

- (11) Patent numeris: **4034**
- (21) Paraiškos numeris: **IP1543**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 07**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 09 25**
- (60) SU duomenys: **PCT/EP 91/00192, 1991 02 01**
- (31,32,33) Prioritetas: **40 03 149.7, 1990 02 03, DE 40 15 921.3, 1990 05 17, DE 40 15 922.1, 1990 05 17, DE 40 39 415.8, 1990 12 10, DE**
- (72) Išradėjas:
Thomas F. Meyer, DE
Johannes Pohlner, DE
Guenter Schumacher, DE
Carola Dony, DE
- (73) Patent savininkas:
MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e. V.,
Bunsenstrasse 10, D-3400, Goettingen, DE
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT
- (83) Mikroorganizmo deponavimas:
DSM 2102, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, DE
-
- (54) Pavadinimas:
Fermentinis rekombinantinių baltymų skaldymo būdas IgA-proteinaze, sulietas baltymas, rekombinantinė DNR, ląstelė

(57) Referatas:

Fermentiniam sulietų baltymų skaldymui ir šių sulietų baltymų norimų dalių gavimui, modifikuojama

(1) genoinžineriniais metodais tarpinė sritis, kuria sujungtos dvi sulieto baltymo dalys, šioje tarpinėje srityje yra bent viena IgA-proteinazės atpažinimo sritis, kurios aminorūgščių liekanų seka yra Y-Pro- · · I · -X-Pro, kur X yra bet kuri aminorūgštis liekana ir Y- gali būti viena arba kelios bet kokios aminorūgščių liekanos,

(2) gautas (1) stadijoje sulietas baltymas suskaldomas Ig A-proteinaze pažymėtoje simboliu · · I · atpažinimo srities vietoje,

(3) po suskaldymo gaunama viena arba kelios tikslinės sulieto baltymo dalys.

Išradimas susietas su specifiniu sekoms biotechnologijos būdu gautų baltymų skaldymo būdu, naudojant IgA-proteinazes (taip pat vadinamomis igazėmis), ir ypatingai su būdu, kuriuo gaunami prokariotuose rekombinantiniai baltymai arba peptidai, nuo kurių N-galo pašalinamos aminorūgščių liekanos.

Biotechnologijos pagalba gaunami baltymai, panaudojant mikroorganizmus, kurie lengvai kultivuojami ir iš kurių paprastais būdais išgryninami baltymai. Tam tinkami mikroorganizmai, pavyzdžiui, yra gramneigiamos bakterijos Escherichia coli, gramteigiamos bakterijos Streptococcus carnosus ir kepmo mielės - Saccharomyces cerevisiae. Bet, autentinių svetimų genų ekspresija tokiuose mikroorganizmuose dažnai turi trūkumus. Pavyzdžiui, E. coli transliacijos metu baltymuose esantis metioninas N-gale gamtiniuose baltymuose daugeliu atvejų efektyviai nuskeliamas proteinazėmis. Bet svetimų baltymų pirmos aminorūgšties liekanos baltymo N-gale atskeliama tik dalinai. Todėl tokių baltymų, kuriuose N-gale yra kita aminorūgšties liekana, nei metioninas, tinkamiausias gavimo būdas yra pirmiausia gauti sulietą baltymą ir po to jį suskaldyti specifine proteinaze.

Be to, priešingai nei autentiniams baltymams, sulieti baltymai turi privalumą - jie mikroorganizmo ląstelėje ekspresijos metu susirenka į intarpinius kūnelius, kuriuos lengvai galima atskirti nuo kitų ląstelės dalių ir todėl palengvėja tikslinio baltymo išskyrimas ir gryninimas. Iš kitos pusės, baltymai-nešikliai, kurie genų inžinerijos pagalba suliejami su tiksline baltymu, tikslinis sulietas baltymas įgauna atsparumą nespecifinei proteinolizei; ši svetimų baltymų proteolizės problema yra labai svarbi norint gauti mažus peptidus biotechnologijos būdu. Naudojant kitus baltymus-nešiklius, galima padaryti taip, kad tikslinis

baltymas būtų lokalizuotas tam tikrose ląstelės vietose, ten kur jie yra stabilūs ir/arba lengvai prieinami, o tai įgalina lengvai išgryninti tikslinius baltymus. Pagaliau, baltymai nešikliai gali pasižymėti specifinėmis savybėmis, jas panaudojant, galima efektyviai išgryninti sulietus baltymus, pavyzdžiui, afininės chromatografijos pagalba. Daugeliu atvejų konstruojamas toks sulietas baltymas, kai jo N-gale yra baltymas nešiklis, o C-gale yra tikslinis baltymas. Bet, kai kuriais atvejais, gali būti naudingas ir atvirkščias variantas arba tikslinis baltymas yra suliejamas su dviem baltymais tikslinio baltymo galuose. Be to, gali būti naudingas toks variantas, kai tikslinis baltymas atvirkštine tvarka yra pakartojamas sulietame baltyme.

Norint gauti laisvą tikslinį baltymą iš sulieto baltymo, reikia atskelti kovalentiškai sujungtus baltymus. Tai galima atlikti naudojant cheminius arba biocheminius (fermentinius) būdus. Bet dažnai tai ribojama mažu iki šiol esančių būdų specifiškumu; nes norint gauti tikslinį baltymą, svarbu, kad skėlimas būtų atliktas dviejų komponentų sujungimo vietoje, t.y., tarpinėje srityje, bet jokia būdu papildomai, ne tikslinio baltymo viduje. Todėl komponentų skaldymas turi būti labai specifiškas.

Iki šiol naudojami cheminiai sulietų baltymų skaldymo metodai, pavyzdžiui, skaldymas cianido bromidu per metionino liekaną vidury baltymo ir skėlimas tarp Asp-Pro rūgštinėje terpėje skruzdžių rūgštimi. Bet šie būdai tinka tik tada, kai specifinė skėlimo vieta nepasikartoja tiksliniame baltyme. Bendrai, biocheminiai skaldymo būdai yra palankesni, nei cheminiai, nes biocheminis skaldymas vykdomas fiziologinėmis arba, blogiausiu atveju, chemiškai

švelniomis reakcijos sąlygomis, nepažeidžiant tikslinio baltymo.

5 Biocheminiuose sulietų baltymų skaldymo būduose naudojamos specifinės proteinazės. Pavyzdžiui, tripsinas skelia viduje esančią peptidinę jungtį tarp arginino arba lizino baltymo viduje. Specifiškumas gali būti padidintas iš anksto cheminiu būdu modifikuojant liziną, skėlimas tokiu atveju vyks tik po arginino
10 liekanos. Kita biotechnologijoje naudojama proteinazė yra klostripainas; šis fermentas skelia peptidinę jungtį tarp arginino ir bet kokios kitos, už jo esančios, aminorūgšties liekanos. Iki šiol naudojamų sulietų baltymų fermentinių skaldymo būdų apžvalga
15 parašyta G. A. O. Ma ([D.M. Clover, E.]: DNR cloning III, IRL Press, Oksford, Vashington, 1987). Fermentiniai skaldymo būdai turi apribojimus, nes specifinė skėlimo vieta taip pat gali būti ir tiksliniame baltyme. Todėl sulietų baltymų biocheminiam skaldymui labiausiai tinka tokie fermentai, kurių
20 specifiškumas apspręstas ne viena aminorūgšties liekana, bet tam tikra atpažįstama aminorūgščių liekanų seka; tikimybė, kad pasikartos atpažinimo seka, kuri turi būti tarp sulietų komponentų, tiksliniame baltyme tuo mažesnė, kuo daugiau aminorūgščių liekanų yra atpažinimo ir skėlimo sekoje.

Žinomos proteinazės, kurios labai specifiškai skelia baltymus. Nors dauguma tokių specifinių proteinazių
30 (kurios yra, pavyzdžiui, komplementinėje žmogaus kraujo krešėjimo sistemoje) skelia tam tikroje substrato vietoje; bet šią skėlimo vietą perkėlus į kitą baltymą (pavyzdžiui, sulietą baltymą) tokios proteinazės, kaip taisyklė, nesugeba skelti baltymo. Tai apsprendžiama
35 įvairiomis priežastimis, pavyzdžiui, šios proteinazės atpažįsta antrinę ir tretinę substrato struktūrą arba

sulietame baltyme skėlimo sritis tampa neprieinama fermentui.

5 Tarp specifinių, atpažįstančių sekas, proteinazių, kurios iki šiol naudojamos sulietų baltymų skaldymui, yra faktorius Xa. Ši proteinazė skelia specifinę seką Ile-Glu-Gly-Arg-.|-X, kur .|- yra skėlimo vieta ir X - bet kokia aminorūgšties liekana. Bet ir ši proteinazė nėra universali sulietų baltymų skaldymui, kuriuose 10 tarpinėje srityje yra atpažinimo ir skėlimo vieta; dažnai tokie substratai (t.y., sulieti baltymai, kuriuose yra tikslinis baltymas kovalentiškai sujungtas su baltymu nešikliu) visai neskaldomi, skaldomi tik labai silpnai arba skaldomi, kai sulieti baltymai yra 15 ištirpę.

Gaunant rekombinantinius baltymus prokariotuose yra labai svarbus efektyvus sulietų baltymų skaldymas. Klonavimui DNR sekoje būtinas startinis kodonas AUG 20 prieš koduojamą baltymo seką. Dėl to prokariotuose, pavyzdžiui, E. coli, ekspresuojami baltymai, kuriuose pirma aminorūgšties liekana yra metioninas.

25 Daugumoje atvejų būtina gauti rekombinantinius baltymus, kuriuose pirma aminorūgšties liekana nebūtų metioninas. Tokius baltymus, sintetinus prokariotuose, galima gauti metionin-specifinės peptidazės pagalba, kuri atskelia metioniną, esantį baltymo N-gale. Bet šis būdas yra imlus, nes atskėlimą 30 galima patikrinti tik nustatant baltymo N-gale esančią aminorūgšties liekaną. Be to, atskirti baltymą, kurio N-gale yra metioninas, nuo baltymo su nuskeltu metioninu yra labai sunku arba tai atliekama nepilnai, nes šie baltymai turi beveik tokią pat molekulinę masę.

35

PCT paraiškoje W084/02351 atskleistas aminorūgščių liekanų, esančių sulietų baltymų N-gale, atskėlimas.

Daugelis aminorūgščių liekanų, esančių baltymo N-gale viena po kitos atskeliamos egzopeptidaze, pažeidautina leicininpeptidaze, iki sekos X-Pro. Seka X-Pro atskeliama nuo produkto arba dviem arba viena reakcijos stadija, naudojant postprolin-dipeptidil-aminopeptidazę (EC 3.4.14). Bet šis būdas turi trūkumą, nes, skeliant po vieną aminorūgšties liekaną iš N-baltymo galo, susidaro ne vienas produktas, o produktų mišinys, kuriame be tikslinio produkto yra baltymas, kurio N-gale yra ne visos aminorūgščių liekanos atskeltos.

Kitas fermentinio skaldymo būdas yra pateiktas Europos patente Nr. 0 020 290. Šiame sulietų baltymų, kuriuose yra atitinkama atpažinimo seka, skaldymo būde yra naudojama kolagenazė. Po skaldymo kolagenaze, kitas sulieto baltymo aminorūgščių liekanas galima pašalinti antru fermentiniu skaldymu. Buvo nustatyta, kad kolagenazė ir kitos endopeptidazės pasižymi nedideliu specifiškumu (žiūr. Biocim. Biophys. Acta 271 (1972), 133-144). Be to, kolagenazė yra aktyvi, kai baltymai turi specifinę kolagenazei erdvinę struktūrą.

Žinomas jau minėto Xa faktoriaus panaudojimas sulietų baltymų N-galo skaldymui. Bet ir šis būdas, be jau paminėtų efektyvaus skėlimo problemų, turi kitus trūkumus, tokius kaip: matomai šis fermentas atpažįsta ir skelia vidines baltymo sritis. Be to, reikia išgryninti faktorių Xa iš raguočių serumo, o skaldant juo baltymus, kurie yra naudojami medicinos praktikoje, po to reikia papildomai juos valyti ir analizuoti, tam kad įrodyti, jog juose nėra patogeninių faktorių arba virusų.

Įvairios patogeninės bakterijos (pavyzdžiui, rūšies Neisseria, tokios kaip Neisseria gonorrhoeae ir Neisseria meningitidis arba rūšies Haemophilus, tokios kaip Haemophilus influenzae ir Haemophilus

aegypticus), kurios auga žmogaus gleivinėje, produkuoja proteinazes, kurios išsiskiria savo sekomis, artimomis giminingomis proteinazėms, kurios yra specifinės žmogaus IgAI, todėl jos vadinamos IgA-proteinazėmis arba igazėmis. Imunoglobulinas IgAI yra svarbus sekrecinio imuninio atsako komponentas, kuris apsaugo nuo tokių patogeninių mikroorganizmų infekcijos (Apžvalga: Kornfeld ir Plant, Rev. Infect. Dis. 3 (1981), 521-534). Be to, IgA-proteinazė skaldo savo probaltymą. IgA-proteinazės iš *Neisseria gonorrhoeae* MSLI sintezė autentiiniame bakterijų kamiene ir gramneigiamose šeimininko ląstelėse smulkiai aprašyta (VFR patentas Nr. 36 22 221.6).

IgA-proteinazė skelia, kaip aprašyta Pohlner (Nature 325 (1987), 458-462), pavyzdžiui, sekančias atpažinimo sekas:

1. Pro-Ala-Pro-.|. -Ser-Pro,
2. Pro-Pro-.|. -Ser-Pro,
3. Pro-Pro-.|. -Ala-Pro,
4. Pro-Pro-.|. -Thr-Pro.

Simbolis .|. nurodo IgA-proteinazės skėlimo vietą. IgA-proteinazės klonavimas aprašytas Pohlner ir kt., 1987.

Todėl šio išradimo tikslas buvo patobulinto sulietų baltymų biocheminio (fermentinio) skaldymo būdo sukūrimas, kurio genų inžinerijos būdu gautus sulietus baltymus, kurie sudaryti iš bet kokių komponentų ir specifinės skėlimo vietos tarpinėje srityje, būtų galima naudoti kaip substratus, norint gauti didelės išeigos norimus baltymus ir kad šis būdas būtų atsikartojantis.

- Šis uždavinys buvo sprendžiamas genų technologijos metodu, įvedant į tarpinę sulietų baltymų sritį atpažinimo seką arba skėlimo vietą Pro-.|. -X-Pro, 5 specifiaiškai skaldant ją IgA-proteinaze pažymėtoje simboliu .|. vietoje, kur X pageidaujama, kad būtų Ser, Thr, Ala ir ypatingai pageidaujama, kad būtų Ser arba Thr, bet taip pat gali būti ir kitokios aminorūgščių liekanos.
- 10 Todėl šio išradimo tikslas yra fermentinio sulietų baltymų skaldymo būdas ir tikslinis šių sulietų baltymų gavimas, kuris besiskiria tuo, kad
- 15 (1) tarpinė sritis, kuria sujungtos dvi sulieto baltymo dalys, modifikuojamos genų inžinerijos pagalba, taip, kad šioje srityje būtų bent viena IgA-proteinazės atpažinimo vieta, kurioje yra šios aminorūgščių liekanos Y-Pro-.|. -X-Pro, kur X gali būti bet kokia 20 aminorūgšties liekana ir Y - viena arba kelios bet kokios aminorūgšties liekanos,
- (2) gautas (1) stadijos metu sulietas baltymas skaldomas IgA-proteinaze simboliu .|. pažymėtoje 25 vietoje atpažinimo srities vietoje ir
- (3) po skaldymo gaunamos viena arba kelios sulieto baltymo norimos dalys.
- 30 Terminas IgA-proteinazė pagal šį išradimą apima proteinazes, kurios specifiaiškai skelia IgA, kurios yra aprašytos, pavyzdžiui, Rev. Infekt. Dis. 3 (1981), 521-534. Tinkamos ir rekombinantinės IgA-proteinazės, kurios aprašytos, pavyzdžiui, paraiškoje VFR patentui 35 Nr. 36 22 221, Proc. Natl. Acad. Sci JAV 79 (1982), 7881-7885, Proc. Natl. Acad. Sci JAV 80 (1983), 2681-

2685, Nature 325 (1987), 458-462 ir EMBO Journ. 3 (1984), 1595-1601.

Pagal šio išradimo būdą atliekamas sulietų baltymų tarpinės srities modifikavimas, pagrindinai, taip, kad į sulieto baltymo tarpinę sritį įterpiama nukleotidų seka, kuri koduoja IgA-proteinazės atpažinimo vietą, ši nukleotidų seka įterpiama prieš arba/ir po vieno arba kelių DNR segmentų, koduojančių norimų sulietų baltymų dalis. Šiam tikslui, pagrindinai, naudojamos cheminiu būdu susintetintos nukleotidų sekos.

Nelauktai buvo nustatyta, kad šio išradimo būdas ypatingai tinkamas taip pat ir sulietų baltymų, kurie neturi (t.y., prieš tarpinės srities modifikavimą) jokios IgA-proteinazės atpažinimo vietos, skaldymui.

IgA-proteinazės atpažinimo vieta šiam išradimo būdui yra nustatyta aminorūgščių seka Y-Pro-.-X-Pro. Kur X gali būti bet kokia aminorūgštis liekana ir Y - gali būti viena arba kelios bet kurios aminorūgščių liekanos. Pageidautina, kad X būtų Ser, Thr arba Ala ir ypatingai pageidautina, kad būtų Ser arba Thr. Y gali būti įvairios aminorūgščių sekos, kurios baigiasi Pro, Pro-Ala, Arg-Pro, Pro-Arg-Pro, Ala-Pro-Arg-Pro arba Pro-Ala-Pro-Arg-Pro.

Todėl šio išradimo būdas atskleidžia tai, kad IgA-proteinazės atpažinimo vietą kartu su skėlimo vieta Pro-.-X-Pro galima įterpti į sulieto baltymo tarpinę sritį, pavyzdžiui, tarp baltymo-nešiklio ir norimo baltymo, panaudojant IgA-proteinazę skelti ją, gaunant norimą baltymą. Skėlimo vietoje Pro-.-X-Pro yra įterpiamas X padėtyje, pagrindinai, Ser, Ala arba Thr. Tolesniam nurodytoje vietoje skaldymo optimizavimui galima įterpti prie skėlimo vietos kitas specialias aminorūgščių liekanas, ypatingai Pro.

Ypatingai pageidautinos aminorūgščių sekos:

- 5 a) Pro-Ala-Pro.|.Ser-Pro,
- b) Pro-Pro.|.Ser-Pro,
- c) Pro-Arg-Pro-Pro.|.Ala-Pro,
- 10 d) Pro-Pro.|.Thr-Pro,
- e) Ala-Pro-Arg-Pro-Pro.|.Thr-Pro arba
- 15 f) Pro-Ala-Pro-Agr-Pro-Pro.|.Thr-Pro.

Pritaikant šio išradimo sulietų baltymų skaldymo būdą, kuriuose norimas baltymas yra prijungtas po baltymo-nešiklio, po IgA-proteinazės skėlimo, susidaro baltymas, kurio N-gale yra X-Pro seka. Ši seka, kaip
20 norimo baltymo dalis, gali būti naudinga, nenaudinga arba neesminė. Naudinga ši seka tada, kai genų inžinerijos būdu gautas norimas baltymas ir gamtinis savo N-gale turi atitinkamas aminorūgščių liekanas X-Pro. Svarbūs biotechnologijoje baltymai, kurių N-gale
25 yra X-Pro seka, sutinkami gamtoje.

Šio išradimo būdas, priešingai, nei kiti žinomi sulietų baltymų skaldymo būdai, turi privalumus: jį galima, nelauktai, universaliai taikyti sulietų baltymų, kurių
30 tarpinėje srityje yra nurodyta skėlimo vieta, skaldymui, jį taip pat galima naudoti netirpių, tirpių, lokalizuotų ląstelės membranoje ir surištų ląstelėje sulietų baltymų skaldymui. Be to, kaip ypatingas šio būdo privalumas yra galimybė sulietus baltymus
35 skaldyti, kai jie yra gaunami mikroorganizmuose kaip intarpiniai kūneliai, kuriuos yra lengva išgryninti. Kitas šio metodo privalumas yra tas, kad naudojama

skėlimui fermentą - igazę, galima gauti be didelių išlaidų iš nepatogeninių bakterijų kultūrinio skysčio.

5 IgAs skėlimo vietos įterpimas į tarpinę sulietų baltymų sritį atliekamas genų inžinerijos pagalba. Taip, pavyzdžiui, nukleotidų seką arba nukleotidinę seką, koduojančią skėlimo vietą arba jos dalį, galima cheminiu būdu susintetinti ir įterpti žinomais genų inžinerijos metodais tarp baltymo-nešiklio DNR dalimis ir norimo baltymo. Atitinkamai galima taip pat įterpti gamtines nukleotidų sekas, kurios koduoja tinkamą skaldymui vietą arba jos dalį. Genas, koduojantis sulietus baltymus įterpiamas pagrindinai taip, kad būtų jo ekspresija kontroliuojama (pagrindinai indukcijos) 10 promotoriumi, taip kad atitiktų norimus sulietų baltymų sintezės reikalavimus. Sulietų baltymų sintezei galima naudoti prokariotinius arba eukariotinius (kaip augalinės, taip ir gyvulinės kilmės) recipientus; bet galimi recipientai, kurie neturi ląstelės sistemos. 15 Pasirenkami baltymai-nešikliai gali turėti įvairias funkcijas, priklausomai nuo to, kokias savybes jie turi suteikti sulietiems baltymams, pernešimo funkcijas, savybes, kurios palengvina sulietų baltymų gryninimą arba savybes, kurios padidina sulietų baltymų stabilumą 20 ir kitas. Tinkamiausi baltymai-nešikliai yra aiškinami žemiau.

Atitinkamas šio išradimo sulietų baltymų skaldymo būdas vykdomas IgAs pagalba, kuri gaunama iš nepatogeninio bakterijų kamieno superproducento, išgryninant ją iš kultūrinio skysčio (žiūr., pavyzdžiui, VFR patentą Nr. 30 36 22 221).

Šio išradimo būdą galima naudoti tiek preparatyviniams, 35 tiek ir analitiniams tikslams. Šio būdo pagalba galima biotechnologijos metodais gauti svarbius baltymus, kurie, pavyzdžiui, gali būti pritaikyti medicinos

praktikoje, moksliniuose tyrimuose, aplinkos išsaugojimui, pramoniniuose procesuose arba produktuose. Naudojant analitiniams tikslams su kitomis tinkamomis ekspresijos sistemomis, šis būdas gali būti naudojamas, pavyzdžiui, standartiniam genų suliejimui tirti.

Pageidautinas šio išradimo būdo, skirto fermentiniam sulietų baltymų skaldymui, gaunant norimo sulieto baltymo dalis realizavimas, besiskiriantis tuo, kad

(1) ląstelė transformuojama su rekombinantine DNR arba rekombinantiniu nešikliu, kur DNR arba nešiklio sudėtyje yra bent viena geno, koduojančio sulietą baltymą, kuriame yra bent IgA-proteinazės atpažinimo vieta tarpinėje sulieto baltymo dalyje, kopija,

(2) transformuotos ląstelės auginamos tam tinkamoje terpėje,

(3) pasiekama geno, koduojančio sulietą baltymą, ekspresija transformuotoje ląstelėje,

(4) sulietas baltymas suskaldomas IgA-proteinaze ir

(5) išskiriamos viena arba kelios tikslinės sulieto baltymo dalys.

Sulieto baltymo skaldymą IgA-proteinaze galima atlikti kultūriniame skystyje po ląstelių lizavimo arba/ir po dalinio arba ląstelių baltymų visiško pašalinimo.

Be to, geriausia skaldyti sulietą baltymą, geriau prokariotų ekspresijos produktą, imobilizuotą žinomais specialistui imobilizacijos metodais, pavyzdžiui, aprašytais Europos patente Nr. B 0 141 223 arba Europos patente Nr. B 0 141 224, IgA-proteinaze.

Ypatingai pageidaujama naudoti šio išradimo būdą, norint gauti rekombinantinius baltymus arba peptidus be metionino N-baltymo gale iš sulietų baltymų arba
 5 peptidų, kuriuose yra aminorūgščių liekanų seka Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A, kur X yra bet kokia aminorūgštis liekana, pageidautina, kad Thr, Ala arba Ser, Y - viena arba kelios bet kokios aminorūgščių liekanos, pageidautina, jei X yra Thr arba Ala, tai Y gale turėtų
 10 būti Pro, jei X yra Ser, tai Y gale turėtų būti Pro-Ala arba Pro-Pro, ir A yra bet kokia aminorūgščių liekanų seka. Sulietas baltymas arba peptidas skaldomi IgA-proteinaze, gaunamas skėlimo produktas, kurio aminorūgščių liekanų seka yra: X-Pro-A. Pavyzdžiui,
 15 rekombinantinių baltymų iš prokariotų be metionino baltymo N-gale gavimo, pagal šį būdą, yra sekančios stadijos:

(1) prokariotinės ląstelės transformacija genu, kuris
 20 koduoja baltymą arba peptidą, kuriame yra aminorūgščių liekanų seka Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A, kur X, Y, A yra tokios, kaip apibrėžtos aukščiau,

(2) transformuotų ląstelių auginimas tam tinkamoje
 25 terpėje ir transformuoto geno ekspresija,

(3) ekspresijos produkto, gauto iš transformuotų ląstelių, kuriame yra aminorūgščių seka Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A, skaldymas IgA-proteinaze,
 30

(4) gauto po skaldymo produkto, kuriame yra aminorūgščių liekanų seka X-Pro-A, bet nėra baltymo N-gale metionino.

35 Šiuo išradimo būdu nelauktai galima gauti su didele išeiga ir aukštu specifiškumu viena stadija baltymus, kuriuose N-gale nėra metionino, kurių N-galo

aminorūgščių seka yra X-Pro, kur X pageidautina, kad būtų Thr, Ala arba Ser.

5 Sulieto baltymo nešiklio Y dalis yra aminorūgščių seka, mažiausiai iš vienos, pageidautina iki 100 liekanų, ypatingai tinkama, kai yra nuo 1 iki 50 aminorūgščių liekanų, jos gale yra IgA-proteinazės atpažinimo nuskelta seka. Jei X yra Ser, tai Y gale turėtų būti Pro-Ala seka arba Pro. Jei X yra Thr arba Ala, tai Y 10 gale turėtų būti Pro, ypatingai gerai, kai Arg-Pro, Pro-Arg-Pro arba Ala-Pro-Arg-Pro.

Ypatingai pageidaujamas variantas yra toks, kai Y yra 5 aminorūgščių liekanos, šios sekos gale turėtų būti Pro-Ala-Pro-Arg-Pro. Vis dėlto šio išradimo būde naudojamos 15 visos IgA-proteinazės skėlimo vietos.

Y nešiklio dalyje gali būti ir kitos bet kokios aminorūgščių liekanos, paprastai iki 100 liekanų, 20 ypatingai pageidautina kad būtų iki 50 aminorūgščių liekanų. Pagrindinai naudojamos tokios aminorūgščių sekos, kurios DNR lygyje pagerina baltymo Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A ekspresiją arba/ir palengvina sulieto baltymo gryninimą.

25 Baltymo Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A ekspresiją, DNR lygyje, galima pagerinti, pavyzdžiui, suliejant su β -galaktozidazės geno fragmentu, t.y., nešiklio Y dalyje turi būti dalis β -galaktozidazės baltymo. Žinomos ir 30 kitos baltymo Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A ekspresijos padidavimo galimybės. Sujungiant su kitais polipeptidais, ypatingai su dideli krūvi turinčiais (pavyzdžiui, poli (Lys, Arg)) arba su polipeptidais, kurie suriša medžiagas dideliu selektyvumu (pavyzdžiui, streptovidinas) arba su baltymais, kurie palengvina 35 ekspresijos produkto išskyrimą ir gryninimą (žiūr., pavyzdžiui, EP Nr. A 0 089 626, EP Nr. A 0 306 610).

Taip pat šio išradimo objektu yra sulietas baltymas, kuriame yra daug polipeptido dalių ir kuris yra įterptas bent tarpinėje srityje tarp polipeptidų dalių, ir kuriame yra viena arba kelios IgA-proteinazės atpažinimo sritys, kurių seka yra Pro-.|.X-Pro, kur X yra bet kuri aminorūgšties liekana, geriausia, kad būtų Ser, Thr arba Ala. Ypatingai pageidautina, kad būtų šios atpažinimo sekos:

(a) Pro-Ala-Pro-.|.Ser-Pro,

(b) Pro-Pro-.|.Ser-Pro,

(c) Pro-Arg-Pro-Pro-.|.Ala-Pro,

(d) Pro-Pro-.|.Thr-Pro,

(e) Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-.|.Thr-Pro arba

(f) Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-.|.Thr-Pro, kur simbolis .|. nurodo skėlimo vietą.

Šis išradimas taip pat apima baltymą arba peptidą, kuriame yra sekanti aminorūgščių seka: Met-Y-Pro-.|.X-Pro-A, kur X pageidautina, kad būtų Thr, Ala arba Ser, Y yra viena arba kelios bet kokios aminorūgščių liekanos, geriausia, jei X yra Thr arba Ala, tai Y gale turi būti Pro, arba jei X yra Ser, tai Y gale turi būti Pro-Ala arba Pro, ir A yra bet kokia aminorūgščių liekanų seka. Toks, pagal šį išradimą, baltymas arba peptidas ekspresuojami po transformacijos į prokariotines ląsteles rekombinantinio nešiklio, kuriame yra bent viena geno, koduojančio tokį baltymą arba peptidą, kopija.

Seka A reiškia bet kokią aminorūgščių liekanų seką. Tikslinga, kad šios sekos viduje nebūtų kitos IgA-proteinaze skeliamos srities.

- 5 Taip pat šio išradimo objektu yra rekombinantinė DNR, kuri koduoja baltymą arba peptidą, ir kurioje yra bent tarpinėje sulietų baltymų srityje viena arba kelios IgA-proteinazės atpažinimo arba skėlimo sritys.
- 10 Rekombinantinę DNR, pagal šį išradimą, galima gauti žinomais molekulinės biologijos metodais. Paprastai tai nešiklis, kuriame yra koduojanti A aminorūgščių liekanų seką, DNR, kuri yra skaldoma endonukleazėmis 5' šio geno gale ir liguojama su oligonukleotidais, kurie
- 15 koduoja norimą seką. Oligonukleotide turi būti seką, kuri koduoja IgA-proteinazės skėlimo vietą arba jos dalį.

- 20 Taip pat šio išradimo objektu yra rekombinantinis nešiklis, kuriame yra bent viena rekombinantinės DNR, kopija. Pagrindiniai nešikliai, tinkami baltymų klonavimui į prokariotinius organizmus, yra žinomi specialistams. Tinkamas nešiklis yra tas, kurio pagalba galima gauti rekombinantinės DNR, didelę transkripciją.
- 25 Rekombinantinės DNR transkripcija, paprastai, yra kontroliuojama ekspresijos indukcijos signalu (pav., λ , Tac, Iac arba trp promotoriumi).

- 30 Nešiklis gali būti nechromosominis (pav., plazmidė), integruotas (pav., bakteriofagas λ).

- Pagrindiniai, pagal šį išradimą, nešiklis yra plazmidė. Nešikliai, kurie yra tinkami geno klonavimui pasirinktame recipiente, yra žinomi molekulinės biologijos specialistams. Recipientai gali būti
- 35 eukariotai, bet dažniausiai, prokariotai. Tinkamų DNR

nešiklių, pagal šią išradimą, klonavimui prokariotuose, yra komerciniai, tai pUC ir pUR nešikliai.

5 Kitas išradimo objektas yra ląstelė, ypatingai pasirinkta E. coli ląstelė, kuri transformuojama su rekombinantine DNR, pagal šią išradimą, arba/ir rekombinantiniu nešikliu, pagal šią išradimą.

10 Pavyzdžiai baltymų, kurių N-galuose yra sekos X-Pro, kur X yra Thr, Ala arba Ser, ir kuriuos galima viena stadija gauti pagal šią išradimą, yra žmogaus eritropoetinas, žmogaus T-ląstelių receptoriaus ?-grandinė ir ypatingai, žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF).

15 G-CSF sintetinamas aktyvuojamų monocitų, makrofagų ir taip pat kitų ląstelių linijų limfokinais. Limfokinai dalyvauja imuninės sistemos arba kraujo sistemos ląstelių brendime.

20 Jie stimuliuoja kaulų čiulpų ląstelių brendimą iki ląstelių diferenciacijos. Pavyzdžiui, G-CSF indukuoja neutrofileno ir granulocitų susidarymą.

25 Kadangi G-CSF gali greitai ir žymiai padidinti neutrofilinių ląstelių populiacijas, tai G-CSF gali būti plačiai taikomas terapijoje. G-CSF faktorius gali būti panaudotas po chemoterapijos, gydant vėžį, kurios metu žūsta imuninės sistemos ląstelės. Taip pat G-CSF
30 gali būti panaudotas transplantuojant kaulų čiulpus, esant sunkiems nudegimams, infekcijoms, atsirandančioms dėl silpno imuniteto ir leukemijos gydymui.

G-CSF yra sekretuojama baltymo molekulė. Todėl
35 transliacijos produkto - G-CSF probaltymo signalinė seka, esanti baltymo N-gale, sekrecijos metu yra nuskeliama, gaunamas subrendęs G-CSF, kurio N-gale yra

Thr(+1)-Pro(+2) (aminorūgščių liekanų padėtys +1 ir +2). Prokariotuose G-CSF signalinis peptidas nuskeliamas dalinai arba visai nenuskeliamas, todėl, norint gauti G-CSF prokariotuose be signalinio peptido, reikia klonuoti AUC (Met) kodoną kaip inicijuojanti kodoną prieš DNR seką, koduojančią subrendusią G-CSF, kuri prasideda Thr(+1)-Pro(+2). To pasėkoje prokariotuose, tokiuose kaip E. coli, ekspresuojamas G-CSF, kuriame pirma aminorūgšties liekana yra metioninas.

Šio išradimo būdu galima lengvai gauti prokariotuose be pirmos aminorūgšties liekanos-metionino, G-CSF, kurio N-gale būtų Thr(+1)-Pro(+2).

Tai pasiekama sekančiai: gaunamas neprokariotų G-CSF darinys, kurio sekos +1 ir +2 padėtyje yra aminorūgščių liekanos Thr(+1)-Pro(+2) ir prieš jas prijungiama aminorūgščių liekanų seka, kurią atpažįsta IgA-proteinazė, ir gali būti atskeliama nuo G-CSF sekos, kuri prasideda nuo Thr(+1)-Pro(+2).

Teikiama pirmenybė tokiam variantui, kai G-CSF darinio baltymo sekos padėtyje -1 ir -2 yra Pro, padėtyse nuo -3 iki -1 yra aminorūgščių liekanų seka Arg-Pro-Pro, padėtyse nuo -4 iki -1 yra Pro-Arg-Pro-Pro arba kai nuo -5 iki -1 padėties yra aminorūgščių liekanų seka Ala-Pro-Arg-Pro-Pro.

Ypatingai pageidautinas G-CSF darinio variantas, kai baltymo sekoje nuo padėties -6 iki -1 yra aminorūgščių liekanos:

-6;-5;-4;-3;-2;-1
Pro-;Ala-;Pro-;Arg-;Pro-;Pro

G-CSF šiame išradime suprantamas, aišku, G-CSF, kurio seka publikuota, pavyzdžiui Science 232 (1986), 61, o taip pat jo dariniai, kurie pasižymi granulocitų stimuliavimu, kurių aminorūgščių liekanų seka prasideda X(+1)-Pro(+2), kur yra Thr, Ser arba Ala, ypatingai pageidaujamas variantas, kai X yra Thr.

G-CSF darinį, pagal išradimą, po ekspresijos prokariotuose galima skaldyti IgA-proteinaze tarp aminorūgščių liekanų -1 ir +1 (tarp Thr(+1) ir Pro(-1)). To pasėkoje, vienintele hidrolizės stadija gaunamas G-CSF, neturintis -1 padėtyje metionino, jo aminorūgščių liekanų seka N-gale prasideda Thr(+1)-Pro(+2), o toks G-CSF sutinkamas ir gamtoje.

Ekspresuojant G-CSF, prokariotuose susidaro sunkiai tirpūs agregatai, kurie neturi aktyvumo. Visų pirma, tam kad baltymą galima būtų naudoti terapiniams tikslams, jį reikia pervesti į jo aktyvią formą. Žinomais būdais (pavyzdžiui, Europos patentas Nr. A 0 219 874, Europos patentas Nr. A 0 114 506, WO 84/03711), iš pradžių, pridėjus denatūruojančių agentų, ištirpinamas, po to renatūruojamas ir jei to reikia, gryninamas. Baltymo skaldymą IgA-proteinaze, pagal išradimą, galima atlikti prieš baltymo ištirpinimą, po ištirpinimo arba po baltymo renatūracijos. Tuo atveju, kai baltymo skaldymas IgA-proteinaze turi būti atliktas po baltymo ištirpinimo, reikia prieš pridedant IgA-proteinazę, pašalinti dializuoiant denatūruojančius agentus (pavyzdžiui, guanidino hidrochloridą, arba karbamidą). Paprastai IgA-proteinaze skaldymas atliekamas po baltymo renatūracijos, nes tokiu atveju pasiekiamos didesnės G-CSF išeigos.

G-CSF arba kito atskeliama baltymo skaldymo IgA-proteinaze sąlygos gali būti įvairios. Bet pageidautina, kad skaldymas būtų atliekamas, kai G-CSF

(arba kito baltymo) santykis pagal svorį su IgA-proteinaze būtų nuo 1:1 iki 100:1. Skaldymas vykdomas vandeniniame buferiniame tirpale, kurio pH pageidautina, kad būtų nuo 6.5 iki 8.5. Buferinio tirpalo koncentracija turėtų būti nuo 50 mmol/l iki 300 mmol/l, o esant būtinybei, pridedama nuo 20 iki 100 mmol/l natrio chlorido. Skaldymas vykdomas kambario temperatūroje ilgiau, nei 20-60 minučių.

Po baltymo ištirpinimo, renatūravimo ir skaldymo IgA-proteinaze, gautas skaldymo produktas gryninamas paprastai jonų mainų chromatografijos pagalba ir grubiu frakcionavimu. Taip gautame G-CSF, kurio sekos -1 padėtyje nėra metionino, pašalinių baltymų yra mažiau, nei 0.1%, o paprastai mažiau, nei $10^{-3}\%$.

Tokiu būdu, G-CSF, kuriame nėra N-gale metionino, gaunama skaldant IgA-proteinaze, galima atskirti ir išgryninti nuo sulieto baltymo, kuriame yra metioninas.

Pagal šio išradimo būdą galima gauti rekombinantinį G-CSF prokariotuose, kuriame pašalinių baltymų yra mažiau, nei 0.1%, o paprastai mažiau, nei $10^{-3}\%$ ir kuriame nėra G-CSF, gaunamo prokariotuose, kurio sekos padėtyje -1 yra metioninas.

Išradimo objektu taip pat yra vaistinis preparatas, kurio sudėtyje yra pagal išradimo būdą gautas prokariotuose G-CSF, kaip veiklioji medžiaga, ir jei to pageidaujama, pridedami įprasti farmaciniai nešikliai, užpildai ir pagalbinės medžiagos. Toks vaistinis preparatas ypatingai tinka gydymui, kurio metu reikalinga stimuliuoti granulocitų, ypatingai neutrofilų, susidarymą.

Paprastai vaistinė forma, pagal išradimą, būna tirpalas injekcijoms, kuriame yra šio išradimo komponentai.

Galimos ir liofilizuotos vaistinės formos. Pastarosios paruošiamos naudojimui žinomomis, tinkamomis priemonėmis arba tirpalais. Tirpikliu, paprastai naudojamas vanduo, kuriame yra įprasti injekcijoms naudojami priedai, tokie kaip stabilizatoriai, tirpumo padidinimo agentai, buferiniai tirpalai, priedai, kad susidarytų izotonis tirpalas, pavyzdžiui, fiziologinis natrio chlorido tirpalas. Priedai gali būti, pavyzdžiui, manitas, tartrato arba citrato buferinis tirpalas, etanolis, kompleksodaris, toks kaip, etilendiamintetraacto rūgštis ir jos netoksiškos druskos, o taip pat didelės molekulinės masės polimerai, tokie kaip, polietileno oksidas, kuris naudojamas klampumui pakeisti. Skysčiai, naudojami kaip nešikliai injekcijoms, turi būti sterilūs, ir paprastai, išpilstyti į ampules.

Pagaliau, šis išradimas apima G-CSF, kurio baltymo sekoje -1 padėtyje nėra metionino, gaunamo prokariotuose, panaudojimą farmacinių preparatų, pagal šį išradimą, gavimui.

Tuo atveju, kai skaldant bet kokią kitą sulietą baltymą šio išradimo būdu, gaunamas produktas X-Pro-A (kur X yra bet kuri aminorūgšties liekana ir A yra bet kokia aminorūgščių seka), kurio N-gale yra nepageidaujamas dipeptidas X-Pro, tai šį dipeptidą galima nuskelti dipeptidilaminopeptidaze (DPAP). Dipeptidilaminopeptidazės buvo surastos kai kuriuose mikroorganizmuose, vabzdžiuose, amfibijose ir įvairiuose žmogaus audiniuose. Jos reikalingos palaipsniam probaltymų modifikavimui ir pasižymi dideliu specifiškumu baltymo N-galo dipeptidui X-Pro (X-ProDPAPazės: G. Kreil, Trends in Biochemical Sciences 15, 23-26, 1990). Todėl derinant, pagal šį išradimą, skaldymą igaze ir X-Pro-DPAP, galima gauti

norimus baltymus su norimomis aminorūgščių liekanomis baltymo N-gale.

5 Dabar, panaudojus aukščiau aprašytą igazės ir X-Pro-DPAP skaldymo derinį, galima taip pat gauti prokariotuose baltymus su kitokia aminorūgšties liekana baltymo N-gale, kai -1 padėtyje nėra metionino. Tam iš pradžių gaunamas sulietas baltymas, kuriame yra aminorūgščių liekanų seka Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A, kur
10 šiuo atveju A yra pageidaujama ekspresuojamo baltymo aminorūgščių liekanų seka be dviejų aminorūgščių liekanų X-Pro N-gale.

15 Prokariotinės ląstelės ekspresijos produktas, kurio aminorūgščių liekanų seka yra Met-Y-Pro-.|-X-Pro-A, iš pradžių skaldomas IgA-proteinaze, susidaro pirmas skaldymo produktas, kurio aminorūgščių seka yra X-Pro-A.

20 Tokį, baltymą, kaip aprašyta aukščiau, galima skaldyti dipeptidilaminopeptidaze, kuri specifiškai atpažįsta seką X-Pro ir skelia už Pro. Tokiu būdu yra gaunamas antras skaldymo produktas, kurio seka A gali būti laisvai pasirenkama. Todėl šio išradimo būdas gali būti
25 ypatingai naudingas pačių įvairiausių baltymų gavimui, kuriuose nėra N-gale metionino, ir neapsiriboja baltymų, kurių N-gale yra X-Pro seka, kur X yra paprastai Ser, Thr arba Ala, gavimu.

30 Pagaliau, išradimas apima taip pat ir rekombinantinę DNR, kurioje yra klonuota (apibrėžta aukščiau) IgA-proteinazės atpažinimo seka, ir tinkama įterpimui į tarpinę sulietų baltymų sritį. Pagrindinai DNR sekos fragmentas yra gaunamas cheminiu sintezės būdu, kurio
35 galuose yra viena arba kelios tinkamos persidengimo sritys.

Terminai

- Šio išradimo būdas apima norimų baltymų gavimą biotechnologijos metodais. Biotechnologija suprantama, kad norimas baltymas arba jo tarpinis produktas gaunamas naudojant genų inžinerijos metodus ir kitus biotechnologijos būdus (pavyzdžiui, mikroorganizmų kultivavimas).
- 10 Norimas baltymas yra tarpinis produktas arba galinis produktas, kuris gali būti naudojamas, pavyzdžiui, medicinoje, tyrimams, aplinkos apsaugai arba pramoniniuose procesuose arba produktuose.
- 15 Šio išradimo būdas apima ir tai, kad norimas baltymas gaunamas iš sulieto baltymo, kai sulieto baltymo sudėtyje yra kovalentiškai sujungti vienas su kitu suliejami komponentai. Vienas iš suliejamų komponentų yra tikslinis baltymas. Komponentų sekos ir jų pasikartojimas sulietame baltyme gali būti bet kokios; bet paprastai sulietame baltyme N-gale yra baltymas-nešiklis ir C gale - tikslinis baltymas.
- 25 Baltymas-nešiklis arba jo dalis yra reikalinga tam, kad suteiktų norimam baltymui, kuris yra sulietame baltyme, ypatingas savybes. Šios savybės gali būti, pavyzdžiui, sulietų baltymų stabilumo padidinimas, kuris remiasi struktūrinėmis savybėmis, tuo pačiu žymiai padidėja jo atsparumas ląstelės proteinazėms arba sulietų baltymų lokalizacija, tose vietose kur yra nedidelis proteolitinis aktyvumas. Be to, baltymas-nešiklis gali turėti tokias savybes, kurių pagalba galima efektyviai išgryninti sulietus baltymus. Tai gali būti, pavyzdžiui, tam tikrų ligandų surišimas, kurio dėka galima pritaikyti afininę chromatografiją baltymų gryninimui, sulieto baltymo lokalizacija intarpiniuose kūneliuose, o tai įgalina be didesnių sąnaudų išskirti

juos, ir baltymų lokalizacija į lengvai prieinamas sritis.

5 Sritys, esančios sulieto baltymo viduje, kuriomis sulieto baltymo komponentai (baltymai-nešikliai ir tikslinis baltymas) sujungiami vienas su kitu, vadinamomis tarpinėmis sritimis.

10 Kiekviena tarpinė sritis gali būti apibrėžiama viena arba keliomis aminorūgščių liekanų sekomis. Aminorūgščių liekanų sekos (kaip ir visos kitos baltymų aminorūgščių liekanų sekos) yra suprantamos ir vaizduojamos nuo N-baltymo galo (iš kairės) baltymo C-galo kryptimi (iš dešinės).

15 Išradimo būde visos aminorūgščių liekanų sekos, esančios tarpinėse srityse, kurios turi būti perskeltos IgA-proteinaze, turi turėti skėlimo arba atpažinimo sritis, pagal išradimo būdą.

20 Ta vieta, tarp dviejų aminorūgščių liekanų sekų, kur yra skeliamas sulietas baltymas, vadinama skėlimo vieta.

25 Būdas, pagal šį išradimą, apima fermentinį sulietų baltymų skaldymą tarpinėse srityse, naudojant IgA-proteinazę. IgA-proteinazė arba igazė, išradimo būdo ribose, yra IgA-proteinazė, išskirta iš kamieno Neisseria gonorrhoeae MSII ir visi kiti fermentai, 30 giminingi šiai proteinazei nukleotidų lygyje ir pagal susidarymo procesą. Ypatingai įtrauktinos IgA-proteinazės išskirtos iš Neisseria ir Haemophilus rūšies.

35 E. coli ED 8654 mikroorganizmas buvo deponuotas Vokietijos mikroorganizmų Centre, Grizebachštrase, 8, 3400 Gettingen, suteikiant jam numerį DSM 2102.

Išradimas aiškinamas sekančiais pavyzdžiais ir figūromis.

5 Figūrų aprašymas:

Fig. 1 schematiškai pavaizduotas MS2-polimerazės (99 aminorūgščių liekanos) ir IgA-proteinazės iš N. gonorrhoeae MSII probaltymo β -srities (1195-1505 aminorūgščių liekanos) suliejimas. Tarpinėje srityje tarp šių dviejų dalių yra 12 aminorūgščių liekanų, kurioje yra igazės skėlimo seka Pro-Pro-.|-Thr-Pro. Konstruojant skėlimo vietą, buvo įterpiami keturi oligonukleotidai nuo (1) iki (4) į EcoRI ir HindIII skėlimo saitą. Polipeptido gavimas ir skaldymas su išgryninta igaze smulkiai paaiškinti 5 pavyzdyje.

Fig. 2 pavaizduotas baltymo-nešiklio (99 aminorūgščių liekanos yra MS2-polimerazės ir 6 koduojamos plazmidėje) ir 206 aminorūgščių žmonių T-limfocitų CD8-baltymo liekanos suliejimas. CD8 baltymo sekoje yra gamtinė igazės skėlimo seka (žiūr. 6 pavyzdį).

Fig. 3 pavaizduotas baltymas B63, kuris buvo produkuojamas E. coli ląstelės sekrecinės sistemos pagalba. Jo N-gale yra choleros B toksino apatinė dalis (103 aminorūgščių liekanos), tarpinė sritis (11 aminorūgščių liekanų), kurioje yra igazės skėlimo vieta ir baltymo C-gale IgA-proteinazės probaltymo β -sritis (1097-1160 aminorūgščių liekanos). Igazės skėlimo vieta buvo įterpiama tarp dviejų baltymų dvejais oligonukleotidais Tk 006 ir Tk 007.

Fig. 4 schematiškai pavaizduotas baltymų B49 ir B59 suliejimas. Jis sudarytas iš choleros toksino B apatinės dalies ir IgA-proteinazės probaltymo β -srities. Tarp šių dalių yra dvi skirtingos igazės

skėlimo vietos (Pro-Pro-Ala-Pro ir Pro-Pro-Thr-Pro). Skėlimo sekos buvo konstruojamos iš sintetinių oligonukleotidų (žiūr. fig. 3).

5 I PAVYZDYS

Plazmidės konstravimas G-CSF ekspresijai, kuriame nėra metionino.

10 Konstravimas buvo atliekamas panaudojant ekspresijos nešiklį pPZ07 - mgIIac (WO 86/09373). Tam, ekspresijos nešiklis pPZ07 - mgIIac buvo skeliamas su NcoI ir pašalinami lipnūs galai su Mung bean nukleaze. Po to nešiklis skeliamas su BamHI. IgA-proteinazės atpažinimo
15 seka DNR lygyje buvo gaunama naudojant šiuos oligonukleotidus:

A Oligonukleotidas:

20 5'-AAT TCG GAG GAA AAA TTA ATG ACA CAA CTG CGA CCT CCT
ACA CCA CTG GGC CCT G-3'

B Oligonukleotidas:

25 5'-GAT CC AGG GCC CAG TGG TGT AGG AGG TCG CAG TGC TGT
CAT TAA TTT TTC CTC CGA ATT-3'

Abu nukleotidai sumaišomi ekvimoliniais kiekiais ir 100 kartiniu pertekliumi sudedami, kaip aprašyta aukščiau,
30 į suskaldytą nešiklį pPZ07-mgIIac. Po pakartotinio ligavimo juo transformuojamos E. coli K12 ląstelės. Žinomais metodais išskiriama iš ląstelių DNR ir skaldoma ApaI ir BamHI restriktazėmis. G-CSF fragmentas, kurio ilgis yra apie 520 bp, išskiriamas,
35 naudojant ApaI ir BamHI restriktazes, iš G-CSF sekos (Science 232 (1986), 61-65). Šis fragmentas suliguojamas su perskeltu ApaI ir BamHI nešikliu.

2 PAVYZDYS

Papildomai prie IgA-proteinazės atpažinimo sekos sulietame baltyme gali būti tokie peptidai, kurie palengvina baltymo gryninimą. Tai gali būti DNR, kuri koduoja streptavidiną. Tam streptovidino genas (WO 89/03422) klonuojamas prieš IgA-proteinazės atpažinimo srities seką.

3 PAVYZDYS

Panaudojant 1 pavyzdyje aprašytą plazmidę, transformuojamos E. coli K12 ląstelės (EDS 8654, DSM 2102), atliekama selekcija naudojant antibiotiką (ampiciliną) ir atliekama restrikcinė plazmidės analizė. Atrinktas klonas naudojamas tolesniam kultivavimui ir G-CSF ekspresijai. Ląstelės kultivuojamos pilnoje terpėje. Šios terpės sudėtis vienam litrui: 16 g baktotriptono (Difco), 10 g mielių ekstrakto (Difco) ir 5 g natrio chlorido. Ląstelės auginamos iki $OD_{546} = 2.0$ ir po to atliekama indukcija 10^{-3} mol/lIPTG. Po 4 valandų ląstelės surenkamos centrifūguojant, lizuojamos lizocimu su EDTA (etilendiamintetraacto rūgštimi) ir išskiriami G-CSF intarpiniai kūneliai (IB'S, pal. Europos patentą Nr. A 0 219 874).

Išskirtų netirpių sulietų baltymų, kuriuose yra G-CSF, denatūravimas arba renatūravimas atliekamas pagal Europos patentą Nr. A 0 219 874. Denatūravimas atliekamas tirpinant 6 mol/l guanidinhidrochlorido tirpale. Po denatūravimo tirpalas, atskiriamas nuo nuosėdų, dializuojamas prieš 5 mmol/l buferinį kalio fosfato tirpalą, pH7 ir baltymas skaldomas IgA-proteinaze (pavyzdys 4).

Kitokiu būdu po denatūracijos vykdoma dializė guanidino chloride prieš 5 mmol/l kalio fosfato buferinį tirpalą, pH 7, kuriame yra 1mmol/l GSH ir 3 mmol/l GSSG. Po renatūracijos dabar taip pat dializuojama prieš 5
5 mmol/l kalio fosfato buferinį tirpalą, kurio pH 7.

4 PAVYZDYS

10 Sulieto baltymo skaldymas IgA-proteinaze, gaunant G-CSF be metionino padėtyje - 1.

IgA-proteinazė išskiriama pagal EMBO Jour., 3, (1984), 1595 - 1601. Į 10 µg renatūruoto arba denatūruoto pagal 3 pavyzdį G-CSF, pridedama 2 - 5 µg IgA-proteinazės ir
15 inkubuojama 30 minučių kambario temperatūroje. Panaudojus jonų mainų sorbentus, tokius kaip Mono-Q arba Mono-S, galima išskirti G-CSF, kuris N-gale neturi metionino. Aminorūgščių liekanų analizė baltymo N-gale parodė, kad G-CSF N-gale yra reikalinga aminorūgščių
20 liekanų seka Thr (+1)-Pro(+2).

5 PAVYZDYS

25 Sulietų baltymų gavimas, netirpių baltymų agregatų, esančių intarpiniuose kūneliuose, skaldymas specifinėje igazės skėlimo vietoje

Prokariotinis ekspresijos nešiklis pEX31C (K. Strebel, Journal of Virology 57, 983 - 991, 1986) buvo
30 modifikuotas taip, kad superprodukuotus šioje E. coli sistemoje sulietus baltymus buvo galima suskaldyti igaze į baltymą-nešiklį ir norimą baltymą. Tam buvo iš sintetiniu būdu gautų oligonukleotidų gautas dvispiralinės DNR fragmentas, koduojantis aminorūgščių
35 seką Thr-Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-.|-Thr-Pro. Šis DNR fragmentas buvo įterpiamas, naudojant genų inžinerijos metodus, į Eco RI skėlimo vietą ekspresijos nešiklyje

pEX31C. Be to, HindIII skėlimo vietoje buvo įterpiami kiti du sintetiniai DNR fragmentai, kuriuose yra daugelio restriktazių skėlimo vietos ir ekspresijos terminavimo kodonas. Į tokiu būdu gautą ekspresijos plazmidę pEV 37 per SmaI ir Hind III skėlimo vietas buvo įterpiamas DNR fragmentas, koduojantis IgA-proteinazės iš Neisseria gonorrhoeae MSII probalymo β-sritį. To pasėkoje buvo gautas hibridinis genas, kuri transformavus į E. coli, buvo gaunamas sulietas baltymas. Sulieto baltymo iš N-galo buvo baltymas-nešiklis - MS2-polimerazė, jos ilgis - 99 aminorūgščių liekanos, vidurinėje tarpinėje srityje buvo igazės skėlimo vieta, kurios ilgis - 12 aminorūgščių liekanų ir norimas baltymas - MSII probalymo β-sritis C-gale (žiūr. fig. 1). Išgryninta iga e buvo galima nuskelti nuo sulieto baltymo C-galo MSII probalymo β-sritį, tarpinės srities skėlimo vietoje Pro-.|. -Thr.

Hibridinio geno plazmide buvo transformuojamos E. coli ląstelės, kuriose buvo reguliacijos faktorius CI⁸⁵⁷ iš bakterofago λ (E. Remaut, Gene 22, 103-113, 1983). Pakėlus temperatūrą nuo 28° iki 42°, buvo inaktyvuojamas CI⁸⁵⁷ represorius, ko pasėkoje buvo aktyvuojama baltymo sintezė rekombinantinėse E. coli ląstelėse. Tam 50 ml E. coli ląstelių, augintų 12 valandų 28° temperatūroje, suspensijos buvo perpilama į 200 ml iš anksto pašildytą iki 45°C terpę ir po to buvo kultivuojama 2 valandas 42°C temperatūroje. Šioje stadijoje dideliais kiekiais kaupėsi sulieti baltymai intarpinių kūnelių formoje bakterijų citoplazmoje. Ląstelės buvo surenkamos centrifūguojant, suspenduojamos 20 ml lizatinio buferinio tirpalo (10% sacharozės, 50 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol EDTA) ir pridėjus 400 μl lizocimo tirpalo (5 mg/ml) inkubuojamos 30 minučių 22\$ temperatūroje. Pridėjus detergento Triton X-100 iki galutinės koncentracijos 0.1%, buvo vėl inkubuojama 30 minučių. Išsiskyrusi lizavimo metu DNR buvo suardoma ultragarsu,

nuosėdos, tame tarpe ir sulieti baltymai, esantys intarpiniuose kūneliuose, buvo atskiriamos centrifūguojant ir po to praplaunamos 5 ml HINTE buferiniu tirpalu (1 mol karbamido, 50 mmol NaCl, 50 mmol Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol EDTA). Po pakartotino centrifūgavimo, nuosėdos buvo suspenduojamos ultragarso pagalba 5 ml PBS (20 mmol kalio fosfato, pH 7.5, 140 mmol NaCl) ir plaunamos. Ši stadija buvo pakartojama kelis kartus, tam kad pašalintų karbamido liekanas. Pagaliau, netirpi frakcija, kurioje buvo sulietas baltymas, buvo suspenduojama ultragarso pagalba 5 ml PBS.

Suspenduotų sulietų baltymų švarumas ir kiekis buvo nustatomas SDS PAGE (elektroforėzė denatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamidiniame gėlyje), gėlio koncentracija 12.5%, dažant Coomassie Brilliant Blue. Skaldant sulietus baltymus_ suspensija buvo inkubuojama santykiu fermentas/substratas: 1/100 (m/m) 3 valandas 37°C temperatūroje. Po skaldymo mišinys buvo analizuojamas SDS PAGE, buvo nustatyta, kad susidarė reikalingo ilgio β -baltymas. Šis baltymas buvo perneštas ant nitroceliuliozės membranos ir buvo nustatoma jo seka. Nustatyta galinių aminorūgščių liekanų seka patvirtino, kad buvo gautas norimas baltymas iš sulietų baltymų ir kad sulietas baltymas buvo perskeltas igazės skėlimo vietoje.

Bet skaldymo metu buvo suskaldoma tik 50% sulieto baltymo. Pridėjus didesnius kiekius igazės ir ilgiau vykdant skaldymą, nebuvo pasiekama didesnė skaldymo išeiga. Tai vyksta todėl, kad neperskelta sulieto baltymo vieta yra neprieinama igazei. Hibridinis baltymas ir skaldymo produktai po inkubavimo su igaze yra netirpių agregatų formoje, todėl negali būti atskirti centrifugavimu.

Skaldymo išeigos iki 90% buvo pasiekiamas tada, kai vietoj intarpinių kūnelių užterštos frakcijos buvo imami sulieti baltymai, kurie buvo papildomai išgryninti. Tam, šios netirpios nuosėdos po praplovimo

5 H1NTE buferiniu tirpalu (žiūr. aukščiau), buvo suspenduojamos 5 ml H7NTE buferiniame tirpale (7 mol karbamido, 50 mmol NaCl, 50 mmol Tris-HCl, pH 8.1, 1 mmol EDTA). Netirpi dalis buvo pašalinama centrifuguojant, o tirpi frakcija buvo dializuojama

10 prieš 5 litrus PBS 4°C temperatūroje. Pašalinus dializuojant karbamidą, sulietas baltymas išsėda netirpių agregatų pavidalu. Nusėdę agregatai buvo suspenduojami ultragarsu ir, kaip aprašyta aukščiau, buvo skaldomi igaze ir analizuojami.

15

6 PAVYZDYS

Renatūruoto tirpaus sulieto baltymo specifinis skaldymas igaze

20

Naudojant pEX ekspresijos sistemą, buvo gautas hibridinis baltymas (žiūr. pavyzdį), kuriame yra MS2-polimerazė ir žmogaus citotoksinių T-limfocitų CD8 baltymo dalis (žiūr. fig. 2). Po pirminio išgryninimo

25 ir baltymo, esančio intarpiniuose kūneliuose, ištirpinimo H7NTE buferiniame tirpale, sekanti gryninimo stadija buvo elektroforėzė, naudojant 12.5% SDS poliakrilamidinį gelį. Sulietas baltymas, kaip viena juosta, dažant Coomassie Brilliant Blue, buvo

30 išpjaunama iš gelio ir, po to pagal Hunkapiller (Methods in Enzymology 91, 227 - 235, 1983) buvo ekstrahuojamas iš gelio. Elektroeliucija buvo vykdoma TAE buferiniame tirpale (40 mmol Tris-acetatas, pH 7.9), į kurią papildomai buvo įdedama 0.1% SDS (natrio laurilsulfatas).

35 SDS vėliau buvo pašalinamas dializuojant prieš 5 litrus TAE buferinio tirpalo 22°C temperatūroje. Toliau dializuojant, baltymas buvo

pervedamas į saugojimo buferinį tirpalą (20 mmol kalio fosfato, pH 7.5, 140 mmol NaCl, 50% glicerino).. Gautas tokiu būdu tirpus sulietas baltymas buvo inkubuojamas su išgryninta igaze (žiūr. pavyzdį 5) ir pilnai suskaldomas baltymo CD 8 molekulės skėlimo vietoje (-Pro-Pro- .|. -Thr-Pro-Ala-, žiūr. fig. 2) į du polipeptidus. Skėlimo specifiškumas buvo įvertinamas, analizuojant trumpesnio produkto aminorūgščių seką iš N-galo. Buvo gauta, kaip ir tikėtasi, seka Thr-Pro-Ala-Pro-Thr-Ile.

7 PAVYZDYS

Renatūruoto tirpaus sulieto baltymo, gauto iš kultūrinio skysčio supernatanto, specifinis skaldymas igaze

Sulieti baltymai, kurių sudėtyje yra apatinė ir β -dalis choleros toksino B (padėty 1097 - 1160; J. Pohlner, Nature 325, 458-462, 1987) ir IgA-proteinazės iš N. gonorrhoeae MSII probaltymas, buvo gaunami tirpūs rekombinantinių E. coli ląstelių kultūriniame skystyje. Tam, kad būtų galima atskirti dvi baltymo dalis, į tarpinę sritį tarp choleros toksino B apatinės ir β -dalies, naudojant genų technologijos metodus, buvo įterpta sintetinė igazės skėlimo vieta (Pro-Pro- .|. -Thr-Pro-). Tuo tikslu oligonukleotidai Tk 006 ir Tk 007 buvo įterpiami į EcoRI ir SacII skėlimo vietą (žiūr. fig. 3). Sulietas baltymas buvo paimamas iš 2 litrų bakterijų kultūrinio skysčio po 12 valandų auginimo 37°C temperatūroje, išsodinant amonio sulfatu, po to dializuojamas prieš 5 litrus PBS buferinio tirpalo. Jo skaldymas, esant baltymo koncentracijai 50g/ml, PBS buferiniame tirpale, kai santykis fermentas/substratas buvo 1/50 (m/m), vykdomas su išgryninta igaze 2 valandas 37°C temperatūroje. Imuninės analizės metu buvo nustatyta, kad pilnai suskaldžius sulietą baltymą,

didesnis fragmentas pagal molekulinę masę ir pagal reakciją su antiserumu, atitiko gamtinei apatinei choleros toksino B daliai.

5 8 PAVYZDYS

Renatūruoto tirpaus sulieto baltymo, esančio ant gramneigiamų bakterijų paviršiaus, specifinis skaldymas igaze

10

Ekspresijos sekrecinė sistema buvo panaudota tam, kad sulietus baltymus TKB 49 ir TKB 59, kurių sudėtyje yra apatinė choleros toksino dalis ir IgA- proteinazės β -sritis, gauti lokalizuotus ant rekombinantinių salmonelių paviršiaus. Hibridiniame gene, koduojančiame sulietą baltymą TKB 49, tarpinėje srityje tarp toksino ir β -srities buvo originali igazės skėlimo seka (c) (-Pro-Pro-.|. -Ala-Pro). Priešingai, į geną, koduojantį baltymą TKB 59, buvo įterpiamas sintetinis DNR fragmentas iš oligonukleotidų Tk 006 ir Tk 007 tarp EcoRI ir SacII skėlimo vietų, kuris kodavo skėlimo seką (-Pro-Pro-.|. -Thr-Pro) (žiūr. fig. 3). Jei nepažeistos bakterijos, ant kurių paviršiaus buvo sulieti baltymai, buvo inkubuojamas su išgryninta igaze, tai vyko specifiškas skaldymas igazės skėlimo vietoje. Imuninės analizės metu buvo nustatyta, kad pilnai suskaldžius sulietą baltymą, nedideli fragmentai pagal molekulinę masę ir pagal reakciją su antiserumu, atitiko gamtinei apatinei choleros toksino B daliai.

30

9 PAVYZDYS

Aktyvios igazės išgryninimas iš rekombinantinių, E. coli, ląstelių kultūrinio skysčio

35

Rekombinantinės E. coli C 600 ląstelės, kuriose yra plazmidė pEX 1070 (VFR patentas Nr. 36 22 221.6) su

modifikuotu IgA-proteinazės genu, išskiria aktyvia
igazę į kultūrinį skystį. Filtruojant per membraną
kultūrinį skystį, galima sukonzentruoti fermentą ir, po
to, išsodinti amonio sulfatu (0.42 g/ml). Po
5 centrifūgavimo, nuosėdos buvo tirpinamos Bio Rex
buferiniame tirpale (50 mmol kalio fosfato, pH 7.0,
8.6% glicerino) (1 ml buferinio tirpalo 1 litrui
kultūrinio skysčio), nulygsvarinamos dializuojant prieš
10 2 litrus buferinio tirpalo ir po to vykdoma jonų mainų
chromatografija (BioRex 70). Sorbuota IgA-proteinazė
buvo atplaunama buferiniu tirpalu (500 mmol kalio
fosfato, pH 7.0, 8.6% glicerino) ir eliuojama. Po to
frakcijos, kuriose buvo IgA-proteinazė, buvo tiriamos
SDS elektroforeze poliakrilamidiniame gėlyje (12.5%).
15 Po šios gryninimo stadijos buvo pasiekiamas
vidutiniškai >90% švarumo baltymo preparatas. Tam, kad
gautų išgrynintą igazę, buvo atliekama gelfiltracija
per Sephacryl HR 300 BioRex buferiniame tirpale, po to
buvo atliekama jonų mainų chromatografija (žiūr.
20 aukščiau). Igazės aktyvumas buvo tikrinamas inkubuojant
su IgA antikūnais ir analizuojant gautus produktus
poliakrilamidiniame gėlyje.

10 PAVYZDYS

25

Plazmidės konstravimas interleukino 3 ekspresijai,
kuriame nėra metionino N-gale,

Konstravimas buvo atliekamas naudojant ekspresijos
nešiklį pPZ 07 -mgIac (W0 88/09373). Tam ekspresijos
30 nešikliu pPZ 07 -mgIac skeliamas NCOI, lipnūs galai
pašalinami su Mung bean nukleaze. Po to papildomai
skaldomas nešiklis su BamHI. Optimizuota sulieto
baltymo aminorūgščių liekanų seka, DNR lygyje, gaunama
35 naudojant šiuos oligonukleotidus:

1A Oligonukleotidas:

5' AATTCGGAGGAAAAATTAATGAAAGCCAAACGTTTAAAAACATGTCGACCA
TGGAG-3'

5 1B Oligonukleotidas:

5' GGATCCTCCATGGTCGACATGTTTTTAAAACGTTTGGCTTTCATTAATTTTCC
TCCGAATT-3'

10 Abu oligonukleotidai sumaišomi kartu ekvimoliniais
kiekiais su apytikriai 100 kartiniu pertekliumi su
suskaldytu, kaip aprašyta aukščiau, nešikliu pPZ 07 -
mgIac. Po ligavimo, atlikto įprastu būdu,
transformuojamos kompetentinės E. coli K12 ląstelės.
15 Žinomais būdais iš ląstelių išskiriama DNR, skaldoma
SalI/BamHI ir liguojama su DNR fragmentu, kuriame yra
interleukiną 3 koduojanti seka, kurioje nėra baltymo
signalinės sekos (kaip aprašyta aukščiau).

20 Koduojanti interleukiną 3, seka su IgA-proteinazės
skėlimo vieta, DNR lygiu, buvo gaunama panaudojant
žinomą PGR metodą, PGR vykdoma naudojant matricą
interleukino 3 DNR su sekančiais pradmenimis:

25 2A Pradmuo:

5'-AAGCTTGTGACCCACGTCCACCAGCTCCCATGACCCAGACAACGCCC-3'

2B Pradmuo:

30

5'-TTCGTTGGATCCCTAAAAGATCGCGAGGCTCAAAGT-3'

Gaunamas PGR metu fragmentas papildomai skeliamas
fermentais SalI ir BamHI, toks fragmentas gali būti
35 tiesiogiai įterpiamas į aprašytą DNR-nešiklį liguojant.

Po DNR transformacijos į atitinkamą recipientą, pavyzdžiui, E. coli K12 C 600, galima sintetinti IL 3 E. coli ląstelėse Rb'S formoje ir po to išskirti. Kaip aprašyta G-CSF atveju, atliekama baltymo denatūracija ir renatūracija ir renatūruotas baltymas skaldomas IgA-proteinaze. Gautas tokiu būdu IL 3, kurio N-gale nėra metionino, po kitų gryninimo stadijų, gali būti naudojamas terapijoje.

10 11 PAVYZDYS

Plazmidės konstravimas interleukino 2, ekspresijai, kuriame nėra metionino N-gale,

15 Konstravimą galima atlikti naudojant ekspresijos nešiklį pPZ07 -mgIIac (W0 88/09373), kuris, po oligonukleotidų 1A ir 1B įterpimo, kaip aprašyta pavyzdyje 10, skaldomas SalI/BamHI. Koduojanti interleukiną 2 seka su IgA-proteinazės skėlimo vieta, 20 DNR lygiu, buvo gaunama panaudojant žinomą PGR metodą, PGR vykdoma naudojant matricą interleukino 2 DNR su pradmenimis 3A ir 3B, kurie taip pat koduoja IgA-proteinazės atpažinimo seką.

25 3A Pradmuo:

5'-AAGCTTGTGACCCACGTCCACCAGCACCTACTTCACGTTCTACAAAG-3'

3B Pradmuo:

30

5'-TTCGTTGGATCCTCAAGTTAGTGTTGAGATGATGCTTT-3'

Gaunamas PGR metu fragmentas papildomai skeliamas fermentais SalI ir BamHI, toks fragmentas gali būti tiesiogiai įterpiamas į aprašytą DNR-nešiklį liguojant. 35 Toliau viskas vykdoma, kaip aprašyta IL 3 atveju.

Ankstesniame pavyzdyje buvo aprašyta, kaip panaudojant atitinkamą IgA-proteinazės atpažinimo seką ir po to sekančiais metodais galima gauti baltymuos, neturinčius N-gale metionino, kurių N-galas prasideda aminorūgščių
 5 liekanų seka Ala-Pro. Kiti baltymai, kuriuos analogiškai, pagal aprašytus būdus, galima gauti be metionino N-gale, konkrečiai, naudojant oligonukleotidus, kurie koduoja IgA-proteinazės atpažinimo seką, ir sritį, kuri, pagal analogiją,
 10 atitinka publikuotos sekos 5'- arba 3'- galą ir gali būti gaunama per PGR amplifikaciją. Žemiau pateikiami kiti atitinkami naudojami terapijoje baltymai, kurie subrendusioje formoje, sutinkamoje gamtoje, prasideda nuo Ala-Pro ir, todėl, gali būti gaunami analogišku
 15 būdu pagal šio išradimo būdą.

Katepsinas L (EC 3.3.22.15), Masoh, R.W. et.al., Biochem. J. 240, 373 - 377, 1986.

20 Eritropoetinas, Lai P. H. et al., J. Biol. Chem., 261, 3116 - 3121, 1986.

Interleukinas 1 β , Iseto K.M. et al., Blood 71, 962 - 968, 1988.

25 Osteonektinas, Fisher L. N. et al., J. Biol. Chem., 262, 9702 - 9708, 1987.

Kolagenazė tipas IV, Collier. I. E. et al., J. Biol. Chem., 263, 6579 - 6587, 1988.

Taip pat, tokiu keliu galima gauti baltymus, kurie subrendusioje formoje prasideda aminorūgščių liekanų seka Ser, Pro. Kaip pavyzdį galima pateikti:

35 α 1 antitripsinas, Hill R. E. et all., Nature, 311, 175 - 177, 1984.

Atrial natriuretic factor, Kambayashi j., et al., FEBS Lett., 259, 341 - 345, 1990.

- 5 Kiti baltymų pavyzdžiai, kurių subrendusioje formoje N-gale yra Thr-Pro ir gali būti naudojami terapijoje:

Komplemento B faktorius, Campell R. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 4464 - 4468, 1983.

10

Apolipoproteinas A, Eato D. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 3224 - 3228, 1987.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Genų inžinerijos būdu gautų sulietų baltymų, sudarytų iš bet kokių komponentų ir specifinės skėlimo vietos tarpinėje srityje, fermentinio skaldymo būdas,
5 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
(1) tarpinę sritį., kuria sujungtos sulieto baltymo dalys, modifikuoja genų inžinerijos metodais taip, kad šioje tarpinėje srityje būtų bent viena IgA-proteinazės
10 atpažinimo vieta, kurioje turi būti šios aminorūgščių liekanos Y-Pro. |.X-Pro, kur X gali būti bet kurios aminorūgšties liekana, o Y - viena arba kelios aminorūgščių liekanos,

15 (2) sulietą baltymą, gautą (1) stadijoje, skaldo IgA-proteinaze simboliu . |. pažymėtoje atpažinimo srities vietoje ir

(3) po skaldymo gauna vieną arba kelias norimas sulieto
20 baltymo dalis.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sulietų baltymų tarpinę sritį modifikuoja, įterpiant nukleotidų sekas, kurios koduoja IgA-proteinazės atpažinimo vietą arba jos dalį; be to,
25 nukleotidų sekas įterpia prieš arba/ ir po vieno arba kelių DNR segmentų, kurie koduoja norimas sulieto baltymo dalis.

30 3. Būdas pagal vieną iš aukščiau esančių punktų, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad

(1) ląstelę transformuoja su rekombinantine DNR arba/ir rekombinantiniu nešikliu, kur DNR arba nešiklio
35 sudėtyje yra bent viena geno, koduojančio sulietą baltymą, turintį bent IgA-proteinazės atpažinimo vietą tarpinėje sulieto baltymo dalyje, kopija,

(2) transformuotas ląsteles augina tam tikslui tinkamoje terpėje,

5 (3) pasiekia geno, koduojančio sulietą baltymą, ekspresiją transformuotoje ląstelėje,

(4) sulietą baltymą suskaldo IgA-proteinaze ir

10 (5) išskiria vieną arba kelias tikslines sulieto baltymo dalis.

4. Būdas pagal vieną iš aukščiau esančių punktų, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad norint gauti
15 rekombinantinius baltymus prokariotinėse ląstelėse be metionino baltymo N-gale, sulietą baltymą, kuriame yra Met-Y-Pro. |.X-Pro-A seka, kurioje X yra bet kurios aminorūgšties liekana, Y - viena arba kelios bet kurių aminorūgščių liekanos ir A yra bet kokia aminorūgščių
20 liekanų seka, skaldo IgA-proteinaze ir gauna baltymą arba polipeptidą, kuriuose yra X-Pro-A aminorūgščių liekanų seka.

5. Būdas pagal vieną iš aukščiau esančių punktų, b e -
25 s i s k i r i a n t i s tuo, kad X-Pro-A yra žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (G-CSF) arba jo dariniai.

6. Sulietas baltymas, kuriame yra kelios polipeptido
30 dalys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo tarpinėje srityje tarp atitinkamų polipeptidų dalių yra bent viena arba kelios genų inžinerijos būdu įungtos IgA-proteinazės atpažinimo sritys, kurių aminorūgščių liekanų seka yra Y-Pro. |.X-Pro, kurioje X yra bet
35 kurios aminorūgšties liekana, geriausia Ser, Thr arba Ala, o Y gali būti viena arba kelios bet kurių aminorūgščių liekanos.

7. Rekombinantinis G-CSF arba rekombinantinis G-CSF darinys, gauti iš prokariotų, neturintis metionino baltymo N-gale, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
5 G-CSF arba G-CSF darinys iš esmės nėra užteršti prokariotuose gaunamu G-CSF, kurio N-gale yra metioninas.

8. Vaistinis preparatas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje yra G-CSF arba G-CSF darinys pagal
10 7 punktą ir, esant reikalui, įprasti farmaciniai priedai, pagalbinės medžiagos arba/ir nešikliai.

9. Rekombinantinė DNR, b e s i s k i r i a n t i tuo,
15 kad ji koduoja baltymą pagal 6 punktą.

10. Ląstelė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji yra transformuota DNR pagal 9 punktą.

Fig.1

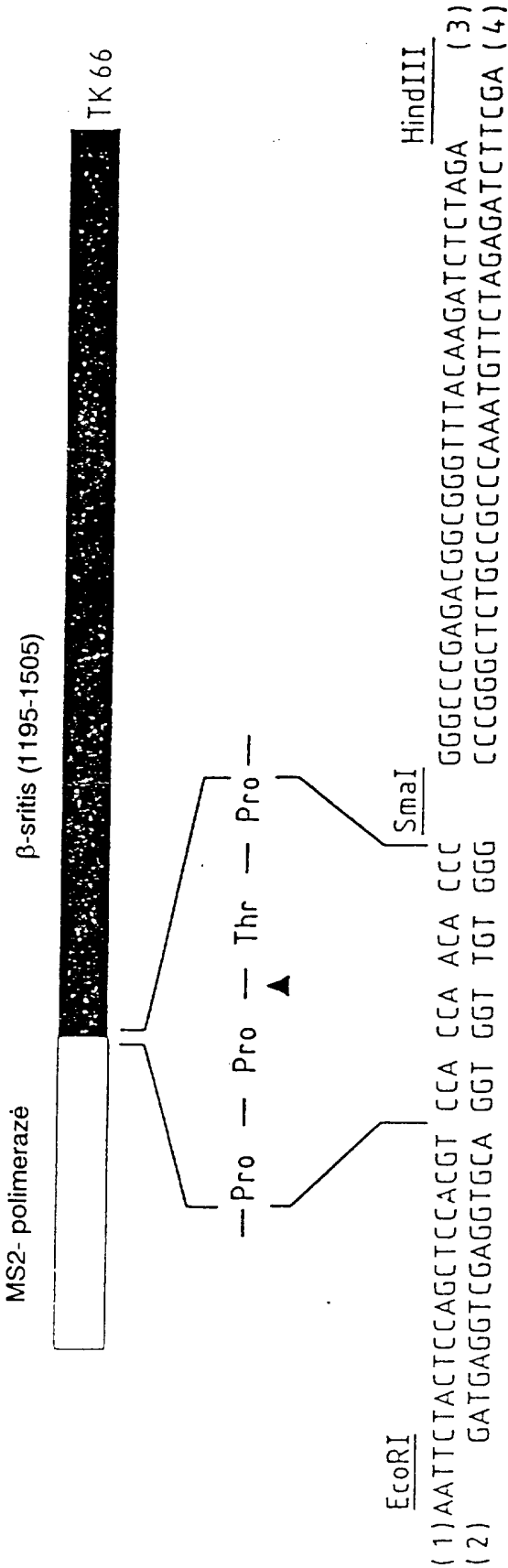


Fig. 2

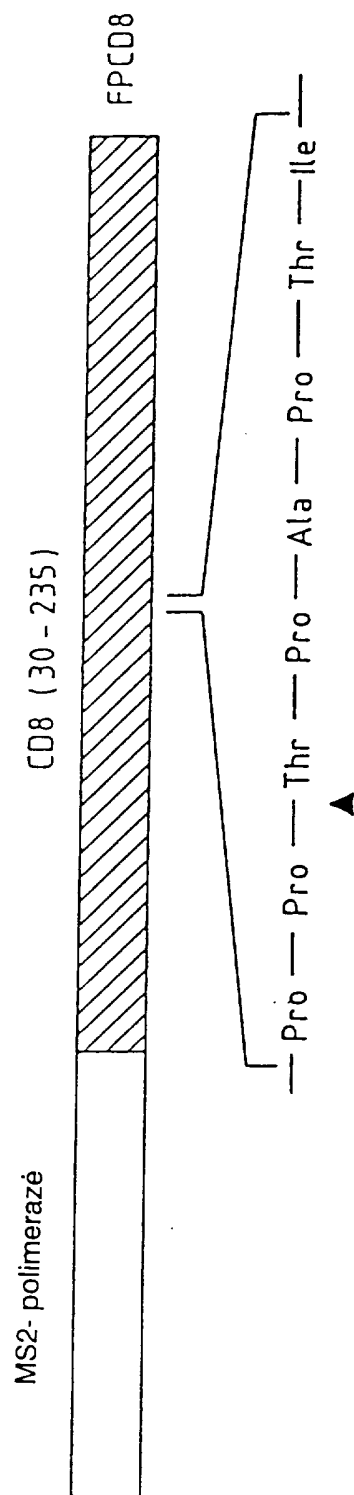


Fig. 3

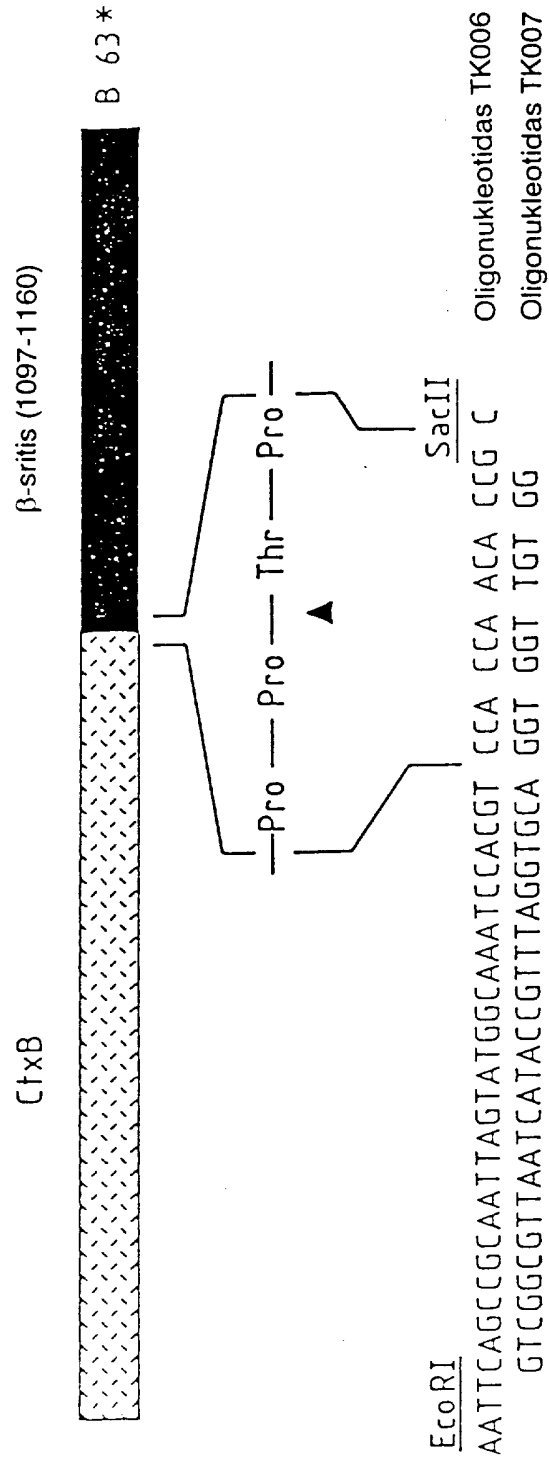


Fig. 4

