

(11) Patento numeris: **4481** (51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/12**

(21) Paraiškos numeris: **98-116**

(22) Paraiškos padavimo data: **1998 08 19**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 01 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1999 03 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/EP97/00611**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1997 02 11**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 08 19**

(31, 32, 33) Prioritetas: **MI96A000264, 1996 02 13, IT**

(72) Išradėjas:

Alberto Bartorelli, IT
Bruno Berra, IT
Irma Colombo, IT
Severino Ronchi, IT

(73) Patento savininkas:

ZETESIS S.P.A., Galleria del Corso, 2, I-20122 Milano, IT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liucija Janickaitė, 29, a/d 1700, 2010 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Nukleotidų seka iš ožkos kepenų

(57) Referatas:

Aprašyta pilna kDNR, koduojančios 14 kDa baltymą iš ožkos kepenų, pasižymintį citotoksinėmis savybėmis, seka.

5

Šis išradimas susijęs su kDNR, koduojančios 14 kDa baltymą iš ožkos kepenų, seka.

WO 92/10197 aprašo perchlotato rūgšties ekstraktus iš žinduolių organų, konkrečiai, iš ožkos kepenų, susidedančius iš
10 mažiausiai trijų skirtingų baltymų ir pasižyminčių neįprastinėmis farmakologinėmis ir imunologinėmis savybėmis.

Kiek vėliau, publikacijoje WO 96/02567 aprašyta 14 kDa baltymo, išgryninto iš ekstraktų, aprašytų WO 92/10197, dalinė aminorūgščių seka. Šis baltymas pasižymi žymiu antineoplastiniu
15 aktyvumu tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, o gyvūnų, imunizuotų šiuo baltymu, serumas pasižymi citotoksiniu aktyvumu prieš žmogaus auglio ląstelių linijas.

1993 m. Levy-Favatier et al. [*Eur. J. Biochem.* 212 (3), 665-673] aprašė kDNR seką, koduojančią 23 kDa dimerinį
20 polimerą, išgrynintą iš žiurkės kepenų ir inkstų 5 % perchlorato rūgštimi; atitinkama aminorūgščių seka pasižymi dideliu homologiškumu su 14 kDa baltymo, aprašyto WO 96/02567, seka. kDNR seka deponuota EMBL duomenų banke, registracijos Nr. X70825.

25 1995 m. EMBL duomenų banke deponuota dar viena kDNR seka, koduojanti 14 kDa baltymą, išgryninta perchlorato rūgštimi iš žiurkės kepenų, pasižyminti dideliu homologiškumu su seka, aprašyta Levy-Favatier et al., registracijos Nr. D49363.

Šią seką aprašė Oka *et al.*, [*J. Biol. Chem.* (1995) 270 (50), 30060-30067].

Be to, 1996 m. dvi naujos iRNR sekos, pasižyminčios dideliu homologiškumu kDNR, aprašytai Levy-Favatier *et al.* ir
5 Oka *et al.*, buvo deponuotos EMBL duomenų banke. Viena iš jų (registracijos Nr. X95384) koduoja 14,5 kDa žmogaus baltymą ir neseniai buvo aprašyta Schmiedeknecht *et al.* [*Eur. J. Biochem.* (1996) 242 (2), 339-351]. Kita seka (registracijos Nr. U50631) koduoja "*Mus Musculus* į šilumą reaguojantį baltymą"; iki šiol
10 nepaskelbta jokio išsamesnio tyrinėjimo apie šią seką.

Mes radome naują kDNR seką, koduojančią visą 14 kDa baltymą, išekstrahuotą perchlorato rūgštimi iš ožkos kepenų ir aprašytą Wo 96/02567. Visa nukleotidų seka pateikta ID Nr. 1.

kDNR seka, koduojanti 14 kDa baltymą, išekstrahuotą
15 perchlorato rūgštimi iš ožkos kepenų ir aprašytą WO 96/02567 (seka ID Nr. 2) tinka minėto baltymo arba jo mutantų gavimui rekombinantinės DNR metodais arba diagnostiniam panaudojimui nukleotidinių zondu pagrindu.

Šio išradimo kDNR seka gauta tokiu būdu:
20 aminorūgščių sekos, aprašytos WO 96/02567, pagrindu susintetinti du degeneruotų oligonukleotidų mišiniai. Vienas mišinys (vadinamas PG-1) susideda iš 2.048 oligo-20-merų, atitinkančių aminorūgščių sekai nuo Met-1 iki Gln-7. Kitas mišinys (vadinamas PG-2) susideda iš 192 oligo-20-merų,
25 atitinkančių aminorūgščių sekai nuo Ala-46 iki Xaa-52.

Atlikta PCR reakcija, panaudojant šiuos oligonukleotidų mišinius praimeriais ir kDNR, gautas iš atvirkštinės transkripcijos nuo totalinės RNR, išskirtos iš ožkos kepenų, kaip šablonus. Atvirkštinės transkripcijos reakcija vykdyta 42 °C temperatūroje

60 min., naudojant oligo(dT)₁₅ kaip praimerį. Po 35 gausinimo ciklų šiose sąlygose: 95 °C - 2 min., -55 °C - 2 min., -72 °C - 1 min.; 2 mM MgCl₂, pagausintas DNR fragmentas (155 bazių poros) subklonuotas į plazmidės vektorių pCRII ir trijų skirtingų klonų intarpo seka nustatyta naudojant T7 ir Sp6 sekos nustatymo praimerus. Šio fragmento nukleotidų seka (atitinkanti sekos ID Nr. 1 sritį nuo 215 iki 369 nukleotido) patvirtina WO 96/02567 aprašytą aminorūgščių seką ir identifikuoja, kad Xaa-33 yra Cys.

10 Nustačius pilną 14 kDa baltymo, aprašyto Ceciliani et al. [*FEBS Lett.* (1996) 393, 147-150], aminorūgščių seką, po panašios kaip aukščiau aprašyta procedūros, nustatyta sekos ID Nr. 1 nukleotidų seka nuo 215 iki 511 nukleotido. Trumpai tariant, susintetinti degeneruoti oligonukleotidai (vadinami PG-
15 9). Šis mišinys susideda iš 32.768 oligo-20-merų, atitinkančių aminorūgščių seką nuo Pro-131 iki Val-137. PCR reakcija vykdyta tokiose pačiose kaip anksčiau aprašyta sąlygose, naudojant oligonukleotidų mišinius PG-1 ir PG-9 praimeriais ir kDNR, gautas iš atvirkštinės transkripcijos nuo totalinės RNR, išskirtos
20 iš ožkos kepenų, kaip šablonus. Pagausintas 296 bazių porų DNR fragmentas subklonuotas į plazmidės vektorių pCRII ir intarpo seka nustatyta naudojant T7 ir Sp6 sekos nustatymo praimerus.

Nukleotidų seka link poly(A) galo nustatyta tinkamai
25 modifikuotu greito pagausinimo kDNR 3'-gale metodu (3'-RACE). Šiuo atveju šablonas, naudotas PCR reakcijoje buvo gautas iš atvirkštinės transkripcijos nuo totalinės RNR, išgrynintos iš ožkos kepenų, , praimeriu naudojant su adapteriu sujungtą oligo(dT)₁₇. PCR praimeriai susideda iš adapterio ir oligo-30-mero (vadinamo

PG-4), esančio srityje nuo 236 iki 265 nukleotido. PCR reakcijos sąlygos buvo tokios: reakcijos mišinyje, turinčiame 2 mM MgCl₂ ir tik praimerį PG-4, atlikta 10 pagausinimo ciklų po dvi stadijas: 45 s 95 °C temperatūroje, 3 min. -72 °C temperatūroje. Po to, 5 pridėjus antro PCR praimerio (adapterio), atlikti 35 pagausinimo ciklai tokiose sąlygose: 45 s 95 °C temperatūroje, 1 min. -52 °C temperatūroje, 2 min. -72 °C temperatūroje. Siekiant išskirti individualesnį DNR fragmentą, atlikta iš eilės dar viena PCR reakcija, naudojant praimerį PG-5, link 3'-galo, apimantį 10 nukleotidus nuo 266 iki 289 sekoje ID Nr. 1. Šis DNR fragmentas (apie 800 bazių porų) taip pat buvo subklonuotas į plazmidės vektorių pCRII, ir seka nustatyta su T7 ir Sp6 sekos nustatymo praimeriais. Jo seka patvirtina 14 kDa baltymo, aprašyto Ceciliani *et al.* [FEBS Lett. (1996) 393, 147-150] aminorūgščių seką nuo 15 Lys-56 link C-galo, išskyrus paskutinę aminorūgštį: Val-137 yra pakeistas Leu-137.

Nukleotidų seka link kDNR 5'-galo nustatyta 5'-RACE metodu. Ši procedūra susideda iš dvigubos grandinės kDNR sintezės nuo RNR poly(A), išekstrahuotos iš ožkos kepenų, šių 20 kDNR ligavimo adapteriu ir pagausinimo PCR reakcijoje, naudojant praimerį, esantį adapterio sekoje ir dar kitą praimerį, esantį kDNR sekoje. Šiuo atskiru atveju buvo naudotas praimeris, apimantis sekos ID Nr. 1 nuo 290 iki 316 nukleotido. Gautas DNR fragmentas. (apie 300 bazių porų) subklonuotas į plazmidės 25 vektorių pCRII, ir seka nustatyta su sekos nustatymo praimeriais T7 ir Sp6.

Visa kDNR seka galutinai patvirtinta tiesiogiai nustatant dviejų DNR fragmentų, gautų skirtingose PCR reakcijose, seką. Kaip ir anksčiau, DNR šablonas buvo kDNR, gautos iš

atvirkštinės transkripcijos nuo totalinės RNR iš ožkos kepenų, praimeriu naudojant oligo (dT)₁₅, o du gausinimo praimeriai buvo kDNR sekos ID Nr. 1 5'-gale nuo 1 iki 26 nukleotido ir 3'-gale nuo 984 iki 1007 nukleotido. Po 35 pagausinimo ciklų (sąlygos: 45 s 5 95 °C temperatūroje, 45 s -60 °C temperatūroje, 1 min. 30 s -72 °C temperatūroje, 2 mM MgCl₂), 1007 bazių porų DNR fragmento seka nustatyta pagal standartinę metodiką.

10

15

20

25

SEKOS

(1) BENDRA INFORMACIJA:

(i) PAREIŠKĖJAS:

(A) PAVADINIMAS: ZETESIS S.P.A.

5 (B) GATVĖ: GALLERIA DEL CORSO

(C) MIESTAS: MILANAS

(E) ŠALIS: ITALIJA

(F) PAŠTO INDEKSAS: 20122

(ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS:

10 OLIGONUKLEOTIDŲ SEKA IŠ OŽKOS KEPENŲ

(ii) SEKŲ SKAIČIUS: 2

(iv) KOMPIUTERINIS PAVIDALAS

(A) LAIKMENOS TIPAS: diskelis

(B) KOMPIUTERIS: suderinamas su IBM PC

15 (C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMINIS APRŪPINIMAS:

Patent In Release 1.0, Version 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIJA SEKAI ID Nr. 1:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

20 (A) ILGIS: 1017 bazių porų

(B) TIPAS: nukleino rūgštis

(C) GRANDINĖ: vienguba

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: kDNR

25 (vi) ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: Capra hircus

(F) AUDINIŲ TIPAS: kepenys

(ix) ŽYMĖS:

(A) PAVADINIMAS/KODAS: CDS

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEKA ID Nr. 1:

	CTTTGAAGCA	GCGATTCTGG	CTTCGGCTGG	TCAGGCGACG	CGAGCAGAAC	CGTGTGCTGC	60
	GTACTTGTTT	CCGAAGGGCA	GCAAAGGAAA	AGGGTTAGCC	ATG TCG TCT	TTG GTC	115
					Met Ser Ser	Leu Val	
5					1	5	
	AGA AGG	ATA ATC	AGC ACG	GCG AAA	GCC CCC	GCG GCC	ATT GGT
	Arg Arg	Ile Ile	Ser Thr	Ala Lys	Ala Pro	Ala Ala	Ile Gly
			10		15		20
	AGT CAG	GCT GTG	TTA GTC	GAC AGG	ACC ATT	TAC ATT	TCA GGA
10	Ser Gln	Ala Val	Leu Val	Asp Arg	Thr Thr	Ile Tyr	Ile Ser
		25		30		35	
	GGT ATG	GAC CCT	GCA AGT	GGA CAG	CTT GTG	CCA GGA	GGG GTG
	Gly Met	Asp Pro	Ala Ser	Gly Gln	Leu Val	Pro Gly	Gly Val
		40		45		50	
15	GAG GCT	AAA CAG	GCT CTT	ACA AAC	ATA GGT	GAA ATT	CTG AAA
	Glu Ala	Lys Gln	Ala Leu	Thr Asn	Ile Ile	Gly Glu	Ile Leu
		55		60		65	
	GGC TGT	GAC TTC	ACG AAT	GTG GTA	AAA GCA	ACG GTT	TTG CTG
	Gly Cys	Asp Phe	Thr Asn	Val Val	Lys Ala	Thr Val	Leu Leu
20	70		75		80		85
	ATA AAT	GAC TTC	AGT GCT	GTC AAT	GAT GTC	TAC AAA	CAA TAT
	Ile Asn	Asp Phe	Ser Ala	Val Val	Asn Asp	Val Tyr	Lys Gln
			90		95		100
	AGT AGT	TTT CCG	GCG AGA	GCT GCT	TAC CAG	GTT GCT	GCT TTG
25	Ser Ser	Phe Pro	Ala Arg	Ala Ala	Tyr Gln	Val Ala	Ala Leu
			105		110		115
	GGA GGC	CGT GTT	GAG ATC	GAA GCA	ATA GCT	GTG CAA	GGA CCT
	Gly Gly	Arg Val	Glu Ile	Glu Ala	Ile Ala	Val Gln	Gly Pro
							Leu Thr

	120		125		130	
30	ACA GCA TCA CTC	TAAGTGGGCC	AAGTGTTATT	TAGTCTGGAA	ATTTAATAGT	551
	Thr Ala Ser Leu					
	135					
	ATTTTAAAC	TAATGGCTTA	ATCCTTGTTG	GAAAGTATTA	AGGTTGAAAT	ATCTGAAAAT
5	611					
	ATTATGGAAA	TACCATATAA	TAAGGGAAAC	GATATGAATT	GAAGATTAAT	GATGAATCTA
	671					
	GTTACTAATA	TTACAAATTA	TACTTCTGTA	ACACTTGTAT	TGCTGGATGT	GGGAAAACAG
	731					
10	ACATGCCTTA	CTGAGTTAAC	TCAGAAGAAT	AAAAGTAGAA	GGAAATAACA	TGTAGGAAAG
	791					
	ATGAGCTACT	ATGCCTGAAA	AGTAAGGAAA	AGCACACCTA	ATTCAACTAA	ACCCTATTAA
	851					
	TTTAATGATG	GGAAGTATTT	TATTATGTCA	GATATGTGAT	TTTACTTGA	ATAAACTAA
15	911					
	AGCATTTAAA	TTTGAATGGC	AGAGATAAAG	GAGAAGAAAC	TGGACCAAAT	TTTATATAGA
	971					
	TAATATTTTT	CTAGTGGAAA	TAAAATAGCA	TGCAGATTTT	CAAAAA	
	1017					

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. kDNR seka, pateikta ID Nr.1, o ID Nr.1 yra šios
5 apibrėžties dalis, ir jos fragmentai.

10

15

20

25