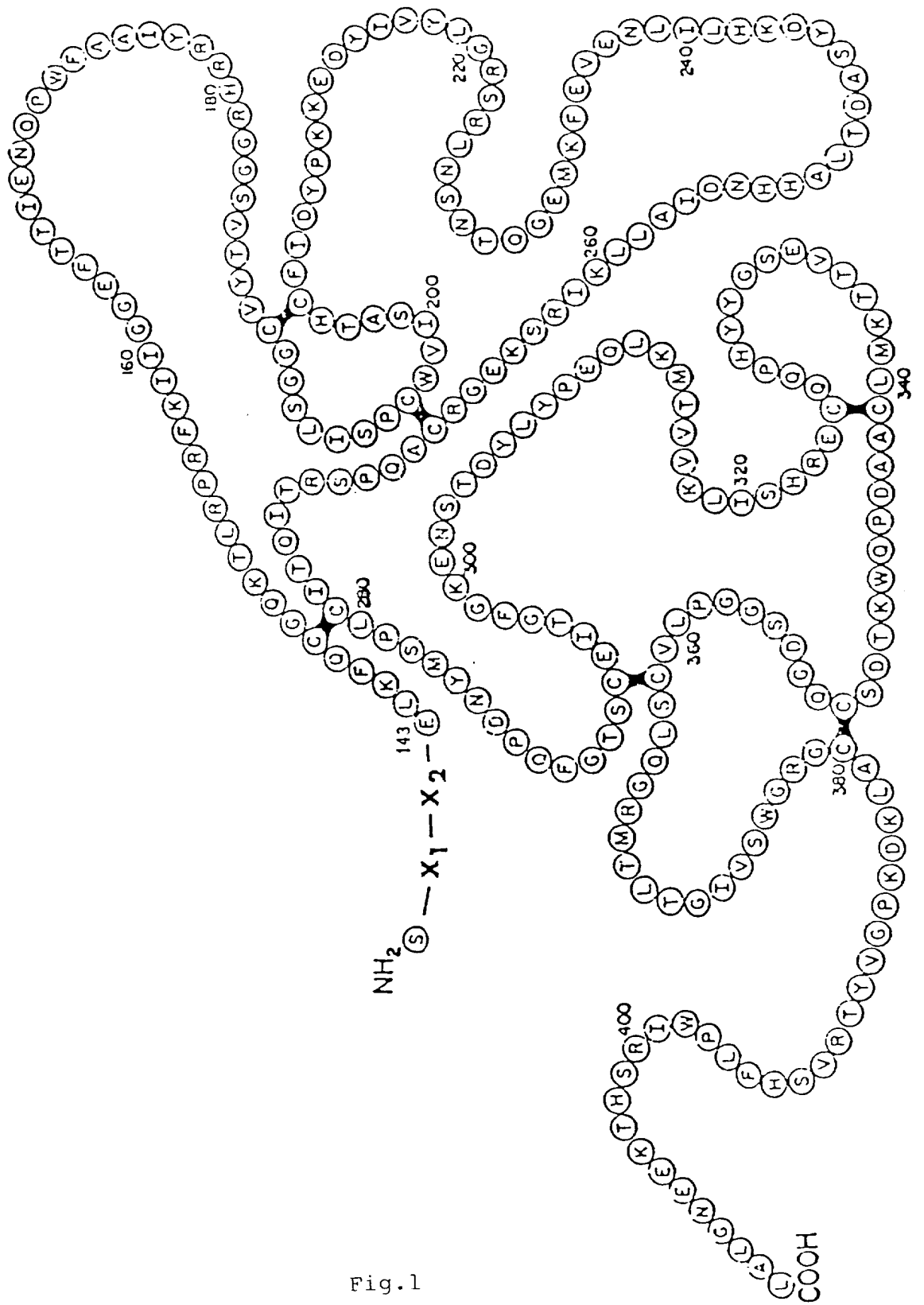


Fig.1

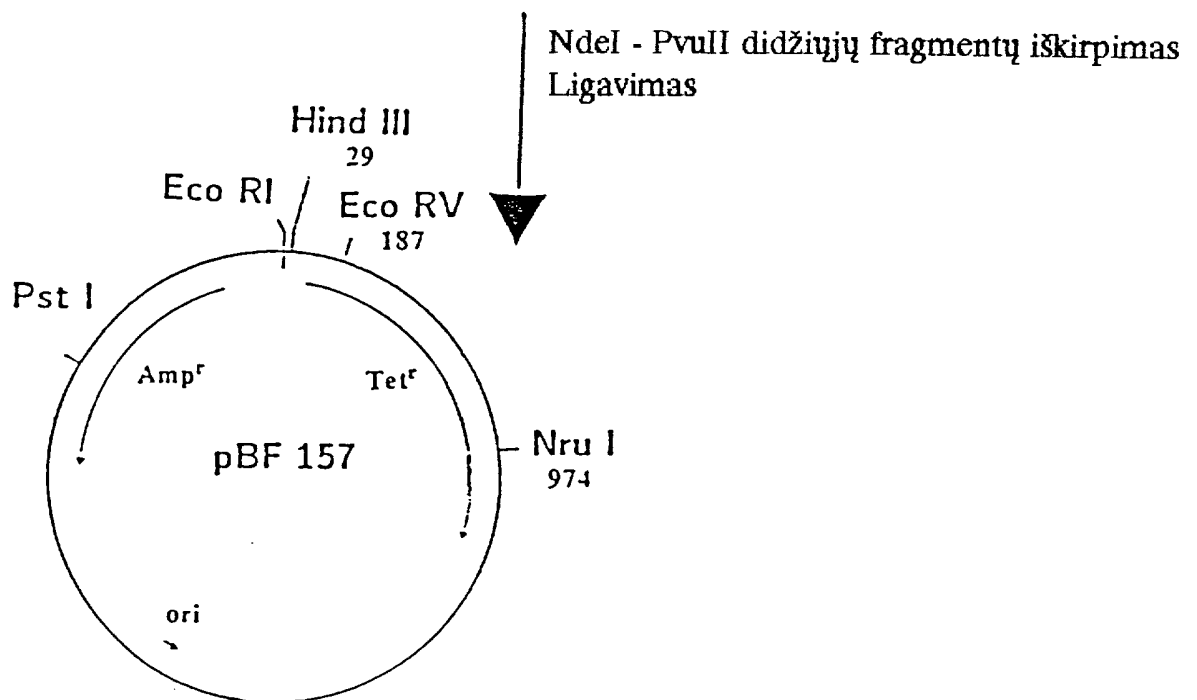
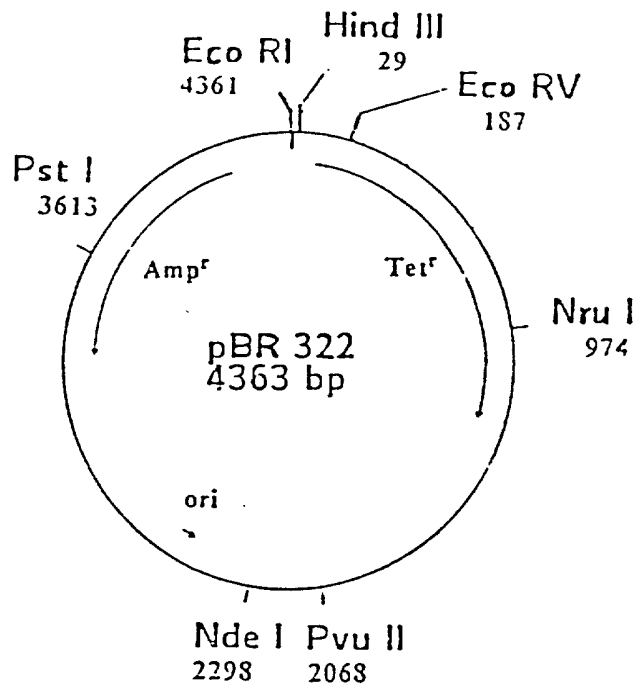


Fig.2a

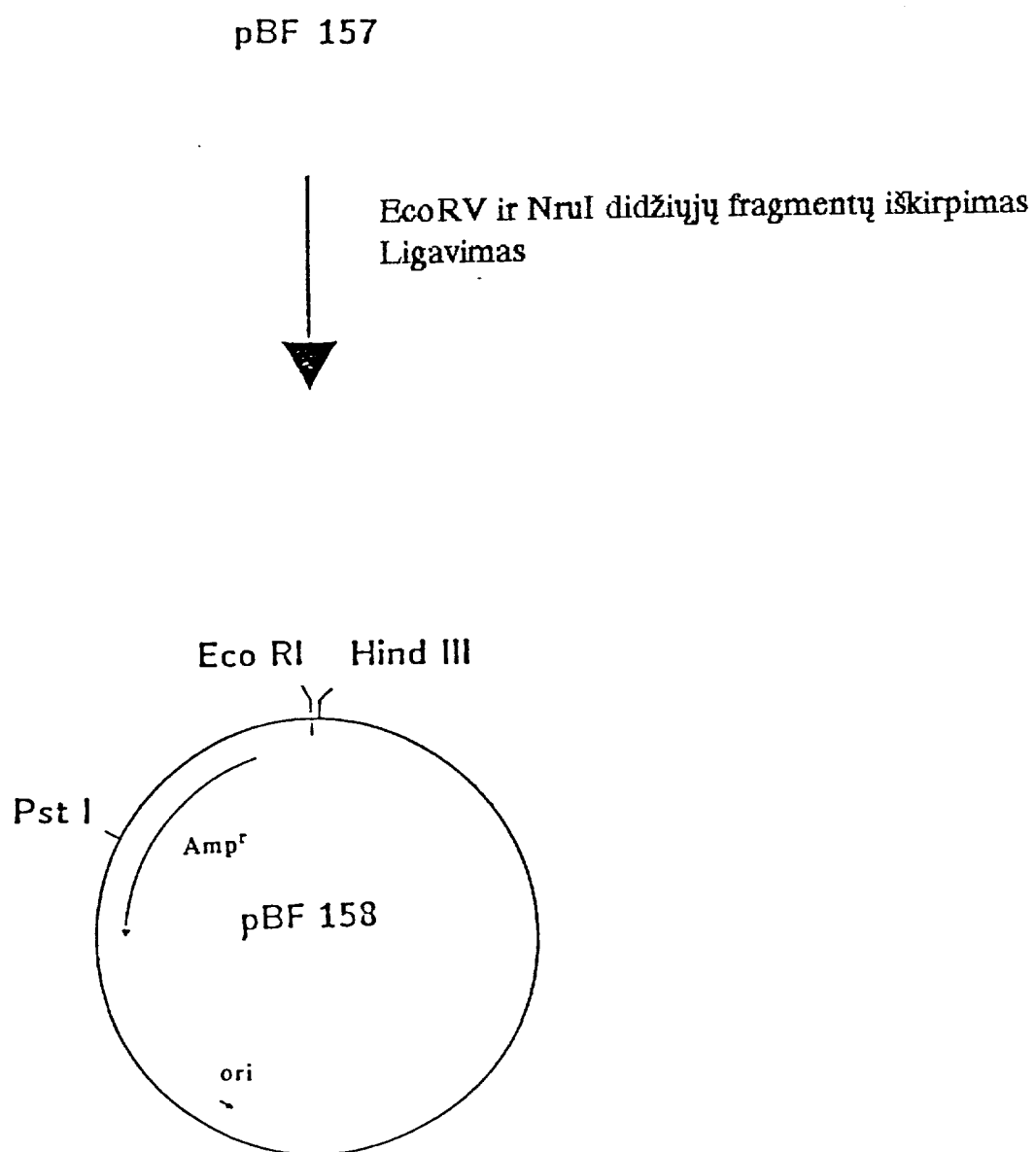


Fig.2b

Sintetinė polilinkerinė seka

EcoRI

```

<-----B1-----
AATTCATTCTGGTCTGCGATGCTAGTCTAGATAAGGAGGAAATCATATGAGCAATGAACT
  GTAAGACCAGACGCTACGATCAGATCTATTCCCTCCTTTAGTATACTCGTTACTTGA
<-----B1A-----
  
```

```

-----><-----B2-----
TCATCTGCAGCAAGTTCCATCGAACGAGCTCAAATTCCAGTGCGGTCAGCGGCCGTTCTC
AGTAGACGTCGTTCAAGGTAGCTTGCTCGAGTTTAAGGTCACGCCAGTCGCCGGCAAGAG
-----><-----B2A-----
  
```

```

-----><-----
GTCTCAACTCTGGTACCTCTTGCGATTTACAGGTACTAGTTTGCTCTCGCCAGCGTGGA
CAGAGTTGAGACCATGGAGAACGCTAAAGTGTCCATGATCAAACGAGAGCGGTCCGACCT
-----><-----
  
```

```

B3----->
TCCGTTCTCACACCAAAGAAATCGATGACCTTCAAGTTCTGCA
AGGCAAGAGTGTGGTTTCTTTAGCTACTGGAAGTTCAAGACGTTCGA
B3A----->
  
```

HindIII

Fig.3

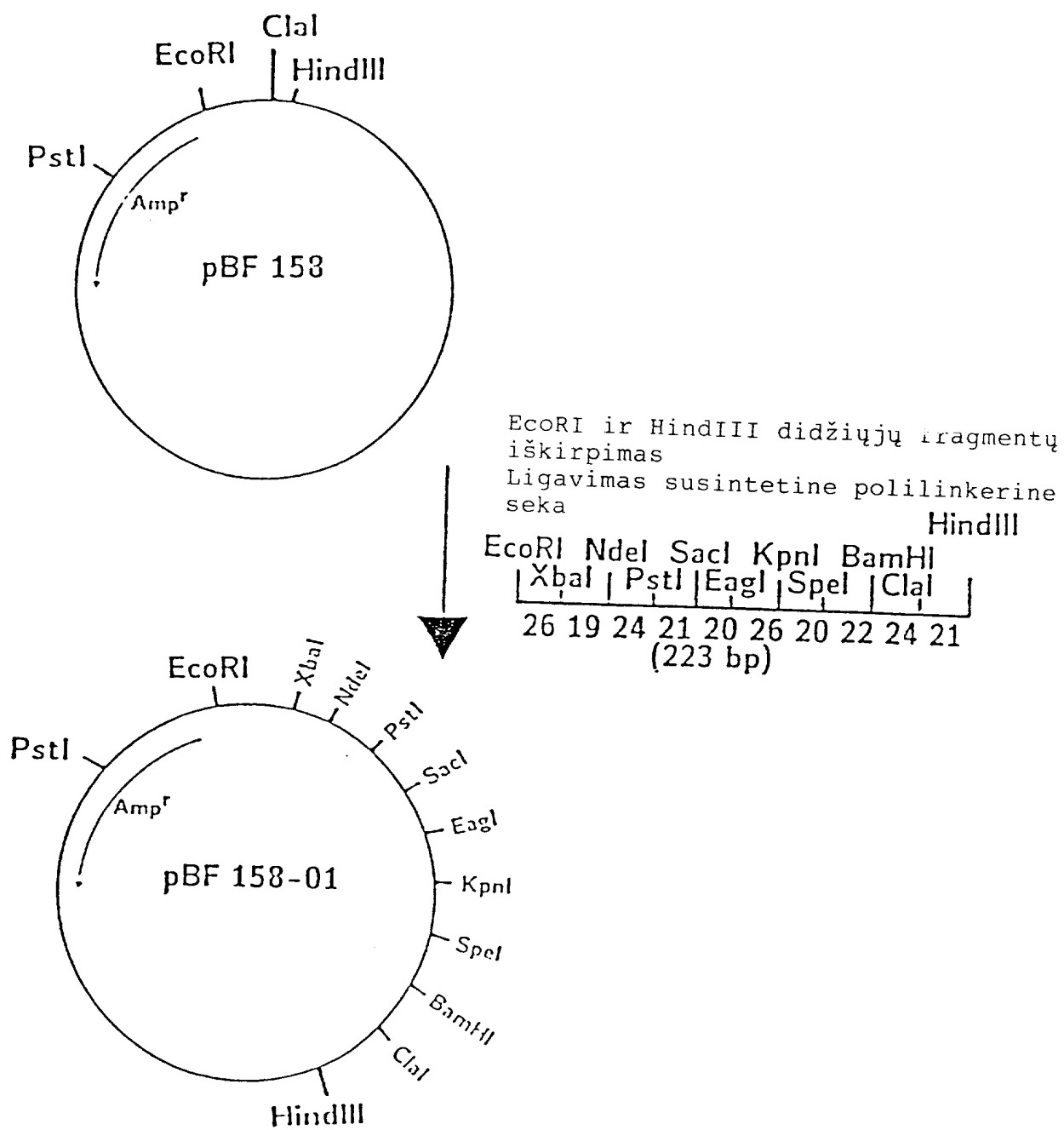


Fig.4

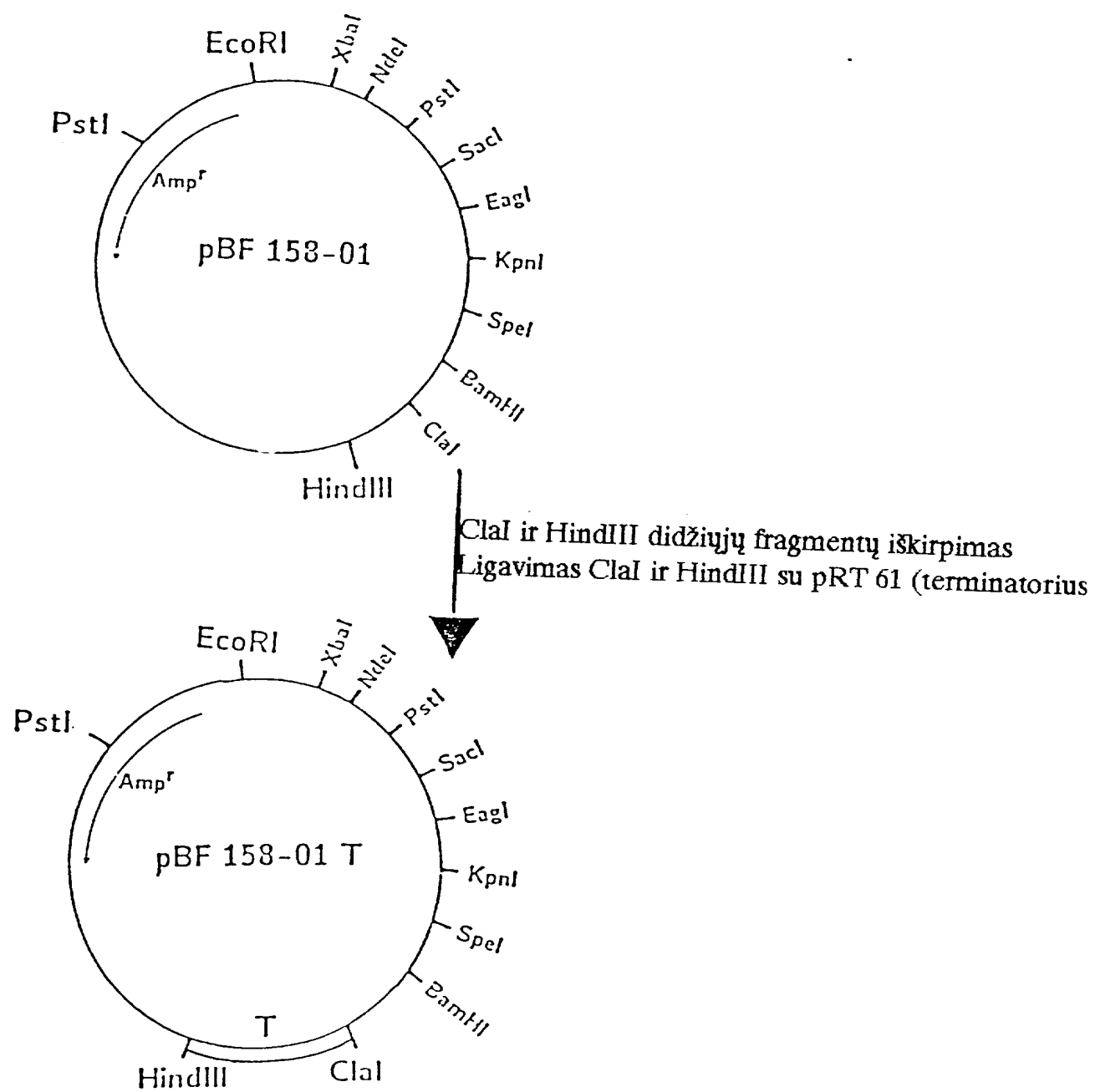


Fig.5

LT 3948 B

M4 (O8-O10; O3A-O10A):

SacI

```

<-----05--
CAAATTCAGTGCGGTCAAAAAACCCTACGTCCGCGTT
TCGAGTTTAAGGTCACGCCAGTTTTTTGGGATGCAGGCCCAA
<-----08A-----

```

```

-----><-----
TTAAAATCATCGGTGGTGAGTTCACCACCATCGAAAACCAGCCGTGGTTCGCTGCTATCT
AATTTTAGTAGCCACCACTCAAGTGCTGGTAGCTTTTGGTCGGCACCAAGCGACGATAGA
-----><-----08B-----

```

```

-----09-----><-----
ACCGTCGTCACCGTGGTGGTCTGTTACCTACGTTTGCGGTGGTCTCTGATCTCTCCGT
TGGCAGCAGTGGCACCAAGACAATGGATGCAAACGCCACCAAGAGACTAGAGAGGCA
-----><-----09A-----

```

```

-----010-----
GCTGGGTATCTCTGCTACCCACTGCTTCATCGACTACCCGAAAAAAGAAGACTACATCG
CGACCCAATAGAGACGATGGGTGACGAAGTAGCTGATGGGCTTTTTTCTTCTGATGTAGC
-----><-----010A-----

```

----->

TTTACCTC

AAATGGAGCCGG

----->

EagI

Fig.6a

M5 (O11-O13; O11A-O13A):

EagI <-----O11-----
 GGCCGTTCTCGTTTAAACTCTAACACCCAGGGTGAAATGAAATTGGAAGTTG
 CAAGAGCAAATTTGAGATTGTGGGTCCCACTTTACTTTAAGCTTCAAC
 <-----O11A-----

-----><-----O12-----
 AAAACCTGATCCTGCACAAAGACTACTCTGCTGACACCCTGGCTCACCACAACGACATCG
 TTTTGGACTAGGACGTGTTTCTGATGAGACGACTGTGGGACCGAGTGGTGTGCTGTAGC
 -----><-----

-----><-----
 CTCTGCTAAAAATCCGTTCTAAAGAAGGTCGTTGCGCTCAGCCGTCTCGTACCATCCAGA
 GAGACGATTTTTAGGCAAGATTTCTTCCAGCAACGCGAGTCGGCAGAGCATGGTAGGTCT
 ---O12A-----><-----

-----O13----->
 CCATCTGCCTGCCGTCTATGTACAACGACCCGCAGTTCGGTAC
 GGTAGACGGACGGCAGATACATGTTGCTGGGCGTCAAGC
 -----O13A----->

KpnI

Fig.6b

M6 {O14-O16; O14A-O16A,B):

KpnI <-----
 CTCTTGCGAAATCACCG
 CATGGAGAACGCTTTAGTGGC
 <-----

-O14I-----><-----O14II-----><-----
 GTTTCGGTAAAGAAAACCTCTACCGACTACCTGTACCCGGAACAGCTGAAAATGACCGTTG
 CAAAGCCATTTCTTTTGAGATGGCTGATGGACATGGGCCTTGTCGACTTTTACTGGCAAC
 -----O14A-----><-----

-----O15-----><-----
 TTAAACTGATCTCTCACCGTGAATGCCAGCAGCCGCACTACTACGGTTCTGAAGTTACCA
 AATTTGACTAGAGAGTGGCACTTACGGTCGTCGGCGTGATGATGCCAAGACTTCAATGGT
 -O15A-----><-----O16A-----

-O16I-----><-----O16II-----
 CCAAATGCTGTGCGCTGCTGACCCGCGAGTGGAACCGACTCTTGCCAAGGTGACTCTG
 GGTTTACGACACGCGACGACTGGGCGTCACCTTTTGGCTGAGAACGGTTCCACTGAGAC
 -----><-----O16B-----

----->
 GTGGTCCA SpeI
 CACCAGGTGATC
 ----->

Fig.6c

M7 (O17/O18; O17A/O18A):

```

                                <-----O17-----
SpeI  CTAGTTTGCTCTCTCCAGGGTCGTATGACCCTGACCGGTATTGTTTCTTGGG
      AAACGAGAGAGGTCCCAGCATACTGGGACTGGCCATAACAAAGAACCC
                                <-----O17A-----

-----><-----O18-----
GTCGTGGTTGCGCTCTGAAAGACAAACCGGGTGTTTACACCCGTGTTTCTCACTTCCTGC
CAGCACCAACGCGAGACTTTCTGTTTGGCCCAAAATGTGGGCACAAAGAGTGAAGGACG
-----><-----O18A-----

---->
CGTG      BamHI
GCACCTAG
----->

```

Fig.6d

M8 (O19; O19A):

BamHI

```

<-----O19-----
GATCCGTTCTCACACCAAAGAAGAAAACGGTCTGGCTCTGTAAGCTAGCCCGCCTA
GCAAGAGTGTGGTTTCTTCTTTTGCCAGACCGAGACATTGATCGGGCGGAT
<-----O19A-----

```

```

----->
ATGAGCGGGCTTTTTTTTAT
TACTCGCCCGAAAAAAATAGC
----->

```

Clal

Fig.6e

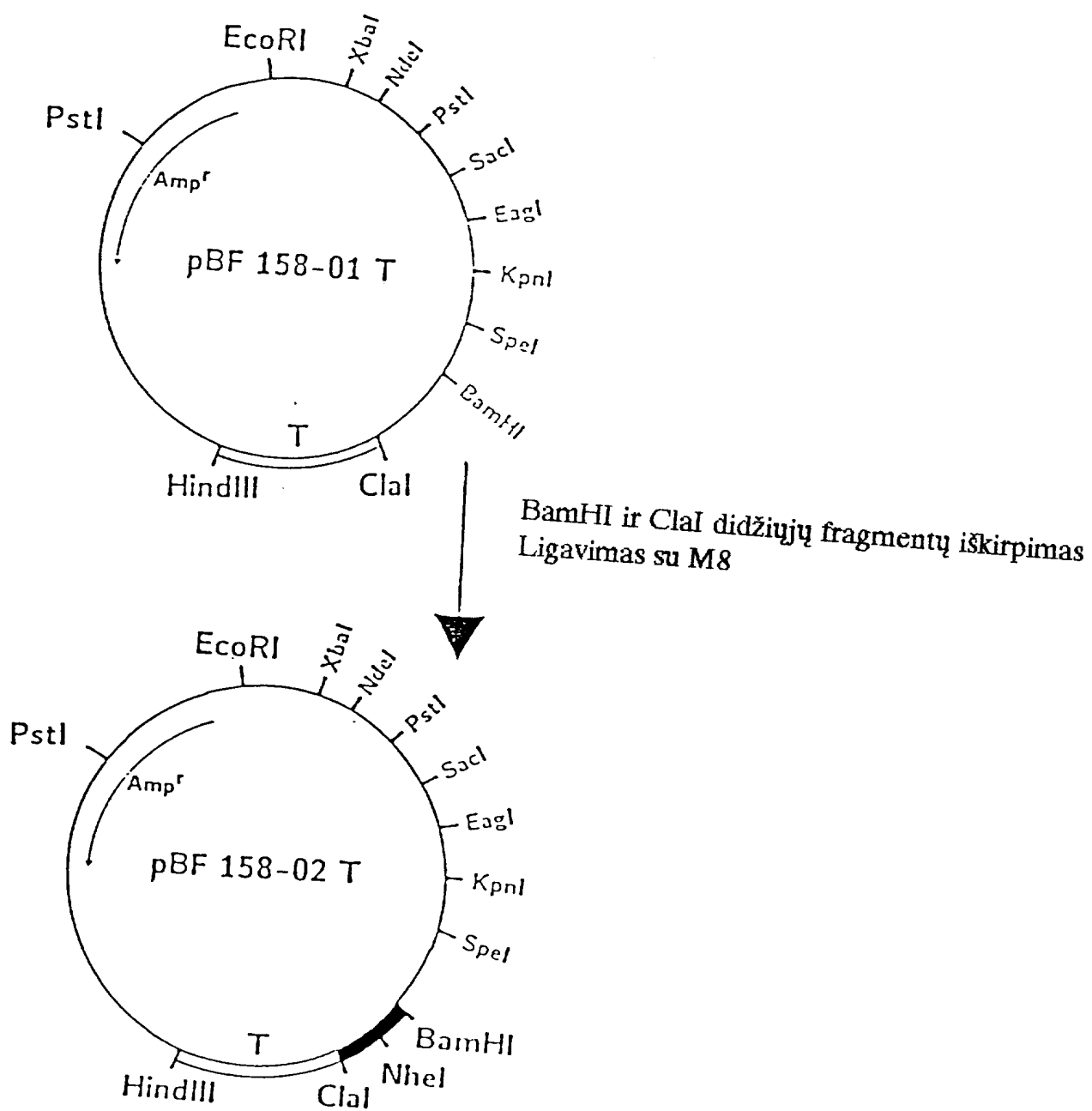
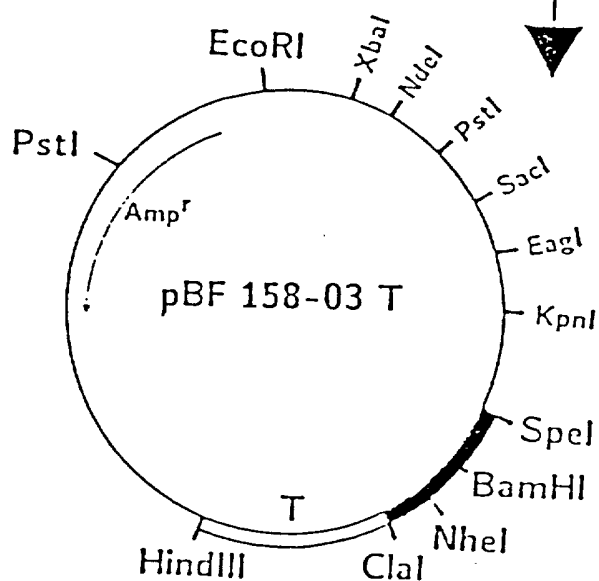


Fig.7a

pBF 158-02 T

SpeI ir BamHI didžiųjų fragmentų iškirpimas
Ligavimas su M7



KpnI ir SpeI didžiųjų fragmentų iškirpimas
Ligavimas su M6

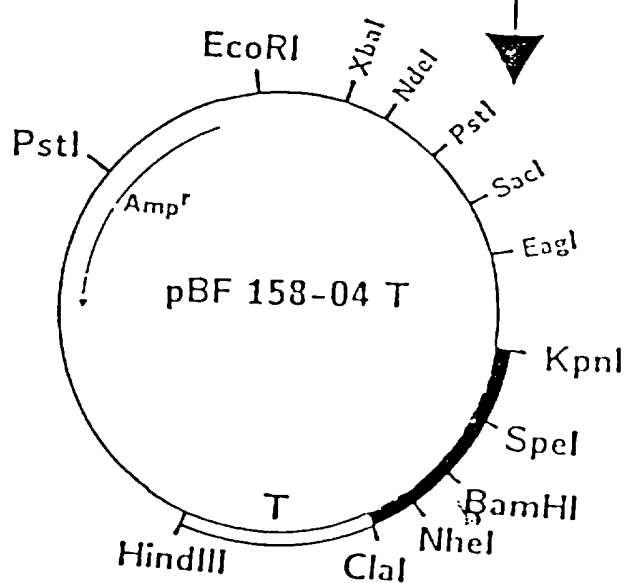
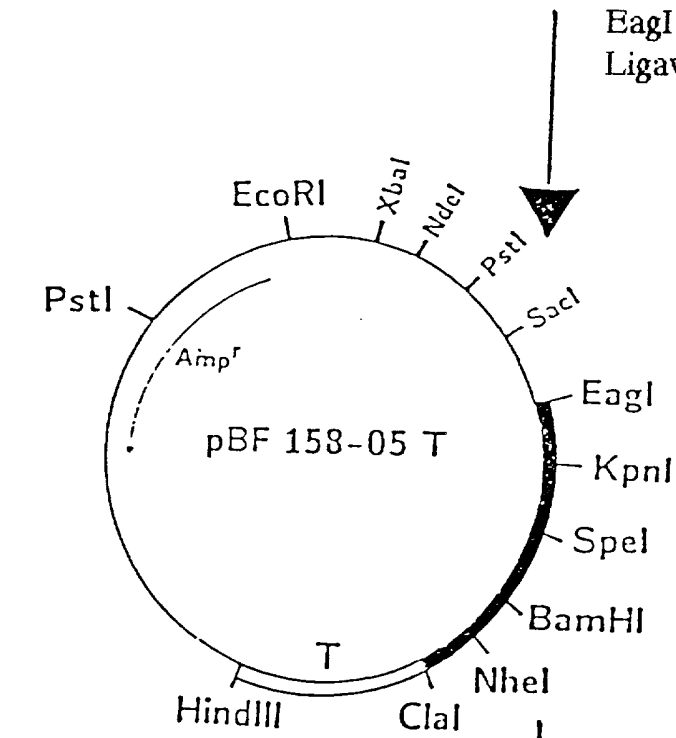


Fig. 7b

pBF 158-04 T

EagI ir KpnI didžiųjų fragmentų iškirpimas
Ligavimas su M5



SacI ir Eag I didžiųjų fragmentų iškirpimas
Ligavimas su M4

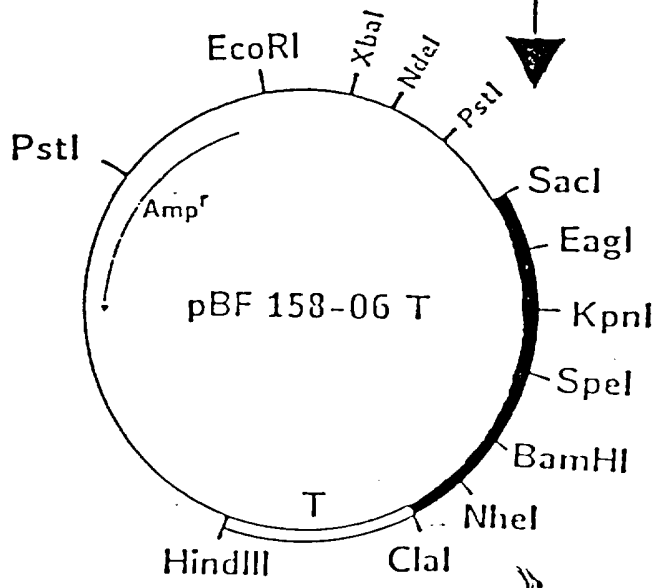


Fig.7c

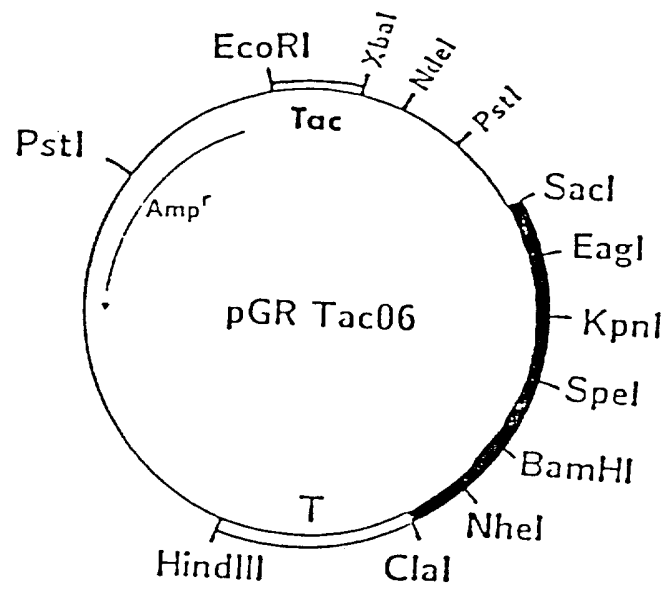


Fig.8

Met Ser Asn Glu Leu His Leu Leu Gln Val Pro Ser Asn
CATATG AGC AAT GAA CTT CAT CTG CAG CAA GTT CCA TCG AAC
 Nde I

143 144
 Glu Leu
GAG CTC
 Sac I

bis

410 411
 Ala Leu
 GCT CTG

Fig.9

M1 (021; 021A):

```

EcoRI  <-----021-----
        AATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGC
        GACTTTACTCGACAACCTGTTAATTAGTAGCTTGATCAATTGATCATGCC
        <-----021A-----

        ----->
        AAGTTCACGTAAAAAGGGTAT
        TTCAAGTGCATTTTCCCATAGATC
        ----->
XbaI

```

Fig.10

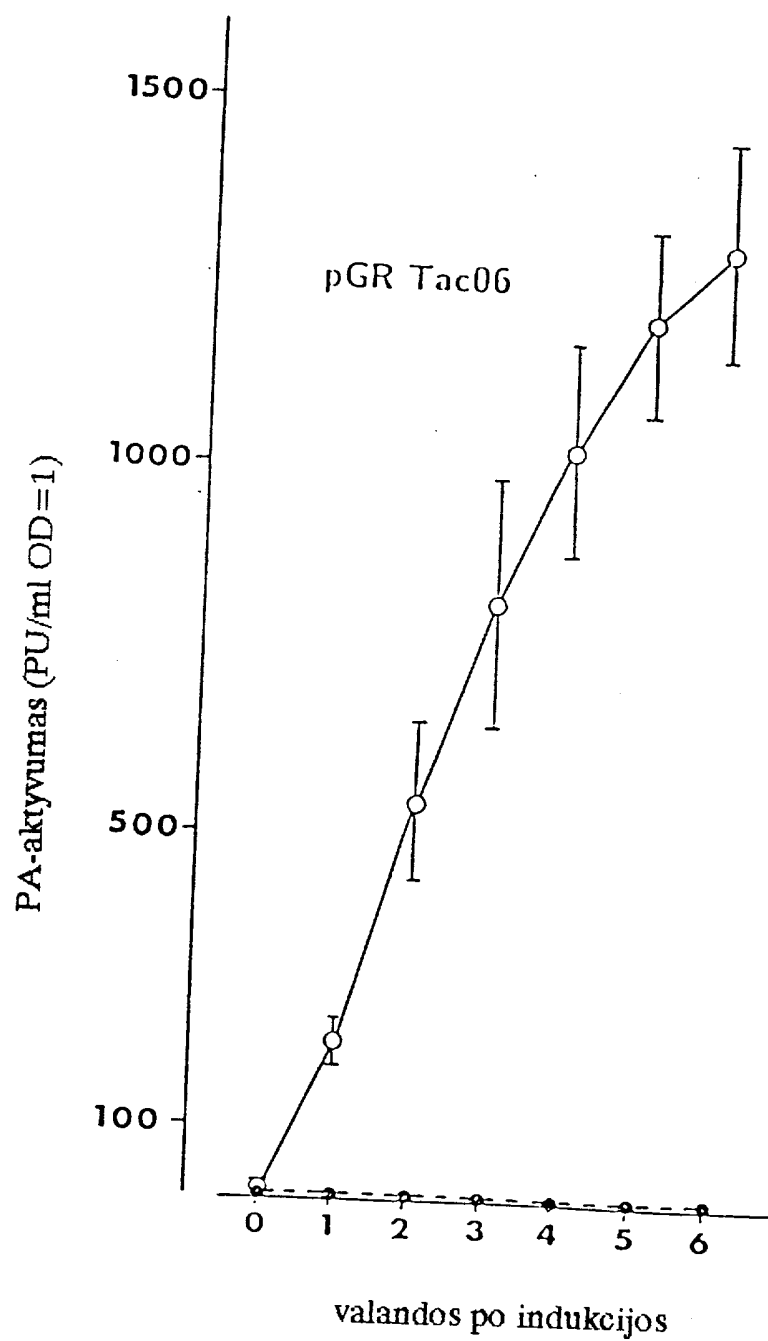


Fig.11

Nukleotidų ir jiems atitinkamų aminorūgščių sekos
junginių, kurių formulė

(Met)-Ser- X_1 - X_2 -rscu-PA¹⁴³⁻⁴¹¹

Nukleotidų seka	pGR bzw. PA-Nr.	X_1	X_2
ATGAGCAAT	318	Asn	-
ATGAGCAATGAA	319	Asn	Glu
ATGAGCAGTCCACCAGAA	327	Ser	Pro-Pro-Glu
ATGAGCCCACCAGAA	336	Pro	Pro-Glu

Fig.12

Fig.13

