

(19)



(10) **LT 4029 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4029**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 3/20**
C07K 15/06
C07K 15/04
C07K 7/36

(21) Paraiškos numeris: **IP1656**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 08 26**

(60) SU duomenys: **SU 4356445, 1988 08 12**

(31, 32, 33) Prioritetas: **86161, 1987 08 14, US**

(72) Išradėjas:

James P. Gilligan, US
Barry N. Jones, US
Arthur H. Bertelsen, US
Nozer M. Mehta, US

(73) Patento savininkas:

UNIGENE LABORATORIES, INC., 110 Little Falls Road, Fairfield,
New Jersey, US

(74) Patentinis patikėtinis:

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

(54) Pavadinimas:

Alfa-amidinančius fermentus turinčios kompozicijos ir jų gavimo būdas

(57) Referatas:

Šio išradimo fermentinėse kompozicijose yra alfa-amidinantys fermentai, kurie gali katalizuoti peptidinio junginio, turinčio C-gale glicino liekaną, virsmą į atitinkamą peptidinį junginį, turintį aminogrupę vietoj minėto glicino. Išvalytų fermentinių kompozicijų santykinis fermentinis aktyvumas yra mažiausiai 25 mE/mg baltymo; jose nėra proteazių, ir todėl jos gali efektyviai katalizuoti peptidų, sudarytų iš L-aminorūgščių, virsmus. Naudojant šio fermento katalizuojamas alfa-amidinimo reakcijas, efektyviai gaminami biologiškai svarbūs alfa-amidinti produktai, tokie kaip kalcitoninas ir kiti reguliuojantys hormonai. Alfa-amidinantys fermentai valomi išskirstymo pagal dydžius ir anijonų mainų chromatografijos metodais; taip gaunami išvalyti fermentai, kurie naudojami specifiniams alfa-amidinančiam fermentui antikūnams gauti. Genas, galintis ekspresuoti alfa-amidinantį fermentą, įstatomas į ekspresijos vektorių ir transformuojamas į šeimininko ląstelę, galinčią ekspresuoti šį geną.

Ši paraiška yra dalis paraiškos JAV patentui, reg. Nr.655366, paduotos 1984 m. rugsėjo 27 d., ir į kurią bus nurodoma šioje pateikiamoje paraiškoje.

Šis išradimas skirtas alfa-amidinantiems fermentams, jų gavimui ir panaudojimui alfa-amidintiems produktams gauti, veikiant šiais fermentais glicinu pailgintus substratus. Tam tikrais realizavimo atvejais alfa-amidinantis fermentas pagal išradimą gali būti panaudojamas naudingų alfa-amidintų hormonų ir produktų, naudojamų žemės ūkyje ir medicinoje, gamyboje, įskaitant kalcitoninus, augimo reguliavimo hormono faktorius, kalcitonininius peptidus ir kitus alfa-amidintus produktus.

Viduląstelinis apdorojimas (gamtinių baltymų skaidymas ir/arba jų pradinių formų, gautų po transliacijos ribonukleino rūgštyse, funkcinis pakeitimas) yra aprašytas įvairiuose dokumentuose.

Paprastai žinduolių ir kitų eukariotų ląstelėse galimos tam tikros potransliacinės operacijos su baltymais, tuo tarpu kai prokariotuose tas nevyksta. Kai kurie prokariotai, kaip pavyzdžiui, *E.coli*, plačiai naudojami kaip šeimininkai žinduolių baltymams gauti, naudojant rekombinantinės DNR (rDNR) metodą, kadangi jie gali būti lengvai išauginami parcialinės fermentacijos eigoje ir yra genetiškai tiksliai aprašyti. Tačiau daugeliui žinduolių baltymų, gautų genų inžinerijos būdu, reikia atitinkamo potransliacinio apdorojimo, kuris paprastai būna realizuojamas *in vitro*, panaudojant sudėtingas chemines reakcijas, kurių didelė kaina neleidžia jų pritaikyti pramoninėje gamyboje.

Į vieną iš apdorojimo būdų įeina baltymų karboksilinio galo aminorūgšties amidinimas. Daugelis gamtoje sutinkamų peptidų ir hormonų turi šitokį pakeitimą, kuris yra labai svarbus, kad baltymas būtų biologiškai aktyvus. Kaip pavyzdys yra kalcitoninas, kai, pakeitus amidintą prolino liekaną į neamidintą, biologinis aktyvumas sumažėja 3000 kartų.

Agentas, veikiantis C-galo amidinimą (alfa), atpažįsta glicino liekaną, kuri eina tuoj pat po amidinamos aminorūgšties (R-X-Gly, kur R yra pagrindinė baltymo seka, X - amidinama liekana ir Gly - glicino liekana). Glicinas yra skaldomas ir faktiškai atiduoda aminogrupę priešpaskutinei aminorūgščiai, ir taip ją amidina.

Pirmieji autoriai, paskelbę apytikslę alfa-amidinančio fermento molekulinę masę, buvo Bradbury A.F. et al., *Nature*, 298, 686-688 (1982). Panaudoję Sephadex G-100, jie

išreiškė prielaidą, kas minimali molekulinė masė yra apie 60000 daltonų (1 daltonas = $1,6601 \times 10^{-27}$ kg).

Tolimesni tyrimai parodė, kad tokio fermento molekulinė masė yra nuo 60000 iki 70000 daltonų (matuota gel-filtracinės chromatografijos metodu). Šie tyrimai atspindėti tokiuose darbuose: Husain I. ir Tate S.S., FEBS Letters, 152, Nr.2, 277-281 (1983); Eipper et al., PNAS, 80, 5144-5148 (1983); Gomez et al., FEBS Letters, 167, Nr.1, 160-164 (1984) ir Kizer J.S. et al., PNAS, 81, 3228-3232 (1984).

Eipper et al., PNAS, 80, 5144-5148 (1983) paskelbė, kad maksimaliam amidinimo fermento aktyvumui pasiekti, be molekulinio deguonies, yra reikalingi du kofaktoriai - askorbino rūgštis ir vario(II) jonai.

Cheminė peptido karboksilinio galo amidinimo reakcijai reikia aminogrupės šaltinio. Bradbury A.F. et al., Nature, 298, 686-688 (1982) parodė, kad glicinas skyla ir atiduoda aminogrupę priešpaskutinei aminorūgščiai, kuri tokiu būdu yra amidinama. Glicino, kaip aminogrupės donoro, reikalingumas buvo parodytas ir kitų autorių darbuose.

Landymore A.E.N et al., BBRC, 117, 283-293 (1983) parodė, kad D-alaninas taip pat gali būti aminogrupės donoriumi amidinimo reakcijoje. Kizer ir kt., PNAS, 81, 3228-3232 (1984) atliktas darbas parodė du skirtingus fermentinius aktyvumus žiurkės smegenyse, kurie gali katalizuoti alfa-amidinimo reakcijas. Didesnės molekulinės masės forma (70000 daltonų) pasižymi specifiškumu tik glicinui, esančiam substrato karboksilo gale. Fermentas su mažesne molekuline mase veikia substratą su β -alaninu, kuris yra karboksilo galo aminorūgštimi.

Optimali pH reikšmė alfa-amidinančiam fermentui, išskirtam iš kiaulės hipofizio ir dalinai išvalytam, pagal Bradbury A.F. ir Smythe D.G., BBRC, 112, Nr.2, 372-377 (1983) yra apie 7,0. Eipper B.A. et al., PNAS, 80, 5144-5178 (1983) patvirtino šią reikšmę, paskelbdami duomenis apie optimalų pH 7,0 alfa-amidinančiam fermentui, išskirtam iš žiurkės hipofizio. Jie taip pat pažymėjo, kad aktyvumas greitai krenta, kai pH mažesnis nei 6,5 arba didesnis nei 7,5.

Aukščiau paminėtose publikacijose ekstraktai ir dalinai išvalyti fermentiniai mišiniai turi dar ir proteolitinių fermentų, kurie gali skaldyti potencialius substratus ir produktus, o taip pat ir pačius alfa-amidinančius fermentus, tokiu būdu sumažindami

peptidų ir polipeptidų, gautų iš gamtinių šaltinių arba naudojant rekombinantinės DNR metodą, amidinimo efektyvumą.

Bendrai paėmus, visi amidinimo aktyvumo matavimai buvo paremti virsmais D-substratų, tokių kaip tripeptidai, pvz., D-Tyr-Val-Gly-COOH į D-Tyr-Val-CONH₂. Iš dviejų galimų konfigūracijų (D arba L) gamtoje biologiškai svarbios aminorūgštys sutinkamos tik L-formoje. Tačiau D-formos naudojimas buvo sąlygotas tuo, kad reikėjo neutralizuoti pašalinių proteolitinų fermentų buvimą užterštuose amidinančių fermentų preparatuose, kurie buvo naudojami šiuose eksperimentuose. Šie pašaliniai fermentai gali turėti išreikštą proteolitinį poveikį į substratus su L-aminorūgštimi ir silpnai veikti D-substratus. Todėl eksperimentatoriai naudojo nenatūralų D-substratą. Iki pastarojo laiko niekas negalėjo parodyti, kad jų fermentiniai preparatai gali amidinti atitinkamus fiziologiškai svarbius substratus, t.y. L-substratus pakeisti į biologiškai aktyvius alfa-amidintus L-produktus.

Šiame išradime parodyta, kad šio išradimo preparatai gali efektyviai amidinti L-substratus, o D-substratams turėti nuo 60 iki 1000 kartų didesnę aktyvumą negu didžiausias aktyvumas, parodytas anksčiau pateiktuose išradėjams žinomuose darbuose.

Fermentiniai preparatai, kurie gali amidinti peptidų ir baltymų karboksilines grupes, aprašyti daugelyje literatūros šaltinių. Pvz., Bradbury A.F. et al., *Nature*, 298, 686-688 (1982) rašoma, kad alfa-amidinimo aktyvumas surandamas kiaulių hipofizyje. Fermentą turintis preparatas iš kiaulės hipofizio gali pakeisti peptidus, kurie baigiasi glicinu, į atitinkamus deglicininis amidopeptidus. Tačiau, Bradbury et al. teigia, kad preparatai neamidina peptidų ar polipeptidų, išskirtų iš gamtinės kilmės šaltinių:

“Amidinimo aktyvumo aptikimo ir įvertinimo tyrimo sistema buvo sukurta, tiriant fermentinių preparatų galimybes pakeisti sintetinį D-tirozilvalilgliciną į atitinkamą dipeptidą - D-tirozilvalinamidą... D-tirozino liekana apsaugo nuo suskaldymo amino-peptidazėmis, kurios buvo audinių homogenatuose... Kontroliniai eksperimentai parodė, kad iš lėto skyla ir sintetinis D-tirozilvalinamidas, inkubuojamas tokiose sąlygose. Tokiu būdu, tripeptido amido pagaminimas hipofizio fermento pagalba buvo lydimas jo skaidymo kitais fermentais, esančiais hipofizio ekstrakto.” (686 psl.).

Taigi. Bradbury et al., pripažįsta, kad aprašytuose preparatuose yra kiti proteolitiniai fermentai, kurie skaldo peptidus arba polipeptidus, ir kad naudojama negamtinio D-tirozino liekana, siekiant minimizuoti šį skaldymą.

Be to, Bradbury et al. siūlo amidinančio fermento išvalymui naudoti homogenizaciją arba subląstelinį frakcionavimą, o po to gel-filtracinę chromatografiją, tačiau šis fermentas, pagal bendrą nuomonę, vistiek lieka užterštas proteolitiniais fermentais.

Husain I. ir Tate S.S., FEBS Letters, 152, Nr.2, 277-281 (1983) aprašo alfa-amidinantį aktyvumą jaučio hipofizio neuroskrecinėse granulėse..

Eipper et al., PNAS, 80, 5144-5148 (1983) paskelbė, kad alfa-amidinantis fermentinis aktyvumas stebimas ir priekinėse, vidurinėse ir užpakalinėse žiurkės hipofizio liaukos dalyse bei jaučio tarpiniame hipofizyje. Tačiau čia nurodoma, kad alfa-amidinancio aktyvumo tyrimui naudojamas sintetinis D-Tyr-Val-Gly substratas, ir pripažįstama, kad naudoti preparatai yra nešvarūs.

Gomez ir kt., FEBS Letters, 167, Nr.1, 160-164 (1984) nustatė, kad žiurkių hipotalamas taip pat pasižymi alfa-amidinanciu fermentiniu aktyvumu.

Bradbury A.F. ir Smythe D.G. "Peptides Structure and Function": Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium; p.249-252 (1983). Eds. Hraby V.J. and Rich D.H. aprašo alfa-amidinancio aktyvumo buvimą žiurkių skydliaukėje.

Maines R.E. et al., Endocrinology, 114, 1522-1530 (1984) paskelbė, kad žiurkių arba pelių ląstelių linija, gauta iš priekinės hipofizio dalies (ATT-20), turi alfa-amidinantį fermentinį aktyvumą, kuris, laikui bėgant, mažėja.

Liaukos arba organai, apie kuriuos žinoma, kad jie turi amidintus peptidus, gali turėti fermentą, sugebantį katalizuoti amidinimo reakciją. Pavyzdžiui, žemesnės formos, tokios kaip jūros šuo (*Squalus acanthias*), pagal O'Donohue T.L. et al., Peptides 3, 393-395 (1982) pranešimą, turi amidintus peptidus hipofizio ekstrakto. Scheller R.H et al., Cell, 32, 7-22 (1983) paskelbė apie signalinių amidintų peptidų buvimą jūros sraigėse *Aplysia*. Nežiūrint į lyg ir platų šio aktyvumo tipo paplitimą gamtoje, informacijos apie fermento fizikines-chemines savybes nėra daug. Tai gali būti susiję su tuo, kad neuroendokrininiuose organuose yra mažas peptido kiekis.

Amidintų peptidų buvimas tam tikruose audiniuose nebūtinai surištas su alfa-amidinančio fermento dideliais kiekiais. Pvz., priekinė žiurkių hipofizio dalis pasižymi dideliu alfa-amidinančiu aktyvumu, bet neturi žinomų substratų (Eipper et al., PNAS, 80, 5144-5148 (1983)). Žiurkių hipofizio užpakalinėje dalyje yra amidintų peptidų (okситосино ir vazopresino), bet ji pasižymi nedideliu alfa-amidinančiu aktyvumu (Eipper et al., Endo, 116, 2497-2504 (1985)). Todėl tol, kol nebus ištirtas atskirų audinių alfa-amidinantis aktyvumas, esančių arba potencialių fermento kiekių numatyti negalima.

Šio išradimo tikslas yra alfa-amidinančių kompozicijų sukūrimas, kurios galėtų būti efektyviai naudojamos, gaminant naudingus alfa-amidintus produktus net iš L-aminorūgštis turinčių substratų, tokių kaip peptidiniai ir polipeptidiniai substratai tiek gamtinės kilmės, tiek ir gauti rekombinantinės DNR technologijos būdu.

Papildomas šio išradimo tikslas yra efektyvaus ir ekonomiško fermentinių kompozicijų gamybos būdo sukūrimas.

Kitas papildomas šio išradimo tikslas yra monokloninių antikūnų, specifinių alfa-amidinančiam fermentui, ir imobilizuotų antikūnų, valymo dervų, imuninės chromatografijos arba į jas panašių kolonėlių, kurios, naudojant minėtus antikūnus, efektyviai išvalytų alfa-amidinantį fermentą, sukūrimas.

Kitas papildomas tikslas yra šeimininko ląstelių sukūrimas genų inžinerijos būdu, kurios galėtų užtikrinti aukštą alfa-amidinančio fermento ekspresijos lygį.

Kitas papildomas išradimo tikslas yra alfa-amidintų produktų gavimas iš substratų, turinčių glicino liekaną C-gale, naudojant reakcijoje substratą ir fermentinę kompoziciją.

Šie ir kiti tikslai paaiškės iš toliau duodamo aprašymo. Pagal šį išradimą, pareiškėjai pateikia naujas pakankamai švarias alfa-amidinančias fermentines kompozicijas, kurių santykinis alfa-amidinantis aktyvumas yra mažiausiai 25 mE/mg, geriau 50 mE/mg arba daugiau nei 150 mE/mg baltymo, esančio minėtoje kompozicijoje. Visos čia pateiktos santykinio aktyvumo reikšmės yra duotos pagal Dansil-D-Tyr-Val-Gly-COOH virsmo į Dansil-Tyr-Val-CONH₂ reakciją. Vienu mE laikomas toks aktyvumo dydis, kurio reikia paversti 1 nanomoliui Dansil-Tyr-Val-Gly-COOH į vieną nanomolį Dansil-Tyr-Val-CONH₂ 37 °C temperatūroje per 1 minutę, esant pH 7,0, askorbato jonų koncentracijai - 3 mM (skaičiuojant suminiam reakcijos mišiniui, įskaitant fermentą, substratą, kofaktorius

ir t.t.), molekulinio deguonies pertekliui ir pakankamam kiekiui vario jonų (paprastai apie $2\ \mu\text{M}$, priklausomai nuo fermento švarumo).

Pagal išradimą, alfa-amidinantys fermentai yra fermentai, tokie kaip peptidil-glicin-alfa-amidinanti monooksigenazė, gali katalizuoti peptidilinio junginio, turinčio glicino liekaną bent jau peptidinės grandinės C-gale, virsmą atitinkamu peptidil-amidiniu junginiu, turinčiu aminogrupę vietoj C-gale buvusio glicino. Terminas “peptidinė grandinė” čia reiškia bet koki polipeptidą, turintį mažiausiai dvi aminorūgštis, sujungtas tarpusavyje peptidine jungtimi. Terminas “peptidinis junginys” reiškia bet koki junginį, turintį peptidinę grandinę. Terminas “atitinkamas peptidil-amidas” reiškia bet kuri reakcijos produktą, kuriame peptidinės grandinės C-gale esantis glicinas yra pakeistas aminogrupe.

Alfa-amidinimo reakciją tikslinga vykdyti esant deguoniui ir redukuojančiam agentui. Tokiais reduktoriais gali būti (bet neapsiriboti) askorbino rūgštis, askorbino rūgšties druskos, dihidroksifumaratas, metalų cianidai, tetrahidropterinas. Buvo nustatyta, kad tam tikri kofaktoriai skatina reakciją ir/arba lėtina fermento skilimą, bei jo aktyvumo mažėjimą. Tokiais kofaktoriais gali būti (bet neapsiriboti) katalazė, etanolis, kalio jodidas ir vario jonai. Išvalytos fermentinės kompozicijos pagal šį išradimą neturi proteolitinio aktyvumo, galinčio suardyti alfa-amidinantį fermentą, alfa-amidinimo reakcijos produktus arba reagentus, todėl šios kompozicijos gali katalizuoti alfa-amidinimo reakcijas ir tais atvejais, kai substratas ir produktas susideda iš L-aminorūgščių. Proteolitinis aktyvumas amidinimo reakcijos mišinyje gali tiesiogiai neatitikti proteazės koncentracijos. Aktyvumas, netgi esant didelėms proteazės koncentracijoms, gali būti užslopintas, pavyzdžiui, veikiant įvairiems inhibitoriams. Proteolitinio aktyvumo nebuvimas, padidinantis fermentinės kompozicijos panaudojamumą pramonėje ir praktkoje, kai naudojami substratai sudaryti iš L-aminorūgščių, jokių būdu nesumažina šios kompozicijos naudingumo substratams, kuriuose nėra L-aminorūgščių.

Kaip toliau aprašyta, pareiškėjai išvalė labai daug specifinių baltymų, pasižyminčių alfa-amidinančiu aktyvumu, pavyzdžių. Čia naudojamas terminas “alfa-amidinantis aktyvumas” reiškia bet koki aktyvumą, turintį tendenciją peptidinio substrato C-gale, kuriame yra glicino liekana, palikti tik aminogrupę. Tokio pakeitimo metu glicinas, išskyrus aminogrupę, gali būti suardomas, ir toje vietoje, kur pirma buvo glicinas, lieka tik

aminogrupė. „Alfa-amidinantis fermentas“ čia naudojama prasme yra bet kokia kompozicija arba junginys, jo aktyvus homologas arba fragmentas, pasižymintis alfa-amidinančiu aktyvumu.

Fermentinės kompozicijos, išgrynintos pagal šį išradimą, gali būti valomos tol, kol jos taps vienalytėmis. Čia naudojamas terminas „vienalytis“ reiškia fermentinį preparatą, kuris duoda vienintelę ryškią juostą natrio dodecilsulfato/poliakrilamido gelio elektroforezėje ir parodo vienintelę aminorūgščių seką, nustatant ją įprastais sekų nustatymo būdais.

Atitinkami alfa-amidinantis fermentai, išgryninti iki vienalytės būsenos pagal šį išradimą, turėjo santykinį aktyvumą, didesnį nei 1500 mE/mg baltymo.

Fermentinės kompozicijos, pagamintos pagal šį išradimą, gali būti panaudotos alfa-amidinimo reakcijų katalizei, gaminant naudingus alfa-amidintus peptidinius produktus. Substratu naudojamas toks peptidinis junginys, turintis glicino liekaną bent jau peptidinės grandinės gale, kuriame pakeitus C-galo gliciną, gaunamas norimas produktas. Substratas reaguoja, esant deguoniui ir redukuojančiam agentui bei fermentinei kompozicijai, gautai pagal šį išradimą, ir reakcija vykdoma tol, kol peptidas pavirsta į atitinkamą peptidilamidą. Virsmas prasideda tuoj pat, kai tik substratas sueina į kontaktą su fermentu, bet reakcijos greitis labai priklauso nuo pH, temperatūros, substrato specifiškumo, kofaktorių koncentracijos bei kitų parametrų, kuriuos galima keisti, norint optimizuoti procesą. Paprastai reakcija turi būti vykdoma tol, kol pasiekiamas norimas virsmo (substrato į produktą) procentas. Tinkamiausiuose išradimo realizavimo variantuose, siekiant pagreitinti reakciją ir/arba padidinti arba palaikyti fermento aktyvumą, naudojami aukščiau minėti kofaktoriai.

Daug naudingų produktų, įskaitant gamtinius hormonus ir panašius junginius, kuriems reikalingas arba pageidautinas alfa-amidinimas, gali būti gaunami iš peptidinių junginių, besibaigiančių glicinu, kai reakcijoje dalyvauja šio išradimo alfa-amidinančios fermentinės kompozicijos. Tokie produktai, kurie gali būti panaudoti, pavyzdžiui, žemės ūkyje arba medicinoje, gydant hormonų trūkumu charakterizuojamas ligas, apima (bet neapsiriboja) įvairius kalcitoninus, augimo hormonų faktorius, kalcitonininius peptidus ir panašius. Čia minimi hormonai, kuriems priklauso įvairūs kalcitoninai, augimo hormonų faktoriai ir kalcitonininiai peptidai, yra įvairūs baltymai, turintys C-gale amidogrupę,

pasižymintys charakteringu minėtų hormonų aktyvumu, žinomu šios srities specialistams. Pavyzdžiui, kalcitoninai apima visokias jų atmainas, kurios sugeba reguliuoti kalcio įsisavinimą kauluose. kas būdinga kalcitoninams.. Įvairių baltymų homologai taip pat priklauso šiam išradimui, o taip pat ir nukleotidų sekos, koduojančios baltymų sekas bei jų homologus, modifikuotus taip, kad sekos atliekamos funkcijos nepasikeičia. Pageidautina, kad 40 %, o dar geriau 50 % aminorūgščių atitiktų išradime pateiktoms aminorūgštims. Nukleotidų sekose kodonai gali būti pakeisti ekvivalentiniais kodonais, koduojančiais tas pačias aminorūgštis.

Šio išradimo fermentinės kompozicijos gali katalizuoti netgi substratų, turinčių L-aminorūgštis, alfa-amidinimo reakciją, realizuoti efektyvią ir ekonomišką amidinimo produktų gamybą, panaudojant substratus, gaunamus išvalant gamtinius baltymus, arba rekombinantinės DNR technologijos pagalba gaunamus substratus.

Kai kuriuose tinkamiausiuose šio išradimo realizavimo variantuose alfa-amidinimo reakcija gali būti palengvinta, imobilizuojant fermentą ant kieto nešiklio, kuris netirpsta vandeninėje terpėje ir nesuyra reakcijos sąlygomis, leidžiant substratą per imobilizuotą fermentą, geriausia esant kofaktoriams. Terminas “imobilizacija” čia suprantamas kaip fermento surišimas su pagrindu arba nešikliu. Tokio tipo nešikliams priklauso (bet neapsiriboja) kontroliuojamo porėtumo stiklas arba aktyvuotas adsorbentas, pavyzdžiui, sefarozė, aktyvuota bromcianu. Tokiu būdu imobilizuoti fermentai gali būti daug kartų panaudojami, atskiriant reakcijos mišinį nuo kieto nešiklio, prie kurio yra prikibęs fermentas.

Pareiškėjai atrado, kad fermentinės kompozicijos pagal išradimą gali būti gautos ir išvalytos daugeliu būdų. Nustatyta, kad geriausi pradiniai alfa-amidinančio fermento šaltiniai yra žiurkių karcinomos pažeistos skydliaukės šerdies audinys, jo ląstelių linijos ir/arba ląstelių kultūros iš minėtos ląstelių linijos terpė. Nešvarus alfa-amidinantis fermentas gali būti valomas tiek išstūmimo chromatografija, tiek ir anijonų mainų chromatografija, ypačiai stipri anijonų mainų chromatografija. Terminas “stipri anijonų mainų chromatografija” čia suprantamas kaip anijonų mainų chromatografija, vykdoma bet kokioje dervoje, kuri išsaugo pastovų teigiamą krūvį pH ribose 2-12. Tam tikrais išradimo realizavimo atvejais po išstūmimo chromatografijos naudojama stipri anijonų mainų chromatografija, o taip pat ir prieš išstūmimo chromatografiją gali būti vykdoma

stipri anijonų mainų chromatografija. Tam tikrais atvejais gali būti reikalinga antroji stipri anijonų mainų chromatografija, einanti po pirmojo etapo. Viename iš tinkamiausių realizavimo variantų arba pirmoji stipri anijonų mainų chromatografija arba antroji stipri anijonų mainų chromatografija vykdoma, esant šarminiam pH, o kita - esant rūgštiniam pH.

Naudojant gerai išvalytus vienalyčius šio išradimo fermentų mėginius, kaip antigeną siekiant iššaukti imuninį atsaką pelėse ir viščiukuose, buvo gauti atitinkamai monokloniniai ir polikloniniai antikūnai. Taip gauti antikūnai gali būti išvalyti ir imobilizuoti ant kieto nešiklio, siekiant gauti kolonėlę fermento imuninei chromatografijai realizuoti. Ši kolonėlė gali būti panaudota pradinės fermentinės medžiagos valymui, padidinant fermento efektyvumą ir sudarant jo pakartotino panaudojimo galimybę.

Fermentas, išvalytas pagal šį išradimą, bei jo skaidymo tripsinu fragmentai, buvo sekvenuojami žinomais būdais ir sekų analizės duomenys panaudoti oligonukleotidiniais zondams gauti. Naudodami žymėtus oligonukleotidinius zondus, pareiškėjai išskyrė alfa-amidinantį fermentą koduojantį geną iš kDNR bibliotekos, kurią sintetavo iš išskirtos iš žiurkės karcinominės skydliaukės poli-A RNR. Šis genas, kuris bus smulkiai aprašytas toliau, gali būti įstatytas į atitinkamą ekspresijos vektorių ir transformuotas į bet kurią ląstelę-šeimininką, galinčią ekspresuoti geną. Tokiais šeimininkais gali būti (bet neapsiriboja) *E. coli*, mielių štamai, tokie kaip *S. cerevisiae* arba aukštesniųjų eukariotų ląstelės, tokios kaip ląstelių linija, iš kurios buvo gautas fermentas. Galima manyti, kad dideliems alfa-amidinančio fermento kiekiams gauti pramoninėje gamyboje bus naudojami mikroorganizmai, sukurti genų inžinerijos būdu.

Pramoninėje gamyboje galima naudoti gamtinius fermentus, juos išvalant išstūmimo chromatografijos arba anijonų mainų chromatografijos metodais, kur kolonėlėje sulaikyti fermentai eliuuojami valgomosios druskos tirpalu, kurio koncentracija didesnė nei 250 mM, pageidautina apie 350 mM arba 500 mM. Didelės koncentracijos druskos tirpalas eliuoja labiausiai sulaikytus kolonėlėje fermentus. Išstūmimo chromatografija naudojama fermentų rūšims, kurių molekulinė masė 58000-67000, geriau apytikriai nuo 60000 iki apytikriai 65000 daltonų, atskirti. Išvalytas preparatas gali amidinti peptidinį junginį, gautą išskiriant jį iš gamtinių šaltinių arba naudojant rekombinantinės DNR metodą, t.y. peptidus turinčius L-aminorūgštis.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 - Fig.5 paaiškina 1 pavyzdį.
Fig.6 - Fig.12 paaiškina 2 pavyzdį.
Fig.13 - Fig.16 paaiškina 3 pavyzdį.
Fig.17 - Fig.21 paaiškina 4 pavyzdį.
Fig.22 paaiškina 5 pavyzdį.
Fig.23 paaiškina 6 pavyzdį.

Buvo rasta, kad vienalytis alfa-amidinantis fermentas gali būti gautas daugiaetapiu metodu, naudojant išstūmimo ir jonų mainų chromatografiją, iš auglių kietų audinių ekstraktų, auglių ląstelių linijų ir tokių ląstelių linijų audinių kultūrų terpių.

Fermentas buvo ekstrahuojamas iš žiurkių skydliaukės karcinomos (MTC), sukeltos WAG/Rij Wistar žiurkėms, kurią aprašė Roos B.A et al., *Endocrinology*, 150, Nr.1, 27-32 (1979). Šis audinys deponuotas kaip eksponatas Nr.IVI-10028. Fermentas buvo išskirtas ir iš kitų šaltinių, būtent iš žmogaus ir žiurkės skydliaukės karcinomos ląstelių linijos. Žiurkių ląstelių linija (CA-77) buvo gauta iš žiurkės skydliaukės karcinomos auglio, kaip aprašė Muszynski M. et al., *J. Biol. Chem.*, 258, 11678-11683 (1983). Ši ląstelių linija buvo deponuota kaip eksponatas IVI-10029. Žmogaus ląstelių linija (HTT 54/34) buvo išvesta B.A. Roos (VA Medical Center of Cleveland, Ohajo), pradine kultūra naudojant žmogaus skydliaukės karcinomos ląsteles. Žmogaus ląstelių linija (HTT 54/34) buvo deponuota kaip eksponatas IVI-10031. (Žr. "Recognition of the Deposit of Micro-Organisms for the Purposes of Patent Procedure" ir "Budapest Notification" Nr.34, 1983.11.03)

Buvo nustatyta, kad tam tikros tiek žmogaus, tiek ir žiurkės ląstelių linijų audinių terpės, pasižymi nemažu alfa-amidinančio fermento aktyvumu, kas rodo, kad dalis fermento išsiskyrė iš ląstelių. Fermentas gali būti gautas ir išvalytas, apdorojant pradinę medžiagą (įskaitant kultūros terpę, fermentus ir priedus) anijonų mainų chromatografijos būdu. Mėginys gali būti patalpinamas į patroną, tokį kaip CUNO-250 (CUNO Corp.). su dietilaminoetilu ("DEAE").

Eliuota iš šio patrono kompozicija, pasižyminti alfa-amidinančiu aktyvumu, toliau apdorojama išstūmimo chromatografijos būdu, panaudojant tam tikros skiriamosios gebos dervą, pvz., Sephacryl S-200 (firma Pharmacia Fine Chemicals).

Po to aktyvi frakcija chromatografuojama jonų mainų metodu, naudojant stiprią anijonų mainų matricą. Šiuo atveju naudojama derva - stipri anijoninė derva Mono Q

HR5/5 (Pharmacia Fine Chemicals). Norint gerai išgryninti fermentą, gali reikėti vieno arba kelių valymų. Kolonėlė Mono Q HR5/5 turi 10 μm dydžio daleles, porėtumas - 40 %, joninė gelio grupė - $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, jonų mainų talpa - 0,28-0,36 mmol/ml.

Kiekvienas valymo etapas gali būti kontroliuojamas tiek pagal baltymo kiekį, tiek ir pagal alfa-amidančio aktyvumo lygį. Ši informacija naudojama specifinio fermento aktyvumo, kuris yra fermento santykinio švarumo rodiklis, nustatymui.

Peptidil-glicin-alfa-amidinanti monooksigenazė, išvalyta pagal išradimą (fermentas, gautas iš žiurkių ląstelių, depozito Nr.IVI-10032; fermentas, gautas iš žmogaus ląstelių, depozito Nr.IVI-10033), turi molekulinę masę apie 60000-65000 daltonų, kas buvo nustatyta gel-filtracijos metodu.

Fermentas buvo išvalytas taip, kad jo santykinis fermentinis aktyvumas buvo mažiausiai apie 25 mE/mg baltymo, pageidautina - mažiausiai 50 mE/mg baltymo. Santykinis fermento aktyvumas, didesnis nei 150 mE/mg baltymo, yra ypač tinkamas. Alfa-amidinantis fermentas buvo išvalytas taip, kad dodecilsulfato/poliakrilamido gelio elektroforezėje (SDS-PAGE) rodė vienintelę ryškia juostą.

Išvalyta peptidil-glicin-alfa-amidinanti monooksigenazė naudojama polipeptido, kurio C-gale yra glicinas, karboksilo grupės amidinimui, kur glicino liekana yra kaip aminogrupės donoras. Substratinis peptidas arba polipeptidas gali būti išskirtas iš gamtinių produktų, sintezuotas iš jį sudarančių aminorūgščių arba gautas, naudojant rekombinantinės DNR technologiją. Polipeptidas su glicino galu jungiasi su deguonimi, esant efektyviam fermento kiekiui. Reikalingas fermento kiekis priklauso nuo kelių šioje srityje žinomų faktorių, tokių kaip santykinis fermentinio preparato aktyvumas, reaguojančio substrato prigimtis ir kiekis, reakcijos laikas, reakcijos mišinio temperatūra ir pH. Šios srities specialistams žinomi ir kiti veikiantys faktoriai. Paprastai būna deguonies perteklius, lyginant su substrato koncentracija. Reikalingą vario jonų koncentraciją galima palaikyti, panaudojus bet kurią druską, kuri nekenkia reakcijos eigai. Fermentui, kurio santykinis fermentinis aktyvumas yra tik apie 1 mE/mg baltymo, maksimalus alfa-amidinimas pasiekiamas tik esant didelei vario jonų koncentracijai (apie 4 μM). Didėjant fermento grynumui, egzogeninių (išorinių) vario jonų poreikis sumažėja. Fermentinį aktyvumą taip pat galima padidinti askorbato jonais, gaunamais iš askorbino rūgšties druskų, kurių katijonas netrukdo reakcijos eigai. Išvalytam fermentui, kurio santykinis

aktyvumas yra 50 mE/mg, maksimalus alfa-amidinimas pasiekiamas, esant 50mM askorbato koncentracijai. Alfa-amidinimo aktyvumas taip pat gali būti padidintas, pridėdant katalazės. Optimalus alfa-amidinimo reakcijos biologiškai svarbiems substratams pH yra nuo 6,5 iki 7,5.

Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai, nukreipti prieš fermentą, buvo gauti, naudojant švarų fermentą, kaip antigeną, siekiant atitinkamai gauti pelių ir viščiukų imunines reakcijas. Tiek monokloninius, tiek ir polikloninius antikūnus pareiškėjai gavo ir išvalė pagal metodiką, aprašytą 8 pavyzdyje. Specifiškų alfa-amidinančiam fermentui antikūnų sukūrimo išradimas laikomas išradėjų laboratorijose.

Antikūnai gali būti imobilizuoti ant kietos matricos, netirpstančios naudojamoje terpėje. Pageidautina, kad matrica būtų atspari irimui. Matricoje yra funkcinė grupė, sugebanti surišti baltymus, kuriuose funkcinės grupės po to kovalentiškai susiriša su antikūnais. Tokia antikūnų imobilizacija palengvins alfa-amidinančio fermento išskyrimą iš gamtinių ir/arba rekombinantinių šaltinių. Tai padaroma, sumaišant imobilizuotus antikūnus su pradiniais fermento preparatais. Antikūnai specifiškai suriša alfa-amidinančio fermento molekules. Pašaliniai baltymai nesusiriša su antikūnais ir lengvai pašalinami eliuuojant arba centrifuguojant. Pašalinus priemaišas, alfa-amidinantį fermentą gali būti atskirtas nuo imobilizuotų antikūnų, pakeičiant joninę jėgą, pH arba pridėdant atskiriančių jonų ("Affinity Chromatography: Principles and Methods", Manual, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) ir išskiriamas labai švariame pavidale.

Fermentas buvo išvalytas taip, kad buvo galima nustatyti jo aminorūgščių seką. Ši informacija buvo panaudota, siekiant išskirti nukleino rūgštį, koduojančią fermentą.

Tolimesnis įvedimas į atitinkamą vienaląstį organizmą arba šeimininko ląstelę vykdomas, naudojant standartinius rekombinantinės DNR gavimo būdus (Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, 1982 arba Wu R., ed., "Methods in Enzymology", Vol.68, Academic Press, 1979). Gautos ląstelės, turinčios heterologinę, koduojančią alfa-amidinantį fermentą DNR, gamina pakankamus fermento kiekius, kad būtų galima vykdyti *in vitro* potransliacinį alfa-amidinimą ir teoriškai leidžia šioms ląstelėms vykdyti peptido ar polipeptido modifikaciją *in vivo*.

Nors šis išradimas ir aprašomas pagal pageidautinus jo realizavimo variantus, šios srities specialistams bus suprantami ir įvairūs galimi pakeitimai. Tinkamiausi šio išradimo realizavimo variantai pateikti pavyzdžiuose.

1 pavyzdys

Alfa-amidinančio fermento, gauto iš skydliaukės karcinomos, išvalymo metodika

Užšaldyti žiurkių MTC augliai buvo susmulkinti į mažyčius fragmentus ir homogenizuoti 150 mM Tris (pH 7,5) su 250 mM sacharozės, 0,25 % N-acetilglukopiranozido, 0,1 mM PMSF, 20 µg/ml pepstatino ir 100 µg/ml tripsino inhibitoriaus iš sojos pupelių. Paprastai 25 g auglio audinio buvo homogenizuojama 200 ml ledu šaldomo minėto buferio. Homogenizacija buvo atlikta Poltyron (Brinkman) homogenizatoriumi, 7-je padėtyje, naudojant 4 impulsus po 20 sek.. Homogenatas centrifuguojamas 15 min. rotoriniame įrenginyje JA-20 (Beckman), esant 9000g, ir supernatantas nupilamas. Nuosėdos vėl homogenizuojamos 60 ml homogenizacijos buferio 3 impulsais po 20 sek. 7-je padėtyje. Šis antrasis homogenatas centrifuguojamas 15 min., esant 9000g. Šio centrifugavimo supernatantas sumaišomas su pirmuoju supernatantu. Gautas mišinys centrifuguojamas 30 min. SW-28 (Beckman) rotoriumi 4 °C temperatūroje, esant 100000g. Į nuskaidrintą homogenatą buvo dedama amonio sulfato kristalų iki 25 % koncentracijos. Kristalai dedami palaipsniui per 15 min., maišant homogenatą 4 °C temperatūroje. Pamašius 30 min. šioje temperatūroje, mišinys centrifuguojamas 15 min., esant 27000g, JA-20 (Beckman) rotoriumi 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupiltas ir į jį pridėta amonio sulfato iki 40 % koncentracijos. Pamašius 30 min., mišinys vėl centrifuguotas 15 min., esant 27000g. Po to supernatantas buvo atskirtas, ir nuosėdos, kurios turėjo bent 50 % bendro fermentinio aktyvumo homogenate, buvo vėl suspenduotos 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) bandinių suformavimui. Aktyvumas sudarė 8,2 mE/mg baltymo.

Gelio filtracinė išskyrimo pagal dydį chromatografija per Sephacryl S-300

Sephacryl S-300 (Pharmacia) buvo stabilizuotas 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) ir supiltas į kolonėlę K 50/100 pagal gamintojo instrukciją. Kolonėlės sluoksnio tūris - apie 1,3 litro. Pakrautas bandinys sudarė 3 % kolonėlės sluoksnio tūrio. Baltymai buvo eliuuoti iš kolonėlės 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), esant 20 ml/min. srautui. Surinktos frakcijos po 10

ml, ir ištirtas jų alfa-amidinantis aktyvumas, kaip substratą naudojant Dansil-D-Tyr-Val-Gly. Eliuotas iš kolonėlės fermentas, kurio vienintelis aktyvumo maksimumas parodytas Fig.1, turėjo molekulinę masę 60000-65000 daltonų. Jo aktyvumas buvo mažiausiai 50 mE/mg baltymo.

Mono-Q chromatografija, esant pH 6,0 (stipri anijonų mainų chromatografija)

Frakcijos iš kolonėlės Sephacryl S-300 su maksimaliu alfa-amidinančiu aktyvumu buvo surinktos ir dializuotos 4 lituose 20 mM bis-Tris buferio (pH 6,0). Gautas tirpalas supiltas į kolonėlę mono-Q HR 5/5, kuri buvo paruošta pagal gamintojo instrukcijas ir stabilizuota 20 mM bis-Tris, pH 6,0. Surinkus nesusijungusį su kolonėlės adsorbentu baltymą eliuente, surišti baltymai buvo eliuuojami tiesiniu druskų gradientu nuo 0 iki 300 mM NaCl 20 mM bis-Tris, pH 6,0, buferyje. Srautas per kolonėlę buvo 0,5 ml/min., ir buvo frakcionuojama po 2 ml. Baltymų tirpalas, ištekančias iš mono-Q kolonėlės esant pH 6,0, buvo tuoj pat neutralizuotas, renkant į mėgintuvėlius, turinčius po 200 μ l 1,0 M Tris (pH 7,0). Frakcijos buvo testuojamos pagal alfa-amidinimo aktyvumą, ir aktyvumo pikas buvo pastebimas, eliuojant 160 mM NaCl (Fig.2). Aktyvumas buvo 161 mE/mg baltymo.

Mono-Q chromatografija, esant pH 8,0

Frakcijos su maksimaliu alfa-amidinančiu aktyvumu po mono-Q chromatografijos, esant pH 6,0, buvo dializuojamos du kartus keičiant po 4 litrus 5 mM Tris-HCl (pH 8,0). Fermentas buvo supiltas į Mono-Q HR 5/5 kolonėlę (Pharmacia), stabilizuotą 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Baltymai buvo eliuoti druskų gradientu 0-300 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Srautas buvo 0,5 ml/min., ir buvo frakcionuojama po 2 ml. Kiekviena frakcija buvo neutralizuojama, pridedant 200 μ l 1,0 M Tris, pH 7,0. Pastebėti du fermento aktyvumo maksimumai: eliuojant 190 mM NaCl ir 220 mM NaCl (Fig.3). Fermento aktyvumai buvo atitinkamai 80 mE/mg ir 400 mE/mg baltymo.

Aktyviausių fermento frakcijų iš Mono-Q (pH 8,0) chromatografijos gel-elektroforezė

Vienodos maksimumo frakcijos dalys (eliuotos 220 mM NaCl, aktyvumas 408 mE/mg baltymo) po šiluminės denatūracijos buferyje su SDS ir β -merkaptioetanoliu uždėtos ant 10 % SDS-poliakrilamidinio gelio. Stebima vienintelė juosta iš 220 mM NaCl frakcijos (Fig.4), ir šią juostą atitinkanti molekulinė masė yra 73000-75000 daltonų.

73000-75000 daltonų juostos, kaip alfa-amidnancio fermento, patvirtinimas

Išvalyto alfa-amidinančio fermento vienodos dalys buvo analizuotos elektroforeze nedenatūruojančiame 10 % akrilamidiniame gelyje. 50 μ l mėginiai buvo suleisti į vieną iš dviejų takelių. Po elektroforezės, baltymas iš vienos juostelės buvo eksponuotas nudažant sidabru. Iš kitos juostelės išpjautos 3 mm dydžio gabaliukai ir kiekvienas iš jų patalpintas į mikrotitravimo plokštelės lizdus. Į kiekvieną lizdą buvo pridėta po 100 μ l mišinio, kuriame yra dansil-substrato, katalazės, askorbino rūgšties ir 150 mM Tris, pH 7,0. Inkubacija buvo vykdoma 16 valandų 37 °C temperatūroje ir pastoviai kratant. Po to, patalpintos į kiekvieną lizdą dalys buvo analizuojamos pagal sugebėjimą paversti substratą į amidintą produktą. Fermentinis aktyvumas buvo aptiktas dviejose gelio išpjovose. Aktyviausias buvo tas, kuris atitiko stipriai nudažytą baltymą atitinkamoje gelio juostelėje (Fig.5).

2 pavyzdys

Rekombinantinio žmogaus kalcitonino gavimo metodikos

Žmogaus kalcitoninas - tai 32 aminorūgščių sekos hormonas, C-gale turintis amidintą prolino liekaną. Mikroorganizmas buvo gautas genų inžinerijos būdu, norint gauti rekombinantinį sulietą baltymą, turintį aminorūgščių seką, atitinkančią žmogaus kalcitoniną. Sulieto baltymo genas buvo parinktas tokiu būdu, kad žmogaus kalcitonino seka būtų apribota arginino liekana N-gale, o C-gale būtų glicino liekana, kuri užbaigtų rekombinantinį dirbtinį baltymą (Fig.7). Patalpinus žmogaus kalcitonino geną į plazmidę, mikroorganizmas buvo transformuotas šios plazmidės pagalba ir gauta geno ekspresija (Fig.6). Šis baltymas, turintis žmogaus kalcitoniną, buvo gautas iš rekombinantinių ląstelių lizatų nusodinant. Cisteino liekanos buvo paverstos S-sulfonatais, o lizino liekanos buvo grįžtamai blokuotos citrakonio anhidridu. Kadangi žmogaus kalcitoninas neturi arginino, tai rekombinantinį dirbtinį baltymą apdorojus tripsinu, gaunamas peptidas su žmogaus kalcitonino seka, kuri C-gale yra pailginta glicinu. Šis peptidas buvo išskirtas atvirkščių fazių HPLC arba jonų mainų chromatografijos būdu, o jo struktūra (Fig.7) nustatyta aminorūgščių analizės ir mikrosekų analizės metodais.

Peptido glicino liekana pašalinta ir priešpaskutinė prolino liekana pakeista į prolinamidą, panaudojant šio išradimo alfa-amidinantį fermentą. Šio peptido pusiau preparatyvinio alfa-amidinimo sąlygos buvo tokios: liofilizuotas peptidas (200-300 nanomolių) (substratas) buvo ištirpintas 200 μ l 150 mM Tris-HCl buferio (pH 7,0),

turinčio apie 750 μ E alfa-amidinančio fermento. Fermentas buvo gautas arba iš žiurkių karcinomos audinio arba iš žiurkių MTC ląstelių linijos SA-77. Fermentas buvo išvalytas iki proteolitinio aktyvumo pašalinimo. Tai buvo padaryta, naudojant jonų mainų chromatografiją ir išskyrimo chromatografiją (žr. aukščiau aprašytą metodiką). Švarus homogenizuotas fermentas nėra būtinas. Į šį mišinį pridėta askorbino rūgšties ir vario sulfato atitinkamai iki 3 mM ir 2 μ M. Gautas tirpalas sumaišytas ir inkubuotas 37 °C temperatūroje 5-6 val. Paprastai 70-90 % substrato virsdavo produktu. Pašalinus S-sulfonatinės grupės, rekombinantinis žmogaus kalcitoninas (rkCT) valomas atvirkščių fazių chromatografijos metodu (žr. Fig.9). Galutinis produktas buvo charakterizuotas jo sulaikymu atvirkščių fazių HPLC chromatografijoje (Fig.10), tripsininzacijos fragmentų kiekybiniu vaizdu (Fig.11), aminorūgščių analize (I lentelė) ir jo biologiniu aktyvumu (Fig.12). Visuose pavyzdžiuose rekombinantinis žmogaus kalcitoninas buvo identiškas sintetiniam žmogaus kalcitoninui.

Aukščiau pateikta medžiaga rodo, kad šio išradimo preparatai gali amidinti fiziologiškai tinkamus substratus, pvz., žmogaus kalcitoniną, gautą naudojant rekombinantinės DNR technologiją, t.y. turintį tik L-aminorūgštis.

PALYGINIMO EKSPERIMENTAI

Pateikiamo preparato aktyvumo palyginimas su žinomais preparatais

Bandymo sistemų pateikiamų preparatų santykiniam aktyvumui nustatyti palyginimas

Jau anksčiau buvo naudojamos kelios aktyvumo nustatymo sistemos. Daugelyje žinomų darbų buvo naudota metodika, paremta D-Tyr-Val-Gly pavertimu į D-Tyr-ValNH₂. Ši metodika yra kiekybinė, jei naudojamas žymėtas atomas (¹²⁵I-D-Tyr-Val-Gly), kuris sumaišomas su nežymėtos medžiagos pertekliumi (D-Tyr-Val-Gly). Išmatuotas žymėtos medžiagos pakeitimas leidžia ekstrapoliuoti į nežymėtą medžiagą ir taip išskaičiuoti aktyvumą

Nors pareiškėjai naudojo ir tokio tipo aktyvumo nustatymo metodiką, pateikiamų preparatų aktyvumo nustatymas paremtas tiesioginiu Dansil-Tyr-Val-Gly pavertimu į Dansil-Tyr-ValNH₂ matavimu.

Norint nustatyti ir palyginti žinomų preparatų ir pateikiamų preparatų santykinį aktyvumą, buvo atliktas metodikų palyginimo testas.

Eksperimentiniai protokolai buvo sugrupuoti taip:

I. Monodansil-L-Tyr-Val-Gly

Alfa-amidinantis fermentinis preparatas, gautas iš žiurkių skydliaukės karcinomos ir iš audinių kultūros terpės, surinktos iš CA-77 ląstelių, buvo naudojamas kaip fermento šaltinis. Naudojama pastovi fermento koncentracija, išskyrus kai kuriuos nurodytus atvejus.

Reakcijos mišinys, skirtas monodansilo pakaito pakeitimui, susidėjo iš:

5 μ l fermento,

5 μ l 30 mM askorbato,

5 μ l 20 μ M CuSO₄,

5 μ l 100 μ g/ml jaučio kepenų katalazės,

5 μ l tirpalo, turinčio 2 nanomolius substrato,

25 μ l 150 mM TES, pH 7,0.

Buvo paruošti du bandiniai ir inkubuoti 37 °C temperatūroje 10, 20 ir 30 min. Fermentinė reakcija nutraukiama, pridedant 10 μ l 500 mM EDTA. Substratas atskiriamas nuo produkto atvirkščių fazių RP HPLC chromatografijos metodu, naudojant skysčių chromatografijos įrangą (Hewlett Packard-1090), o kiekybiniai rodikliai buvo gauti, naudojant integratorių HP-3392. Monodansil-L-Tyr-Val-Gly virsmo į alfa-amidintą produktą priklausomybė nuo laiko buvo tiesinė.

II. ¹²⁵I D-Tyr-Val-Gly

D-Tyr-Val-Gly ir D-Tyr-ValNH₂ buvo pažymimi jodu, naudojant Pierce Chemical Company firmos jodo preparatą. Gauti junginiai buvo panaudoti jonų mainų kolonėlės su sulfopropilu kalibracijai. ¹²⁵I D-Tyr-Val-Gly buvo pridėtas prie 650 μ M D-Tyr-Val-Gly, ir naudotas kaip substratas. Reakcijos mišinys monodansilo substratui pakeisti susidėjo iš:

5 μ l fermento,

5 μ l 30 mM askorbato (30 mM),

5 μ l 20 μ M CuSO₄,

5 μ l 100 μ g/ml katalazės,

5 μ l substrato, 600 μ M koncentracija,

25 μ l 150 mM TES, pH 7,0.

Bandiniai buvo inkubuoti 37 °C temperatūroje 10, 20 ir 30 min. Fermentinė reakcija buvo nutraukiama, pridedant 500 mM EDTA. Bandinys buvo praskiestas 10 mM

natrio fosfato buferiu (pH 5,2) ir patalpintas į sulfopropilo katijonitinę kolonėlę. Substratas neprisijungdavo prie kolonėlės; amidintas produktas buvo eliuuojamas 500 mM NaCl. Žymėto substrato amidinimo priklausomybė nuo laiko buvo tiesiška.

III. D-Tyr-Val-Gly

Reakcijos sąlygos, naudojamos D-Tyr-Val-Gly amidinimui, yra identiškos kaip ir dansilinio bei žymėto jodu substratų atveju. Substratų koncentracija reakcijos mišinyje buvo 650 μ M. Substratas atskiriamas nuo produkto, naudojant gradientinį eliuavimą atvirkščių fazių RP-HPLC chromatografijos būdu, naudojant skysčių chromatografijos įrangą HP-1090. Ištekantis iš kolonėlės skystis buvo kontroliuojamas pagal absorbciją ties 280 nm. Šio tyrimo jautrumas yra daug mažesnis negu tiriant dansilinius ar jodintus substratus. Norint pasiekti tokį patį jautrumą, alfa-amidinimo reakcija buvo vykdoma ilgesnį laiką ir/arba padidinamas alfa-amidinančio fermento kiekis.

Frakcijų analizės duomenys, paverčiant 125 I-D-Tyr-Val-Gly į 125 I-D-Tyr-ValNH₂ ir Dansil-Tyr-Val Gly į Dansil-Tyr-ValNH₂, rodo, kad bet koku laiko momentu jodinto substrato buvo paversta maždaug 1,55 karto daugiau, negu dansilinio substrato. Taigi, lyginant ankstesnių tyrimų sistemas su žinoma pareiškėjų naudojama sistema, nustatant aktyvumą pagal dansilinio substrato metodiką, turi būti taikomas koeficientas 1,5.

Be to, buvo panaudota griežtesnė kinetinė analizė, siekiant sulyginoti tyrimus su Dansil-Tyr-Val-Gly (pareiškėjų) ir D-Tyr-Val-Gly (žinomas anksčiau) substratais:

Substratas	K_m	V_{max}
D-Tyr-Val-Gly	37	31
Dansil-Tyr-Val-Gly	1,7	21

Galima matyti, kad lyginant dviejų substratų maksimalų greitį (V_{max} = produkto pmol/min/ μ l), D-Tyr-Val-Gly (žinomas anksčiau) yra maždaug 1,48 Dansil-Tyr-Val-Gly (pareiškėjų) aktyvumo. Tai patvirtina ir atitinka anksčiau pateiktus duomenis.

Aktyvumo palyginimas

Eipper et al. (PNAS) psl.5147, fig.4. duoda V_{max} = 39 pmol/ μ g/val. Tai atitinka santykinį aktyvumą 0,65 mE/mg baltymo per minutę. Tai didžiausias aprašytas aktyvumas. Padalinus šį dydį iš minėto koeficiento 1,5, gausime santykinį aktyvumą 0,4 mE/mg baltymo per minutę. Šį gautą dydį galima sulyginoti su aukščiau minėtu pareiškėjų gautu aktyvumu. Aukščiau buvo minėta, kad pareiškėjai pasiekė mažiausiai 25 mE/mg baltymo ir

daugiau kaip 1500 mE/mg baltymo. Taigi pareiškėjai gavo 60-3750 kartų didesnį aktyvumą, negu Eipper (PNAS) minimas aktyvumas.

3 pavyzdys

Alfa-amidinančių fermentų, gautų iš žiurkės skydliaukės karcinomos, išvalymas ir tyrimas

Užšaldytą žiurkės skydliaukės karcinomos audinį susmulkindavo į mažyčius gabaliukus ir homogenizuodavo vandeniniame buferyje, naudodami Polytron homogenizatorių. Nucentrifugavus, nupilamas supernatantas, o nuosėdos vėl ekstrahuojamos nauju buferiu. Antrasis homogenatas buvo centrifuguojamas ir šis supernatantas sumaišomas su pirmuoju. Mišinys buvo centrifuguojamas dideliu greičiu, ir gautas supernatantas naudojamas kaip pradinė medžiaga išvalytam fermentui gauti.

Frakcionuojama amonio sulfatu. Nustatyta, kad esant 26-40 % amonio sulfato, nusėda didelė dalis aktyvaus fermento, ir tokios nuosėdos buvo vėl valomos pagal aukščiau aprašytą metodiką.

Išskyrimo chromatografija buvo atliekama Sephacryl S-300 kolonėlėje. Čia pateiktame 1 pavyzdyje visas iš kolonėlės eliuotas fermentas turėjo vieną aktyvumo maksimumą. Šiame pavyzdyje kolonėlė buvo pailginta, o pratekantis srauto greitis sumažintas. Šiose naujose eliuavimo sąlygose, kaip ir 1 pavyzdyje, stebimas pagrindinis aktyvumo maksimumas, o po jo buvo nedidelis šalutinis pikas, kuris gali atitikti fermentą su mažesne molekuline mase. Neaišku, ar egzistuoja fermentas su mažesne molekuline mase *in vivo*, ar jis susidaro dėl dalinio proteolitinio suskaldymo ekstrahavimo ir valymo metu.

Pagrindinis aktyvumo pikas iš S-300 kolonėlės buvo chromatografuotas Mono-Q kolonėlėje, esant pH 6,0. Šiame pavyzdyje buvo panaudota didesnė kolonėlė negu 1 pavyzdyje (Mono-Q HR 10/10) ir eliuuojama naudojant lėkštesnį druskų gradientą. Šiuose matavimuose buvo rasti keturi alfa-amidinančio fermento pikai, eliuuojant su NaCl 160 mM, 200 mM, 220 mM ir 240 mM (atitinkamai I, II, III ir IV pikai, Fig.13). Tai rodo, kad egzistuoja daug fermento formų, ir kad šios formos pasižymi nevienodu krūviu. Atskirų pikų baltymų analizė poliakrilamidiniame gelyje parodė, kad II, III ir IV pikų alfa-amidinantys fermentai turi maždaug tą pačią molekulinę masę (73000-75000 daltonų), o I

aktyvumo pikas atitinka fermentą su kitokia, tikriausiai mažesne, molekuline mase. III piko fermentas buvo paverstas į vienalytę medžiagą tokiu būdu:

III piko fermentas buvo surinktas ir chromatografuotas Mono-Q HR kolonėlėje 10/10, esant pH 8,0 (Fig.14). Iš šios kolonėlės fermentas eliuotas kaip vienas pikas, esant 250 mM NaCl, ir analizė gelyje parodė, kad šis fermentas yra vienalytis (Fig.15a, 6 juostelė). Tolimesni eksperimentai atlikti su išvalytu III piko fermentu.

1. III piko fermento molekulinė masė, nustatyta analizuojant 7 % poliakrilamido gelyje, yra apie 75000 daltonų (Fig.15b).

2. Optimalus fermento aktyvumo pH yra 5,0-5,5, naudojant N-dansil-Tyr-Val-Gly kaip substratą (Fig.16), bet kadangi fermentas pastovesnis neutraliame pH, amidinimo reakcijas galima vykdyti ir tokiomis sąlygomis.

3. Nustatyta, kad vario jonų, reikalingų kaip kofaktoriaus fermento aktyvumui pasiekti, kiekis yra atvirkščiai proporcingas fermento švarumui. Norint pasiekti maksimalų gerai išvalyto fermento aktyvumą, reikėjo 0,1 μM ar mažiau Cu^{2+} jonų, tuo tarpu kai pradinių preparatų atveju - 2 μM .

3. Fermento izoelektrinis taškas (pI) yra 4,8.

5. Santykinis homogeninio fermento aktyvumas buvo 2100 mE/mg baltymo.

II piko fermentas taip pat buvo išvalytas iki homogeninio stovio. Pasirodė, kad norint gauti šį homogeninį fermentą, nepakanka Mono-Q chromatografijos esant pH 8,0. Todėl, perleidus per Mono-Q (pH 6,0) kolonėlę, II piko (Fig.13) fermentas buvo dializuotas 1M Tris pH 7,0 ir suleistas į kolonėlę su fenilsefaroze, buferinta tuo pačiu buferiu. Didžioji dalis pašalinių baltymų pašalinama šioje kolonėlėje, o amidinantis fermentas, gautas paskutinėje stadijoje, buvo gana švarus. Išvalius surinktą fermentą Mono-Q HR 10/10 (pH 8,0) kolonėlėje, gautas homogeninis II piko fermento preparatas, eliuuojamas iš kolonėlės, esant 220 mM arba daugiau NaCl.

II piko fermento tyrimai parodė, kad:

1. II piko fermento molekulinė masė, nustatyta analizuojant 7 % poliakrilamido gelyje, yra apie 73000-75000 daltonų. Taigi, pagal molekulinės masės II ir III pikų fermentai yra vienodi.

2. Optimalus fermento aktyvumo pH yra 5,0-5,5, t.y. sutampa su analogiška III piko fermento charakteristika.

3. Fermento izoelektrinis taškas (pI) yra 5,8.

4 pavyzdys

Alfa-amidinančio fermento, gauto iš ląstelių CA-77 kultūros, išvalymas ir tyrimas

Žiurkės MTC ląstelių CA-77 kultūra buvo išauginta kaip monosluoksninė kultūra 150 cm² T-kolbose (Corning), esant 8 % CO₂. Kultūra laikoma terpėje iš Dulbecco Modified Eagle Medium:F-10 (1:1), 3,7 g/l NaHCO₃, 5 µg/ml transferino, 10 µg/ml insulino, 30 nM seleno, 4 µg/ml gentamicino sulfato. Taip išaugintas kultūras buvo galima laikyti ilgą laiką, keičiant terpę kas 48 valandas. Norint gauti didesnę ląstelių išėigą, ląstelės buvo augintos terpėje su kraujo serumu (5 % arklio ir 2,5 % veršelio fetalinio serumo) tris dienas. Po to, ląstelės buvo perplautos fiziologiniu tirpalu su fosfatiniu buferiu ir užpilamos minėta terpe..

Audinio kultūros terpė buvo pagaminta aseptinėmis sąlygomis ir laikoma -20 °C. Ji praskiedžiama 2 litrais dejonizuoto vandens (3:1) ir 50 ml/min greičiu paduodama į silpnų anijonų mainų kolonėlę DEAE (Cuno 250), kuri buvo buferinta 1,0 litru 20 mM bis-Tris-HCl (pH 6,0) 4 °C temperatūroje. Alfa-amidinantis fermentas ("alfa-AE") eliuuojamas iš kolonėlės laipsnišku būdu 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) su 500 mM NaCl tirpalu 50 ml/min. greičiu. Frakcijos, pasižyminčios alfa-AE aktyvumu (santykinis aktyvumas - 10-15 mE/mg), surenkamos ir koncentruojamos sumažintame slėgyje kol tūris sumažėja 4-5 kartus, naudojant preparatyvinį rotorių Savant RH-100.

Ši medžiaga tiesiogiai leidžiama į 5x50 cm Sephacryl 300-SF (Pharmacia) kolonėlę. Mobili fazė buvo 100 mM Tris-HCl (pH 7,0), srauto greitis - 1,0 ml/min. Chromatografuojama 4 °C temperatūroje (Fig.17).

Šioje išvalymo stadijoje fermentas nerodo proteolitinio aktyvumo, o jo alfa-amidinantis aktyvumas yra mažiausiai 50 mE/mg baltymo. Šios stadijos fermentinis preparatas buvo sėkmingai panaudotas glicinu pailgintų žmogaus rekombinantinio kalcitonino ir augimo hormono atlaisvinimo faktoriaus amidinimui. Pradedant nuo ląstelių tankio 1-1,5 x 10⁶ ląstelių/ml (iš T-kolbų), paprastai buvo gaunama 200-350 mE fermento aktyvumo 1 sunaudotos litrai terpės, kuri praeidavo šiuos du valymo etapus. Fermentas yra stabilus ir tinkamas naudoti tirpale, arba, jį imobilizavus, ant kieto pagrindo.

Kolonėlės frakcijos, turinčios aktyvų alfa-AE, buvo surinktos ir dializuotos 6 litruose 20 mM bis-Tris-HCl (pH 6,0). Fermentas buvo suleistas į stiprių anijonų mainų Mono-Q HR 10/10 kolonėlę (Pharmacia), kuri prieš tai buvo išlyginta 20mM bis-Tris-HCl, pH 6,0. Po to, iš šios kolonėlės eliuuojamas fermentas, naudojant tiesinį 0-300 mM NaCl gradientą per tris valandas, esant 2,5 ml/min. srautui. Šiuose valymo etapuose buvo išskirti keturi chromatografiškai skirtingi alfa-amidinantys fermentai. Maksimaliai sunumeruoti pagal eliuavimo eilę (Fig.13). III ir IV pikai priklauso fermento formoms su didele molekuline mase ir atitinka fermento, gauto iš žiurkių skydliaukės karcinomos, II ir III pikus. I ir II pikai priklauso mažesnės molekulinės masės fermento formoms, kurios gali susidaryti dėl proteolitinio aktyvumo.

Keturios mūsų laboratorijoje identifikuotos alfa-amidinančio fermento formos skiriasi paviršiaus krūviu, ką rodo jų skirtingas sulaikymo laikas chromatografijos metu (Fig.18). Optimali pH reikšmė šioms formoms taip pat skirtinga. Fig.19 pateikti rezultatai rodo, kad III ir IV pikai turi tą patį pH optimumą tarp 5,0 ir 5,5. Šie rezultatai atitinka pH, nustatytą II ir III pikų fermentams, gautiems iš žiurkės skydliaukės karcinomos. I ir II pikai turi platesnį pH diapazoną - nuo 5 iki 8,5 (Fig.19). Šie rezultatai atitinka Eipper et al, "Peptides", vol.4, p.921-928, 1983 bei Murthy et al, J. Biol. Chem., 261, 1815-1822 (1986) nurodytą pH optimumo reikšmę.

Pažymėjus Na^{125}I izotopais II ir IV pikų fermentus ir po to atlikus jų SDS-PAGE, gauta, kad IV aktyvumo piko fermentas turi molekulinę masę 73-75 kDal, o II piko - mažesnę už 55 kDal. Tiksliai II piko molekulinė masė nežinoma, nes jis nebuvo išvalytas iki homogeninės būsenos (45-55 kDal diapazone yra keletas baltymų juostelių).

III ir IV pikų fermentai buvo išvalyti iki homogeninės būsenos, naudojant hidrofobinę chromatografiją ir stiprią anijonų mainų chromatografiją, esant pH 8,0. IV piko (Fig.18) fermentas surinktas, koncentruotas vakuume iki 2 ml ir tuoj pat suleistas į 1,3x8 cm kolonėlę su fenilsefaroze (Pharmacia), buferinta 500 mM Tris-HCl, pH 7,0. Frakcijos, rodančios alfa-amidinantį aktyvumą, eliuuotos 0,5 ml/min. buferio srautu (Fig.20). Surinktos aktyvumą turinčių pikų frakcijos, dializuotos 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), po to jos suleistos į Mono-Q HR 10/10 kolonėlę, subalansuotą 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Fermentas buvo eliuuotas iš kolonėlės, naudojant 0-300 mM NaCl tiesinį gradientą 3 valandas 2,0 ml/min. greičiu (Fig. 21). Alfa-amidinančiu aktyvumu pasižyminčios frakcijos

buvo eliuuotos, esant 240 mM NaCl ir daugiau, surinktos, nustatoma 0,001 % (pagal tūrį) koncentracija Tritone X-100 ir laikomos 4 °C temperatūroje. Pagal matavimų duomenis santykinis išvalyto fermento aktyvumas buvo apie 1500 mE/mg baltymo, esant pH 7,0. III piko alfa-amidinančio aktyvumo fermentas buvo išvalytas iki homogeninės būsenos taip pat kaip ir IV piko fermentas.

Auglio piko (3 pavyzdys) ir audinių kultūros IV piko (4 pavyzdys) fermentų fizikocheminiai tyrimai, lyginant molekulinės masės (73-75 kDal), pH optimumus (5,0-5,5), aminorūgščių sekas ir eliuavimo eigą (stiprioje anijonų mainų chromatografijoje, pH 8,0, eliuavimas vyksta esant daugiau nei 240 mM NaCl) rodo, kad šie du pikai gali atitikti vieną ir tą patį fermentą.

5 pavyzdys

Biologiškai svarbių peptidinių hormonų alfa-amidinimas, naudojant alfa-amidinantį fermentą

Buvo gauta ir sėkmingai alfa-amidinta, naudojant šio išradimo alfa-amidinantį fermentą, keletas rekombinantinių peptidinių hormonų substratų, įskaitant lašišos ir žmogaus kalcitoninus, žmogaus augimo hormono atpalaidavimo faktorių ir žmogaus kalcitonino giminingą genui peptidą. Kaip iliustraciją galima pateikti rekombinantinio lašišos ir žmogaus kalcitoninų bei žmogaus augimo hormono atpalaidavimo faktoriaus gavimą. Tie patys gavimo principai gali būti panaudoti ir kitiems rekombinantiniams peptidams.

Lašišos kalcitoninas yra 32 aminorūgščių sekos peptidas, kurio C-gale yra alfa-amidinta prolino liekana. Siekiant gauti dirbtinį rekombinantinį baltymą, kuris turėtų aminorūgščių seką, atitinkančią lašišos kalcitoninui, genų inžinerijos būdu buvo sukurtas mikroorganizmas. Dirbtinio baltymo genas buvo sukonstruotas taip, kad lašišos kalcitonino seka būtų apribota iš N-galo metionino liekana, o C-gale būtų glicino liekana, kuria baigusi dirbtinis rekombinantinis baltymas. Įjungus kalcitonino geną į plazmidę, mikroorganizmo genas buvo transformuotas šia plazmide ir vyko dirbtinio baltymo ekspresija. Šis kalcitoniną turintis baltymas buvo išskirtas iš rekombinantinių mikroorganizmų lizato, jį nusodinant, o cisteino liekanos buvo paverstos S-sulfonatais. Kadangi lašišos kalcitoninas neturi metionino, skaldant bromcianu, buvo galima gauti

peptidą, turintį lašišos kalcitonino seką, kurios C-gale yra glicinas. Šis peptidas buvo išskirtas atvirkščios fazės aukšto slėgio skysčių (RF-HPLC) arba jonų mainų chromatografijos būdu, o jo struktūra buvo nustatyta analizuojant aminorūgščių sudėtį ir seką.

Priešpaskutinė prolino liekana buvo paversta į prolinamidą, veikiant alfa-amidinančiu fermentu. Šio alfa-amidinančio fermento reakcijos sąlygos buvo tokios: liofilizuotas peptidinis substratas (lašišos kalcitonino pirmtakas, C-gale turintis gliciną, 200-300 nanomolių) buvo ištirpintas 200 μ l 150 mM Tris-HCl buferio, pH 7,0, kuriame buvo 750 μ E alfa-amidinančio fermento. Fermentas buvo gautas iš žiurkių skydliaukės karcinomos auglio arba ląstelių linijos CA-77. Jis turi būti išvalytas taip, kad neturėtų proteolitinio aktyvumo. To galima pasiekti, panaudojus išstūmimo ir jonų mainų chromatografijas (žr. 4 pavyzdį). Švarus vienalytis fermentas nėra būtinas. Į šį mišinį buvo pridėta askorbino rūgšties ir vario sulfato, kad jų koncentracijos mišinyje būtų atitinkamai 3 mM ir 2 μ M. Norint padidinti kalcitonino išeigą, į mišinį galima pridėti katalazės (7,5 μ g/ml), etanolio (1 % pagal tūrį) ir kalio jodido (50 mM). Gautas mišinys sumaišomas ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje 5-6 valandas.

Pašalinus S-sulfonatines grupes veikiant β -merkptoetanoliu, lašišos kalcitonino rekombinantą išvalomas aukšto slėgio skysčių su atvirkščiomis fazėmis chromatografijos būdu. Galutinis produktas charakterizuojamas jo sulaikymu atvirkščių fazių HPLC chromatografijoje, skaidymo tripsinu produktų kiekybiniu pasiskirstymu ir aminorūgščių analize. Visuose pavyzdžiuose rekombinantinis lašišos kalcitoninas buvo identiškas sintetiniam lašišos kalcitoninui.

Žmogaus kalcitoninas yra 37 aminorūgščių sekos ilgio hormonas, C-gale turintis alfa-amidintą fenilalanino liekaną. Buvo sukonstruotas dirbtinio baltymo genas analogiškai lašišos genui, kuris apribotas metionino liekana N-gale ir glicino liekana C-gale, kuria ir baigiasi rekombinantinis dirbtinis baltymas. Išskyrimas, išvalymas, alfa-amidinimas ir tyrimas buvo tokie patys, kaip ir lašišos kalcitonino rekombinanto atveju.

Žmogaus augimo hormono atpalaidavimo faktorius (hGHRF) - tai 44 narių peptidinis hormonas, kurio C-gale yra alfa-amidinta leucino liekana. Dirbtinio baltymo hGHRF genas buvo sukonstruotas taip, kad peptidinio hormono aminorūgščių seka buvo apribota triptofano liekana N-gale ir glicino liekana - C-gale, kuria ir baigiasi dirbtinis

baltymas.. hGHRF turintis dirbtinis baltymas buvo išskirtas iš ląstelių lizato nusodinant. Neturinti hGHRF baltymo dalis buvo denatūruota, paverčiant cisteino liekanas į S-sulfonato darinius. Kadangi hGHRF neturi triptofano, paveikus baltymą BNPS-skatolu, įvyksta oksidacinio skaldymo reakcija, ir gaunamas neamidintas hGHRF, pailgintas glicinu C-gale. Tuo pačiu metu oksidinama 27 padėtis metionino liekana į metionino sulfoksidą. Šis pailgintas glicinu peptidas išskirtas, panaudojant gel-filtracinės ir atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodus. Jo struktūra nustatyta, naudojant peptidų fragmentų, gautų skaldant tripsinu, aminorūgščių analizės metoda.

Priešpaskutinė leucino liekana buvo paversta į leucino amidą, paveikus alfa-amidinančiu fermentu pagal išradimą. Alfa-amidinto hGHRF gavimo sąlygos yra tokios: Liofilizuotas peptidinis substratas (20-40 nanomolių) buvo ištirpintas 150 μ l dejonizuoto vandens ir sumaišytas su 90 μ l (500 μ E) (pH 7,0) alfa-amidinančio fermento preparato, išskirto arba iš žiurkės MTC auglio arba C-77 ląstelių linijos terpės. Fermentas valytas tol, kol neliko proteolitinio aktyvumo; tai galima pasiekti, naudojant ištūmimo ir jonų mainų chromatografiją. Į mišinį pridedama askorbino rūgšties ir vario sulfato, kad jų koncentracijos būtų atitinkamai 3 mM ir 2 μ M. Gautas tirpalas sumaišytas ir inkubuotas 37 $^{\circ}$ C temperatūroje 4-6 valandas. Paprastai 95 % substrato virsdavo produktu (pagal tripsinu suskaidytos medžiagos aminorūgščių analizės duomenis). Metionino sulfoksidinė liekana buvo redukuota iki metionino, naudojant 4 M beta-merkaptioetanolio tirpalą buferyje (pH 4,0) iš 10 mM natrio acetato, 80 $^{\circ}$ C temperatūroje 1 valandą. Galutinis produktas buvo išvalytas aukšto slėgio chromatografijos su atvirkščiomis fazėmis būdu ir identifikuotas pagal skaidymo tripsinu produktų kiekybinį pasiskirstymą ir aminorūgščių analizę. Taip pat buvo patikrintas jo biologinis aktyvumas. Visuose pavyzdžiuose rekombinantinis hGHRF buvo identiškas sintetiniam hGHRF.

Be aukščiau aprašytų tyrimų, buvo įvertinti du pramoniniu būdu gaminami pailginti glicinu peptidiniai hormonai pagal jų galimybę būti substratu alfa-amidinančiam fermentui. Šios medžiagos buvo alfa-melanocitą stimuliuojančio hormono ir P-medžiagos pirmtakai. Abiem atvejais pasirodė, kad šie preparatai yra tinkami substratai alfa-amidinančiam fermentui.

Išvalyto alfa-amidinančio fermento sekų analizė

Frakcijos, turinčios alfa-amidinantį fermentą, buvo surinktos arba iš žiurkių skydliaukės karcinomos audinio, arba iš ląstelių kultūros CA-77 supernatantų, redukuotos fermento sulfhidrilinės grupės, o po to karboksimetilinta. Gautas reakcijos mišinys sulcistas į Vydac C4 atvirkščių fazių skysčių chromatografijos kolonėlę (dalelių dydis 5 μm , porų dydis 33 nm), kuri buvo subalansuota 0,4 % trifluoracto rūgšties tirpalu. Buferio druskoms pašalinti kolonėlė plaunama šiuo tirpalu. Nudruskintas fermentas eliuuojamas iš kolonėlės 80 % acetonitrilu, turinčiu 0,08 % trifluoracto rūgšties. Iš kolonėlės ištekančio srautas kontroliuojamas, matuojant absorbciją ties 220 nm. Gautos baltymų frakcijos surinktos, sumaišytos ir liofilizuotos. Po to ši medžiaga tirpinama 100 μl 0,1 % SDS ir patalpinta į baltymų sekų analizės įrenginį (Applied Biosystems, Model 470 A). Atliekamos operacijos buvo tokios, kokios nurodytos Applied Biosystems instrukcijoje. Gauti aminorūgščių feniltiohidantoino dariniai analizuoti skysčių chromatografijos būdu, naudojant Hypersil C18 kolonėlę (dalelių dydis 5 μm , porų dydis 10 nm). Naudojamas Helwett Packard 1090 skysčių chromatografas, ir matuojama absorbcija ties 269 ir 313 nm. Pagrindinio fermentą turinčio piko (III piko) iš auglio audinio N-galo seka buvo tokia:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
NH ₂ -Ser-Phe-Ser-Asn-Glu-Cys-Leu-Gly-Thr-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Pro-Leu-Asp-Ala-Ser-																		
20	21	22	23	24	25	26	27	28										
-Asp-Phe-Ala-Leu-Asp-Ile-Arg-Met-Pro																		

Fermento, gauto iš ląstelių kultūros CA-77 (IV piko) N-galo aminorūgščių seka yra identiška fermento, gauto iš auglio audinio (III piko) aminorūgščių sekai. Tačiau analizuojant šio fermento seką, buvo rasta nedidelė papildoma komponentė, kuri, matyt, yra šio fermento sekos N-galo tęsinys. Ji galėjo atsirasti potransliacinio apdorojimo metu. Šios komponentės seka yra tokia:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NH ₂ -Phe-Lys-Gly-Thr-Thr-Arg-Ser-Phe-Ser-Asn-Gly-Cys-Leu-Gly-													

Papildomi duomenys apie alfa-amidinančio fermento, išskirto iš žiurkių skydliaukės karcinomos, aminorūgščių seką, gauti atliekant tokias operacijas: Maždaug 400 μg išvalyto fermento buvo redukuota ir karboksimetilinta. Po to 18 valandų vykdoma šio tirpalo ekstruzinė dializė, naudojant 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) ir 0,5 mM karbamido. Liekana buvo patalpinta į 1,5 ml talpos centrifugos mėgintuvėlį ir koncentruojama iki 600 μl

sumažintame slėgyje. Į fermento tirpalą pridėjama 2 μ l (2 μ g) tripsino, ir mišinys buvo inkubuojamas 1 valandą 37 °C temperatūroje. Tada pridėjama antra tripsino porcija (2 μ g) ir inkubuojama 37 °C temperatūroje dar 2 valandas. Reakcija nutraukiama, pridėjant 200 μ l 4 M karbamido/10 % acto rūgštyje. Gautas produktas skirstomas Vydac C18 skysčių chromatografijos kolonėlėje (dalelių dydis 5 μ m, porų dydis 33 nm), kuri buvo stabilizuota 0,1 % trifluoracto rūgšties tirpalu. Kolonėlė buvo eliuuojama tiesiniu acetonitrilo gradientu iki 50 % koncentracijos 4 valandas; frakcijos renkamos kas 2 min. Fermento, suskaldyto tripsinu, eliuavimo pikai skysčių chromatografijoje su atvirkščiomis fazėmis parodyti Fig.23. Nustatytos trijų gautų peptidų aminorūgščių sekos. Rezultatai parodyti žemiau (peptidai pažymėti pagal frakcijos numerį).

Peptidas Nr.65: Ser-Met-Gln-Pro-Gly-Ser-Asp-Gln-Asn-His-Phe-Ser-Gln-Pro-Thr

Peptidas Nr.58: Asn-Gly-Gln-Trp-Thr-Leu-Ile-Gly-Arg

Peptidas Nr.86: Phe-Val-Thr-Gln-Trp-Gly-Glu.

7 pavyzdys

Alfa-amidinančio fermento geno arba DNR sekos, koduojančios žiurkės MTC arba CA-77 alfa-amidinantį fermentą, molekulinis klonavimas

Norint klonuoti geną arba koduojančią alfa-amidinantį fermentą DNR seką, reikia turėti atitinkamą informaciją ir reagentus. Reikia surasti patikimą fermentinio baltymo šaltinį, kuris savo ruožtu bus fermento signalinės RNR (mRNR) šaltiniu ir galų gale komplementarios DNR (kDNR) šaltiniu. Fermento geno arba kDNR išskyrimas reikalauja molekulinio zondo, specifiško duotam fermentui. Paprastai jis gali būti arba oligonukleotidas, kurio seka yra komplementari daliai fermento geno, arba antikūno molekulė (arba antikūno molekulių kolekcija), kuri specifiskai atpažįsta fermento baltymą. Tokiems molekuliniais zondams gauti reikia tokios fermento išvalymo metodikos, kad būtų galima gauti specifinius fermentui antikūnus, arba būtų nustatyta fermento aminorūgščių seka, kad būtų galima konstruoti oligonukleotidinius zondus. Tokia metodika buvo surasta šio išradimo alfa-amidinančiam fermentui.

Alfa-amidinantis fermentas buvo išskirtas iš žiurkės skydliaukės karcinomos auglio audinio arba iš ląstelių CA-77 kultūros. Buvo priimta, kad šios ląstelės turi koduojančią

fermento baltymą mRNR. Metodai, pagal kuriuos buvo gauta kDNR alfa-amidinančiam fermentui, yra gerai žinomi molekulinėje biologijoje.

Šių metodų aprašymai gali būti rasti laboratoriniuose žinyuose, pvz., "Molecular Cloning" (1982), "DNR Cloning" vol.I a Practical Approach (1985), arba pirminiuose literatūros šaltiniuose, pvz., Gubler V., Hoffman B.J., Gene, 25, 262-269 (1983) arba Young R.A., Davis R.W., PNAS, 80, 1194-1198 (1983). Minėtos metodikos yra bendros, jas taikant reikia atsižvelgti į naudojamos mRNR šaltinį. Specifinės amidinančio fermento kDNR gavimui mes panaudojome žiurkės skydliaukės karcinomos ir ląstelių linijos CA-77 mRNR. Dvigrandės kDNR pavyzdžiai, kurie buvo sintezuoti, buvo savo ruožtu panaudoti atskirų genų kolekcijos sukūrimui pagal žinomas metodikas.

Kaip aprašyta aukščiau, tam tikrų kDNR alfa-amidinančiam fermentui identifikacija reikalauja molekulinį zondų, kuriais galima atskirti tuos rekombinantus nuo kitų rekombinantų. 3 ir 4 pavyzdžiuose duotos metodikos, naudojamos fermento, reikalingo molekulinį zondų sukūrimui, išvalymui. 6 pavyzdyje aprašytas šio baltymo panaudojimas, nustatant aminorūgščių sekas, o 8 pavyzdyje aprašoma išvalyto baltymo panaudojimas, gaminant specifinius fermentui antikūnus.

Aminorūgščių sekos, duotos 6 pavyzdyje, yra specifinės sudarant selektyvias oligonukleotidų sekas. Gaminant oligonukleotidinius zondus, yra svarbu atsižvelgti į keletą faktorių. Pilną šios problemos išaiškinimą galima rasti Lathe R.J., J.Mol. Biol., 183, 1-12 (1985). Kadangi tą pačią aminorūgščių seką gali koduoti daugiau kaip viena nukleotidų seka (genetinio kodo išsigimimo principas), bet kuri atskira nukleotidų seka įeis į potencialių nukleotidinių sekų aibę. Norint užsitikrinti, kad nukleotidinis zondas identifikuos dominantį geną, galima pagaminti visų galimų sekų, kurios gali koduoti specifinę amidinančio fermento aminorūgščių seką, ekvimolinį mišinį. Tokių mišinių sudėtingumas daro juos mažiau selektyviais, ir reikia naudoti oligonukleotidų mišinius daugiau negu vienai aminorūgščių sekos sričiai, kad būtų gaunamas absoliutus selektyvumas duotam genui.

Iš kitos pusės, oligonukleotidas, selektyvus dominantiam genui, gali būti gautas pagaminant unikalią pakankamo ilgio nukleotidų seką, kuri sudaro stabilų hibridą. Tikimybė, kad ši seka sudarys stabilų hibridą su kitomis genų sekomis, yra labai maža (priklauso nuo ilgio). Unikali seka yra sudaryta iš labiausiai naudojamo aminorūgščių

sekos kodono. Kodono naudojimo dažnis gali būti nustatytas iš žinomų genetinių sekų ir atitinkamų aminorūgščių sekų kompiliacijos. Tai yra gerai žinoma molekulinės biologijos specialistams.

Dar vienas būdas, kuris gali būti panaudotas gaminant specifinius oligonukleotidinius zondus, yra deoksiinozino liekanų įjungimas į oligonukleotidus maksimalios degeneracijos padėtyse. Šis nukleotidinis pakeitimas tarnauja zondo degeneracijos sumažinimui, ir tokiu būdu gali teigiamai veikti selekcijos procesą. (Apie deoksiinozino panaudojimą oligonukleotidiniuose zonuose žr. Ohtsuka et al, J. Biol. Chem., 260, 2605-2608 (1985)).

Mes naudojome alfa-amidinančio fermento sekas įvairių oligonukleotidinių zondų projektavimui, kurie yra reikalingi amidinančio fermento kDNR išskyrimui. Naudotos sekos ir paruošti zondai parodyti II lentelėje. Reikia pažymėti, kad molekulinės biologijos specialistas gali panaudoti ir alternatyvias genų išskyrimo strategijas.

Tokiu būdu pagaminti oligonukleotidiniai zondai buvo panaudoti gerai žinomais metodais (žr. "Molecular Cloning", 1982) plazmidžių ir bakteriofagų kDNR klonavimui ir alfa-amidinančio fermento kDNR išskyrimui.

II lentelė

N-galo sekos														
AA#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
seka:	Ser	Phe	Ser	Asn	Glu	Cys	Leu	Gly	Thr	Ile	Gly	Pro	Val	Thr
Suprojek-	5' TCC	TTC	TCC	AAT	GAG	TGC	CTG	GGC	ACC	ATT	GGC	CCT	GTG	ACC
tuoto geno	AGT	T	AGT	C	A	T	T	T	A	T	C	A	A	C
sekos	A		A					A	G	A	A	G	C	T
	G		G					C	T	G		T	G	A
Oligo-zondas														
AE1			3'	TTA	CTC	ACG	GAC	CCG	TGG	TAA	CCG	GGA	CAC	TGG
												T	G	
Oligo-zondas														
AE8							3'	AC	CCG	TGG	TAA	CCG	GGA	CAC
								I	I	I	I	I	I	I
AA#	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
seka:	Pro	Leu	Asp	Ala	Ser	Asp	Phe	Ala	Leu	Asp	Ile	Arg	Met	Pro
Suprojek-	CCC	CTG	GAT	GCC	TCT	GAC	TTT	GCC	CTG	GAC	ATC	CGG	ATG	CCT
tuoto geno	T	T		C	T	AGC	T	C	T	T	T	T	A	A
sekos	A	A		A	G			A	A		A	C		C
	G	C		G				G	C			T		G

AA#	1	2	3	4	5	6	7	8	9
seka:	Asn	Gly	Gln	Trp	Thr	Leu	Ile	Gly	Arg
Suprojek-	5' AAT	GGC	CAG	TGG	ACC	CTG	ATT	GGC	CGG 3'
tuoto geno	C	A	A		T	T	C	C	A A A
sekos		G			A	T	A	G	C
		T			G	G		T	T

Oligo-zondas 3' TTA CCG GTC ACC TG 5'
AE4 G T T

Oligo-zondas 3' TTA CCG GTC ACC TG 5'
AE5 G T T

Skaidymo tripsinu maksimumas Nr.65

AA#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
seka:	Ser	Met	Gln	Pro	Gly	Ser	Asp	Gln	Asn	His	Phe	Ser	Gln	Pro	Thr
Supro-	5'TCC	ATG	CAG	CCT	GGC	TCT	GAC	CAG	AAC	CAC	TTC	TCC	CAG	CCC	ACT 3'
jektuo-	AGT		A	A	A	AGC	T	A	T	T	T	AGT	A	T	A
to geno	A			C	G	A						A		A	C
sekos	G			G	T	G						G		G	G

Oligo-zon- 3' TAC GTC GGI CCI AGI CTG GTC TT 5'
das AE6 T A T
Oligo-zon- 3' TAC GTC GGI CCI TCA CTG GTC TT 5'
das AE7 T G A T
Oligo-zon- 3' CTG GTC TTG GTG AA 5'
das AE10 A A A
Oligo-zon- 3' CTG GTC TTG GTG AA 5'
das AE11 A A A

Skaidymo tripsinu maksimumas Nr.86

AA#	1	2	3	4	5	6	7
seka:	Phe	Val	Thr	Gln	Trp	Gly	Glu
Suprojek-	5' TTT	GTG	ACC	CAG	TGG	GGA	GAG 3'
tuoto geno	C	C	T	A		T	A
seka		T	A			G	
		A	G			C	
Oligo-zondas	3' AAA	CAC	TGC	GTC	ACC	CCC	CT 5'
AE9	G	I	I	T		I	

Ši lentelė parodo visas galimas genų sekas, atitinkančias alfa-amidinančio fermento baltymo sritims. Po suprojektuotomis sekomis parodyti kai kurie komplementarūs genui zondai, kurie yra naudingi kDNR identifikacijai ir išskyrimui.

8 pavyzdys

A. Specifinių alfa-amidinančiam fermentui monokloninių antikūnų pelėse sudarymas

Vienuolika Balb/cJ pelių buvo imunizuota ir reimunizuota išvalytu amidinančiu fermentu. Paimta šių pelių kraujo, serumas apdorotas, ir titruota išvalyto fermento atžvilgiu ELISA metodu. Analizė atlikta (ši metodika yra gerai žinoma), adsorbuojant išvalytą fermentą ant polistirolo plokštelės, kuri po to buvo perplauta ir blokuota jaučio serumo albuminu (BSA) pašalinių antikūnų prikibimui prie plokštelės išvengti. Po to ant padengtos amidinančiu fermentu plokštelės buvo inkubuotas praskiestas pelių serumas (kuriame, kaip manoma, yra antikūnų prieš amidinantį fermentą), ir perplauta. Po to, lizduose buvo inkubuoti antrieji antikūnai, pažymėti šarmine fosfataze, kas palengvina nustatyti, ar pirmasis antikūnas susirišo su plokšte. Perplovus ir pridėjus substrato tirpalo, išmatuotas kalorimetrinis signalas spektrofotometriniu įrenginiu. "Teigiami" serumai rodė signalo ir triukšmo santykį mažiausiai 2:1.

Pelė Nr.7, kuri parodė didelį titrą ELISA teste, buvo papjauta po 4 dienų, aseptiškai pašalinta blužnis, mechaniškai supjaustyta, norint gauti blužnies ląsteles ($132,6 \times 10^6$), kurios buvo sumaišytos su $122,8 \times 10^6$ mielomos NS-1 ląstelių 1,28 ml PEG (polietilenglikolio) 4000. Ląstelės buvo išdalintos po lygiai į penkias 24 lizdų plokšteles, kurios prieš tai buvo padengtos Balb/cJ pelių timocitais ir splenocitais, kurie tarnavo kaip maitinančios ląstelės. Ląstelės buvo laikomos selektyvinėje HAT terpėje, kurioje galėjo išgyventi tik hibridinės ląstelės.

116 lizdų supernatantai, kurie parodė kloninį augimą, buvo atrinkti radioimuniniu ir ELISA metodais antikūnams gauti. Radioimuninės analizės metodikos buvo analogiškos ELISA analizei, aprašytai aukščiau, tik antrieji antikūnai buvo pažymėti ^{125}I , ir radioaktyvumas matuojamas gama-skaičiuokliu.

56 iš 116 lizdų parodė teigiamą rezultatą antikūno gavimo atžvilgiu; buvo ištirtas jų reaktyvumas alfa-amidinančiam fermentui. Tokiu būdu atrinkti 25 klonai, parodę teigiamą reakciją į alfa-amidinančius fermentus, buvo išskirti laipsniško praskiedimo metodu. Pirminiai klonai buvo atrinkti pagal alfa-amidinančius fermentus ir BSA (kadangi polistirolo plokštelės buvo blokuotos BSA, antikūnai, kurie buvo prilipdyti prie plokštelės, tikriausiai prikibdavo, arba juos adsorbudavo BSA nespecifiškai), norint nustatyti ar tikrai jie yra specifiški amidinančiam fermentui. Klonai, kurie parodė signalą alfa-amidinančiam fermentui, kuris buvo mažiausiai dvigubai didesnis, negu BSA, buvo klonuoti pasiskirstymo santykiu 2 ląstelės/1 akutė.

21 teigiama hibridoma (žr. III lentelę) buvo pernešta į tretinio klonavimo stadiją ir dvidešimt iš jų buvo charakterizuota pagal Ouchterlony ir ELISA metodikas. Septyniolika klonų turėjo sunkias grandines IgG_{2a}, ir trys - sunkias grandines IgG₁. Visi 20 klonų parodė sekreto antikūnus su kapa lengvomis grandinėmis.

III lentelė

Alfa-amidinantčio fermento monokloninių ląstelių linijos

Ląstelių linija	Sunkioji grandinė	Titras*
4-1-4 20-3	IgG _{2a}	~ 1:5000
4-1-4-18-1	IgG _{2a}	
4-5-7-3	IgG _{2a}	~ 1:5000
4-2-3-17-7	IgG _{2a}	
3-7-1-20-24	IgG _{2a}	~ 1:10000
4-8-18-5-2-6	IgG _{2a}	
4-7-21-14-9	IgG _{2a}	
4-10-45-1-16	IgG _{2a}	
54-2-1-39-2	IgG _{2a}	~ 1:10000
4-6-12-1-3-17	IgG _{2a}	
52-1-31-24-2	IgG _{2a}	
4-3-11-46-1	IgG _{2a}	
3-7-9-9-3	IgG _{2a}	
86-1-38-15	IgG ₁	~ 1:1000
4-5-6-1	IgG ₁	~ 1:1000
4-4-24-3-5	IgG _{2a}	~ 1:5000
4-11-3-1-8	IgG ₁	
8-9-94-4-2	IgG _{2a}	
4-10-30-3-1	IgG _{2a}	
75-10-17-14-4	IgG _{2a}	
92-10-26-32-39	nesuklasifikuota	

*Ascitiniai skysčiai buvo titruoti su 100 ng išvalyto fermento ELISA metodu.

Kiekviena linija buvo individualiai išauginta kultūroje, ir vienodi kiekiai ląstelių buvo užšaldyti skystame azote. Pristane-primed Balb/cJ pelėms į pilvą buvo suleista 5×10^6 hibridomos ląstelių. Po savaitės, pelėms, kurioms nebuvo stebimas ascitinis auglys, injekcija pakartota. Po 1-2 savaičių paimtas ascitinis skystis ir kraujas. Po apdorojimo atrinkti ascitai ir kraujo serumas ir nustatomas alfa-amidinantis fermentas bei neigiami antigenai (pavyzdžiui, jaučio serumo albumino, kiaušinio albumino, anglies anhidrazės ir augimo hormono išlaisvinimo faktoriaus), norint užtikrinti antikūnų specifiškumą

B. Monokloninių antikūnų, gautų pelėse, išvalymo metodika

Monokloniniai antikūnai, specifiniai alfa-amidinančiam fermentui, gauti pagal aukščiau aprašytas metodikas, buvo valomi taip. Ascitinis skystis, surinktas iš kelių pelių, kurioms įskiepytas tas pats klonas, buvo panaudotas kaip antikūnų šaltinis. Skystis praskiestas 5 kartus 10 mM MES, pH 5,6. Praskiestas skystis supiltas į 1,5x20 cm kolonėlę, užpildytą 40 μ m sumaišytos ABX režime silikagelio dervos (J.T. Baker), iš anksto subalansuotos 10 mM MES (pH 5,6) buferiu. Monokloniniai antikūnai eliuuojami iš kolonėlės, naudojant 0-500 mM natrio acetato gradientą (pH 7,0). Frakcijos su išvalytais antikūnais sumaišomos, tikrinamas jų santykinis aktyvumas ir laikomos 4 °C temperatūroje iki kito panaudojimo.

C. Specifinių alfa-amidinančiam fermentui polikloninių antikūnų generavimas vištose

Dviems dėdeklėms į veną, į raumenis ir po oda suleista iš viso maždaug po 50 μ g išvalyto alfa-amidinančio fermento Ribi adjuvante. Ribi adjuvantas yra pilnai metabolizuota riebalinė emulsinė sistema, kuri susideda iš viščiuko limfocitų mitogeno ir adjuvanto antikūno reakcijai į antigeną naminiuose paukščiuose sustiprinti (Ribi Imunochem Research, Montana). Po pradinės imunizacijos buvo padarytos dar dvi injekcijos, maždaug po 30 μ g/vištai, su dviejų savaitių pertrauka. Po 21 ir 35 dienų iš vištų buvo paimtas kraujas, gautas serumas buvo apdorotas ir atrinktas pagal specifiką antigenams pagal tokią metodiką: abiejų vištų serumai, gauti 0 dieną (prieš imunizaciją), 21 dieną ir 35 dieną buvo analizuoti ELISA metodu, naudojant 100 ng išvalyto alfa-amidinančio fermento. Antikūnų specifinio sukibimo neigiamai kontrolei buvo panaudotas jaučio serumo albuminas. Fermentui specifinis antikūnas buvo detektuotas šarmine fosfataze žymėtu triušio prieš vištos IgG serumu.

Aukščiau aprašytų tyrimų rezultatai parodė, kad specifiniai antikūnai gali būti aptikti vištos 257 serume po 35 dienų. Praskiestas 1:10000 serumas davė signalo santykį su triukšmu apie 4:1. Višta 258 parodė specifinius fermentui antikūnus po 21 ir 35 dienų. Abiejų kraujo mėginių praskiestas 1:10000 serumas davė signalo santykį su triukšmu apie 4:1. Abiejų vištų kiaušiniai pradėti rinkti po 56 dienų. Išskirti, nusodinant polietilenglikoliu (PEG), preimunizuotų ir postimunizuotų vištų kiaušinių IgY buvo ištirti Ouchterlony metodu, ir fermentui specifiniai antikūnai buvo atrinkti ELISA metodu.

D. Vištų antikūnų IgY išvalymas

Polikloniniai paukščių antikūnai, specifiniai alfa-amidinančiam fermentui, buvo generuoti vištose taip, kaip aprašyta aukščiau. Imunizuotų vištų kiaušiniai surinkti ir panardinti į parafiną arba užšaldomi iki tol, kol bus naudojami IgY išskyrimui. Kiaušinių baltymai atskiriami nuo trynių, kuriuose yra alfa-amidinančiam fermentui specifiniai antikūnai. Tryniai praskiedžiami 3 kartus 10 mM natrio fosfatu (pH 7,5), kuriame yra 0,1 M NaCl ir 0,01 % natrio azido. Pradinis nusodinimas PEG'u atliktas, naudojant 3,5 % galutinę PEG 8000 koncentraciją. Nusodinimas vykdytas 30 min. kambario temperatūroje, po to centrifuguojama ir atskiriamas supernatantas (jame yra IgY). Į supernatantą vėl pridedama PEG, kad jo koncentracija būtų 12,5 %. IgY antikūnai, nusodinti polietilenglikoliu, atskirti centrifuguojant. IgY antikūnai toliau valomi tokiais dviem būdais:

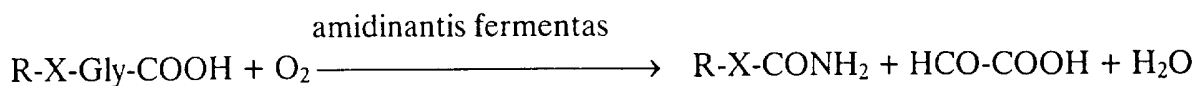
1) Nusodinti IgY antikūnai vėl suspenduoti 10 mM MES (pH 5,6), po to dializuoti per naktį 4 °C temperatūroje tame pačiame buferyje. Po to mėginys supilamas į 1,5x20 cm kolonėlę, turinčią 40 μm sumaišytos ABX silkagelio dervos (J.T. Baker). Tolimesnės valymo procedūros buvo tokios pačios, kaip ir ascitinio skysčio valymo metodikoje.

2) Nuosėdos, turinčios IgY, vėl suspenduotos pradiniam buferyje ir vėl nusodintos, naudojant sotų amonio sulfato tirpalą (3:1, tūris/tūris). Nuosėdos su IgY vėl suspenduotos nedideliame distiliuoto vandens kiekyje ir laikomos 4 °C temperatūroje. Vištų IgY imobilizacijos metodika aprašyta 12 pavyzdyje.

9 pavyzdys

Alfa-amidinančio fermento aktyvumo kinetiniai tyrimai

Alfa-amidinantis fermentas, išvalytas iki homogeniškumo, tiek iš CA-77 kultūros, tiek ir iš žiurkės skydliaukės karcinomos audinio) paverčia neaktyvius glicin-peptidinius prohormonus į bioaktyvius C-terminalinius amidus. Tyrimais buvo nustatyta, kad prohormono C-galinė aminorūgštis turi būti glicino liekana, kad fermentas galėtų ją atpažinti ir amidinti taip:



Šio aktyvumo realizavimas *in vitro* reikalauja be substrato dar ir deguonies bei redukuojančio agento (L-askorbino rūgšties). Mes nustatėme, kad fermentinis aktyvumas

gali būti padidintas, pridėdant Cu^{2+} jonų (vario sulfato) ir katalazės. Šis egzogeninį varį suriša fermentas; jo reikia surišti molekuliniam deguoniui ir aktyvacijai. Iš antros pusės, katalazė yra reikalinga vandenilio peroksidui suardyti, kuris priešingu atveju susikaupų ir vyktų šalutinės reakcijos, dalyvaujant deguoniui, askorbatui, variui, ir ardytų alfa-amidinantį fermentą.

Alfa-amidinančio fermento aktyvumui nustatyti mes radome jautrius neradiometrinius metodus. Šiuose methoduose, kaip substratai, naudojami sintetiniai tripeptidai. Šių peptidų amidinimą patogiu kontroliuoti, atskiriant ir nustatant produkto kiekį (amidintą dipeptidą nuo substrato-tripeptido) HPLC metodu. Jautriausiame iš sukurtų metodų substratu naudojamas monodansil-L-Tyr-Val-Gly. Galima nustatyti labai mažus šio junginio kiekius, kadangi dansilo grupė fluorescuoja. Šio metodo jautrumas priylgsta panašaus radiometrinio metodo, sukurto kitose laboratorijose, jautrumui.

Mes naudojome šį metodą alfa-amidinančio fermento kinetinių savybių tyrimui. Kinetiniai parametrai K_m ir V_{max} buvo nustatyti, matuojant fermento aktyvumo priklausomybę nuo substrato koncentracijos. K_m yra giminingumo tarp fermento ir substrato matas. Kuo mažesnis K_m , tuo didesnis giminingumas. V_{max} yra maksimalus greitis, kuriuo fermentas paverčia substratą produktu, ir stebimas, esant substrato prisotinimo koncentracijoms (t.y. fermento atžvilgiu yra didelis substrato perteklius).

Tipiškas amidinančio fermento mėginio reakcijos mišinys (50 μl) susidės iš fermento (apie 7 μg), dansil-L-Tyr-Val-Gly (iki 40 μM), askorbino rūgšties (3 mM), katalazės (nuo 0 iki 100 $\mu\text{g/ml}$) ir vario sulfato (nuo 0 iki 2 μM), ištirpintų 60 mM TES buferyje (pH 7,0). Reakcija inicijuojama 37 °C temperatūroje, pridėdant fermentą, ir nutraukiama po tam tikro laiko tarpo, pridėdant 0,1 M EDTA, kuri suriša varį, padarydama jį neprieinamą fermentui.

Alfa-amidinantis fermentas turi didelį giminingumą fermentiniam dansil-L-Tyr-Val-Gly amidinimui, kurio K_m yra 1-2 μM ribose. Atrodo, kad šis dydis yra pastovus, nepriklausomai nuo fermento išvalymo laipsnio. Pavyzdžiui, fermento mėginys, gautas chromatografuojant per Sephacryl S-300, turi tą patį K_m kaip ir elektroforetiškai švarūs fermento preparatai, gauti iš MonoQ pH 8,0 arba mažesnės molekulinės masės formos iš MonoQ pH 6,0 chromatografijos. Iš antros pusės, kaip ir galima laukti, V_{max} reikšmės (išreikštos mg baltymo) labai priklauso nuo išvalymo laipsnio. Pavyzdžiui, V_{max} gauto po

Sephacryl S-300 fermento, yra nuo 50 iki 100 nmol produkto/min/mg baltymo, tuo tarpu kai švaraus fermento $V_{\max}$ yra apie 5000 nmol/min/mg baltymo.

Mes nustatėme, kad askorbatas ir substratas gali konkuruoti tarpusavyje dėl sąveikos su fermentu tam tikromis sąlygomis. Pavyzdžiui, jeigu substrato koncentracija labai daug viršija įsisotinimo lygį, fermento aktyvumas mažėja dėl jo sąveikos su askorbino rūgštimi. Taigi, kiekvienam konkrečiam substratui, matyt, egzistuoja tam tikras balansas tarp optimalių substrato/askorbato kiekių priklausomai nuo fermento giminingumo šiam substratui.

Amidinančio fermento giminingumas glicinu pailgintiems peptidams

Reakcijai tarp amidinančio peptido ir keleto glicin-prohormoninių peptidų identifikuoti buvo naudotas monodansil-L-Tyr-Val-Gly amidinimas. Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti fermento santykinį giminingumą įvairių tipų peptidiniams substratams. Nors anksčiau parodėme, kad fermentas sėkmingai amidina žmogaus kalcitonino ir žmogaus augimo hormono išlaisvinimo faktoriaus glicinu pailgintus substratus, tai dar nieko nepasako, kuris iš šių peptidinių substratų turi didesnę giminingumą fermentui.

Mes nustatėms, kad glicinu pailgintas alfa-melanocito stimuliuojantis hormonas, substancija P, vazopresino analogai ir augimo hormono išlaisvinimo faktorius pasižymi dideliu giminingumu amidinančiam fermentui, ir fermentas nemetabolizuoja dansil-L-Tyr-Val-Gly. Be to, žmogaus kalcitoninas, neuropeptidas Y, cholecitokinas, kortikotropiną išskiriantis faktorius ir kalcitonininis peptidas, kurių C-gale yra papildoma glicino liekana, rodo konkurenciją šiame bandyme. Kitaip sakant, fermentas gali surišti ir tikriausiai amidinti visus šiuos glicinu pailgintus peptidinius substratus.

Atvirkščiai, amidinti šių substratų produktai daug blogiau sąveikavo su fermentu. Šio fermento katalitinio centro savybė atpažinti daugelį glicinu pailgintų peptidinių substratų daro jį labai naudingą peptido prohormono, gauto rekombinantinės DNR technologijos būdu, amidinimui.

10 pavyzdys

DNR SEKOS, KODUOJANČIOS III PIKO α -AMIDINANTĮ FERMENTĄ,

IŠSKYRIMAS

RNR gavimas

RNR buvo gauta iš žiurkės skydliaukės karcinomos, naudojant guanidino tiocianatą. Poli-A-RNR buvo išskirta, panaudojant oligo dT celiuliozę.

kDNR sintezė

Dvigrandė kDNR buvo gauta žinomais metodais. Naudojant žiurkės skydliaukės karcinomos A RNR kaip matricą ir oligo dT₁₂₋₁₈ kaip pradžią, pirmos grandinės sintezė buvo atlikta, panaudojant atvirkštinės transkriptazės fermentinę reakciją. kDNR ir RNR atskirtos, ir RNR suskaldoma šarmais. Antros kDNR grandinės sintezė buvo vykdoma, naudojant *E.coli* DNR polimerazę I. Norint pašalinti kDNR kilpas ir viengrandes kDNR sritis, panaudotas skaldymas nukleaze S1. Po reakcijos su DNR polimeraze I dvigrandė kDNR apdorota EcoR1 metilaze ir S-adenozilmetioninu EcoR1 saitų metilinimui, apsaugant juos nuo fermentinio skaldymo. EcoR1 linkeriai liguoti į kDNR. Po skaldymo EcoR1 papildomi linkeriai atskirti nuo kDNR, ir kDNR buvo frakcionuota pagal dydį Sepharose 4B kolonėlėje. Vienos tokios molekulės sintezėje panaudota daugiau nei 500 bazių porų, kitoje - buvo įjungta daugiau nei 1000 bazių porų.

kDNR λgt 11 kolekcijos konstravimas

Susintetinta dvigrandė kDNR buvo panaudota vektoriuje λgt II kDNR kolekcijos konstravimui. Tai realizuojama, prijungiant kDNR prie λgt II DNR, kuri buvo suskaldyta EcoR1 pagalba ir paveikta fosfatu, siekiant sutrukdyti DNR vektoriaus savaiminiam susirišimui. Po to, iš rekombinantinių DNR *in vitro* buvo gaminamos infekuotos bakteriofago dalelės (ekstraktus dalelių sudarymui galima gauti iš Promega Biotech arba Clontech laboratorijų arba pasigaminti standartiniais metodais).

Buvo patikrintos gautos DNR alikvotos, norint nustatyti rekombinantų skaičių kolekcijose. Rasta, kad vienoje iš kolekcijų buvo apie $2,57 \times 10^6$ infekcinių dalelių, iš kurių maždaug 78 % buvo rekombinantai (duoda aiškias dėmes ant X-Gal plokštelių, auginant su IPTG). Kitoje kolekcijoje buvo apie $2,75 \times 10^6$ dalelių, ir maždaug 81 % iš jų yra rekombinantai.

Kolekcijos atrinkimas

Norint identifikuoti rekombinantinį bakteriofagą, kuris turi alfa-amidinančio fermento kDNR, fagas buvo atrinktas panaudojant radiožymėtus oligonukleotidus, sukonstruotus pagal alfa-amidinančio fermento aminorūgščių seką (7 pavyzdys, II lentelė). Atranka buvo vykdoma, užsėjant bakteriofagą ir pernešant jį ant nitroceliuliozės filtrų

diskų. Fago imobilizacijos metodikos ant nitroceliuliozės diskų yra gerai žinomos. Dvigubi filtrai buvo hibridizuoti žymėtu ^{32}P oligonukleotidu AE 9. Hibridizacija buvo vykdoma 37 °C temperatūroje 20-24 val. 6xNET, 0,5 % NP40, 5x Denhardt tirpale, 100 $\mu\text{g/ml}$ lašišos spermos DNR, esant oligotidinio zondo koncentracijai 0,3-0,4 pmol/ml. Po hibridizacijos filtrai buvo plauti 6x SCC 44-45 °C temperatūroje kelias valandas ir eksponuoti į rentgeno plėvelę. Teigiamai hibridizuotas fagas buvo identifikuojamas pagal sutampančias dėmes dvigubuose filtruose. Tokie fagai buvo išvalyti per kelis užsėjimo ir hibridizacijos etapus. Iš maždaug $4\text{-}5 \times 10^4$ atrenkamų fagų 18 buvo identifiukuota AE 9 pagalba.

Selekcijos specifiškumo nustatymui buvo hibridizuojama su antru alfa-amidinančio fermento oligonukleotidu AE 8. Šis bandymas parodė, kad mažiausiai 4 iš 18 fagų turėjo alfa-amidinančio fermento kDNR. Šis faktas buvo patvirtintas papildoma specifine oligonukleotido hibridizacija (AE 4 ir AE 5 pagalba), o taip pat DNR sekos analize.

Alfa-amidinančio fermento ekspresija

Alfa-amidinančio fermento aktyvumo pikas III atitinka junginį, kurio molekulinis svoris yra 75000 daltonų. Laikant, kad aminorūgšties vidutinis molekulinis svoris yra 120 daltonų, gaunama, kad amidinantis fermentas turi daugiausiai 625 aminorūgštis. Genas, atitinkantis tokią aminorūgščių seką, turi turėti mažiausiai 1875 bazių poras. Visos keturios kDNR, kurios buvo išskirtos kaip specifinės alfa-amidinančiam fermentui, yra pakankamai ilgos, kad galėtų koduoti alfa-amidinantį fermentą. Vieno iš kDNR klonų, λAEI , ilgis yra 2200 nukleotidų. Pirmų 50 nukleotidų ribose prasideda N-galo aminorūgščių sekos, atitinkančios III piko fermento seką, kodavimas. Todėl galima teigti, kad ši kDNR turi visą koduojančią III piko fermento seką; tai žinant, galima naudoti kDNR atitinkamuose prokariotiniuose organizmuose, tokiuose kaip *E.coli*.

Viena iš potencialių metodikų, kuri gali būti pritaikyta kDNR λAEI , duota Fig.22. Pavyzdžiui, 2200 bp kDNR λAEI išskiriama po rekombinantinio bakteriofago DNR skaldymo EcoR1 ir elektroforezės agarozės gelyje. Ji klonuojama į EcoR1 saitą pBR 322 susidarant plazmidei pAE8-1, kuri turi unikalų KpnI skilimo saitą kDNR sekose ir unikalų saitą Hind III sekose pBR 322. Apdorojus pAE8-1 su KpnI ir Hind III, gaunamas apie 2,14 Kb fragmentas, praradęs 62 kDNR bazių poras (N-gale). Pilnam sekos atstatymui fragmentas, besibaigiantis Kpn I-Hind III, liguojamas su oligotidinių linkerių adapteriais.

Duotame pavyzdyje naudota *E.coli* ekspresijos plazmidė pKK233-2, gauta iš Pharmacia. kDNR 2,15 Kb fragmentas liguojamas su dvigrandžiu linkeriu-adapteriu, susidedančio iš

AE17(+)³⁰5'CATGTCATTTTCCAATGAATGCCTTGCTAC³

ir

AE18(-)²²5'CAAGGCATTCATTGGAAAATGA³.

Adaptuotas fragmentas liguojamas su plazmidės pKK233-2 DNR, kuri buvo suskaidyta su NcoI ir Hind III, ir gaunamas 4,6 Kb linijinis vektorius. Liguotas produktas, pAE12, turi alfa-amidinančio fermento kDNR, prasidedančią ATG startiniu kodonu ir ribosomą jungiančiu saitą, bei turi hibrido kontroliuojamą IPTG iniciatorių trc. Po šio geno eina RNR 5S genas ir transkripcijos pabaigos saitai. IPTG indukuojama pAE12 ekspresija gaunama po plazmidės DNR transformacijos į laci^q genotipo *E. coli* grandinę.

2,2 kb λAEI kDNR intarpo sekos fragmentas

2,2 Kb ilgio intarpas buvo iškirptas, apdorojant λAEI su EcoR1, ir intarpas buvo pažymėtas ³²P. Po antrinio apdorojimo Hind II, gauti 1,6 Kb ir 0,6 Kb ilgio fragmentai buvo sekvenuoti cheminio skaldymo būdu pagal Maxam ir Gilbert metodą.

Šiuo metodu gauta DNR seka sekvenuojant 600 bp λAEI fragmentą nuo Eco R1 galo yra:

```

      v           v           v           v           50v
AATTCCGGTCTTTAAGAGGTTTAAAGAACTACCAGATCATTTTCCAATG
      v           v           v           v           100v
AATGCCTTGGTAC CATTGGACCAGTCACCCCTCTTGATGCATCAGATTTT
      v           v           v           v           150v
GCGCTGGATATTCGCATGCCTGGGGTTACACCTAAGGAGTCTGACACATA
      v           v
CTTTCTGCACCGTCCATGCGTCTACCT

```

DNR seka, gauta sekvenuojant 1600 bp fragmentą λAEI nuo Eco R1 galo yra:

```

      v           v           v           v           50v
AATTCCGTCTCAGTTTCTGTTTCTCTTGCATCTTCTGCAATTCTGAGGAG
      v           v           v           v           100v
GTGGGTTTGTCTCCACTTTGGGTTTCGACAACTGCCTCGGCTTCTTTGAT
      v           v           v           v           150v
TTCGTGGACTTCGATGCCAGCCTTTTAACTGACGCATGCTCCATTTTTT
      v           v           v           v           200v
CGGTCAGGGTGAACTTCCACACGGTGTGTGTGTGCGCTCGAAGACCG

```

Oligonukleotidinio zondo AE8(-)33 sekos homologijos paieškos

Buvo atliktas kompiuteriniai tyrimai homologijai tarp aminorūgščių, panaudotų sudarant AE8 zondą (Leu-Gly-Thr-Gly-Pro-Val-Thr) ir λAEI DNR fragmento 600 bp nustatyti.

Buvo gauta homologinė sritis, kuri išskirta “*“. Aminorūgštys, identifikuojančios NH₂ galą, duotos skliausteliuose. Aminorūgštys, kurios skiriasi nuo DNR seka koduojamų aminorūgščių, pažymėtos “+”:

```

AATCCGGTCTTTAAGAGGTTTAAAGAACTACCAGATCATTTTCCAATG
- - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 50
  i p v f k r f k e t t r (s f s n e

* * * * *

AATGCCTTGGTACCATTGGACCAGTCACCCCTCTTGATGCATCAGATTTT
- - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 100
  C L G T I G P V T p l d a s d f

GCGCTGGATATTCGCATGCCTGGGGTTACACCTAAAGAGTCTGACACATA
- - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + - - - - - + 150
a l d I r m p) g v t p k e s d t y

CTTTCTGCACGTCCATGCGTCTACCT
- - - - - + - - - - - + - - - - - 176
  f l h v h a s t .

```

11 pavyzdys

Fermento imobilizacija

Alfa-amidinančio fermento išvalymas.

Prieš imobilizaciją alfa-amidinantį fermentą buvo išvalytas silpnos anijonų mainų ir gelio filtracijos chromatografijos metodais (4 pavyzdys). Tam tikrais atvejais į fermento valymo procedūrą gali įeiti ir papildomas valymas, naudojant arba imuninę chromatografiją, arba fenilsefarozės chromatografiją. Imobilizacijos metodika nepriklauso nuo valymo metodikos, tačiau specifinis fermento aktyvumas turi būti ne mažesnis negu 25 mE, o geriau 50 mE arba daugiau.

Alfa-amidinančio fermento imobilizacija.

Alfa-amidinančio fermento imobilizacija gali būti paremta vienalaikė reakcija tarp trijų komponentų: fermento, vandenyje tirpaus akrilamido kopolimero (PAN) ir nedidelio molekulinio svorio skersinės jungties sudarančio reagento (TET). Iš anksto paruoštas polimeras (PAN) susideda iš akrilamido ir N-akriloksisukcinimido, kuris polimerizuotas

THF tirpale, naudojant terminę inicijaciją su azobis (izobutironitrilu). Skersines jungtis sudarantis reagentas gali būti α,ω -diaminas, trietilentetraminas (TET), cistaminas. Diamino reakcija su aktyviomis esterinėmis PAN grupėmis sukuria skersinį polimero grandinių susijungimą per amidines jungtis ir suformuoja netirpstantį gelį. Fermento aminogrupės (geriausia lizino ϵ -aminogrupė) tuo pačiu metu reaguoja su likusiomis gelio esterinėmis grupėmis ir sudaro stabilias kovalentines amidines jungtis. Imobilizacija vykdoma, esant substratui ir kofaktoriams. Didelio giminingumo laipsnio substratas ir kofaktoriai, kurių koncentracijos didesnės už K_m , neleidžia reaguoti PAN ir nukleofilinėms grupėms arti katalitinio fermento centro, ir taip fermentas apsaugomas nuo cheminės inaktyvacijos.

Imobilizacijos sąlygos.

Dalinai išvalytas alfa-amidinantis fermentas ištirpinamas 30 mM HEPES buferyje (pH 7,0). PAN ir TET santykis yra toks, kad 15 % aktyvių esterinių grupių lieka nsureagavusios, kurios lieka ryšiams su alfa-amidinančiu fermentu sudaryti. Standartinis PAN tirpalas yra 20 % (pagal svorį). Alfa-amidinančio fermento reakcijos mišinys susideda iš 0,2 μ M CuSO_4 , 40 μ M dansil-His-Phe-Gly, 10 mM askorbato ir 0,5-2,0 mg α -AE gramui PAN. TET koncentracija lygi 0,85 pirminio amino ekvivalento/aktyvaus esterio ekvivalentui. Paprastai parenkant optimalias reakcijos sąlygas, reakcija vykdoma be fermento, norint nustatyti gelio susidarymo laiką, tai yra laiką praėjusį nuo TET pridėjimo iki gelio susidarymo. Optimalios alfa-amidinančio fermento imobilizavimo išeigos gaunamos tada, kai fermentas pridedamas netoli gelio susidarymo taško. Bendra taisyklė yra tokia, kad kuo mažiau fermentas būna sąveikoje su PAN, tuo didesnis jo aktyvumas. Daugelyje reakcijų alfa-amidinantis fermentas (apie 2,0 mg/PAN gramui) pridedamas, praėjus 45-60 sek. po TET pridėjimo. Kad pilnai įvyktų reakcija, fermentą prisijungęs gelis laikomas kambario temperatūroje 1 valandą. Po to gelis susmulkinamas, padarant 100 μ dydžio fragmentus. Šios dalelės plaunamos amonio sulfatu, norint pašalinti nsureagavusias medžiagas ir pakeisti aktyvias esterines grupes amidinėmis. Laukiama, kad aktyvaus fermento išeiga po imobilizacijos bus mažesnė nei 60 %. Nuoplovose gali likti nuo 30 iki 40 % pradinio aktyvumo. Iš nuoplovų galima regeneruoti alfa-amidinantį fermentą, didinant amonio sulfato koncentraciją iki 45 %, kuris skatina alfa-amidinančio fermento nusėdimą.

Gelio su imobilizuotu fermentu dalelės yra tinkamos porcijiniam alfa-amidinimui, kur dalelės yra suspenduotos, maišant mechanine maišykle. Pasibaigus fermentinei reakcijai, dalelės nusėda, o supernatantas, kuriame yra produktas -amidintas peptidas - nupilamas. Gelio dalelės nėra pakankamai tvirtos, todėl jomis negalima užpildyti kolonėlės, per kurią būtų galima leisti substratą tinkamais greičiais. Šios problemos sprendimui galimi du alternatyvūs keliai:

1. Gelis polimerizuojamas, esant terpėje stiklo granulėms (pridedama likus minutei iki galutinio gelio susiformavimo ir maišoma mechanine maišykle, kol granulės pasidengia PAN tirpalo sluoksniu). Gautos kompozicinės medžiagos savybės pratekėjimo atžvilgiu yra daug geresnės, negu gelio dalelių.

2. PAN dalelės sumaišomos su Celitu 545, skirtu filtracijai. PAN ir Celito mišinyje PAN yra mažiau nei 8 % nuo bendro mišinio svorio. Tokiai kolonėlei pagaminti gelio dalelės suspenduojamos 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, maišant pridedama Celite 545 ir maišoma dvi valandas. Kolonėlė užpildoma gautu mišiniu (3x40 cm), ir temperatūra joje palaikoma apie 37 °C, siekiant sudaryti optimalias amidinimo sąlygas. Tokioje kolonėlėje galima pasiekti 8-10 litrų per dieną srauto greitį.

Patrauklia alternatyva kolonėlių chromatografijai gali būti tangentinio srauto sistemos panaudojimas. PAN polimeras prieš gelio susidarymo tašką užpilamas ant porėto (0,45 μm poringumo) polisulfono lapo. Susidarius geliui, lapai gali būti supjaustomi ir naudojami ultrafiltracijos su tangentiniu srautu Millipore arba New Brunswick sistemos įrenginiuose. Šioje sistemoje kompleksiniai polisulfono-PAN lapai su imobilizuotu fermentu dedami sluoksniais, ir taip labai padidėja paviršiaus plotas. Toks variantas leidžia pasiekti apytikriai iki litrų per minutę srauto greitį. Šio tipo sistemos leidžia patogiai reciklinti reakcijos mišinį ir pasiekti maksimalų amidinimą.

Alfa-amidinto fermento imobilizacija leidžia regeneruoti ir vėl panaudoti fermentą. Be to, imobilizuotas ant matricos fermentas yra stabilesnis; tokia fermento forma tinka stambaus masto (nuo gramo iki kilogramų) amidinimui ir gali būti naudojama ilgą laiką.

12 pavyzdys

Imuninės kolonėlės gaminimas užterštoms alfa-amidinančio fermento kompozicijoms
valyti

A. Imobilizacijos metodika

Imobilizacijos matrica buvo bromcianu aktyvuota Sepharose 4B (Pharmacia). Iš pradžių sausas gelis perplaunamas 1 mM HCl (200 ml/g dervos), išbrinkinant ir išplaunant kietą nešiklį. Apie 10 mg išvalytų polikloninių antikūnų, išskirtų iš vištos kiaušinių trynių, dializuojama, naudojant 100 mM NaHCO₃, pH 8,3, pridėjus 0,5 M NaCl. Surišama, naudojant 8 ml kieto išbrinkinto ir išplauto nešiklio. Reakcija buvo vykdoma tris valandas kambario temperatūroje natrio bikarbonato buferyje (100mM, pH 8,3) su 500 mM NaCl, kuris buvo pridėtas, norint sutrukdyti nespecifinio ryšio su nešikliu susiformavimą. Likusios aktyvios gelio grupės buvo blokuotos 0,2 M glicinu. Po to gelis buvo plaunamas 4-5 kartus, naudojant didelio ir mažo pH buferius (100 mM NaHCO₃ pH 8,3 + 500 mM NaCl buferį, 100 mM acetato, pH 4,0, + 500 mM NaCl buferį). Taip plaunant pašalinami nesurišti baltymai ir blokuojantis reagentas (glicinas). Gauta derva pamerkiama į bazinio pH buferį, turintį mertiolato, kaip bakteriostatinio agento, ir laikoma 4 °C temperatūroje. Analogišku būdu galima imobilizuoti ir išvalytus monokloninius antikūnus.

B. Imunogeninė chromatografija

Kaip alternatyva geram alfa-amidinančio fermento išvalymo laipsniui pasiekti naudojama imuninė kolonėlė. CA-77 (4 pavyzdys) ląstelės praskiedžiamos distiliuotu vandeniu ir perleidžiamos per DEAE anijonų mainų įrenginį, subalansuotą 20 mM bis-Tris-HCl, pH 6,0. Alfa-amidinantis fermentas eliuuojamas iš įrenginio 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) su 500 mM NaCl. Frakcijos, kuriose yra amidinančio fermento, prieš imunogeninę chromatografiją arba dializuojamos Tris-HCl (pH 7,0) buferyje arba valomos, panaudojant gel-filtracijos chromatografiją (4 pavyzdys). Mėginiai, kuriuose yra amidinančio fermento, perleidžiami per imunoabsorbcinę kolonėlę su neutraliu pH. Antikūnai specifiškai suriša fermentą, o pašaliniai baltymai nesurišami ir patenka į ištekančią tirpalą. Alfa-amidinantis fermentas gali būti eliuotas iš kolonėlės 100 mM glicino-HCl buferiu, kurio pH 3,0 (gali būti panaudoti ir kiti desorbcijos agentai, įskaitant karbamidą, dioksaną, etilenglikolį ir NaI). Frakcijos renkamos į 1,0 M Tris-HCl (pH 7,0) buferį, kad būtų neutralizuojama buferinė sistema ir išlaikomas alfa-amidinančio fermento aktyvumas.

oligonukleotidinis 3' TAC GTC GGI CCI AGI CTG GTC TT 5' ;

zondas AE6	T	A	T	
oligonukleotidinis zondas AE7	3' TAC GTC GGI CCI TCA CTG GTC TT 5' ;			
	T	G	A	T
oligonukleotidinis zondas AE8	3' AC CCG TGG TAA CCG GGA CAC TG 5' ;			
	I	I	I	I
oligonukleotidinis zondas AE9	3' AAA CAC TGC GTC ACC CCC CT 5' ;			
	G	I	I	I
oligonukleotidinis zondas AE10	3' CTG GTC TTC GTG AA 5' ;			
	A	A	A	
oligonukleotidinis zondas AE11	3' CTG GTT TTG GTG AA 5'			
	A	A	A	

2. Šeimininko ląstelė, besiskirianti tuo, kad ji yra transformuota arba transfekuota ekspresijos vektoriumi, turinčiu DNR seką pagal 1 punktą.

3. Peptidilglicino alfa-amidinančios monooksigenazės (PAM) rekombinantinės ekspresijos būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima šeimininko ląstelių pagal 2 punktą kultivavimą tokį laiką, kurio pakanka minėtos PAM ekspresijai, ir minėtos PAM išskyrimą.

4. Amidinto peptido gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad į jį įeina pradinio peptido, turinčio C-gale gliciną, veikimas peptidilglicino alfa-amidinančia monooksigenaze, pagaminta pagal 3 punktą.

Fig. 1

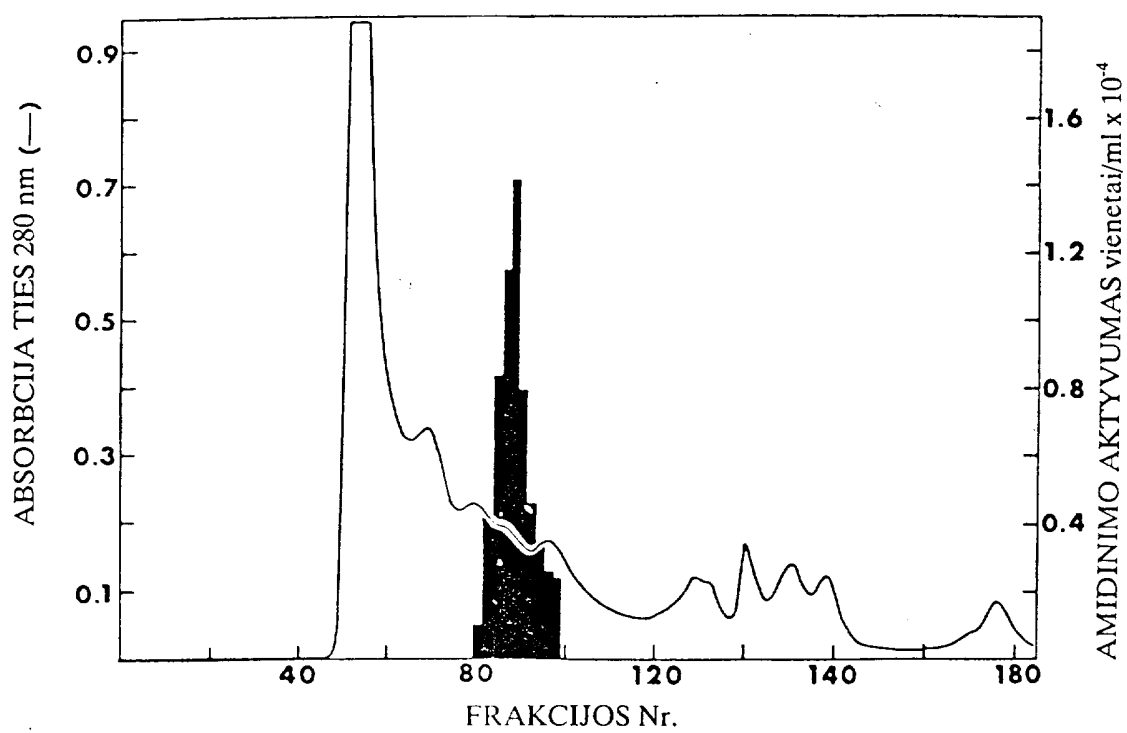


Fig. 2

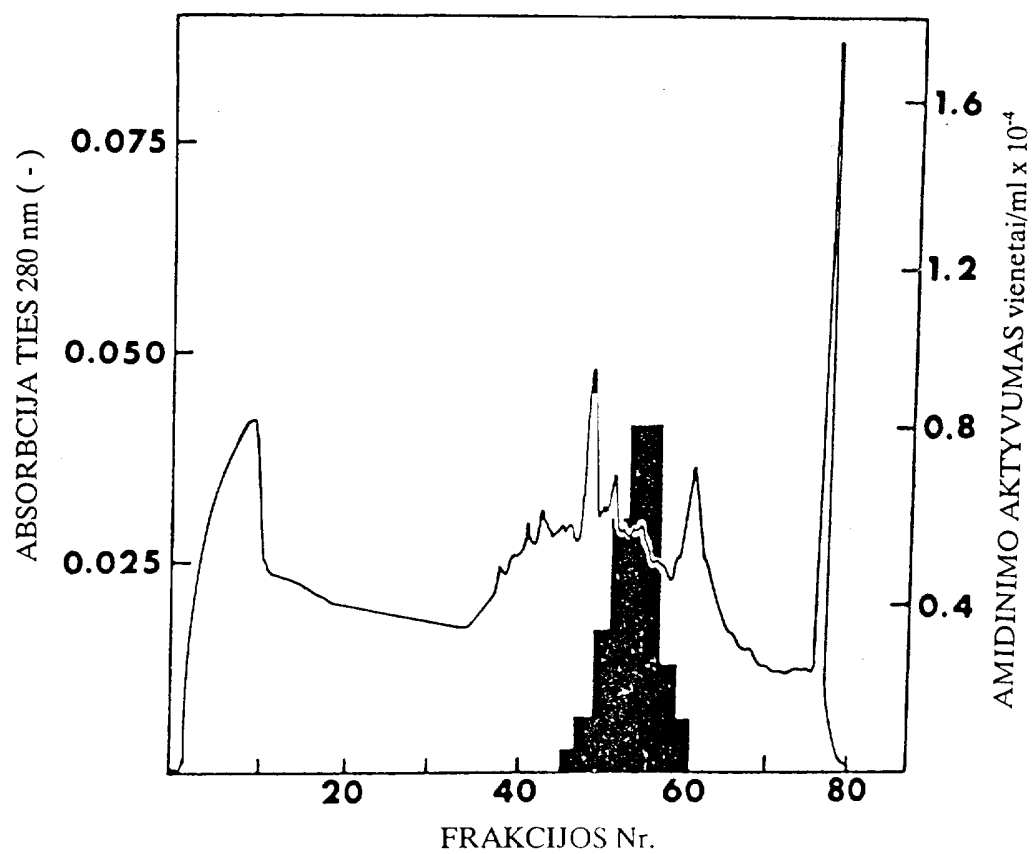


Fig. 3

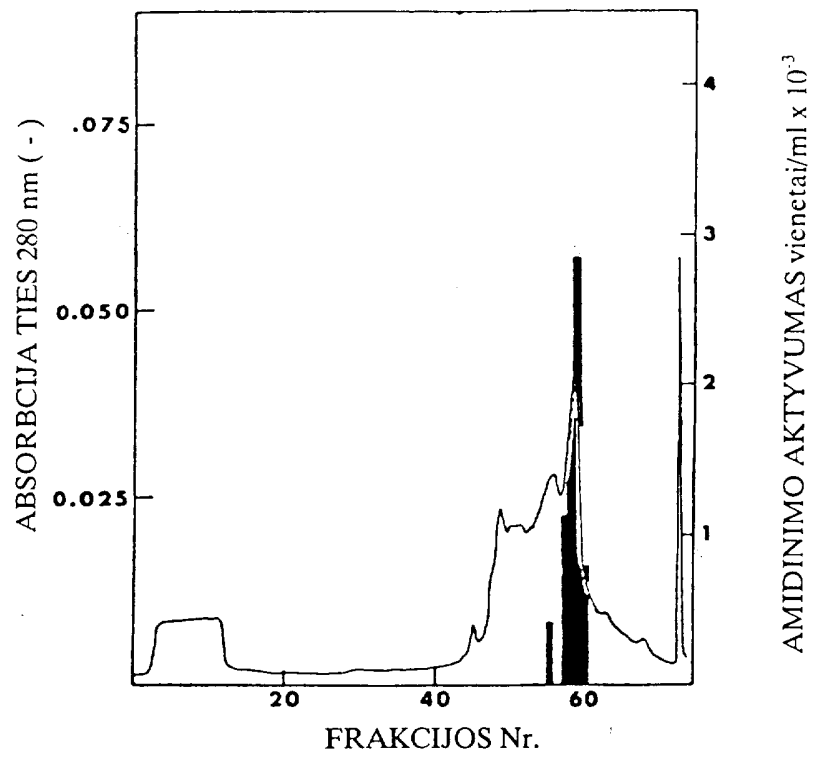


Fig. 4

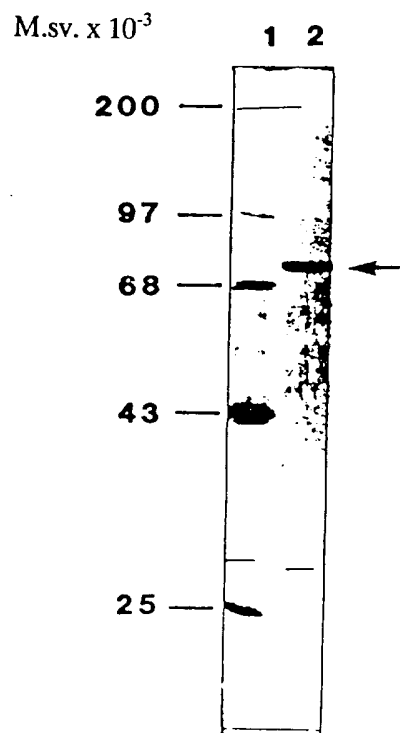


Fig. 6

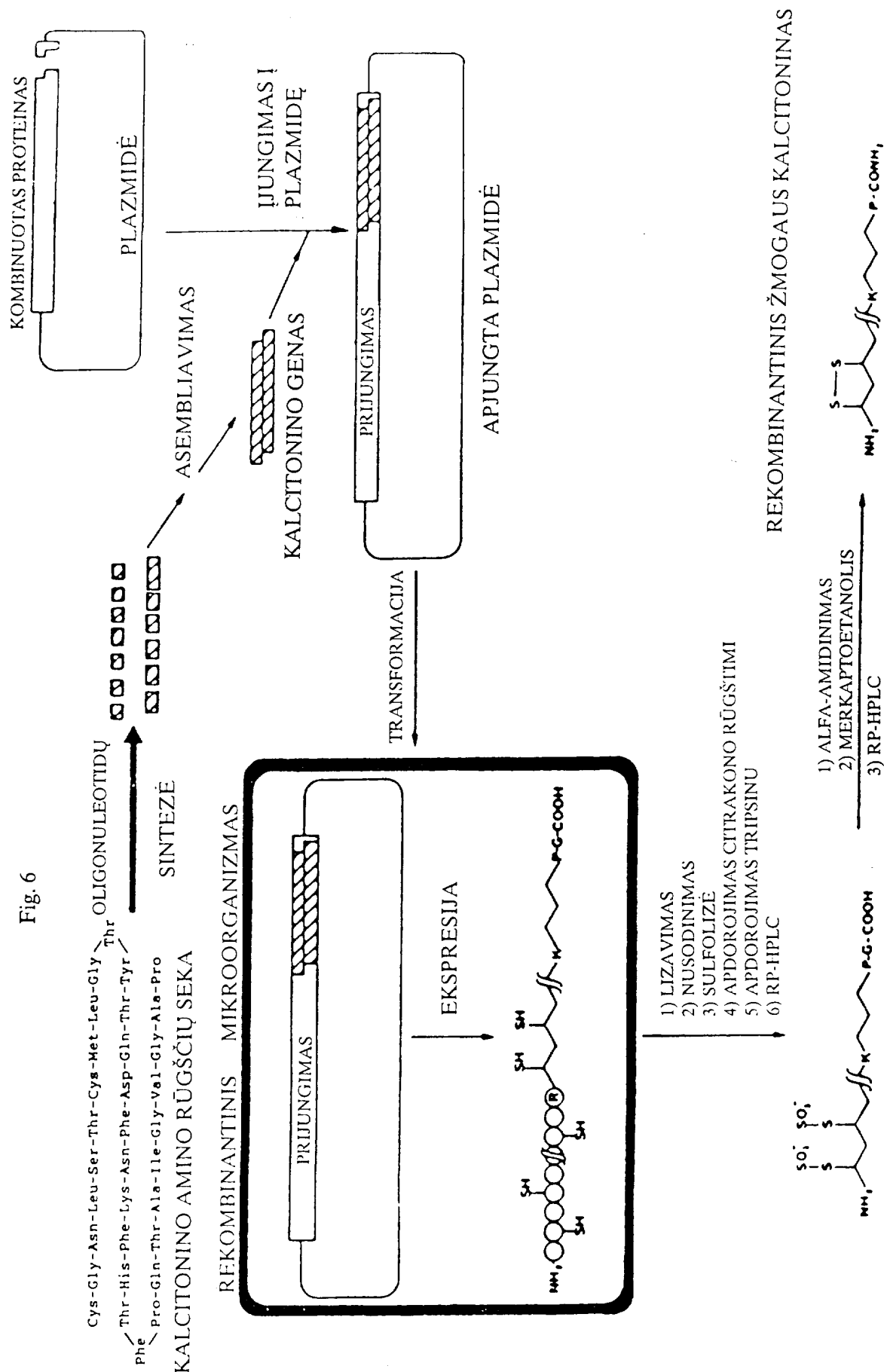


Fig.5

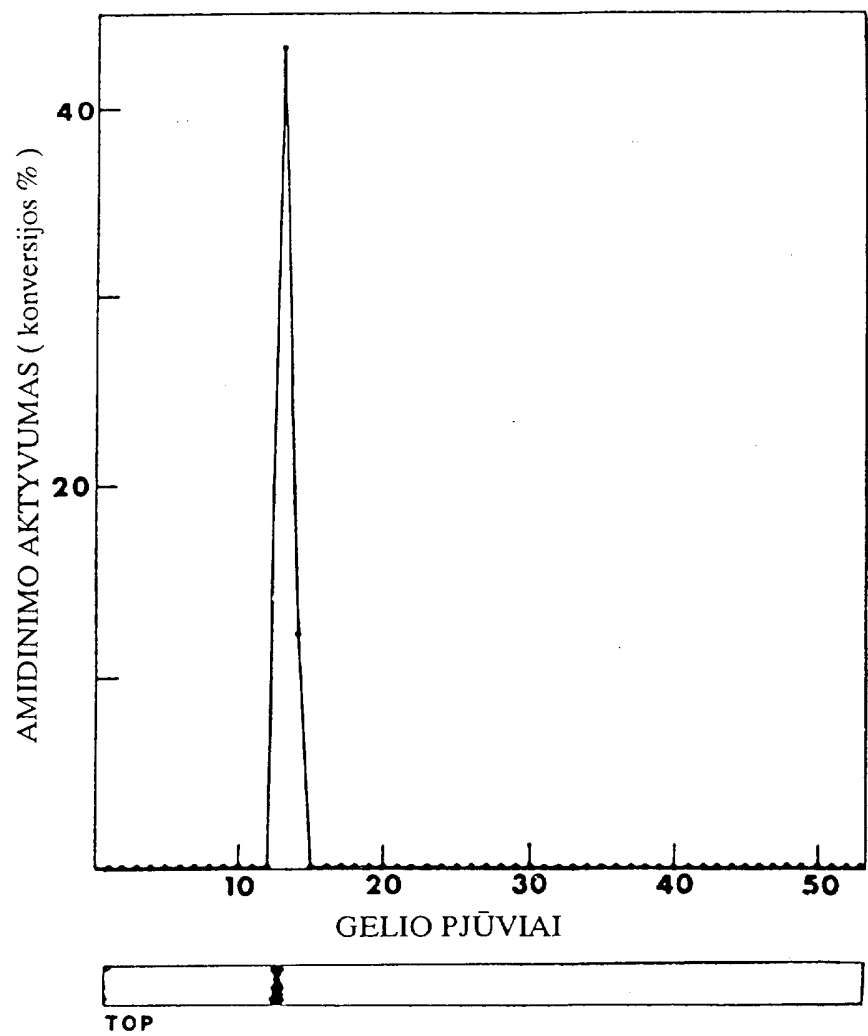


Fig.7

SUJUNGTO BALTYMO GENO SANDARA

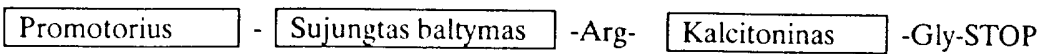


Fig.8

RP-HPLC: SUJUNGTO BALTAMO SKAIDYMAS TRIPSINU

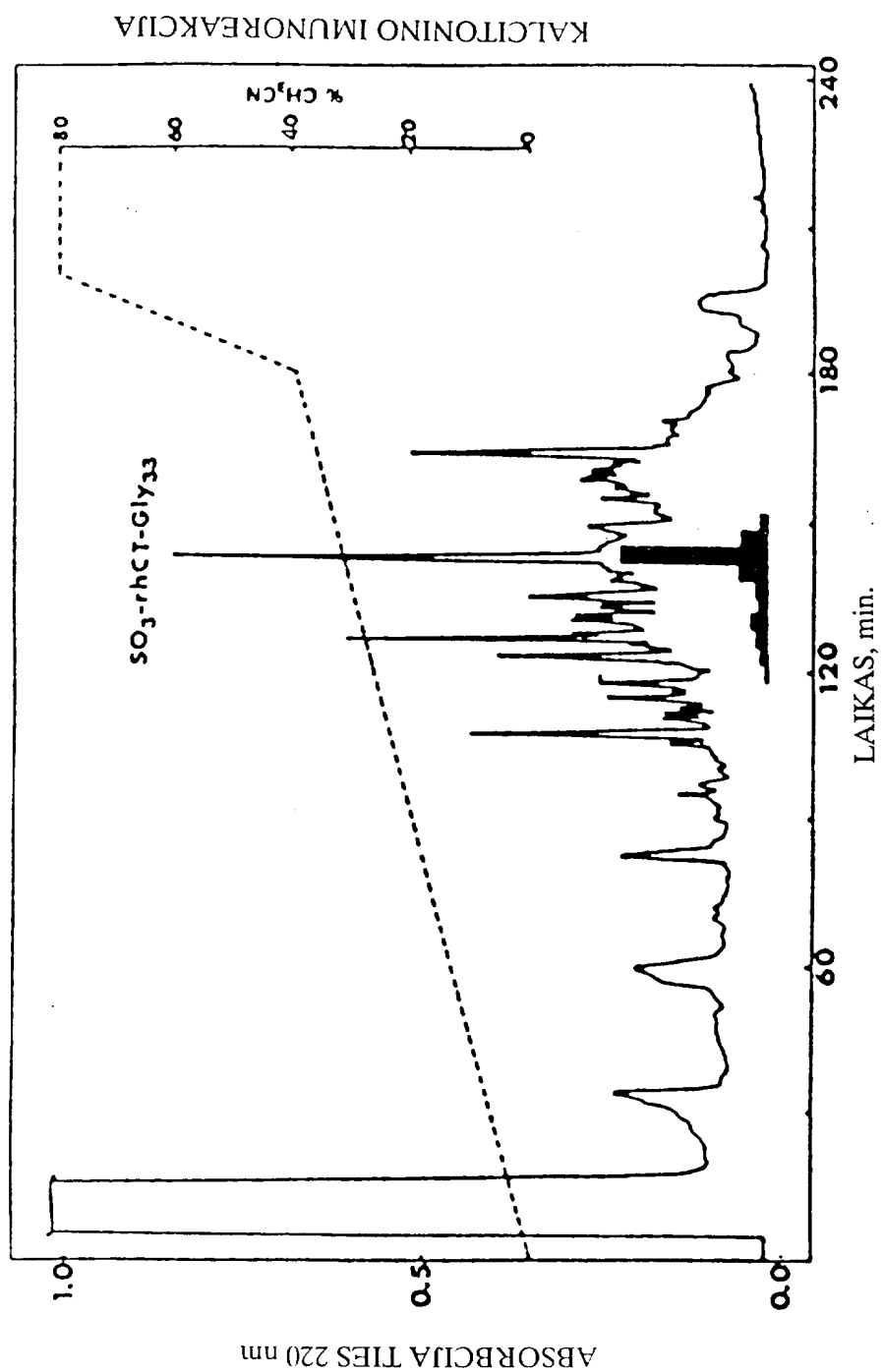


Fig.9
RP-HPLC: ALFA-AMIDINANTIS REAKCIJOS MIŠINYS

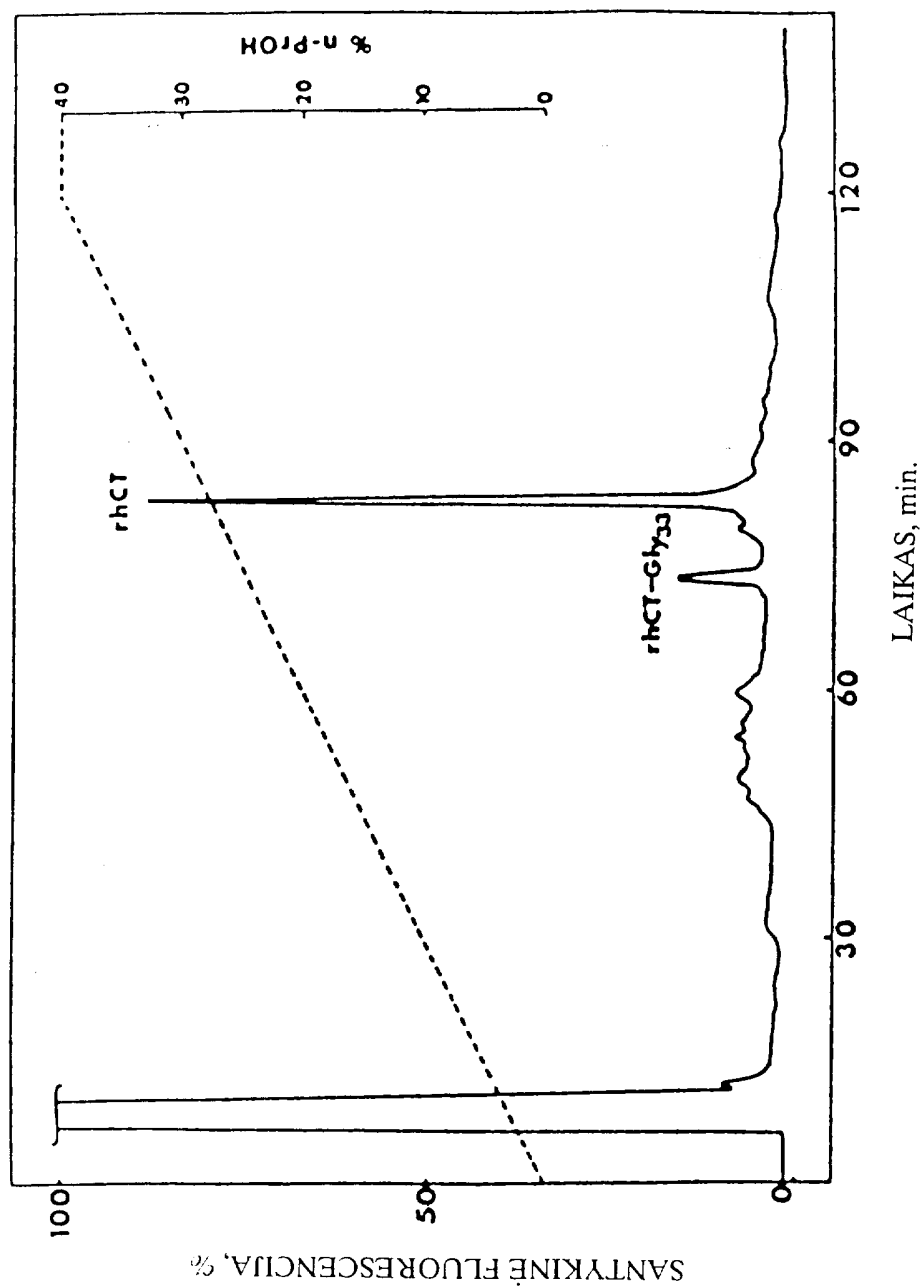


Fig.10
ŽMOGAUS REKOMBINANTINIO KALCITONINO RP-HPLC ANALIZĖ

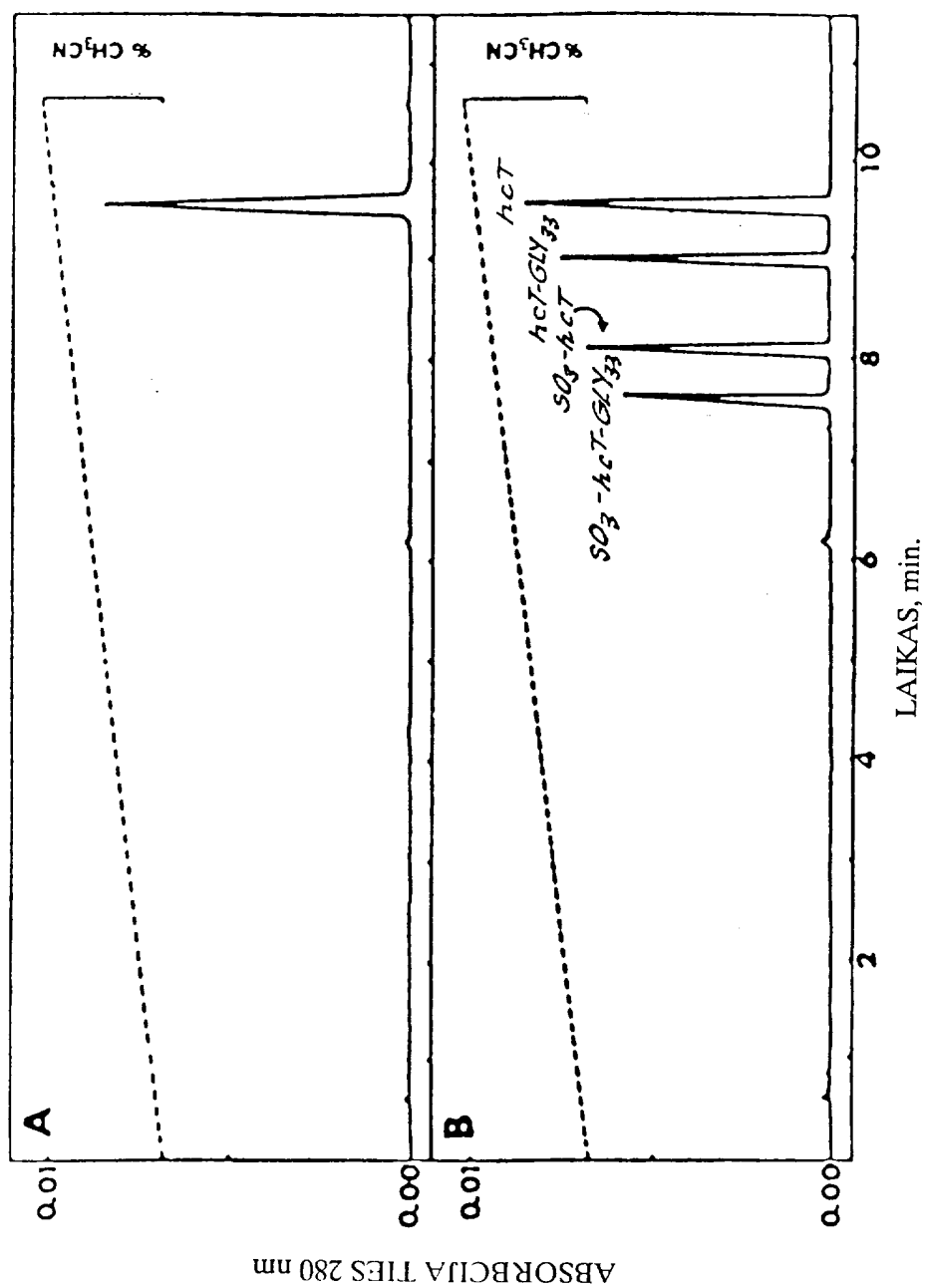


Fig.11

ŽMOGAUS REKOMBINANTINIO KALCITONINO SKAIDYMO TRIPSINU
PRODUKTŲ ANALIZĖ

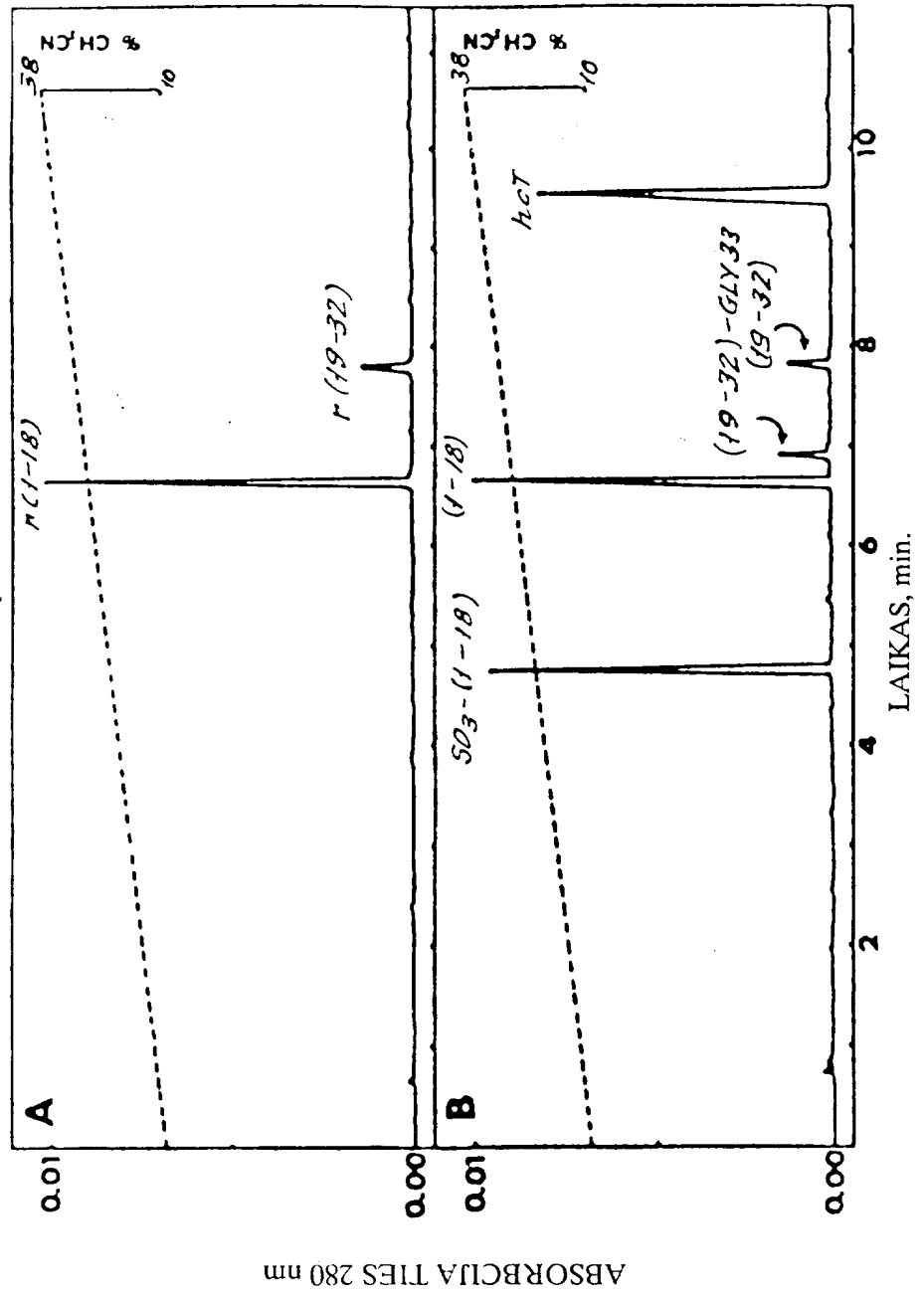


Fig.12

Sintetinio ir rekombinantinio žmogaus kalcitoninų (hCT) amino rūgščių kompozicija

Amino- rūgštis	Rekombinantinis hCT-Gly ₃₃	Rekombinantinis hCT	Sintetinis hCT	Likučiai
ASX	2.78	2.96	3.01	3
GLX	2.12	2.08	2.03	2
SER	1.03	0.80	0.78	1
GLY	4.97	4.11	4.18	4
HIS	0.97	0.99	1.06	1
ARG	0.00	0.00	0.00	0
THR	4.52	4.82	4.67	5
ALA	2.07	2.08	2.05	2
PRO	2.03	2.11	2.07	2
TYR	0.93	0.98	0.96	1
VAL	1.09	1.06	1.03	1
MET	1.00	0.99	0.98	1
CYS	1.58	1.82	1.78	2
ILE	1.01	1.02	1.01	1
LEU	2.15	2.13	2.10	2
PHE	2.92	3.00	3.07	3
LYS	1.03	0.99	1.00	1
TRP	N.D.	N.D.	N.D.	0
				<u>32</u>

BIOBANDYMAS

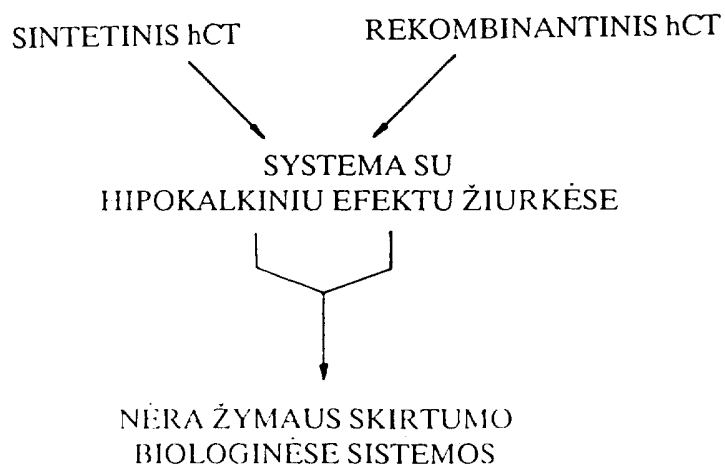


Fig.13

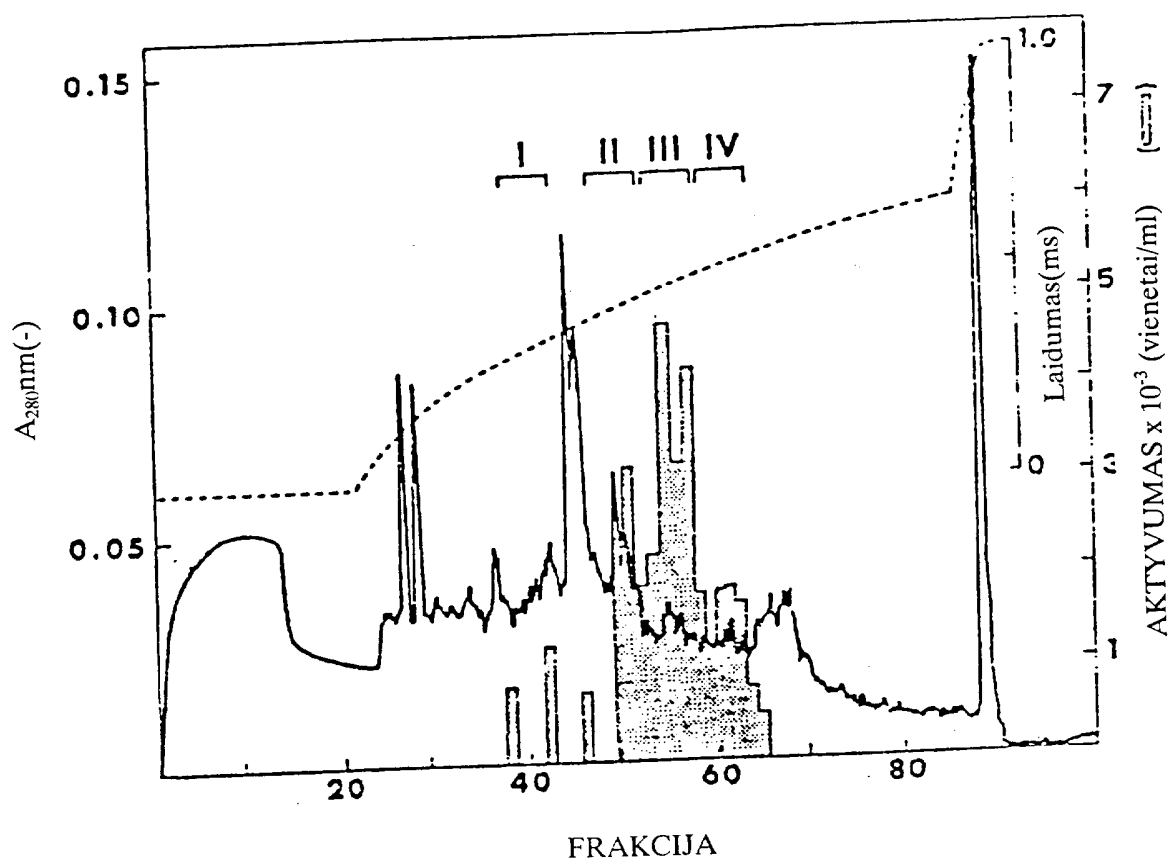


Fig.14

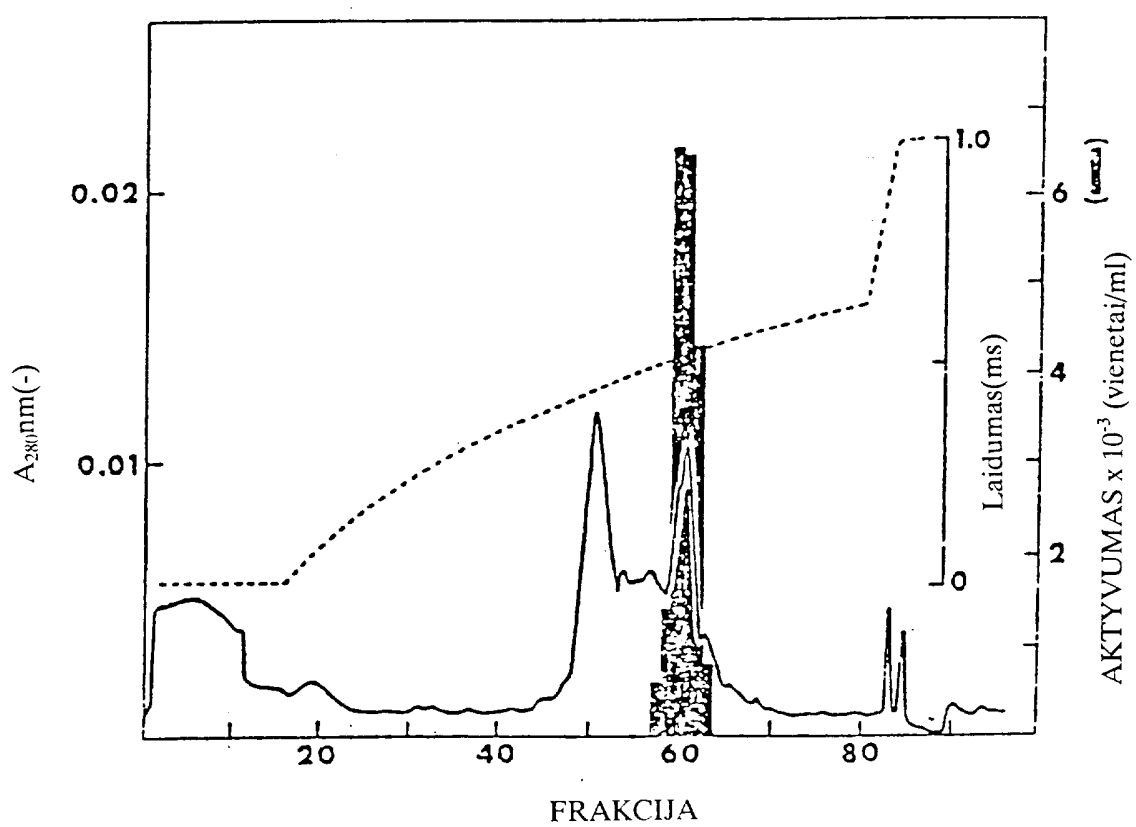


Fig.15

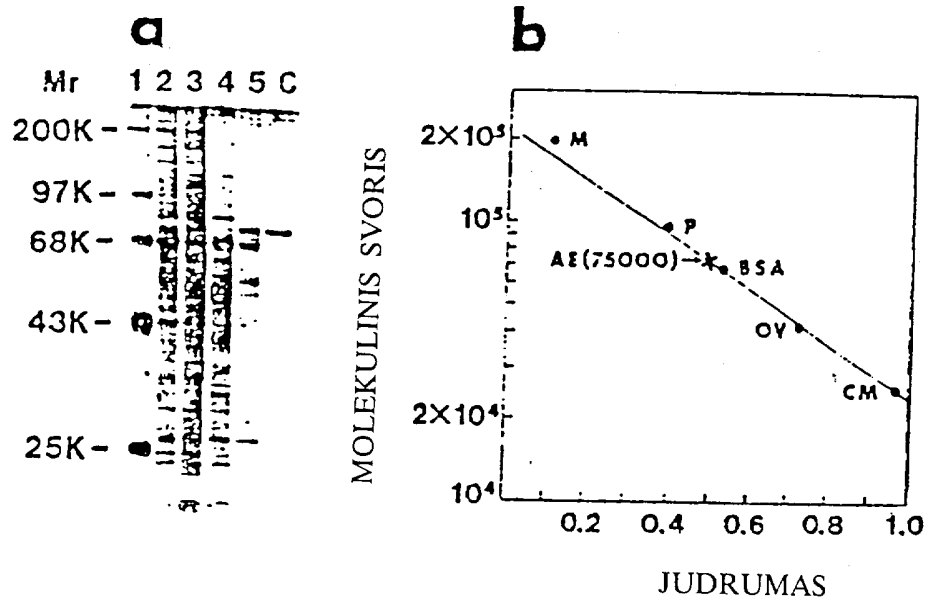


Fig.16

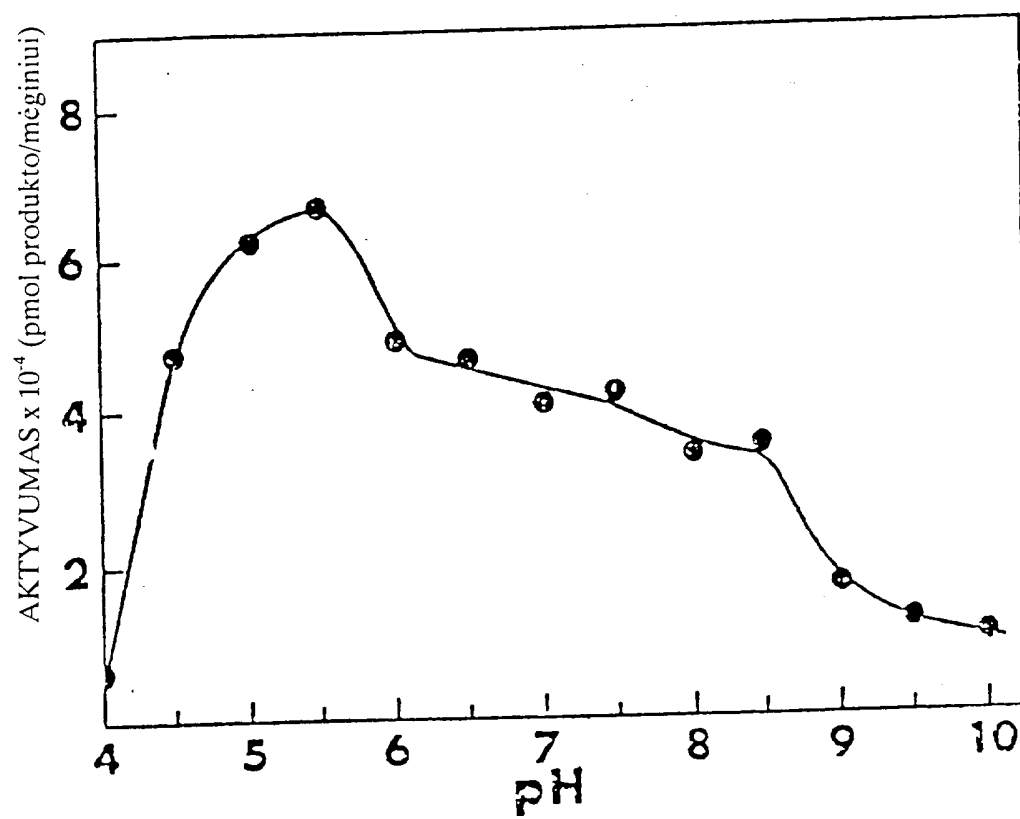


Fig.17

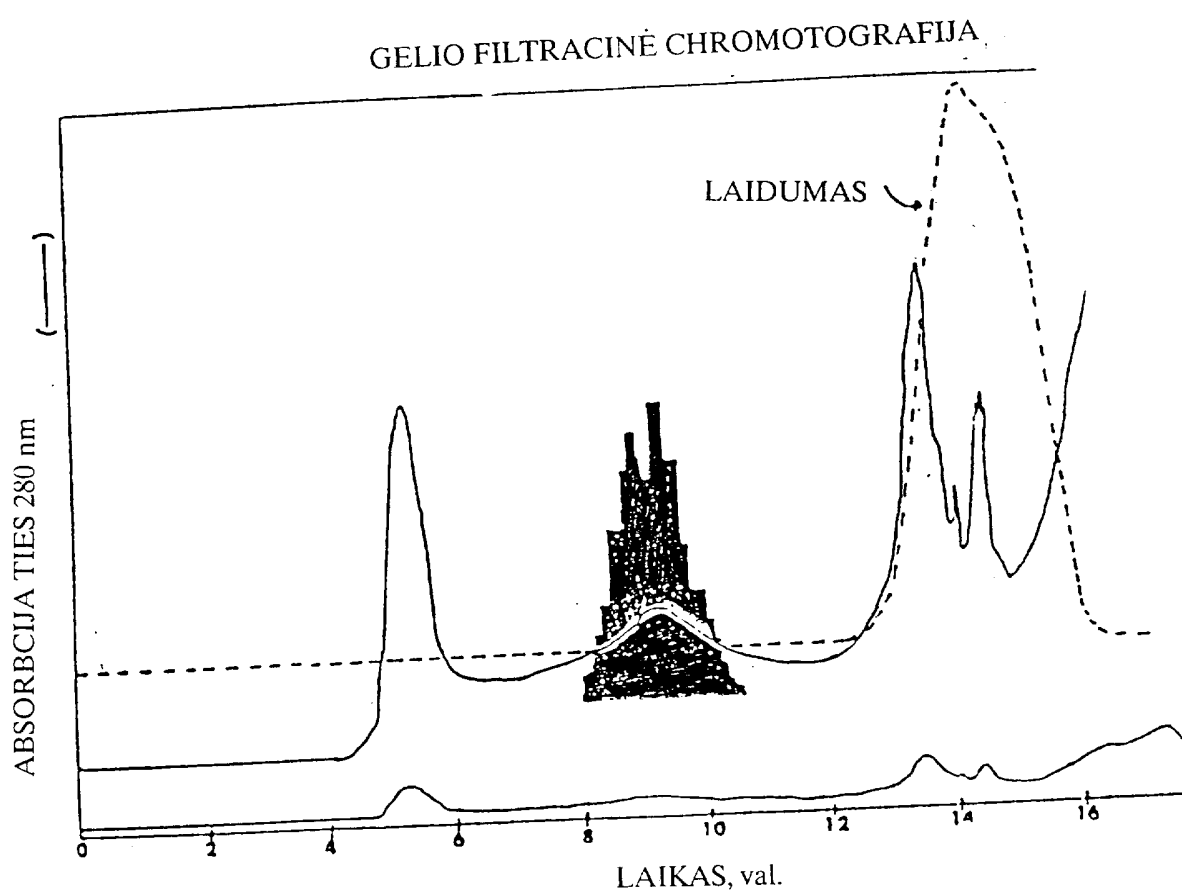


Fig.18

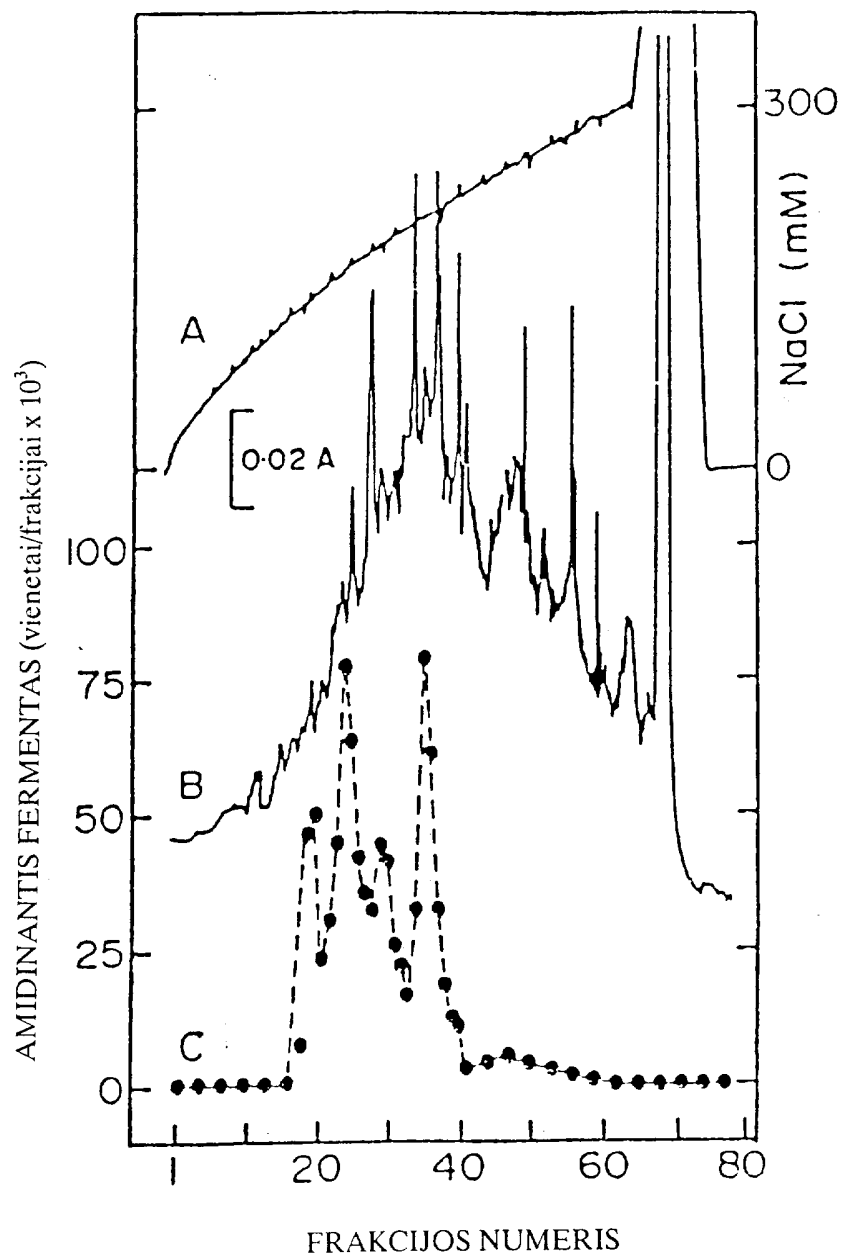


Fig.19

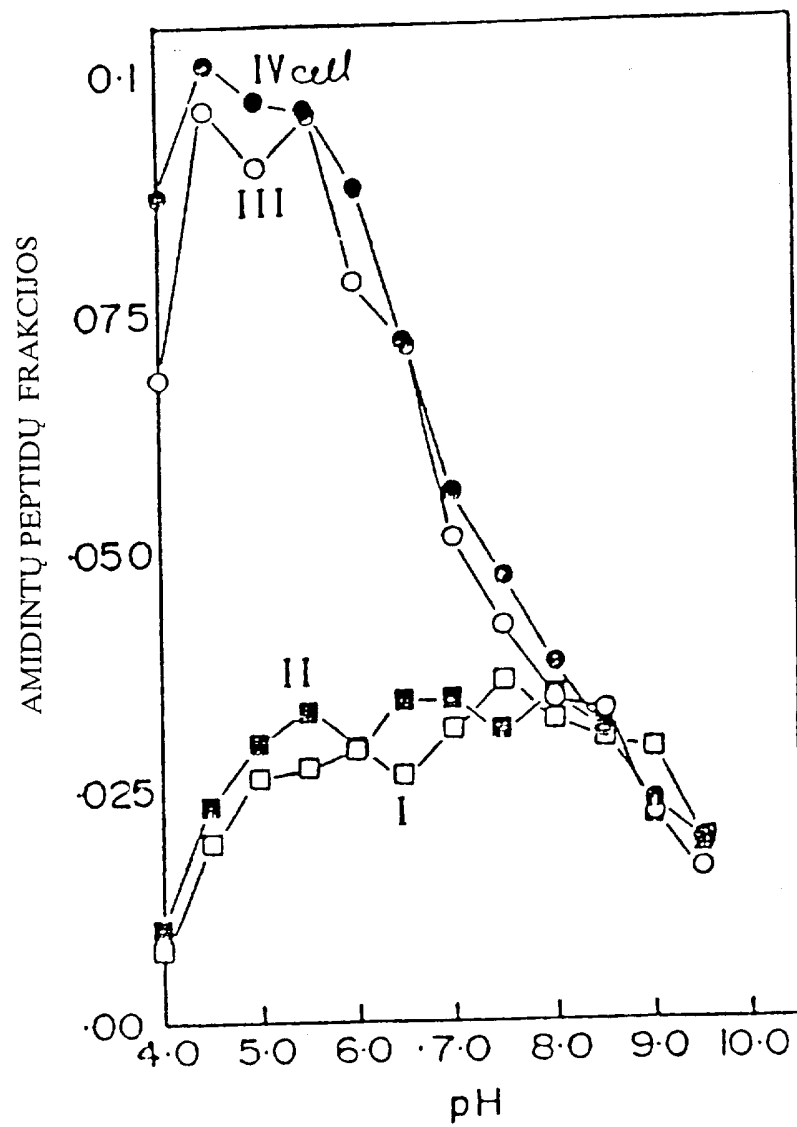


Fig.20

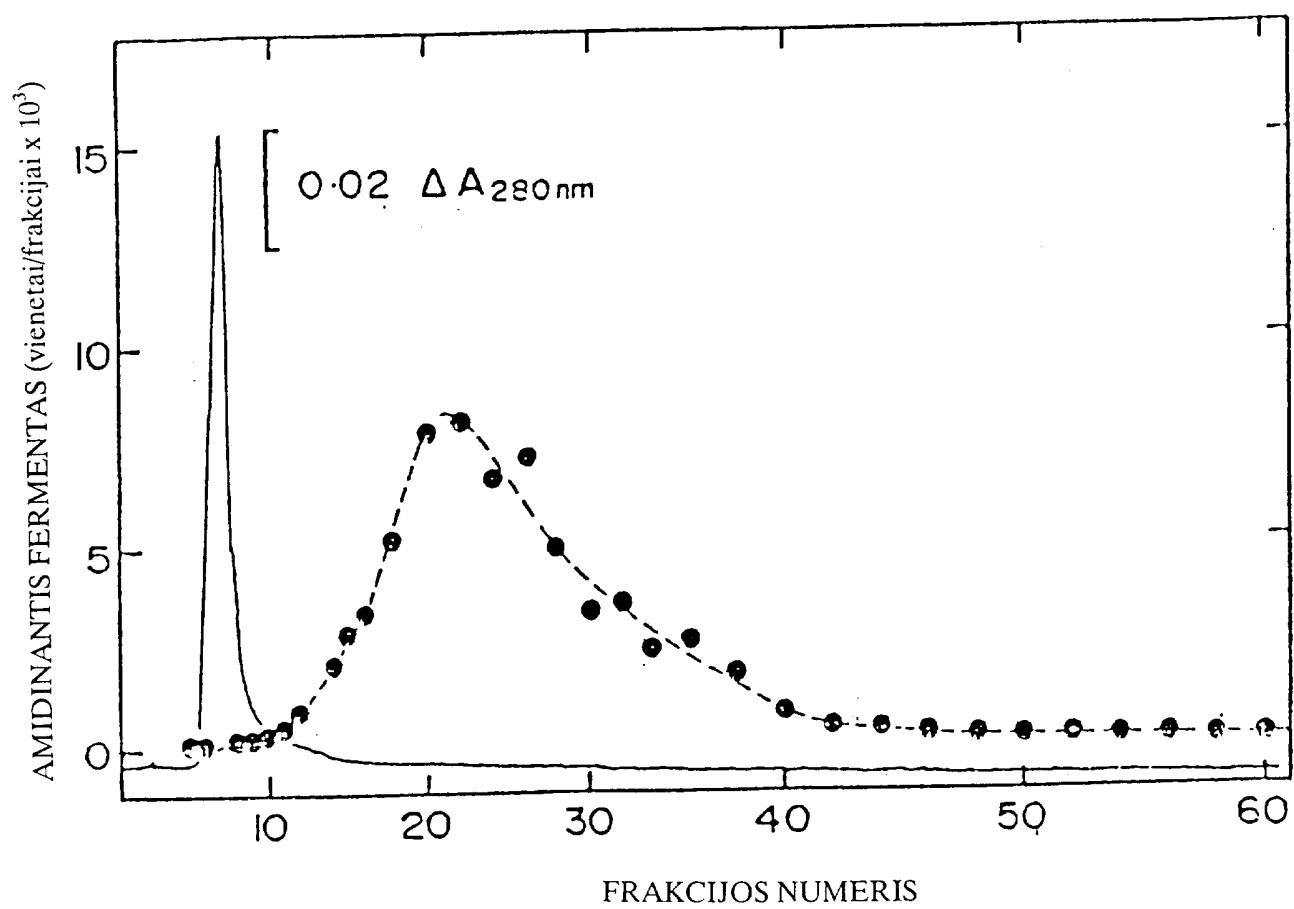
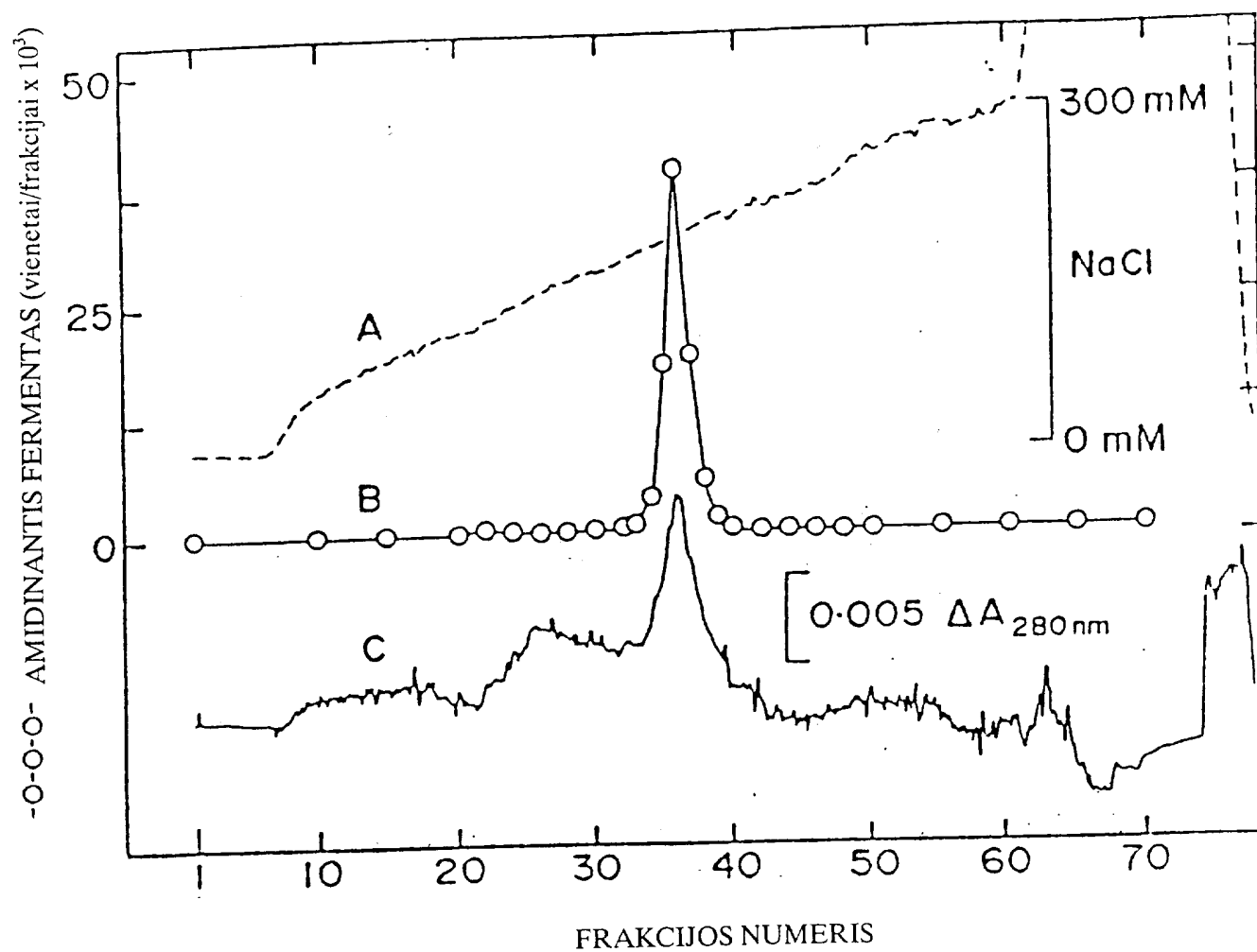


Fig.21



KAMBARIO TEMPERATŪRA

KOLONĖLĖ: VYDAC C18

POMPA: 30/30

A BUFERIS: 0,1%TFA

B BUFERIS: 0,08%TFA/80%CH₃CN

DETEKTORIUS: 0-0,2

BANGOS ILGIS: 220nm

GRAFIKO GREITIS: 10cm/val

FRAKCIONAVIMAS: 2min/mėg

BANDINYS: KARBOKSIMETILINTO AE

SKAIDYMO TRIPSINU PRO-

DUKTŲ MIŠINYS

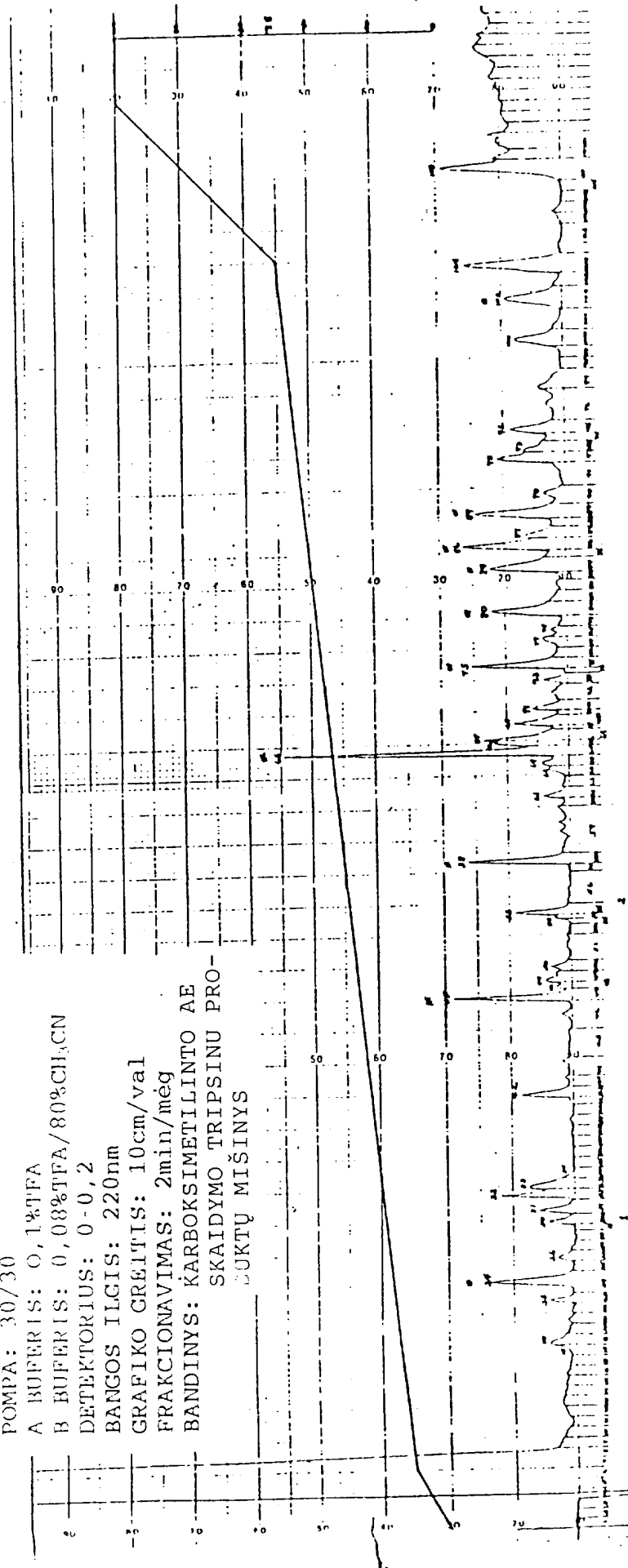


Fig.23