

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4077**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/52,**
C12N 1/21,
C12N 5/00

(21) Paraiškos numeris: **IP1829**

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

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

(45) Patent paskelbimo data: **1996 12 27**

(60) SU duomenys: **SU 4743221, 1990 02 05**

(31,32,33) Prioritetas: **307366, 1989 02 06, US**

(72) Išradėjas:
Arthur H. Bertelsen, US
Nozer M. Mehta, US
Gary Agide Beaudry, US

(73) Patent 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

(83) Mikroorganizmo deponavimas:
ATCC 75168 (IVI 10028), ATCC75145 (IVI 10032), ATCC 75146 (IVI 10033), ATCC CRL
10918 (IVI 10031), ATCC CRL 10919 (IVI 10029), US

(54) Pavadinimas:
Amidinio fermento ekspresijos sistemos

(57) Referatas:

Alfa-amidinio fermentas, gaunamas rekombinantinės DNR metodais geros išeigos ir labai grynas. Pateikiami eukariotiniai ir prokariotiniai ekspresijos vektoriai, turintieji transkripcijos promotorių su žemiau lokalizuota DNR seka, kuri koduoja amidinio fermentą. Vektorius parenkamas iš grupės, gebančios pasirinktame šeimininke įvykdyti polipeptidų ekspresiją, ir tinkamiausi šeimininkai atskiriami nurodytais vektoriais.

Išradimas apima alfa-amidinimo fermentų gavimą rekombinantinės DNR metodais, iš dalies ekspresijos vektorius ir šeimininkus, gebančius didelėmis išieigomis ekspresuoti aukšto atgaminamo lygio ir didelio grynumo
5 alfa-amidinimo fermentą.

Literatūroje gerai atspindėtas natyvių baltymų pirmtako formų vidulastelinis procesingas (funkcinių grupių atskėlimas ir/arba modifikacija) po transliacijos nuo
10 koduojančių nukleino rūgščių sekų.

Apskritai, žinduolių ląstelėse ir kituose eukariotuose galima realizuoti tam tikras post-transliacinio procesingo metodikas, tuo tarpu prokariotuose tai
15 nepavyksta. Kai kurie prokariotai, kaip E. coli, plačiai naudojami kaip šeimininkai žinduolių baltymams išskirti, panaudojant rekombinantinės DNR (rDNR) technologiją, kadangi juos nesunku išauginti grupinės fermentacijos metodais ir charakterizuoti. Tačiau
20 daugumai žinduolių baltymų reikia keleto tipų post-transliacinio procesingo ir, jeigu, pavyzdžiui, šie baltymai gaunami E. coli genų inžinerijos metodais, tada dažnai post-transliacinis procesingas *in vitro* turi būti lydimas sudėtingų cheminių metodų, kurie
25 ekonomiškai neapsimoka gamyboje.

Vienas procesingo tipas vykdo specifinį peptido arba baltymo karboksi-galinės aminorūgšties amidinimą. Daugelis gamtoje rastų hormonų ir peptidų turi tokią
30 modifikaciją, kuri dažnai apsprendžia, ar baltymas bus biologiškai aktyvus. Pavyzdžiui, kalcitoninas, kuriame neamidinto prolino liekanos pakeitimas amidintu natyvios formos prolino 3000 kartų sumažina biologinį aktyvumą. Kiti biologiniai peptidai, kurių aktyvumas
35 visiškai išryškėja tik po post-transliacinio amidinimo, turi (bet neapsiriboja) augimo relising-faktorių, kitus kalcitoninus ir peptidą, surištą su kalcitonino genu.

Specifinį baltymo aminorūgšties karboksi-galinių amidinimą katalizuoja alfa-amidinimo fermentai. Daugeliui biologiškai svarbių baltymų, kurių maksimalus efektyvumas pasiekiamas amidinimo dėka, polipeptidinės sekos gali būti sukonstruotos genų inžinerijos metodais. Tačiau svarbus ir kartais esminis karboksigalo amidinimas dažnai turi būti atliekamas *in vitro*. Pageidautina šiuo momentu išvengti brangių ir varginančių cheminio amidinimo metodikų, todėl specifiniam amidinimui paranku panaudoti amidinantį fermentą. Tačiau alfa-amidinimo fermentą sunku gauti laisvoje būklėje.

Amidintų peptidų buvimas konkrečiame audinyje nebūtinai reiškia sinonimiškai didelį alfa-amidinimo fermento aktyvumą. Pavyzdžiui, žiurkės adenohipofizio audinys pasižymi dideliu alfa-amidinimo aktyvumu, tačiau (neturi) nė vieno žinomo substrato (Eipper ir kt., PNAS 80, 5144-5148 (1983). Žiurkės neurohipofizio audinyje yra amidinti peptidai (oksitocinas ir vazopresinas), tačiau labai žemas alfa-amidinimo aktyvumas (Eipper ir kt., Endo ... 116, 2497-2504 (1985). Taigi, kol alfa-amidinimo aktyvumas tiriamas atskiruose audiniuose, negalima tikėtis rasti fermentą ar jo potencialų lygį.

Dar didesnė kliūtis iš natūralių šaltinių išskirto amidinimo fermento taikymui yra žemas jo grynumo laipsnis. Amidinimo fermentai, išskirti iš gamtinių šaltinių, dažniausiai yra užteršti proteolitiniais fermentais ir kitomis priemaišomis. Efektyvus amidinto produkto redukavimas labai apsunkintas, kai šie fermentai su priemaišomis panaudojami amidinti substratui, susidedančiam iš L-aminorūgščių. Proteazės gali suskaldyti substratą ir/arba amidintą produktą ir/arba patį amidinantį fermentą. Daugelis biologiškai svarbių polipeptidų susideda iš L-aminorūgščių ir

lengvai veikiami proteolizės ir kitų amidinimą trukdančių faktorių atsirandančių dėl priemaišų amidinančio fermento preparatuose.

- 5 Nesant pakankamai gamtinių šaltinių, dėl žemos alfa-amidinimo fermentų išeigos ir nepakankamo grynumo, būtina sukurti efektyvius masinius alfa-amidinimo fermento skyrimo metodus, duodančius geras aukšto grynumo fermento išeigas.

10

Šiame aprašyme terminai "amidinimo fermentas" ir "alfa-amidinimo fermentas" reiškia bet kokią medžiagą, sugebančią katalizuoti peptidil-substrato konversiją į atitinkamą peptidil-amidą, turintį amino grupę vietoje C-galinės nurodyto substrato aminorūgšties.

15

Šio išradimo tikslas yra didelėmis išeigomis išskirti labai gryną alfa-amidinimo fermentą.

- 20 Kitas šio išradimo tikslas yra sukurti organizmus-šeimininkus, sugebančius ekspresuoti alfa-amidinimo fermentus, išskiriamus su didele išeiga ir labai grynus.

- 25 Kitas šio išradimo tikslas yra sukurti ekspresijos vektorius, turinčius DNR sekas, koduojančias alfa-amidinimo fermentą.

- 30 Dar vienas šio išradimo tikslas yra sukurti ekspresijos vektorius, sugebančius ekspresuoti alfa-amidinimo fermentą tokiu būdu, kad ekspresuotas fermentas būtų lengvai išskiriamas ir išvalomas tokiu laipsniu, kad būtų efektyviai amidinami peptidilsubstratai, sudaryti iš L-aminorūgščių, pavyzdžiui, substratai, išskirti iš natūralių šaltinių, susintetinti cheminiu būdu arba gauti rekombinantiniais metodais.

35

Kitas šio išradimo tikslas yra sukurti ekspresijos vektorius, apsprendžiančius alfa-amidinimo fermento ekspresiją šeimininke-eukariote.

- 5 Dar vienas šio išradimo tikslas yra sukurti ekspresijos vektorius, apsprendžiančius alfa-amidinimo fermentų ekspresiją šeimininke-prokariote.

- 10 Kitas šio išradimo tikslas yra sukurti priemonės efektyviai masinei alfa-amidinimo fermento gamybai.

Šie ir kiti tikslai pasiekiami, sukuriant šeimininką, gebantį ekspresuoti alfa-amidinimo fermento polipeptidinę seką, be to šeimininkas turi ekspresijos vektorių, kuriame yra transkripcijos promotorius su žemiau pateikiama nurodytam šeimininkui svetima DNR seka, koduojančia amidinimo fermentą, be to nurodytas vektorius sugeba vykdyti polipeptidų ekspresiją šeimininke.

- 20 Tam tikruose šio išradimo įgyvendinimo variantuose siūlomas šeimininkas, kuris sugeba ekspresuoti alfa-amidinimo fermento polipeptidų seką, be to šeimininke yra ekspresijos vektorius, turintis transkripcijos promotorių su žemiau pateikiama šeimininkui svetima DNR seka, kuri griežtose sąlygose hibridizuoja su DNR-seka, pavaizduota Fig. 5 kaip A tipo seka.

- 30 Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante siūlomas šeimininkas, kuris sugeba ekspresuoti alfa-amidinimo fermento polipeptidų seką, kartu šeimininkas turi ekspresijos vektorių, kuriame yra transkripcijos promotorius su žemiau duota DNR seka, svetima nurodytam šeimininkui, kuri griežtose sąlygose hibridizuoja su DNR seka, pavaizduota Fig. 6 kaip B tipo seka.

Šiame aprašyme terminas "griežtos sąlygos" reiškia 2 x SSC (0,3 M natrio chlorido ir 0,03M natrio citrato) 62°C temperatūroje.

5 Šiame išradime taip pat pateikiami ekspresijos vektoriai alfa-amidinimo fermento ekspresijos įvykdymui prokariotinėse ir eukariotinėse sistemose. Pavyzdžiui, siūlomas ekspresijos vektorius, kuris sugeba prokariotiniame šeimininke ekspresuoti alfa-amidinimo
10 fermento polipeptidų seką, be to nurodytame vektoriuje yra transkripcijos promotorius, kurio pirminė DNR seka pateikiama žemiau, ši DNR seka turi amidinimo fermento kodavimo sritį, minėta pirminė seka yra pakankamai homologiška natūraliai DNR sekai, kad ekspresuotų
15 natūralus amidinimo fermentas, įvykstant hibridizacijai pagal nurodytą natūralią seką griežtose sąlygose, be to pirminė seka turi inicijuojantį apytikriai 50 nukleotidų metionin-kodoną nurodytos fermentą koduojančios srities pradžioje.

20 Analogiškai, siūlomas ekspresijos vektorius, kuris sugeba įvykdyti alfa-amidinimo fermento polipeptidų sekos ekspresiją eukariotiniame šeimininke, be to nurodytas vektorius turi transkripcijos promotorių su
25 žemiau duota pirmine DNR seka, turinčia amidinimo fermento kodavimo sritį, nurodytoji pirminė seka yra pakankamai homologiška natūraliai DNR sekai kad ekspresuotų natūralus amidinimo fermentas, tam kad įvyktų hibridizacija su natūralia seka griežtose
30 sąlygose, ir nurodyta pirminė seka turi stop kodoną aukščiau sekos, kuri antraip koduotų domeną, perdengiantį membraną.

Paskui tą pirminę seką turi eiti seka, specifikuojanti
35 poli A prijungimą prie informacinės RNR, kuri generuota transkripcija nuo nurodyto promotoriaus.

Šiame aprašyme terminas "domenas, perdengiantis membraną" reiškia, DNR seką, kuri, kaip nustatė Kaitas ir Dulitlas J. Mol. Biol., 157, 105-132 (1982) (jo pilnas aprašymas ištrauktas, kaip nuoroda), koduoja aminorūgščių seką, kurios hidrofobiškumas, ilgis, struktūros pobūdis ir t.t. yra pakankami tam, kad ji išitvirtintų membranoje. Pavyzdžiui, taip gali įvykti tada, kai baltymas sintezuojamas ant su membrana susijusios ribosomos arba, alternatyviai, aminorūgščių seka, koduojama domeno, perdengiančio membraną, gali būti surišama su kitomis baltymo sritimis, kur ji tampa dalimi, taip kad seka tampa įterpta į hidrofobinę membranos terpę posttransliacijos pasėkoje. Domenai, perdengiantys membraną, detaliau aprašyti Von Heine (Sekų analizė molekulinėje biologijoje: lobis arba trivialūs radiniai. Academ. Press, 1987, p. 81-121) darbe, kurio teiginiai šiame aprašyme ištraukti, kaip nuoroda.

Čia naudojami bazių numeriai tai numeriai, kurie konkrečiai duodami bet kuriai DNR sekai, specialiai pateiktai kartu su bazių numerių nuorodomis. Visoms sekoms, kurioms bazių numeriai čia nėra konkrečiai skirti, bazės turi būti nuosekliai sunumeruotos nuo I bazės numerio, kuris reiškia pirmą bazę pirmo kodono, ekspresuoto aptariama seka, o aminorūgštys numeruotos nuosekliai nuo pirmos aminorūgšties, kurią išreiškia 1-3 bazės.

Trumpas brėžinių aprašymas

Fig. 1 pavaizduota žinduolių alfa-amidinimo fermento ekspresijos vektoriaus konstravimo schema.

Fig. 2 pavaizduota prokariotinio alfa-amidinimo fermento ekspresijos vektoriaus konstravimo schema.

Fig. 3 pavaizduota NaDS-PAGE-elektroforegrama (dažyta Kumasi mėliu) netirpios baltymo frakcijos iš JM105 E. coli, nešančios nurodytas plazmides (kurių charakterizavimas duotas (1 pavyzdyje); kultyvuota mitybinėje terpėje su (+) arba be (-) IPTG. (C = netirpūs baltymai JM105 E. coli, nešančios pKK233-2).

Fig. 4 pateikta 3 paveiksle pavaizduoto gėlio Western-blot analizė; baltymas, perkeltas ant nitroceliuliozės filtro tuoj pat apdorojamas triušio antiserumu AE ir anti-triušio imunoglobulinu kartu su šarmine fosfataze, vėliau apdorojant chromogeniniu šarminės fosfatazės substratu.

Fig. 5 pateikta A tipo seka.

Fig. 6 pateikta B tipo seka.

Pagal šį išradimą gaunami ekspresijos vektoriai, tinkami prokariotinėms sistemoms, ir ekspresijos vektoriai, tinkami eukariotinėms sistemoms. DNR, koduojančią amidinimo fermentą, išreikštą šiuose vektoriuose, galima išskirti, kaip aprašyta Europos patento paraiškoje Nr. 0308067, kuri toliau yra išskleista šiame aprašyme. Alfa-amidinimo fermentai išskirti iš žiurkės skydliaukės karcinomos smegeninio audinio arba iš žiurkės ląstelių linijos kondicionuotų terpių ir išvalyti iki homogeniškumo, kaip nurodyta aukščiau pateiktoje pagrindinėje paraiškoje ir pirminėje paraiškoje Nr. 655366, paduotoje 1984 m. rugsėjo 27 d. ir dabar publikuojamoje, kaip JAV patentas Nr. 4708934, kuri turi prioritetą ir šioje paraiškoje ji pilnai atskleidžiama, panaudojant ją kaip nuorodą. Nustatytos gryno alfa-amidinimo fermento aminorūgščių sekos, ir šios sekos panaudojamos projektavimui visos eilės oligonukleotidinių zonų,

kurie pažymėti radioaktyviu izotopu ir naudojami amidinančio fermento kDNR išskyrimui.

- Išskirtos kDNR panaudojamos gautų bibliotekų atrinkimui, pavyzdžiui, iš žiurkės skydliaukės karcinomos smegeninio audinio pilnos RNR, iš ląstelių linijų, arba iš ląstelių linijų, žinomų kaip amidinimo fermento šaltinis, pavyzdžiui biologinio depozito IVI 10028 (In Vitro International, Liptikum, Mariland) (žiurkės MTC (karcinomos) audinys), arba giminingos ląstelių linijos IVI 10029. Pilna RNR gaunama ir Poli-A RNR atrenkama ogilo DT celiulioze. kDNR gaunama gerai žinomais metodais, panaudojant pirmą atvirkštinę transkriptazę ir po to DNR polimerazę. kDNR naudojama kDNR bibliotekų generavimui vektoriuje λ gtII, o rekombinantines DNR supakuoja *in vitro* infekuotame bakteriofage. Šiam tikslui yra prieinami komerciniai ekstraktai, pvz. Promega Biotech arba Klontech Laboratories, arba gali būti gaunami šioje srityje gerai žinomais metodais. Faginis atrinkimas atliekamas radioaktyviais oligonukleotidiniais zondais, gautais, kaip aprašyta aukščiau. Atrinkimas (skriningas) bakteriofage, turinčiame alfa-amidinimo fermento kDNR ("AE kDNR"), atliekamas faginio praskiedimo būdu ir užnešant fagą ant nitroceliuliozės filtro. Specifiškumas pasiekiamas, atliekant hibridizaciją dviem ar daugiau radioaktyvias žymes nešančiais AE-specifiniais oligonukleotidiniais zondais.
- Oligonukleotidiniai zondai, pažymėti AE4, AE5, AE8 ir AE9 Europos patento paraiškoje Nr. 0308067, 61-64 psl., specifiškai atrenkami iš bibliotekų, gautų iš biologinio depozito IVI 10029, kaip nurodyta aukščiau.
- Iš daugelio bakteriofagų minėtu atrankos būdu ir oligonukleotidinės hibridizacijos metodais išskirtų AE kDNR analizė rodo, kad kDNR gali būti suskirstytos į

daugybę skirtingų tipų. Vieno tipo struktūra parodyta Fig. 5, kaip seka A, kur nukleotidai sunumeruoti pagal I bazę, kaip pirmąją metionino iniciatoriaus kodono bazę. Žemiau nukleotidinės sekos pateiktas vienaraidinis aminorūgščių kodas baltymą koduojančių genų sekos transliacijai. Skaičiai apvaliuose skliaustuose eilės gale nurodo aminorūgščių skaičius.

Kitas kDNR sekos tipas, išskirtas oligonukleotidinės hibridizacijos atrankos būdu, pateiktas Fig. 6 kaip seka B, kurioje numeravimas ir kiti žymėjimai tokie pat, kaip ir A tipo diagramoje.

Pareiškėjas panaudoja kDNR, išskirtas aukščiau aprašytu būdu, kaip prokariotinių, taip ir eukariotinių ekspresijos vektorių konstravimui, ir visa eilė šeimininkų buvo transformuoti, panaudojant šiuos vektorius efektyviai alfa-amidinimo fermento ekspresijai.

Igyvendindamas labiau pageidaujamus šio išradimo variantus, pareiškėjas atliko naujas modifikacijas aukščiau minimos kDNR atžvilgiu, turėdamas tikslą optimizuoti ne tik ekspresiją, bet ir amidinančio fermento redukavimą. Modifikacijos charakteris ir laipsnis gali būti varijuojami priklausomai nuo pasirinkto šeimininko ir/arba vektoriaus. Pavyzdžiui, siekiamuose variantuose pareiškėjas įterpė stop-kodoną aukščiau sekos, kuri antraip koduotų domeną, perdengiantį membraną. Membranas perdengiančių domenų buvimas gali būti nepageidaujamas rekombinantinės DNR ekspresijos sistemai, kadangi jie gali skatinti ekspresuotą baltymą asocijuotis su membrana ir, gal būt, būti neaktyviu šeimininko organizme arba ląstelių linijoje. Domenų, perdengiančių membraną, pavyzdžiai atsiranda dvejuose kDNR variantuose, parodytuose sekose A ir B (žiūr., atitinkamai, Fig. 5 ir Fig. 6)

(apytikriai 2275-2355 bazės sekoje A ir apytikriai 2587-2667 bazės sekoje B). kDNR diagramose A ir B, iš esmės identiškos šių transmembraninių domenų amininėje pusėje, išskyrus tai, kad, nuo 1178 bazės iki 1492 bazės, tikriausiai, yra kDNR tipo B intron-sritis.

Sekų A ir B kDNR koduoja maždaug 94 ir 105 kD baltyminius produktus atitinkamai. Abu šie baltymai didesni negu brandūs aktyvūs fermentai, kurie išgryninti iš gyvulinių ląstelių ekstraktų arba ląstelių linių sekrecijų. Kiekvienas iš šių pirminės transliacijos produktų yra pre-profermentas, kuris turi membraną-perdengiančius domenus koduojančios sekos C-galo 1/3 dalyje. Labiau pageidaujama, kad stop-kodonas išsidėstytų taip, kad ekspresuotas baltymas turėtų molekulinę masę apie 75 kD, ekspresuojant su kDNR iš sekos A (t.y., "stop" lokalizuotas tarp bazių 2025-2275) ir 87 kD, ekspresuojant su kDNR iš sekos B (tai yra, "stop" lokalizuotas apytikriai tarp 2340 ir 2690 bazės).

Brandaus E.coli alfa-amidinimo fermento citoplazminei ekspresijai, pavyzdžiui, labiau pageidaujama, kad būtų pašalintos genų sekos, kurios koduoja sekretorinio signalo natūralią seką, kad iniciacijos kodonas būtų lokalizuotas apytikriai 50 nukleotidų apimtyje genų sekose, koduojančiose brandaus baltymo, atitinkančio alfa-amidinimo fermentą, startą, ir kad nebūtų transliuotos genų sekos, koduojančios membranos perdengimo domenus C-galo srityje. Iniciacijos kodonas, be abejo, yra rėmelyje su seka, kuri koduoja fermentą, ir, kai kuriuose pageidaujamuose variantuose, išsidėsto aukščiau srities, o kartais betarpiškai už tos srities.

Ekspresuojant AE kDNR E. coli, rasta, kad natūrali genų seka turi kriptinę E. coli ribosomos ("RBS") surišimo sritį ir natūralių iniciacijos sekų vidinės iniciacijos

- kodoną. Taip gaunamas amidinimo fermento baltymas, nukirstas N-gale. Nors tai nesutrukdo gauti pageidaujamą *E. coli* produktą, tačiau tiesioginės iniciacijos ir vidinės iniciacijos produktų buvimas kartu apsunkina brendimą ir rekombinantinio produkto išgryninimą norimoje formoje, todėl nepageidaujamas. Norint atskirti netikėtą ir nepageidaujamą produktą, būtina atskelti arba ribosominio surišimo sritį, arba vidinės iniciacijos kodoną, arba abu.
- Pavyzdžiui, kai kuriuose šio išradimo įgyvendinimo variantuose valin-kodonas, kuris prokariotinėse sistemose koduoja inicijuojantį metioniną, taškinės mutacijos būdu pakeičiamas ekvivalentišku neinicijuojančiu valin-kodonu ties 661-663 bazėmis (kDNR iš bet kurios A ar B tipo sekos). Vietoje šios taškinės mutacijos, arba papildomai prie jos, kituose pirmenybę turinčiuose šio išradimo įgyvendinimo variantuose, pareiškėjas pašalino arba žymiu mastu modifikavo bet kurią sritį, koduojančią ribosominio surišimo saitą, kuris sutinkamas betarpiškai virš vidinės iniciacijos saito, ir kas labiau pageidaujama - bet kurią ribosominio surišimo vietą, kur ji bebūtų aptikta. Šios modifikacijos atliktos tam, kad būtų iš esmės eliminuota vidinė iniciacija, kad baltymas, ekspresuotas vidinės iniciacijos pasėkoje, po elektroforezės neišsiskirtų atskira juosta.
- Norint ekspresuoti sekretuotą aktyvaus alfa-amidinimo fermento baltymą iš rekombinantinio eukariotinio šeimininko ląstelių linijos, būtina pašalinti genų sekas, koduojančias transmembraninį domeną, esantį natūralių genų sekų C-galo srityje. Tipo A kDNR tai įvykdoma, nukerpant baltymo kodavimo sritį, įvedant stop-kodoną toje vietoje arba arti tos vietos, kur natūralus amidinimo fermentas post-transliaciniu būdu pertvarkomas kai kuriuose natūraliose sistemose, toliau

5 tai paaiškinama smulkiau. Tipo B kDNR tai taip pat
atliekama, įvedant naują stop-kodoną į tą fermento
baltymo sritį, kur natūralus B tipo amidinimo fermentas
perdirbamas post-transliacijos būdu (žr. žemiau). Tai
10 nereiškia, kad išnyksta galimybė kai kuriose šeimininko
ląstelių sistemose ekspresuoti pilnas, gamtoje
pasitaikančias genų sekas. Kadangi B tipo kDNR turi
sekas su neperdirbto introno charakteristikomis, gali
susidaryti sunkumų ekspresuojant šitą kDNR kai kuriose
15 eukariotinio šeimininko ląstelėse. Šios ląstelės gali
neefektyviai produkuoti mRNR iš B tipo geno, dėl
suporintų akceptoriaus ir sukirpimo donoro saitų. Todėl
akceptoriaus saito eliminavimas gali būti
neišvengiamas, norint užtikrinti efektyvią B tipo
AEkDNR ekspresiją.

20 Pareiškėjas aptiko, kad gamtoje pasitaikančio alfa-
amidinimo fermento, kurio molekulinė masė 75 kD,
karboksilinis galas randamas už aminorūgšties 709
padėties (814 tipui B) ribų. Norint gauti 75 kD baltymą
(87 kD tipui B), rekombinantinės DNR šeimininko
ląstelėje stop-kodonas introdukuotas į kDNR, atlikus
lizino kodono mutaciją 716 aminorūgšties padėtyje (821
25 tipui B). Ši modifikacija atliekama, panaudojant
kryptingą oligonukleotidinę mutagenezę. Tokia
mutagenezė gali būti įvykdyta įvairiais būdais.

30 Šie būdai pakankamai išsamiai pateikti literatūroje iš
molekulinės biologijos srities. Pagrindinis pareiškėjo
panaudotas būdas yra aprašytas Dž. W. Teiloro su
bendraautoriais, (1985) Nucl. Acids Res., 13: p.8749-
8764; Dž. W. Teiloro ir kt., (1985), Nucl. Acids Res.,
13: p. 8764-8785; K. Nakamae ir F. Ekšteino (1986),
Nucl. Acids Res., 14: p. 9679-9698. Reagentai,
35 reikalingi mutagenezei įvykdyti šiuo būdu, pristatomi
komplekte iš Amersham Corporation.

Sekos mutacija pakeičia lizino kodoną AAA į stop-kodoną TAA. Mutagenezei naudojamas oligonukleotidas atlieka ši pakeitimą, tačiau kituose santykiuose yra identiškas tai sekai, kuri randama gamtoje kaip kDNR seka atitinkamam (A arba B tipo) mutavimui skirtam fermentui.

Pareiškėjas taip pat aptiko, kad gamtoje randama alfa-amidinimo fermento baltymo sutrumpinta forma 10 produktojama B tipo baltymo brendimu vidinėje baltymo srityje, kuri yra unikali tipo B fermento baltymui. Pasėkoje susidaro fermentinis produktas, kurio molekulinė masė 43 kD. Pareiškėjas mano, kad DNR sekos, esančios aukščiau introno srities, pakanka koduoti 15 polipeptidą, pasižymintį nemažu alfa-amidiniu aktyvumu. Taigi, polipeptidus, kurie be vargo redukuojasi ir kurie sugeba ekspresuoti alfa-amidinių aktyvumą, gali koduoti kDNR, kurios žymiai trumpesnės dėl stop-kodono, esančio kažkur B tipo kDNR introno srityje prieš arba 20 tuo po tos vietos, kurioje šis intronas yra laisvas nuo tipo A kDNR. Parankiausia, kai tas kirpimas įvyksta dėl stop-kodono lokalizavimo apytikriai 30 bazių porų ribose nuo introno srities pradžios, geriausiai, žemiau jos. Norint garantuotai gauti pageidaujamą trumpesnę 25 alfa-amidinimo fermento baltymo formą, rekombinantinėse šeimininko ląstelėse sukuriamą modifikuota kDNR, kuri turi stop-kodoną vietoje lizino kodono 436-os aminorūgšties padėtyje B tipo kDNR. Ši mutacija gaunama įvykdant kryptingą oligonukleotidinę B tipo kDNR 30 mutagenezę.

Nežiūrint to, kad alfa-amidinimo fermento baltymo sutrumpinimas stop-kodono introdukavimu 436 aminorūgšties vietoje B tipo kDNR rezultate duoda 35 baltymą, kuris labiausiai priartėja prie to, kuris gaunamas natūraliu proteolitiniu pirminio transliacijos produkto skaldymu (arba kai kurių kitų tarpinių

skaldymo produktų biosintetiniame apykaitos kelyje), papildomas alfa-amidinimo fermento baltymo trumpinimas taip pat gali duoti aktyvų produktą rekombinantinės DNR šeimininko ląstelėse. Norėdamas sukurti trumpesnio baltymo formas pareiškėjas modifikavo AE kDNR keletu kitų būdų. Viena pavyzdys pareiškėjas panaudoja kryptingą oligonukleotidinę sait-specifinę mutagenę tirozino kodono performavimui į stop-kodoną 396 aminorūgšties padėtyje B tipo kDNR. Toks pakeitimas leidžia gauti 39 kD molekulinės masės baltymą, kai kDNR transliuojama ir perdirbama. Antruoju atveju pareiškėjas panaudoja gamtoje randamą Bam HI fermento atpažinimo vietą B tipo kDNR, norėdamas introdukuoti stop-kodoną linkerių (jungčių) mutageneze. Šitas metodas gerai žinomas molekulinėje biologijoje, pirmiau paprastai atliekamas kDNR skaldymas, vėliau sujungiant su dvigrandžiu sintetinės jungės fragmentu, kuris komplementarus vienam iš perskeltos kDNR galų ir kuris introdukuoja rėmelyje stop-kodoną tuojau už skaldymo vietos ribų:

5' GATCCACTAATGATCA 3'

3' GTGATTACTAGTTCGA 5'

25

Ši jungė patalpina stop-kodoną tuoj po histidino kodono ties 469 aminorūgštimi. kDNR transliacijos ir procesingo rezultate gaunamas baltymas, kurio molekulinė masė 46 kD.

30

Pageidaujamas ribojančio stop-kodono lokalizavimas atliekamas apytikriai 15 bazių porų apimtyje DNR sekos, koduojančios iš eilės einančias bazines liekanas (dažniausiai Lys-Lys), ypač, esančias betarpiškai aukščiau jos. Pareiškėjas mano, kad natūralus polipeptidas, kurį koduoja B tipo kDNR, dėl posttransliacinių modifikacijų, kurios pasitaiko

35

natūralios amidinimo fermento ekspresijos eigoje, ir dėl brendimo (procesingo) toje vietoje arba šalia tos vietos, kur paeiliui išsidėsto tokios bazinės liekanos, kaip pavyzdžiui, eilė lizinių, koduojamų B tipo kDNR introno srityje. Netgi kai įterpti stop-kodonai nėra skirti ekspresuoto polipeptido apribojimui nurodytu būdu, pageidaujama, kad įterptas stop-kodonas būtų lokalizuotas apytikriai 20 bazių porų apimtyje (pageidaujama, betarpiškai aukščiau jų) DNR sekų, koduojančių paeiliui einančias bazines aminorūgštis. Stop-kodonų įterpimas šiose padėtyse, matyt, ekspresuos polipeptidą, primenantį kai kuriuos natūralius amidinimo fermentus po to, kai jie patyrė posttransliacinį brendimą.

Norint įvykdyti citoplazminę ekspresiją prokariotinėse sistemose, bet kurios signalinės sekos kodavimo sritys (pvz., abiejų tipų A ir B kDNR, kurios aukščiau parodytos diagramomis), eliminuojamos, ir metionin-iniciatorius-kodonas insercijuojamas 50 nukleotidų apimtyje nuo pradžios srities, koduojančios amidinimo fermentą.

Alternatyviniame prokariotinės ekspresijos variante eliminuojamos bet kurios signalinės sekos koduojančios sekos arba profermento sekos ir įterpiamas iniciatorius-metionin-kodonas 50 nukleotidų apimtyje pradžioje srities, koduojančios amidinimo fermentą. Daugelyje natūralių AE kDNR tai atitinka pradžią srities, koduojančios Ser-X-Ser (X reiškia Phe arba Leu). Žr., pavyzdžiui, 124-132 bazės A arba B tipo kDNR sekoje. Kai kuriuose variantuose gali būti pageidaujama alfa-amidinimo fermento sekrecija. Tokiu atveju turėtų būti išsaugomos signalinės sekos kodavimo sritys, arba, alternatyviai, pakeistos heterologinėmis sekomis, kurios gali vykdyti analogiškas funkcijas, pavyzdžiui, signalinėmis bakterinio baltymo OMP A sekomis.

Šios srities specialistui suprantama, kad šio išradimo ribose galimi daugelis šiame aprašyme pateiktų mutacijų ir DNR sekų kirpimų amidinimo fermento kodavimui, ir
 5 kad tokios modifikuotos sekos koduos polipeptidus, sugebančius funkcionuoti kaip amidinimo fermentai. Todėl siūlomo išradimo formulė turi būti sudaryta taip, kad apimtų visus DNR sekų, ekspresijos vektorių ir šeimininko ląstelių funkcinius ekvivalentus.

10

Pavyzdžiai prokariotinių ekspresijos vektorių, kurie, pageidaujant, galėtų būti modifikuoti taip, kad turėtų DNR sekas, koduojančias amidinimo fermentą sutinkamai su šiuo išradimu, turi (bet neapsiriboja) pKK233-,
 15 pKK322-2, pKROK-I, pkT279, 280, 287, pPL liamda, pYEJ 001, pKC30, pPROK-C, jie visi - komerciniai pavyzdžiai. Prokariotiniai šeimininkai, kuriuos galima transfekuoti ekspresijos vektoriais sutinkamai su šiuo išradimu, turi (bet neapsiriboja) C600, LE392, RRI, DHI, SF8, be
 20 to visi jie prieinami rinkoje.

Eukariotiniai ekspresijos vektoriai, kurie norint gali būti modifikuoti taip, kad turėtų DNR sekas, koduojančias amidinimo fermentą, sutinkamai su šiuo
 25 išradimu, apimtų (bet neapsiribotų) pMAM1leo, pdBPVMMTNeo, pRSV, pcnKCI, pCH110, iš kurių visi jie prieinami rinkoje. Taip pat gali būti panaudoti atitinkami mielių vektoriai. Pageidaujami eukariotiniai šeimininkai gali būti transfekuoti ekspresijos
 30 vektoriais sutinkamai su šiuo išradimu, ir jie apima (bet neapsiriboja) IVI depozitą 10029, HeLa, CVI, CI27, CHO (kinų žiurkėno kiaušidės) ir COS.

1 PAVYZDYS

35

Alfa-amidinimo fermento baltymų ekspresija E. coli.

Norint ekspresuoti alfa-amidinimo fermentą E. coli, (žr. diagramą Fig. 2, kDNR fragmentas, kurio seka A parodyta Fig. 5, apdorojamas KpnI ir Hind III ir išskiria apie 2,1 kb fragmentą. Norėdami vėl
5 sukonstruoti amino galą, atitinkantį natūralų brandų fermentą, oligonukleotidini linkerį, kurio seka

5' CATGTCATTTTCCAATGAATGCCTTGGTAC 3'

10 3' AGTAAAAGGTTACTTACGGAAC 5'

prijungia prie šio DNR fragmento. Gautame fragmente yra Nco I-suderintas lipnus galas ir vienas lipnus Hind III galas. E. coli ekspresijos vektorius pKK233-2 perkamas iš Pharmacia Co. ir sukarpomamas restrikcijos fermentais
15 NcoI ir HindIII. Didysis linijinis fragmentas išskiriamas ir prijungiamas prie linker-(jungės)-adaptuoto kDNR-fragmento. Jungimo mišinys panaudojamas kompetentinio JM105 E. coli transformacijai.
20 Transformantai atrenkami pagal atsparumą ampicilinui, išskirtuose klonuose rekombinantinė plazmidė tirinama restrikcijos fermentu, atliekama DNR sekų analizė tam, kad patvirtinti juose esančio ekspresijos vektoriaus struktūrą Edalee "pAE12". Ekspresijos vektorius turi
25 hibridinį trp-lac promotorių, kuris represuojamas lac-represoriumi ir indukuojamas, apdorojant ląsteles izopropiltiogalaktozidu (IPTG). Aukščiau metionino-iniciatoriaus vektorius taip pat turi stipraus ribosominio surišimo saito sekas.

30 Alfa-amidinimo fermento ekspresavimui rekombinantines E. coli ląsteles augina kratiklyje LB-buljone, 37°C temperatūroje iki optinio tankio (OD₆₀₀), lygaus 0,4. IPTG pridedamas į kultūrą iki galinės koncentracijos 1
35 mM ir kultyvavimas tęsiamas 37°C temperatūroje kratiklyje, 3-5 valandas. Ląstelės surenkamos centrifuguojant kultūrą, supernatantas dekantuojamas.

Ląstelės resuspenduojamos buferiniame tirpale, kuriame yra proteazės inhibitorių mišinys, apdorojamos lizocimu, po to ultragarsu tam, kad būtų lizuotos ląstelės membranos. Lizatai centrifuguojami 12000 x g
5 tirpiai ir netirpiai ląstelių frakcijoms atskirti. Kiekviena frakcija analizuojama elektroforeze poliakrilamido gėlyje su Na dodecilsulfatu (EF PAAG su Na-DDS), baltymas nudažomas. Alfa amidinimo fermento baltymas nesunkiai identifikuojamas, kaip IPTG-indukcijos produktas netirpioje baltymo frakcijoje.
10 Kadangi pirminės ekspresijos plazmidėje nėra stop-kodono, specifikuoto alfa-amidinimo fermento genu sekoms, susidaręs indukuojamas produktas turi sekas, specifikuotas žemiau esančiai vektorinei DNR,
15 sintezuotai su alfa amidinimo fermento baltyminių sekų C-galu. Be to indukuotas netirpus baltymas turi ir specifinį amidinimo fermento baltymą, mažesnę negu tas, kuris susidaro, kaip baltymų sintezės vidinės iniciacijos kriptiniame RBS ir iniciacijos kodono produktas (221 aminorūgšties padėtis alfa-amidinimo fermento sekoje).

Nepageidaujamų sekų pašalinimui iš ekspresuoto produkto C-galinės dalies, A tipo sekoje atliekama lizin-kodono
25 mutacija 716 padėtyje tam, kad šioje padėtyje būtų generuotas stop-kodonas TAA. Po to mutavusią DNR apdoroja su Kpn I ir Eco RI ir panaudoja pradinio KpnI-Eco RI fragmento pakeitimui pradiniam ekspresijos vektoriui pAE12. Analogiškai B tipo kDNR sekos
30 mutuojamos palyginamoje padėtyje (821 aminorūgštis) stop-kodonui sukurti, o fragmentas KpnI-Eco RI iš mutavusios B tipo kDNR panaudojamas atitinkamo pAE12 fragmento pakeitimui. Tokiu būdu sudarytos dvi ekspresijos plazmidės, pAE24 (tipas A) ir pAE25 (tipas
35 B) vėliau panaudojamos JM105 transformacijai. Gauti kamienai kultyvuojami ekspresavimo tikslu, kaip aprašyta aukščiau pAE12-kamienų atveju. Aptikta, kad

- pAE24 produkuoja du IPTG- inicijuotus netirpius baltymus, kurių molekulinė masė apie 75 kD ir 55 kD, tuo tarpu rasta, kad pAE25 produkuoja du IPTG- inicijuotus netirpius baltymus, kurių molekulinė masė
- 5 apytikriai 87 kD ir 67 kD. Ir vėl, mažas baltymas kiekvienoje iš šių porų, tai - nepageidaujamas amino gale nukirptas produktas iš bet kurios A ar B tipo kDNR.
- 10 Siekdami eliminuoti baltymo sintezės iniciaciją kriptinėje vidinėje ribosominio surišimo vietoje ir iniciacijos kodonus (aminorūgšties padėtis 221), startinį kodoną GTG (GTG gali dirbti kaip MET-kodono iniciatorius bakterijose) paverčia kodonu GTT,
- 15 nesugebančiu inicijuoti baltymo sintezės, tačiau vis dėl to koduojančiu valiną, kuris paprastai būna šioje padėtyje natūralių genų koduojamuose alfa-amidinimo fermentų baltymuose. Kai mutavusi kDNR sritis pakeičiama natūralia ekspresijos vektorių pAE24 ir
- 20 pAE25 seka, susikuria du nauji vektoriai, pAE31 ir pAE32. JM105 E. coli transformavimas šiais modifikuotais ekspresijos vektoriais ir iš rekombinantinių kamienų gautų baltymų ištyrimas parodo, kad mutagenezė yra efektyvi priemonė, eliminuojant
- 25 nepageidaujamą vidinę iniciaciją. Šeimininko ląstelėse, nešančiose pAE31, IPTG-indukuoto produkto molekulinė masė yra 75 kD, tuo tarpu kai to paties produkto iš ląstelių, transformuotų pAE32, molekulinė masė - 87 kD.
- 30 Pareiškėjas rado, kad gamtoje paplitęs amidinimo fermentas iš B tipo kDNR posttransliaciniu būdu perdirbamas į baltymus, kurių molekulinė masė 43 kD, ir atliko eilę mutacijų AE B tipo kDNR, kurios leidžia ekspresuoti baltymus, pasibaigiančius toje padėtyje
- 35 (arba arti jos), kurioje baigiasi ir natūraliu būdu perdirbtas baltymas. Dvi iš šių mutacijų gaunamos oligonukleotidinės mutagenezės būdu, tuo tarpu, kai

trečiąją sukuria adapteriojungės mutacija, kaip parodyta aukščiau. Kada nešančios šias mutacijas kDNR panaudojamos pakeitimui atitinkamų pAE32 segmentų, aukščiau aprašytuose analogiškuose eksperimentuose transformuotų į JM105, tada analizuodami gautus baltymus, randame nukirstus alfa-amidinimo fermento galus. Kai mutacija įvyksta B tipo kDNR 396 amino rūgšties padėtyje, pakeisdama natūralų tirozino kodoną stop-kodonu (pAE36), aptinkamas fermentinis baltymas, kurio molekulės masė 39 kD, o tuo tarpu jungių (linkerinė) mutagenezė, užbaigianti transliaciją ties histidino kodonu 464 aminorūgšties padėtyje, rezultate duoda vektorių pAE51, kuris tuoj po transformacijos ir indukcijos JM105 E. coli gamina alfa-amidinimo fermento rekombinantinį baltymą, kurio molekulinė masė 46 kD.

Visi aukščiau aprašyti rekombinantiniai alfa-amidinimo fermento baltymai, pagaminti E. coli, pasiskirsto netirpioje ląstelės ekstraktų frakcijoje. Fermentus galima paversti tirpiaisiais ir juos aktyvuoti, paveikiant 8 M urea ir po to greit praskiedžiant 50 mM Tris-HCl, pH 7. Kai JM105 E. coli, nešanti pAE12, išauginama ir indukuojama IPTG, kaip aukščiau aprašyta, alfa-amidinimo fermento baltymai sintezuojami mažiausiai iki 30 mg/l bakterinės kultūros.

Būdingi indukuoto netirpaus baltymo, produkuojamo E. coli, nešančioje ekspresijos plazmides AE, pavyzdžiai pateikiami Fig. 3 ir Fig. 4.

2 PAVYZDYS

Žinduolių ekspresijos vektoriaus pd BPV-MMTNEO-AE_{A75} generavimas

Norint generuoti žinduolių ekspresijos vektorių, ekspresuojantį ir išskiriantį žymų kiekį A tipo alfa-

amidinimo fermento, kurio molekulinė masė 75 kD, iš žinduolių ląstelių (žr. diagramą Fig. 1. atliekamos operacijos:

- 5 1) Tarpinis ekspresijos vektorius pd MMTNeo (komercinis tiekimas iš Amerikos Tipinių Kultūrų Kolekcijos) (kaip parodyta) skaldomas su Bgl II. Linijinė forma išskiriama ir išgryninama.
- 10 2) Rekombinantinė A tipo kDNR, turinti pilną pre-pro seką ir dirbtinę stop-kodoną TAA 2146-2148 padėtyje, išskiriama laipsniškai skaldant su Bgl I ir Xho I. Po to išskiriamas ir išgryninamas fragmentas, atitinkantis alfa-amidinimo fermentą.
- 15 3) Intarpas (A tipo alfa-amidinimo fermentas) ir vektorius (pd-MMTNeo) sumaišomi, ir atitinkami galai išlyginami, panaudojant Klenovo DNR-polimerazės I fragmentą. 5'-išsikišę segmentai užpildomi, pridedant dNTF, o 3' - išlindę segmentai, atvirkščiai, suskaldomi, tuo būdu išlyginami galai (alternatyviai, paeiliui: SI-nukleazė ir Klenovas + dNTF gali būti panaudoti galų išlyginimui). Molekulės lygiais galais vėliau liguojamos 16 val. 15° temperatūroje.
- 20 4) Liguoti produktai po to transformuojami į RRI E. coli. Rekombinantiniai klonai atrenkami, pridėjus 50 µg/ml ampicilino. Intarpo orientaciją rekombinantiniuose klonuose tikrina, panaudodami
- 25 30 restrikcijos fermentų komplektą. Kaip nustatyta, vienas klonas, paminėtas kaip pdMMTNeo α -AE_{A75} (klonas II), turi A tipo kDNR teisingai orientuotą promotoriaus MMT atžvilgiu.
- 35 5) Plazmidinę DNR iš rekombinantinio pdMMTNeo α -AE_{A75} (klonas II) suskaldo pasinaudodami Bam HI. Linearizuotas vektorius išskiriamas ir išgryninamas,

vėliau 2 valandas 37°C temperatūroje apdorojant bakterine šarmine fosfataze (B.A.P.), 5' fosfatams pašalinti. BPV-I genomas išskiriamas ir išgryninamas tuoju po vektoriaus pdBPV-MMTNeo skaldymo B ir Bam HI. Šitas BAmHI DNR BPV-I fragmentas, kurio dydis apie 8,0 kb, po to liguojamas į vektorių pdMMTNeo αAE_{A75} , kuris linearizuotas, pasitelkiant BamHI ir apdorotas B.A.P., jungimas (ligavimas) trunka 3 valandas 14°C temperatūroje. Po jungimo mišinio transformacijos į RRI E. coli rekombinantiniai klonai atrenkami agarizuotose plokštelėse su LB buljonu ir 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilino. Rekombinantinės plazmidės analizuojamos, nustatant A tipo kDNR. Restrikciniai žemėlapiai parodo, kad klono 21 dydis yra apie 17 kb ir jis produkuoja laukiamą restrikcijos žemėlapi. Šią ekspresijos plazmidę vėliau panaudoja αAE_{A75} ekspresijai pelės CI27 ląstelėse.

6) Pelės CI27 ląstelės transfekuojamos 20 μg pdBPV-MMTNeo αAE_{A75} standartiniu precipitacijos metodu su $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Praėjus 2 savaitėms po transfekavimo, transformacijos židiniai kiekvienas atskirai perkeliama ir auginami mitybinėje terpėje, su antibiotiku G418. Kai ląstelės išauga iki pakankamo produkavimo lygio modifikuotoje Dulbeko terpėje, į kurią pridėta 10 % fetalinio veršelio serumo, tiriamas klonų sugebėjimas sekretuoti alfa-amidinimo fermentą, matuojant fermentinį aktyvumą kondicionuotose ląstelių kultūrų terpėse, o tap pat matuojant alfa-amidinimo fermento imunoreaktyvumą terpėje, standartiniais radioaktyvių izotopų žymių metodais ir imunoprecipitacija. Klonus, sekretuojančius aktyvų, imunoreaktyvų alfa-amidinimo

fermentą, kurio molekulinė masė 75 kD, padaugina dideliame ląstelių kiekyje (perkeldami į kultūrinę terpę su sumažintu serumo kiekiu ir tuo pačiu sumažintu ekzogeninio baltymo kiekiu) ir panaudoja aktyvaus
5 rekombinantinio fermento gamybai iš ląsteliųinių kondicionuotų terpių.

Terminai ir čia pateikti aprašymai - tai išradimo realizavimo variantai, pateikti tik iliustravimui, ir
10 negali būti apribojimai daugeliui variantų, kurie, specialisto manymu, galimi praktiškai taikant šį išradimą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Šeimininkas, sugebantis ekspresuoti alfa-amidinimo fermento polipeptidų seką, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi ekspresijos vektorių, kuriame yra transkripcijos promotorius su žemiau išsidėsčiusia DNR seka, svetima minėtam šeimininkui, kuris koduoja peptidilglicin- α -amidinančią monooksigenazę (PAM), ir ši seka yra parinkta iš: A tipo sekos, pavaizduotos Fig.5, ir B tipo sekos, pavaizduotos Fig.6, o Fig.5 ir Fig.6 yra šios apibrėžties dalis, kuri minėtą DNR seką įeina stop-kodonas aukščiau sekos, kuri priešingu atveju koduotų domeną, perdengiantį membraną.
2. Šeimininkas, sugebantis ekspresuoti alfa-amidinimo fermento polipeptidų seką, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi ekspresijos vektorių, kuriame yra transkripcijos promotorius su žemiau išsidėsčiusia DNR, svetima minėtam šeimininkui, kuris koduoja peptidilglicin- α -amidinančią monooksigenazę, ir griežtomis sąlygomis gali hibridizuotis su DNR seka, pasirinkta iš: A tipo sekos, pavaizduotos Fig.5, ir B tipo sekos, pavaizduotos Fig.6, kur į minėtą DNR seką įeina stop-kodonas aukščiau sekos, kuri priešingu atveju koduotų domeną, perdengiantį membraną, ir kurioje minėtas stop-kodonas A ir B tipo sekoms yra įterptas atitinkamai tarp bazių 2025 ir 2275 arba bazių 2340 ir 2590.
3. Ekspresijos vektorius, sugebantis įvykdyti alfa-amidinančio fermento polipeptidinės sekos ekspresiją, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ši vektorių sudaro įjungiant į ekspresijos vektorių pSV2 DNR seką, kuri koduoja peptidilglicin- α -amidinančią monooksigenazę ir griežtomis sąlygomis gali hibridizuotis su DNR seka, pasirinkta iš:

A tipo sekos, pavaizduotos Fig.5, ir B tipo sekos, pavaizduotos Fig.6,

5 kur į minėtą įjungtą DNR seką įeina stop-kodonas aukščiau sekos, kuri priešingu atveju koduotų domeną, perdengiantį membraną.

4. Ekspresijos vektorius, sugebantis įvykdyti alfa amidinančio fermento polipeptidinės sekos ekspresiją,
 10 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į šį vektorių įeina transkripcijos promotorius su žemiau išsidėsčiusia DNR seka, turinčia amidinanti fermentą koduojančią sritį, ir ši pirmoji seka yra pakankamai homologinė gamtinės DNR, vykdančios gamtinio
 15 amidinančio fermento ekspresiją, sričiai, kad griežtomis sąlygomis ji gali hibridizuotis su DNR seka, pasirinkta iš: A tipo sekos, pavaizduotos Fig.5, ir B tipo sekos, pavaizduotos Fig.6, kurioje, norėdami apsaugoti nuo vidinės iniciacijos, modifikavo vidinės
 20 iniciacijos saitą, esanti gamtinės DNR kodavimo srityje, panaudojant charakteringą saitui mutagenę.

5. Ekspresijos vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra toks, koks nusakytas 1 arba 2 punkte.

25

6. Ekspresijos vektorius pagal bet kurią iš 3-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra A tipo DNR seka.

30 7. Ekspresijos vektorius pagal bet kurią iš 3-5 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra B tipo DNR seka.

8. Ekspresijos vektorius pagal bet kurią iš 4-7 punktų,
 35 b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį gauna, įjungiant minėtą DNR seką, koduojančią peptidilglicin- α -amidinančią monooksigenazę, į ekspresijos sistemą,

pasirinktą iš grupės, kurią sudaro pdBPVMMTNeo, pSV2, pRSV, pMAMNeo, pueK-C1, pCH110 ir jų dariniai.

5 9. Prokariotinis šeimininkas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jame yra ekspresijos vektorius pagal bet
kurią iš 3-8 punktų.

10 10. Eukaritinis šeimininkas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad jame yra ekspresijos vektorius pagal bet
kurią iš 3-8 punktų.

15 11. Šeimininkas pagal 10 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jį pasirenka iš grupės,
susidedančios iš IVI depozito 10029 (ATCC CRL 10919),
HeIa, CV, CHO (kinų žiurkėno kiaušidžių) ir COS.

20 12. Šeimininkas pagal 11 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad jis yra CHO, ekspresijos
vektorius yra pSV2, DNR seka yra A tipo, o stop-
kodonas yra įterptas prie bazių 2146-2148.

25 13. Substrato amidinimo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad minimam substratui leidžia kontaktuoti
su rekombinantine peptidilglicin- α -amidinančia
monooksigenaze (PAM), kurią gauna panaudojant
ekspresijos vektorių pagal 3-8 punktus, arba iš PAM
ekspresijos bet kuriame iš šeimininkų pagal 1, 2 arba
9-12 punktus.

30 14. Amidintas produktas, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad jį gauna pagal 13 punktą.

35 15. Rekombinantinė peptidilglicin- α -amidinanti
monooksigenazė, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ją
gauna, panaudojant ekspresijos vektorių pagal bet kurią
iš 3-8 punktų, arba ekspresuojant PAM bet kuriame iš
šeimininkų pagal 1, 2 arba 9-12 punktus.

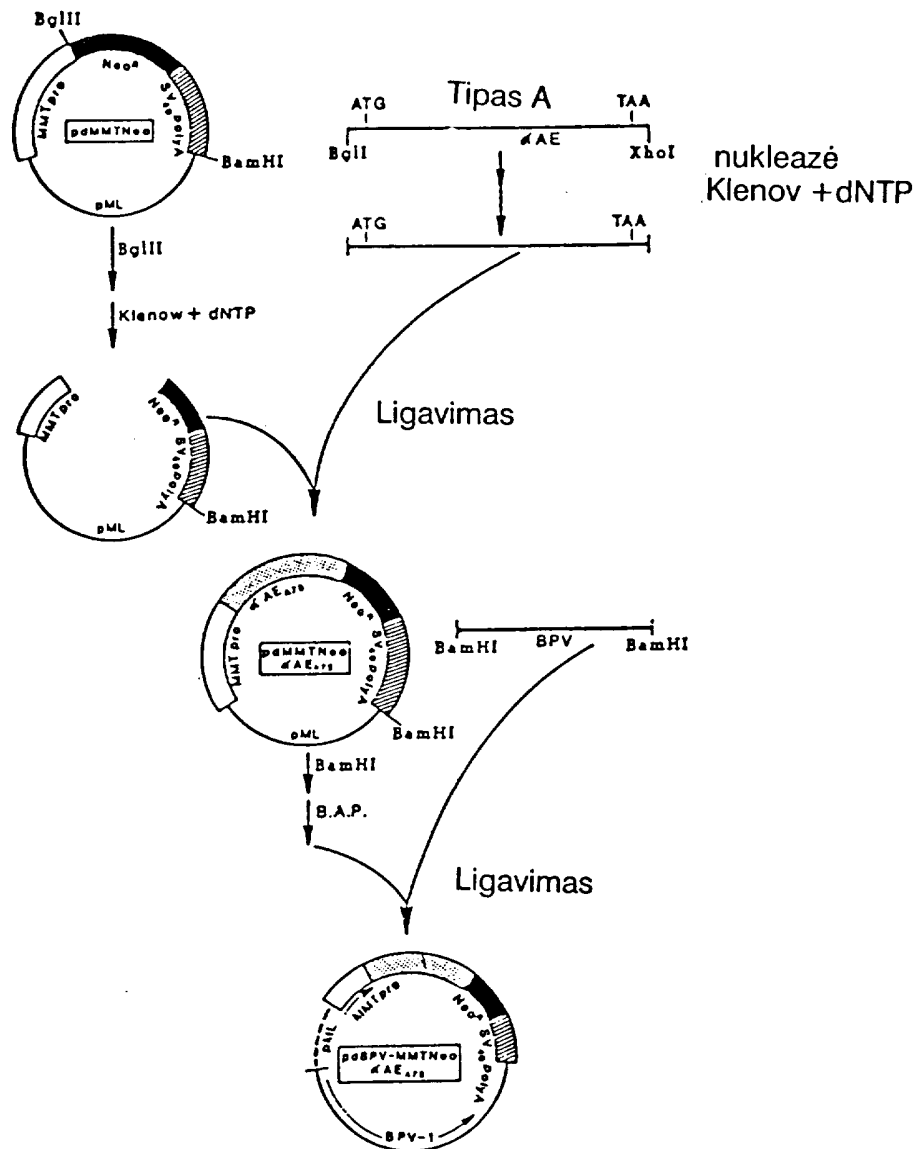


Fig.1

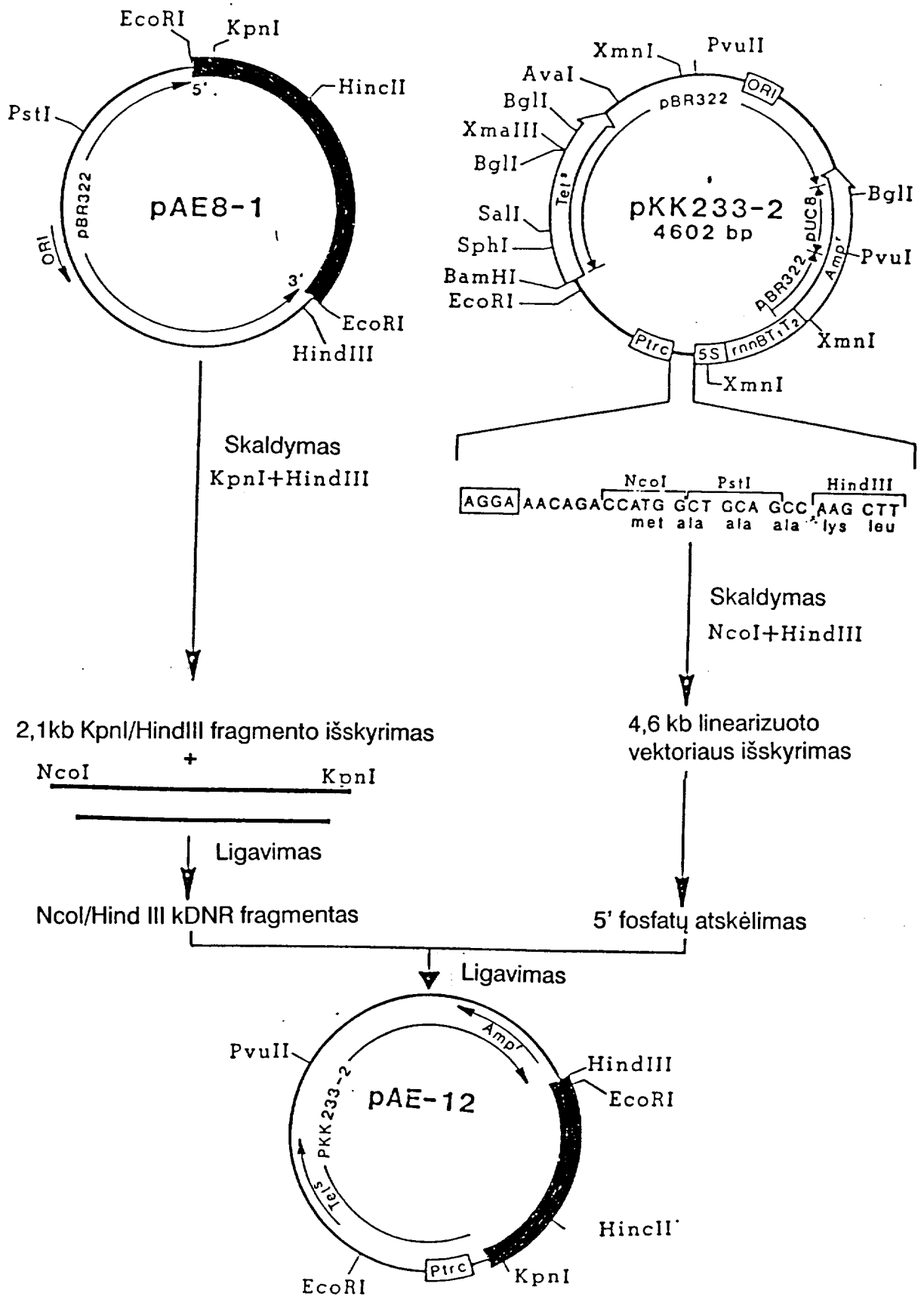


Fig. 2

PAE 51
 PAE 36
 PAE 31
 PAE 24
 PAE 12
 C
 B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 + - + - + - + - + - + - + -

PAE 51
 PAE 36
 PAE 31
 PAE 24
 PAE 12
 C
 A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 + - + - + - + - + - + - + -

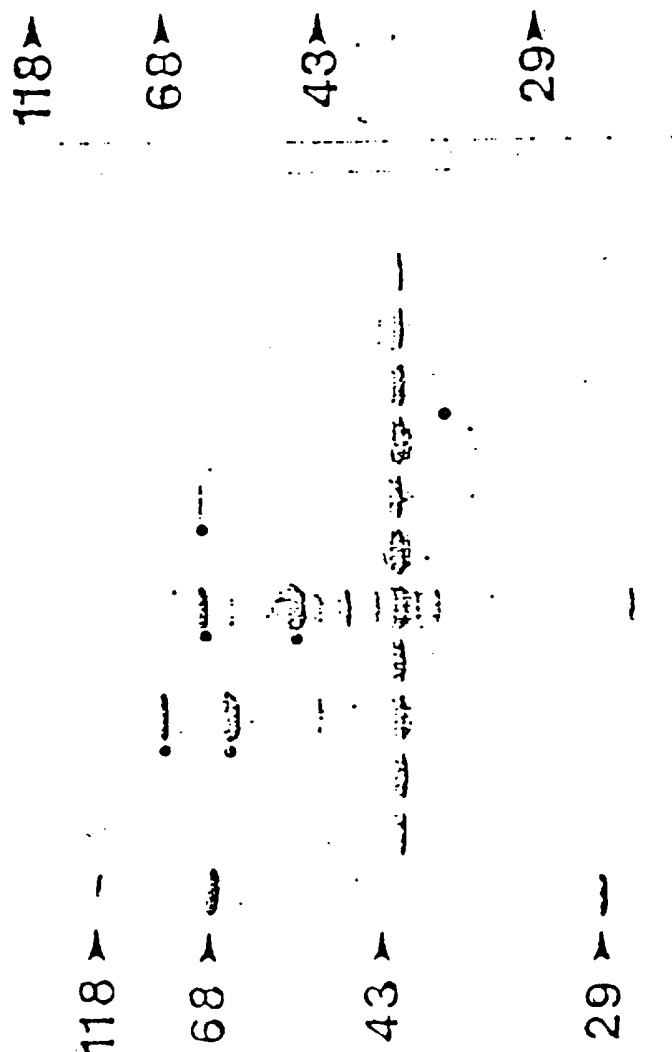


Fig.3

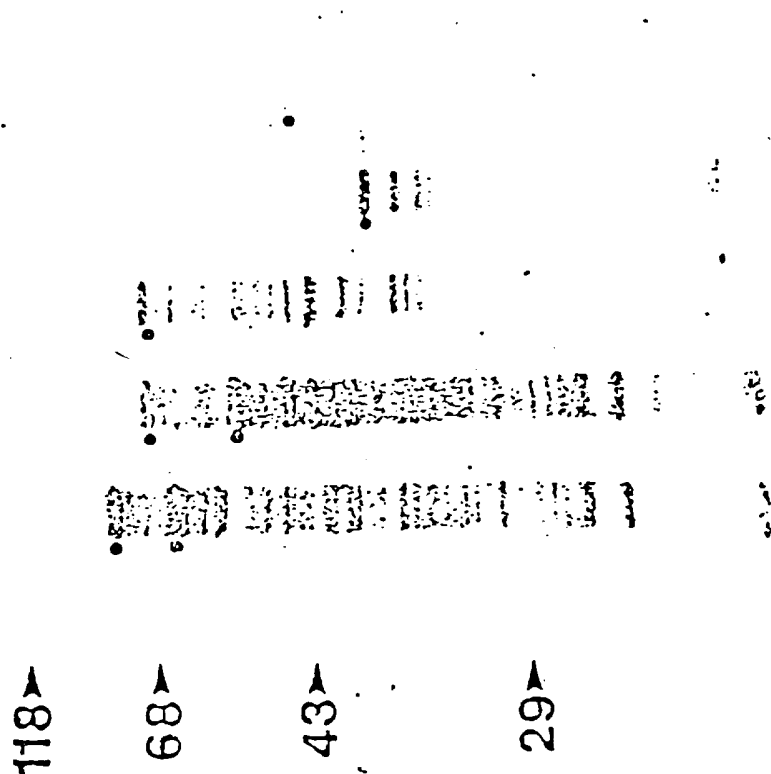


Fig.4

-345
GGATGCTGCCAGTGGGACCAGGTTCCGAATGATGACTGCGGGGTCTGCGGATAGCCCTCACAGCCCTGGCATTTGGAGCGATAAGGACCCCTGCTCC
-246
TCCAGCCCTGTGGCTGCCACCGGCTCTGGCGGCTCTGGAGGGCGGGGCTCCAGGGGGGGGAGCGGACTCCAGAGCCGCTTCCACACGCTGGGA
-146
GGGACGGAGCGGACCGGCTGGCCCGGCGCATGCCCTCGCCCGGGGCCATGAAGTAGCTGCCGCCAGCCCTGCCATCCCGCGGCCCGCAGCCCTGCCA
-46
TCCGCGCGCGCCGACCTGCCCGCTGCCCTGGTCTGCGGGGACATGGCCGGAGCGGCCCGCAGCGGCTGCTACTGCTGCTGGGCTGCTCGCCC
55
M A G R A R S G L L L L L L L L A
(18)
TGCAGAGCAGCTGCCTGGCCTTCAGAAGCCCACTTTCTGTCTTTAAGAGGTTTAAAGAACTACCAGATCAITTTTCAATGAATGCCITGGTACCAITGG
155
L O S S C L A F R S P L S V F K R F K E T T R S F S N E C L G T I G
(52)
ACCACTACCCCTCTTGATGATCAGATTTTGGCTGGATATTGCGATGCTGGGTACACCTAAAGAGTCTGACACATACTTCTGCTGTCATGTCATGCGT
255
P V T P L D A S D F A L D I R M P G V T P K E S D T Y F C M S M R
(85)
CTGCCTGTGGATGAGGAAGCTTCGTGATTGACTTCAAGCCTCGTGCAGCATGATGCTGCCACCATATGCTGCTGTTGGATGCAATATGCCCTCGT
355
L P V D E A F V I D F K P R A S M D T V H M L L F G C N M P S
(118)
CCACTGGAAGTACTGGTTTGTGTAAGGAACCTGTACAGATAAGCCAATATTCTATATGCTGGCAAGGAATGCTCCCCCACCCTGCTCCGAA
455
S T G S Y W F C D E G T C T D K A N I L Y A W A R N A P P T R L P K
(152)
AGGTGTTGGATTGAGGAGAACTGGAAGCAATACTTCGTCTTCAAGTTCACATGCGGATATCAGTGCITTTTCAGATAATCACAAGAC
555
G V G F R V G G E T G S K Y F V L O V H Y G D I S A F R D N H K D
(185)
TGCTCGCGGTGCTGCATCTCACAGTGTGCCCCAGCCTTAATTGGGGCATGTACCTTATGATGCTGTGACACITGTCATACCACCGAGAGAGA
655
C S G V S V H L T R V P O P L I A G M Y L M S V D T V I P P G E
(218)
AAGTAGTGAATGCTGACATTTGCTGCCAATACAAAATGTATCCAATGATGTTTGGCTACAGAGTCCACACTCACCATTAGGTAAGGTGGTGAGCGG
755
K V V N A D I S C O Y K M Y P M H V F A Y R V H T H L G K V V S G
(252)
ATACAGTAAGAAACGGACAGTGGACACTGATTGGACGCCAGAACCCCGCTGCCAGGCTTTCTACCTGTGGAAACCCCGTTGATGTTACTTTT
855
Y R V R N G O W T L I G R O N P Q L P Q A F Y P V E H P V D V T F
(285)

Fig. 5. A tipo seka

GGTGATATACGGCAGCCAGATGTGTGTTCACTGGTGAAGGGAGGACAGAGGCCACCCATATCGCGGCACCTTCTAGTGACGAAATGTGTAACTGTACA
955
G O I L A A R C V F T G E G R T E A T H I G G T S, S D E M C N L Y (318)
TCATGTATTACATGAAGCCAAATATGCACCTTCTTCATGACCTGTACAAAGAAGCTGGCTCCAGATATGTTCAGAACTATCCCAGCAGAGGCCAATAT
1055
I M Y Y M E A K Y A L S F H T C T K N V A P D M F R T I P A E A N I (352)
CCCAATTCCTGTCAACCGGACATGGTTATGATGCACGGGCATCACAAGAAGCAGAAACAAAGAAAGAGTGTCTTAATGCAGCAGCCAAACACAGGGA
1155
P I P V K P D M V M H G H K E A E N K E K S A L M O Q P K O G (385)
GAGGAAGAAGTATTAGACGAGGATTCATGTGGAAGAAGAACTGGACTGGCCTGGAGTGTACTTGTACCAGGCCAGGTTTCIGGGGTGGCCCTGGATT
1255
E E E V L E Q D F H V E E E L D W P G V Y L L P G O V S G V A L D (418)
CTAAGAATAACCTAGTATTTCCACAGAGGTGACCATGTTGGGATGGAAACTCTTTGACAGCAAGTTGTTTACCAGCAAGAGGTCTTTGGGCCAAT
1355
S K N N L V I F H R G D H V W D G N S F D S K F V Y Q O R G L G P I (452)
TGAGAAGACACCATCCTGGTCATTGACCCAAATATGCTGAATCTCCAGTCCAGTGGCAAGAACCTGTTTATTACCACACGGCTTGAGCATAGAT
1455
E E D T I L V I D P N N A E I L O S S G K N L F Y L P H G L S I O (485)
ACAGATGGAATATTGGGTCACAGATGGCTCTCCACCGGTGTTCAAATGGACCCGCATAGCAAGAAGGCCCTCTTAATTCGGGAAGGAGCA
1555
T D G N Y W V T D V A L H O V F K L D P H S K E G P L L I L G R S (518)
TGCAACCTGGGAGTGACCAAAACCATTTCTGCCAGCCACCGATGTGGCTGTGGAGCCAGTACTGGAGCTGTCTTCGTGTGACACGGTTACTGTAAACAG
1655
M O P G S D O N H F C O P T D V A V E P S T G A V F V S D G Y C N S (552)
TCGGATTGTGCAGTTTCACCAAGCGGAAAGTTCGTACCCAGTGGGAGAGAGTCTCTGGAAGCAGTCTTAGGCCAGGCCAGTTCAGTGTTCCTCAC
1755
R I V O F S P S G K F V T O W G E E S S G S S P R P G O F S V P H (585)
AGTTGGCCCTTGTCCTCATTGGACCAGTTGTGTGTGGCAGACAGGGAAATGGCCGAATCCAATGCTTCAAAACTGACACCAAGAAATTTGTGAGAG
1855
S L A L V P H L D O L C V A D R E N G R I O C F K T D T K E F V R (618)

Fig. 5 (tęsinys)

Fig. 5 (tęsinys)

3214
GTTAGAACACTATTTTCAGAACTCTGAATGTAATTGTGTAAATAAAGTGTTTCAGAGCATTACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 5 (tęsinys)

-345
GGGATGCTGCCAGTGGGACCAGGTTCCGAATGATGACTGCGGGGTCTGCGGATAGCCCTACAGCCCCCTGGCATTCGAGCGATAAGGACCCCTGCTCC
-246
TCCAGCCCTGTGGCTGCCACCGGCTCTGGCCGCTCTGGAGGGCGGGGCTCCAGCGGGCGGAGCGGACTCCAGAGCCGCTTCCCACGCTCGGGA
-146
GCGACGGAGCGGACCCGGCTGGCGCGCATCGCCCTCGCCGGGCCATGAAGTAGTGTGCGCCAGCCCTGCCATCCCGCCGGCCCGCAGCCCTGCCA
-46
TCCCGCCCGCCGCTGCCCTGCCCTGCTGCGGGACATGCGCGGACATGCGCGGACGCGCCCGCAGCGGTCTGCTACTGCTGCTGGGCTGCTCGGCC
55
M A G R A R S G L L L L L L L L A
(18)
TGCAGAGCAGCTGCCTGGCCTTCAGAGGCCCACTTTCIGTCTTTAAGAGGTTTAAAGAACTACCCAGATCATTTTCCAATGAATGCCCTTGGTACCATGG
155
L O S S C L A F R S P L S V F K R F K E T T R S F S N E C L G T I G
(52)
ACCAGTACCCCTCTGTGATGCATCAGATTTTGGCTGGATATTGCGATGCTGGGTACACCTAACAGAGTCTGACACATACCTTCTGCATGTCCATGCGT
255
P V T P L D A S D F A L D I R M P G V T P K E S D T Y F C H S M R
(85)
CTGCCGTGGATGAGGAAGCCTTCGTGATTGACTTCAAGCCTCGCCAGCATGATGATGTCACCATATGCTGCTGTTGGATGCAATATGCCCTCGT
355
L P V D E E A F V I D F K P R A S M D T V H H M L L F G C N M P S
(118)
CCACTGGAAGTTACTGGTTTGTGATGAAGGAACCTGTACAGATAAGCCAATATTTCTATGCTGGCGAAGGAATGCTCCCCCACCCTCCCGAA
455
S T G S Y W F C D E G T C T D K A N I L Y A W A R N A P P T R L P K
(152)
AGGTGTTGGATTGAGGAGGAACTGGAGCAATACTTCGTCCTTCAAGTTCATGCGATATGCGATATCAGTGCITTCGAGATAATCACAAGAC
555
G V G F R V G G E T G S K Y F V L O V H Y G D I S A F R D N H K D
(185)
TGCTCTGGCTGTCCGTACATCTCACACGTTGCCCCAGCCCTTAATTGGGGGATGACCTTATGATGCTGTGACACTGTATACCCAGGAGAGA
655
C S G V S V H L T R V P Q P L I A G M Y L M S V D T V I P P G E
(218)
AAGTAGTAATGCTGACATTTGCTGCCAATACAAAATGTATCCAATGCTGTTGCTACAGAGTCCACACTACCATTTAGGTAAGGTGGTGGCGG
755
K V V N A D I S C Q Y K M Y P M H V F A Y R V H T H L G K V V S G
(252)
ATACAGATAAGAAACGGACAGTGGACACTGATTGGAGCCAGAACCCCCAGCTGCCACAGGCTTCTACCTGTGGAACACCCCTGTGATGTACTTT
855
Y R V R N G Q W T L I G R Q N P Q L P Q A F Y P V E H P V D V T F
(285)

Fig. 6. B tipo seka

955 GGTGATATACTGCAGCCAGATGTGTGTTCACTGGTGAAGGGAGGACAGAGGCCACCCACATCGGGGGCACTTCTAGTACGAAATGTGTAACCTGTACA
 (318) G D I L A A R C V F T G E G R T E A T H I G G T S S D E M C N L Y
 1055 TCATGTATTACATGGAAGCCAAATATGCACCTTCCTTCATGACCTGTACAAAGACGTGGCTCCAGATATGTTCCAGAACTATCCAGCAGAGGCCAATAT
 (352) I M Y Y H E A K Y A L S F M T C T K N V A P D M F R T I P A E A N I
 1155 CCCAATTCCTGTCAAAACCGGACATGGTTATGATGCACGGGCATCACAAGAACGAGAAACAAAGAAAGAGTGTCTTAATGCCAGCAGCCCAAAACAGGGA
 (385) P I P V K P D M V M H G H K E A E N K E K S A L M Q O P K O G
 1255 GAGGAAGAAGTATTAGAGCAGGGTGATTTCTATTCACTGCTTTCCAAGCTGCTAGGAGAAAGGAAGATGTTTCATGTGCACAAGTATAATCTACAGAAA
 (418) E E E V L E O G D F Y S L L S K L L G E R E D V H V H K Y N P T E
 1355 AGACAGAATCTGGGTGAGCTGGTAGCTGAGATTGCAAAACGGTGTCCAGAAAGGACCTTGGTGGCTGACGCCAGAGAGGTCAGAGCATGAGGA
 (452) K T E S G S D L V A E I A N V V O K K D L G R S D A R E G A E H E E
 1455 ATGGGTAATGCTATCCTAGTCAGAGACAGGATCCACAGATTCACAGCTAGAGTCAACTCTGAGGCCAGCTGAGAGCAGAGCTTCTCGTTCAGCAG
 (485) W G N A I L V R D R I H R F H O L E S T L R P A E S R A F S F O O
 1555 CCTGGCAAGGCCCTTGGGAACCAAGACCTCAGGAGATTTCCATGTGGAAGAACTGGACTGGCCTGGAGTGTACTTGTACCAGGCCAGGTTTCTG
 (518) P G E G P W E P E P S G D F H V E E E L D W P G V Y L L P G O V S
 1655 GGGTGGCCCTGGATTCTAAGAATAACCTAGTATTTCCACAGAGGTGACCATGTTGGGATGGAACTCTTTGACAGCAAGTTTGTATTACCAGCAAG
 (552) G V A L D S K N N L V I F H R G D H V W D G N S F D S K F V Y O Q R
 1755 AGGCTTGGCCAATTGAAGAAGACCATCCTGGTCATTGACCCAAATAATGCTGAAATCTCCAGTCCAGTGGCAAGAAGCTGTTTATTACCACAC
 (585) G L G P I E E D T I L V I D P N N A E I L Q S S G K N L F Y L P H
 1855 GGCITGAGCATACAGATGGAATATTGGGTACAGATGGCTCTCCACCAGGTGTTCAATTTGACCCCGCATAGCAAGAAGGCCCTCTCTTAA
 (618) G L S I D T D G N Y W V T D V A L H O V F K L D P H S K E G P L L

Fig. 6 (tęsinys)

TTCTGGGAAGGACATGCAACCTGGGAGTGACCAAAATCATTTCTGCCAGCCACCGATGGCTGTGGAGCCAGTACTGGAGCTGTCTTCGTGTCAGA 1955
 I L G R S M O P G S D O N H F C O P T D V A V E P S T G A V F V S. D (652)
 CGTTACTGTACAGTCGGATTGTCAGTTTACCAAGCGGAAAGTTGTCACCCAGTGGGAGAAGAGTCCTCTGGAAGCAGTCTTAGGCCAGGCCAG 2055
 G Y C N S R I V O F S P S G K F V T O W G E E S S G S S P R P G O (685)
 TTCAGTCTCCACAGTTGGCCCTTGGCCTCATTGGACCAGTTGTGTGGCAGACAGGAAATGGCCGAATCCAATGCTTCAAAACTGACACCA 2155
 F S V P H S L A L V P H L D O L C V A D R E N G R I O C F K T D T (718)
 AAGATTGTGAGAGATTAGCACGCATCATTGGAAGGAATGCTTTGCCATTATATACCAGTTTCTCTTTGCCGTAACGGGAAGCCTTA 2255
 K E F V R E I K H A S F G R N V F A I S Y I P G F L F A V N G K P Y (752)
 CTTGGAGACCAAGCCCCGTCAAGGATTGTGATGAACTTTCCAGTGGGAAATTATAGAGCTTTCAGCCAGTACGCAAGCACTTCGACATGCCT 2355
 F G D O E P V O G F V M N F S S G E I I D V F K P V R K H F D M P (785)
 CATGATATTGCTCTGAGATGGACTGTGTACATTGGAGCGCACACAAACCCGTGTGGAAGTTACCCCTGACTGAAAAAATGGAGCATCGGT 2455
 H D I V A S E D G T V Y I G D A H T N T V W K F T L T E K M E H R (818)
 CAGTCAAAAAGGCTGGCATTTGAAGTCCAGGAATCAAGCCGAGGAGTTGTTGAACCCAAAGTGGAGAACAAACCCCTCTCAGAAATTCAGAAGAT 2555
 S V K K A G I E V O E I K A E A V V E P K V E N K P T S S E L O K M (852)
 GCAAGAGAAACAGAAACTGACACAGAGCCCGCTCGGAGTGTCCGTGTTCTCATTACAACCTTCTGTGTTATCTCTGTGCTGGTCTGCTGGCCATT 2655
 O E K O K L S T E P G S G V S V V L I T T L L V I P V L V L L A I (853)
 GTCATGTTTATTCGGTGGAAAAATCAAGGCCCTTTGGAGCAGATCATGACCGCAAGCTCGAGTCAAGTCTGGAAGAGTCTGGGAAGAGAGGAGG 2755
 V M F I R W K K S R A F G A D H D R K L E S S S G R V L G R R G G (886)
 GAGGAGGAAGAGAGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAG 2855
 G G G R R E G R G R E G R K A E G G R R G E G G R . (912)
 AGGCTCTGAGAATAAGTAGAGGGGAAAGGGATTGGCTAAGCACCGGATTCAAGCTGTCAGTCTTTGGGCTGCAGATGCAATGTGGCT 2945

Fig. 6 (tęsinys)