

(19)



(10)

LT 4701 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

- (11) Patent numeris: **4701**
- (21) Paraiškos numeris: **99-133**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1999 11 10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 04 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **2000 09 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/07723**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 04 15**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 11 10**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **043700, 1997 04 16, US**
- (72) Išradėjas:
Nozar M. Mehta, US
Martha V.L. Ray, US
Christopher P. Meenan, US
Angelo P. Consalvo, US
- (73) Patent savininkas:
UNIGENE LABORATORIES INC.,
Little Falls Road, Fairfield, New York 07004-2193, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Tiesioginė peptidų ekspresija į augimo terpę

(57) Referatas:

Aprašomos ekspresijos sistemos, skirtos tisioginei peptidinio produkto ekspresijai į augimo terpę, kurioje auginamos genų inžinerijos būdu gautos ląstelės-šeimininkai. Panaudojant naujuosius vektorius, specialiai pasirenkant šeimininkus ir/arba fermentacijos būdus, kuriuose kruopščiai kontroliuojamas ląstelių augimo greitis, ir augimo fazėje naudojant induktorių, gaunama didelė produkto išeiga. Pateikiami specialūs vektoriai,

kuriuose yra kontrolinės sritys, turinčios daug promotorių, funkciškai sujungtų su signalinį peptidą koduojančiomis sritimis, esančių prieš kryptį nuo koduojančios srities, kuri koduoja dominantinį peptidą. Išėigai padidinti naudojamos daugybinės transkripcijos kasetės. Taip pat aprašomas amidintų peptidų produkavimas naudojant šias ekspresijos sistemas.

Išradimo sritis

Šis išradimas yra susijęs su genų inžinerijos būdu sukurtų ląstelių-šeimininkų, ekspresuojančių peptidinį produktą, tiesioginė peptidinio produkto ekspresija į augimo terpę. Konkrečiau, šis išradimas yra susijęs su ekspresijos vektoriais, ląstelėmis-šeimininkais ir/arba fermentacijos metodais, skirtais didele išeiga produkuoti peptidinį produktą, kurį išskiria šeimininkas į augimo terpę. Kai kuriuose įgyvendinimo variantuose šis išradimas yra susijęs su tiesiogine peptidinio produkto, C-gale turinčio gliciną, ekspresija, kuris po to yra paverčiamas į amidinį peptidą, minėto glicino vietoje turintį aminogrupę.

Su išradimu susijusio technikos lygio aprašymas

Peptidinių produktų, t.y. bet kokio junginio, kurio molekulę sudaro daug aminorūgščių, sujungtų peptidiniu ryšiu, rekombinantiniam produkavimui yra sukurta daug įvairių metodų. Jeigu svetimas peptidas yra mažas, iškyla tokia problema: šį peptidą dažnai lengvai skaldo ląstelių-šeimininkų, kurios buvo naudojamos peptidui ekspresuoti, citoplazmoje arba periplazmoje esančios endogeninės proteazės. Kitos problemos yra: pakankamos išeigos pasiekimas ir palyginus grynos formos peptido išgavimas, nepakeičiant jo tretinės struktūros (kurios pakeitimas gali nepageidaujamai sumažinti jo gebą atlikti pagrindinę funkciją). Norint įveikti mažo baltymo dydžio problemą, anksčiau dažnai būdavo ekspresuojamas dominantis peptidinis produktas, kaip sulietas baltymas su kitu (paprastai didesniu) peptidu, ir šis sulietas baltymas sukaupiamas citoplazmoje. Šis kitas peptidas gali atlikti keletą funkcijų, pavyzdžiui, apsaugoti dominantį peptidą nuo šeimininko citoplazmoje esančių proteazių. Viena tokia ekspresijos sistema yra aprašyta Ray et al., *Bio/Technology*, Vol. 11, p. 64-70 (1993).

Tačiau peptidinio produkto išskyrimas, naudojant tokią technologiją, reikalauja atskėlimo nuo sulieto baltymo ir atskyrimo nuo visų paprastai šeimininko citoplazmoje esančių peptidų. Tam tikslui gali reikėti keleto kitų stadijų, kurios gali sumažinti bendrą proceso produktyvumą. Pavyzdžiui, kai anksčiau aprašytas sulietas baltymas yra sukaupiamas citoplazmoje, paprastai ląstelės turi būti surenkamos ir lizuojamos, ir skaidrinimo stadijoje pašalinamos ląstelių skeveldros. Viso to išvengiama šiame išradime siūlomame būde, kuriame dominantis peptidinis produktas yra ekspresuojamas tiesiogiai į augimo terpę ir išgaunamas iš jos.

Pagal ankstesnę technikos lygį dažnai reikia naudoti afininės chromatografijos stadiją sulieto baltymo gryninimui, kuris turi būti dar suskaldomas, norint atskirti dominantį peptidą nuo jo sulieto partnerio. Pavyzdžiui, aukščiau nurodytame *Bio/Technology* straipsnyje lašišos kalcitonino pirmtakas buvo atskeliamas nuo jo sulieto partnerio naudojant bromcianą. Šiai skaldymo stadijai reikėjo dar papildomos stadijos, kad būtų apsaugotos cisteino sulfhidrilinės grupės, esančios lašišos kalcitonino pirmtako 1- ir 7-je padėtyje. Norint gauti apsaugančias grupes cisteinams, buvo naudojamas sulfoninimas. Tai savo ruožtu pakeitė lašišos kalcitonino pirmtako tretinę struktūrą ir po to šį pirmtaką reikėjo renatūruoti (ir, žinoma, pašalinti apsaugančias grupes).

Šio išradimo peptidinis produktas yra ekspresuojamas tik su signaline seka, ir neekspresuojamas su dideliu sulietu partneriu. Šis išradimas duoda "tiesioginę ekspresiją". Iš pradžių ekspresuojama su signaline sritimi, prijungta prie jos N-galinės dalies. Tačiau ši signalinė sritis yra atskeliama po translacijos, peptidinio produkto *sekrecijos* į ląstelės periplazmą metu. Po to šis peptidinis produktas difunduoja arba yra kitaip išskiriamas iš periplazmos į augimo terpę už ląstelės, iš kur jį galima išskirti reikiamoje tretinėje formoje. Jis nėra prijungtas prie kokio nors suliejimo partnerio, kurio pašalinimui pirmiausia reikėtų ląstelių lizavimo, denatūracijos arba modifikacijos, nors kai kuriuose šio išradimo įgyvendinimo variantuose peptidinio produkto cisteino sulfhidrilinių grupių apsaugojimui yra naudojamas sulfoninimas.

Kita problema, susijusi su ankstesniuose darbuose naudojamu peptidinio produkto sukaupimu ląstelės viduje, yra tai, kad sukaupiamas peptidinis produktas gali būti toksiškas ląstelei, ir tai gali apriboti sulieto baltymo, kurį galima būtų sintezuoti, kiekį. Kita šios strategijos problema yra tai, kad didesnis suliejimo partneris sudaro didesniąją išeigos dalį. Pavyzdžiui, 90 % produkavimo išeigos gali būti didesnis suliejimo partneris, ir lieka tik 10 % išeigos, priklausančios dominančiam peptidui. Dar kita šios strategijos problema yra tai, kad sulietas baltymas gali sudaryti netirpius inkliuzinius kūnelius ląstelėje, ir šių inkliuzinių kūnelių soliubilizavimas, o po to suskaldymas gali nebeduoti biologiškai aktyvių peptidų.

Ankstesniuose darbuose bandyta ekspresuoti peptidą kartu su prijungtu prie N-galo signaliniu peptidu, kad būtų nukreipiama norimo peptidinio produkto sekrecija į periplazmą (žr. EP177343, Genentech Inc.). Buvo identifikuota keletas signalinių peptidų (žr. Watson, M. Nucleic Acids Research, Vol. 12, Nr.13, pp: 5145-5164). Pavyzdžiui, Hsiung et al. (Biotechnology, Vol. 4, November 1986, pp: 991-995) tam tikriems peptidams nukreipti į periplazmą naudojo *E. coli* išorinės membranos baltymo A (OmpA) signalinį peptidą. Labai dažnai į periplazmą sekretuojami peptidai linkę joje ir pasilikti, ir mažai išsiskiria į terpę. Norint išlaisvinti pakankamą kiekį periplazminių komponentų, reikalinga kita nepageidautina stadija - išorinės membranos suardymas arba padarymas laidžia membrana. Kai kuriuose ankstesniuose darbuose buvo bandoma išskirti peptidus iš periplazmos į augimo terpę už ląstelės, statant į pavojų išorinės membranos barjero integralumą, imant šeimininką, ekspresuojantį norimą peptidinį produktą, turintį signalinį peptidą kartu su liziniu peptidiniu baltymu, kuris padaro išorinę membraną laidžią arba nesandaria (U.S. Patent No. 4,595,658). Tačiau reikia būti atsargiam su lizinio peptidinio baltymo kiekio produkavimu, kad nebūtų pavojų ląstelių integralumui ir jos nežūtų. Pagal šią metodiką dominančio peptido išgryninimas dar labiau pasunkėja.

Apart aukščiau aprašytų išorinės membranos destabilizavimo metodikų, yra netokie griežti gram-neigiamų bakterijų laidumo padidinimo būdai. Šie būdai nebūtinai sukelia išorinės membranos destrukciją, kuri gali

sumažinti ląstelės gyvybingumą. Tokie būdai apima, bet neapsiriboja, katijoninių agentų (Martti Vaara, *Microbiological Reviews*, Vol. 56, p. 395-411 (1992) ir glicino (Kaderbhai et al., *Biotech. Appl. Biochem.*, Vol. 25, p. 53-61 (1997) panaudojimą. Katijoniniai agentai membraną padaro laidžia sąveikaudami su išorinės membranos liposacaridiniu karkasu ir sukeldami jo pažeidimus. Pažeidimų ir suardymo laipsnis gali būti neletalinis arba letalinis priklausomai nuo panaudotos koncentracijos. Glicinas gali pakeisti alanino liekanas peptidoglikano peptidiniame komponente. Peptidoglikanas yra vienas iš gram-neigiamų bakterijų ląstelių išorinės sienelės struktūrinių komponentų. Auginant *E. coli* esant didelėms glicino koncentracijoms, padidėja glicino-alanino mainų dažnis ir gaunama defektyvi ląstelės sienelė, dėl ko padidėja laidumas.

Kitas anksčiau aprašytas norimo peptidinio produkto išskyrimą sukeliantis metodas yra produkto suliejimas su baltymu-nešikliu, kuris paprastai yra išskiriamas į terpę (hemolizinas), arba viso baltymo ekspresavimas ant išorinės membranos (pvz. ompF baltymas). Pavyzdžiui, *E. coli* ląstelės gali išskirti žmogaus β -endorfiną kaip sulietą baltymą, jeigu jis yra surištas su ompF baltymo fragmentu (*EMBO J.*, Vol. 4, No. 13A, pp: 3589-3592, 1987). Tačiau norimo peptidinio produkto išskyrimas yra sunkus, kadangi jį reikia atskirti nuo peptido-nešiklio, ir metodas turi kai kuriuos (nors nevisus) trūkumus, susijusius su sulietų peptidų ekspresija citoplazmoje.

Dar kita anksčiau aprašyta strategija yra genetinis ląstelės-šeimininko pakeitimas, sukuriant naujus kamienus, kurie turi laidžią išorinę membraną, kuri santykinai negali išlaikyti jokių periplazminių peptidų arba baltymų. Tačiau tokius kamienus gali būti sunku išlaikyti ir gali reikėti griežtų sąlygų, kurios nepalankiai veikia norimo peptido išėigą.

Raymond Wong et al. (U.S. Patent No. 5,223,407) pasiūlė dar vieną peptidinio produkto išskyrimo strategiją, pagaminant rekombinantinį DNR konstruklą, kurį sudaro DNR, koduojanti heterologinį baltymą, sujungta skaitymo rėmelyje su DNR, koduojančia ompA signalinį peptidą, ir kontrolinė sritis, turinti tac promotorių. Tokios sistemos duodamos išėigos, kaip aprašoma, yra daug mažesnės nei gaunamos naudojant šį išradimą.

Nors ankstesniuose darbuose yra nurodoma galimybė eksportuoti baltymus iš periplazmos į terpę, toks būdas gali duoti nesveikas ląsteles, kurias bus sunku išauginti iki norimų didelių tankių, ir tai nepalankiai veiks produkto išeigą.

Šiame išradime stengiamasi pagaminti peptidą didele išeiga, panaudojant produktyvų ekspresijos vektorių, pateikti didelę išeigą duodančias kultivavimo metodikas ir kitokius patobulinimus, kurie leidžia gauti didelę dominančio išskirto peptido išgavimo iš augimo terpės išeigą, nesuardant ląstelės membranos integralumo.

Išradimo santrauka

Taigi, šio išradimo tikslas yra turėti peptidinį produktą, gera išeiga sukauptą terpėje, kurioje auginamos peptidą produkuojančios ląstelės-šeimininkai. Tai yra naudinga, nes terpėje beveik nėra daugumos ląstelių peptidų teršalų.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti pagerintą fermentacijos būdą peptidinio produkto, kurį ekspresuoja genų inžinerijos būdu sukurtos ląstelės-šeimininkai, išeigos padidinimui.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti genų inžinerijos būdu sukurtas ląsteles-šeimininkus, kurios yra ypatingai tinkamos naujiems šio išradimo vektoriams ekspresuoti.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti ląsteles-šeimininkus, kurios yra ypatingai tinkamos lašišos kalcitonino pirmtakui produkuoti, nepriklausomai nuo ekspresijos vektoriaus, naudojamo lašišos kalcitonino ekspresijai.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti pagerintus amidintų peptidų produkavimo būdus, naudojant peptidus-pirmtakus, turinčius C-galinius glicinus; šie pirmtakai po tiesioginės jų ekspresijos į augimo terpę pagal šį išradimą, yra amidinami.

Viename šio išradimo įgyvendinimo variante pateikiamas ekspresijos vektorius, kurį sudaro: (a) koduojanti sritis iš nukleorūgščių, koduojančių peptidinį produktą, sujungta nukleorūgščių skaitymo rėmelyje 3',

koduojančiame signalinį peptidą; ir (b) kontrolinė sritis, funkciškai sujungta su koduojančia sritimi; ši kontrolinė sritis turi daug promotorių ir bent vieną ribosomų prisirišimo vietą, o bent vienas iš minėtų promotorių yra tac. Pateikiamos šiuo vektoriumi transformuotos arba transfekuotos ląstelės-šeimininkai bei tiesioginės peptidinio produkto ekspresijos metodai, kultivuojant tokias ląsteles-šeimininkus.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante pateikiamos ląstelės-šeimininkai, transformuoti ekspresijos vektoriumi, kuris turi lašišos kalcitonino pirmtako arba su kalcitoninu susijusio peptidinio pirmtako ekspresijos geną; šios ląstelės-šeimininkai yra *E. coli* BLR kamienas; ir jų kultivavimo būdai, gaunant minėtą pirmtaką terpėje.

Dar kitame šio išradimo įgyvendinimo variante pateikiamas amidinto peptidinio produkto produkavimo būdas, kuriame yra produkuojamas pirmtakas, turintis C-gale gliciną, naudojant bet kurį iš čia aprašytų vektorių, šeimininkų arba fermentacijos būdų; o po to minėtas glicinas paverčiamas aminogrupe, gaunant peptidinį amidą.

Dar kitame šio išradimo įgyvendinimo variante pateikiamas tiesioginis peptidinio produkto ekspresijos į augimo terpę būdas, kuris susideda iš tokių stadijų: (a) genų inžinerijos būdu gautų ląstelių-šeimininkų, kurios ekspresuoja minėtą peptidinį produktą kartu su signaliniu peptidu kultivavimo minėtoje terpėje sąlygomis, kuriomis minėtų ląstelės-šeimininkų augimas yra kontroliuojamas taip, kad jis būtų 0,05-0,20 padvigubėjimų per valandą; ir tam tikrą minėto kontroliuojamo augimo laikotarpį yra pridėta induktoriaus; ir (b) minėto peptidinio produkto išgavimo iš augimo terpės po viduląstelinio signalinio peptido atskėlimo.

Dar kitame šio išradimo įgyvendinimo variante tiesioginės ekspresijos fermentacijos eigoje į terpę yra pridedama glicino, norint padidinti išorinės membranos laidumą ir peptidinio produkto išskyrimą.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig. 1A ir 1B parodyta pSCT-016B vektoriaus (1A), kuris yra naudojamas konstruojant pSCT-018D vektorių (1B), kuris savo ruožtu yra naudojamas konstruojant pSCT-025 vektorių, konstrukcijos scheminė diagrama.

Fig. 2 parodyta pSCT-019 vektoriaus konstrukcijos scheminė diagrama. LAC-OMPASCTGLY kasetė, panaudota konstruojant pSCT-025 vektorių, buvo gauta polimerazinės grandinės reakcijos (PGR) būdu, amplifikuojant dalį pSCT-019.

Fig. 3 parodyta pSCT-025 vektoriaus, kuris buvo panaudotas konstruojant pSCT-029A, pSCT-025A, pSCT-037 ir pSCT-038 vektorius, konstrukcijos scheminė diagrama.

Fig. 4 parodyta pSCT-029A vektoriaus, kuris buvo panaudotas konstruojant pSCT-038 ir pSCT-034 vektorius, konstrukcijos scheminė diagrama. Be to, pSCT-029A buvo panaudotas *E. coli* BLR transformuoti ir naujam digeniniam UGL 165 klonui produkuoti.

Fig. 5 parodyta pSCT-E vektoriaus, kuris buvo panaudotas konstruojant pSCT-EY vektorių, konstrukcijos scheminė diagrama.

Fig. 6 parodyta pRLA4 vektoriaus, kuris buvo panaudotas konstruojant pSEC-EY vektorių, konstrukcijos scheminė diagrama.

Fig. 7 parodyta pSEC-EY vektoriaus, kuris buvo panaudotas konstruojant pSCT-037 ir pSCT-038 vektorius, konstrukcijos scheminė diagrama.

Fig. 8 parodyta pSCT-037 ir pSCT-038 vektorių konstrukcijos scheminė diagrama. pSCT-037 buvo panaudotas *E. coli* BLR transformuoti ir monogeniniam UGL 702 klonui produkuoti. pSCT-038 buvo panaudotas *E. coli* BLR transformuoti ir naujam digeniniam UGL 703 klonui produkuoti. pSCT-038 turi dvi OmpA-sCTgly operono kopijas (koduojančias OmpA signalą kartu su lašišos kalcitonino pirmtaku), ir tai padaro jį nauju digeniniu ekspresijos vektoriumi. Jame taip pat yra kopijos genų, koduojančių du antrinius struktūrinius baltymus, kurie stiprina translokaciją per vidinę membraną į periplazminę sritį. Toliau duodamas sutrumpinimų, naudojamų šiam fig.8 vektoriui aprašyti, sąrašas:

TAC - triptofano E ir lac operatoriaus sekų hibridinis promotorius;

LAC P/O - sritis, turinti β -galaktozidazės geno lac promotorių ir lac operatorių;

LAC-IQ - genas, koduojantis lac represorių, kuris susiriša su lac promotoriaus ir tac promotoriaus operatorine sritimi. IPTG konkuruoja su lac represoriumi ir inhibuoja lac represoriaus susirišimą su tac promotoriaus ir lac promotoriaus operatorine sritimi, ir taip indukuoja šiuos promotorius;

TRP P/O - triptofano E geno promotoriaus operatorinė sritis;

OMPA-SCTGLY - geno suliejimas, turintis išorinės membranos baltymo A geno sekrecijos signalinę seką ir glicinu pailginto lašišos kalcitonino (lašišos kalcitonino pirmtako) kodavimo seką;

SEC-E (taip pat žinomas kaip "PrIG") - genas, koduojantis *E. coli* sekrecijos faktorių E. Jis susijungia su prlA (taip pat žinomas kaip secY) arba prlA-4, susidarant sec kelio, kuriuo signalinę seką turintys baltymai yra translokuojami iš citoplazmos į periplazmą, vidinės membranos translokacijos daliai;

PRLA-4 - prlA geno mutantinė alelė;

PRNB T1-T2 - tandeminiai transkripcijos terminatoriai 1 ir 2 iš *E. coli* ribosominio baltymo geno; ir

KAN-R - atsparumo kanamicinui genas.

Fig.9 parodyta pSCT-034 vektoriaus konstrukcijos, kuris buvo panaudotas *E. coli* BLR transformuoti ir trigeniniam UGL 168 klonui produkuoti, scheminė diagrama.

Fig.10 parodytas ląstelių augimo ir UGL 165 klonu (*E. coli* BLR plazmidė pSCT029A) sCTgly produkcijos priklausomybė nuo laiko po tipiškų 1 litro fermentacijos esant induktoriui. Ląstelių augimas buvo matuojamas pagal šviesos sugertį esant 600 nm bangos ilgiui. sCTgly produkcija išreikšta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Nuliniu laiku pažymėtas laikas, kada į kultivavimo terpę, kurioje buvo inkubuojamos šio išradimo ląstelės-šeimininkai, pirmą kartą pridėta induktoriaus. Fig. 10 rodo, kad didžiausia UGL 165 duodama sCTgly produkcija yra tarp 20 ir 25,5 val.

po to, kai į kultivavimo terpę, kurioje buvo inkubuojamos šio išradimo ląstelės-šeimininkai, pirmą kartą buvo pridėta induktoriaus.

Fig.11 parodytas ląstelių augimo ir UGL 703 klonų (*E. coli* BLR plazmidė pSCT 038) sCTgly produkcijos priklausomybė nuo laiko po tipiškos 1 litro fermentacijos esant induktoriui. Ląstelių augimas buvo matuojamas pagal šviesos sugertį esant 600 nm bangos ilgiui. sCTgly produkcija išreikšta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Nuliniu laiku pažymėtas laikas, kada į kultivavimo terpę, kurioje buvo inkubuojamos šio išradimo ląstelės-šeimininkai, pirmą kartą pridėta induktoriaus. Fig. 10 rodo, kad didžiausia UGL 703 duodama sCTgly produkcija yra tarp 20 ir 26 val. po to, kai į kultivavimo terpę pirmą kartą buvo pridėta induktoriaus.

Fig.12 duotas UGL 172 klonų (*E. coli* BLR plazmidė pSCT 025), UGL 165 klonų ir UGL 168 klonų (*E. coli* BLR plazmidė pSCT 034) ląstelių augimo, išmatuoto pagal šviesos sugertį esant 600 nm bangos ilgiui, tipiškoje 1 litro fermentacijoje esant induktoriui priklausomybės nuo laiko palyginimas. Fig. 12 nerodo žymaus skirtumo tarp UGL 165 ir UGL 172 ląstelių augimo greičių, o UGL 168 greitis šiame konkrečiame eksperimente yra šiek tiek mažesnis.

Fig.13 duotas UGL 172 klonų, UGL 165 klonų ir UGL 168 klonų sCTgly produkcijos, išreiktos mg sCTgly išskirto į litrą inkubavimo terpės tipiškoje 1 litro fermentacijoje po inkubavimo esant induktoriui, priklausomybės nuo laiko palyginimas. Fig. 13 rodo, kad digeninis UGL 165 klonas geriausiai tinka sCTgly produkavimui, o trigeninis klonas yra antras pagal gerumą, lyginant su monogeniniu UGL 172 klonu.

Fig.14A ir 14B duotas UGL 165 klonų sCTgly produkcijos (14A) ir ląstelių augimo (14B) po tipiškos 1 litro fermentacijos esant induktoriui priklausomybės nuo laiko palyginimas, į paduodamą orą pridėjus arba ne pridėjus deguonies. Ląstelių augimas buvo matuojamas gramais drėgnų ląstelių masės litre inkubacijos terpės. sCTgly produkcija išreikšta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Fig.14A ir 14B rodo, kad deguonies pridėjimas į fermentacijos terpę nėra kritiškas UGL 165 ląstelių augimui, bet yra labai svarbus didinant sCTgly produkciją.

Fig.15A ir 15B duotas *E. coli* WA837 ir BLR kamienų, kur kiekvienas kamienas ekspresuoja pSCT-029A vektorių (atitinkamai UGL164 ir UGL 165) ląstelių augimo (15A) ir sCTgly produkcijos (15B) po tipiškos 1 litro fermentacijos esant induktoriui priklausomybės nuo laiko palyginimas. Ląstelių augimas buvo matuojamas pagal šviesos sugertį esant 600 nm bangos ilgiui. sCTgly produkcija išreišta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Fig.15A ir 15B rodo, kad *E. coli* BLR kamienas yra tinkamesnis sCTgly produkavimui nei WA835 *E. coli* kamienas.

Fig.16 duotas *E. coli* WA837, BLR, BL21 ir B834 kamienų, kur kiekvienas kamienas ekspresuoja pSCT-029A vektorių (atitinkamai UGL164, UGL 165, UGL167 ir UGL166) sCTgly produkcijos po tipiškos 1 litro fermentacijos esant induktoriui palyginimas. sCTgly produkcija išreišta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Fig.16 rodo, kad *E. coli* BLR kamienas yra tinkamesnis sCTgly produkavimui nei bet kuris iš WA835, BL21 ir B834 *E. coli* kamienų.

Fig.17 duotas UGL 165 (pSCT-029A BLR), UGL 168 (pSCT-034 BLR), UGL 172 (pSCT-025 BLR), UGL 702 (pSCT-037 BLR) ir UGL 703 (pSCT-038 BLR) klonų geriausios sCTgly produkcijos, gautos iš skirtingų eksperimentų po 1 litro fermentacijos esant induktoriui palyginimas. sCTgly produkcija išreišta mg sCTgly, išskirto į litrą inkubavimo terpės. Fig.17 rodo, kad digeniniai UGL 703 ir UGL 165 klonai geriau tinka sCTgly produkavimui nei monogeniniai UGL 172 ir UGL 702 klonai ir trigeninis UGL 168 klonas. Fig. 17 taip pat rodo, kad digeninis UGL 703 klonas, kuris ekspresuoja sekrecijos faktorius, yra tinkamesnis sCTgly produkavimui nei digeninis UGL 165 klonas, kuris neekspresuoja sekrecijos faktorių.

Išsamus išradimo aprašymas

Šis išradimas leidžia gauti peptidinio produkto išeigas, viršijančias 100 mg litrui terpės. Tai pasiekama naudojant naujus ekspresijos vektorius, naujus šeimininkus (kaip transformuotus, transfekuotus arba naudojamus

pagal šį išradimą), naujus fermentacijos būdus arba derinant du arba daugiau aukščiau minėtų faktorių.

Tinkamiausių ekspresijos vektorių apžvalga

Viename šio išradimo įgyvendinimo variante pateikiamas ekspresijos vektorius, kuriame yra koduojanti sritis ir kontrolinė sritis. Koduojančią sritį sudaro nukleorūgštys dominančiam peptidiniam produktui, sujungtos skaitymo rėmelyje pagal kryptį nuo nukleorūgščių, koduojančių signalinį peptidą. Kontrolinė sritis yra prijungta funkcionaliai prie koduojančios srities ir turi daugybę promotorių ir bent vieną ribosomų prisirišimo vietą, kur bent vienas iš promotorių yra pasirinktas iš grupės, kurią sudaro tac ir lac.

Pageidautina, kad vektorius turėtų daug transkripcijos kasečių, sudėliotų viena paskui kitą, ir kiekvienoje kasetėje būtų kontrolinė sritis ir koduojanti sritis pagal šį išradimą. Manoma, kad toks digeninis arba multigeninis vektorius turėtų duoti geresnę ekspresiją nei dicistroninis arba multicistroninis ekspresijos vektorius. Tai yra netikėtas pagerinimas, lyginant su dicistronine arba multicistronine ekspresija, kurios atrodo nebuvo pasiūlyta ankstesniuose darbuose.

Šiame vektoriuje taip pat gali būti nukleorūgštys, koduojančios represorinį peptidą, kuris nuslopina operatorius, susijusius su vienu arba daugiau promotorių kontrolinėje srityje, transkripcijos baigmės sritis, selektyvios žymės sritis ir/arba sritis, koduojant bent vieną sekreciją stiprinantį peptidą. Kitu atveju, kai kuriuose įgyvendinimo variantuose nukleorūgštys, koduojančios represorinį peptidą ir sekreciją stiprinantį peptidą, gali būti atskirame vektoriuje, kuris kartu ekspresuojamas toje pačioje ląstelėje-šeimininke, kaip ir peptidinį produktą ekspresuojantis vektorius.

Sukonstruotų ekspresijos vektorių konkretūs pavyzdžiai ir tokių ekspresijos vektorių konstravimo metodai yra duodami toliau. Pradiniais vektoriais tinkamiausiems šio išradimo vektoriams gauti gali būti naudojami daugelis prekybinių vektorių. Kai kurios iš šio išradimo vektorių pageidautinų

sričių gali būti jau pradiniam vektoriuje, taigi modifikacijų, reikalingų šio išradimo vektoriui gauti, skaičius yra palyginus nedidelis. Tinkamais pradiniais vektoriais yra (bet jais neapsiribojama) pSP72 ir pKK233-2.

Tikimasi, kad naujieji šio išradimo vektoriai turi vektoriams būdingus pranašumus, ir kad šie nelaukti pranašumai išliks net ir tuo atveju, jei vektoriai bus naudojami ląstelėse-šeimininkuose, kurios yra ne tos pačios nei čia nurodytos, kaip ypatingai tinkamos ir nepriklausomai nuo to, ar naudojamas čia aprašytas pagerintas fermentacijos būdas.

Be to, kai kuriuose įgyvendinimo variantuose yra identifikuotos konkrečios ląstelės-šeimininkai kaip ypatingai tinkančios peptidų, kaip antai lašišos kalcitonino pirmtako ir su kalcitonino genu susijusio peptido pirmtako, ekspresijai. Tikimasi, kad čia identifikuotų konkrečių ląstelių specialaus panaudojimo duodami pranašumai išlieka nepriklausomai nuo to, ar vektorius yra vienas iš naujųjų čia aprašytų vektorių, ir nuo to, ar yra naudojamas čia aprašytas fermentacijos būdas. Kitaip tariant, manoma, kad šios ląstelės-šeimininkai duoda žymius nelauktus pranašumus net ir naudojant anksčiau aprašytą fermentaciją arba anksčiau aprašytus vektorius.

Tikimasi, kad naujieji fermentacijos būdai duos padidintą išėigą dėl būdingų privalumų, kuriuos duoda šis fermentacijos būdas. Manoma, kad šie privalumai išliks nepriklausomai nuo to, ar yra naudojamos čia aprašytos tinkamiausios ląstelės-šeimininkai ir/arba naujieji vektoriai.

Nepaisant to, kas pasakyta aukščiau, viename iš tinkamiausių šio išradimo įgyvendinimo variantų vienu metu yra naudojami šio išradimo pagerinti ekspresijos vektoriai, transformuoti į konkrečias identifikuotas šio išradimo ląsteles-šeimininkus ir ekspresuojama, naudojant tinkamiausius šiame išradime aprašytus būdus. Kai yra naudojami šie visi trys išradimai derinyje, tikimasi, kad galima bus pasiekti žymų išėigos ir produkto išgavimo padidėjimą, lyginant su ankstesniu technikos lygiu.

Kontrolinė sritis

Kontrolinė sritis yra funkciškai sujungta su koduojančia sritimi ir apima daugybę promotorių ir bent vieną ribosomų surišimo vietą, kur bent vienas iš

promotorių yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš lac ir tac. Netikėtai buvo rasta, kad aukščiau nurodytas promotorių derinys vienoje kontrolinėje srityje labai padidina koduojančios srities produkuojamo peptidinio produkto išėigą (smulkiau aprašyta toliau). Buvo tikėtasi, kad du tokie promotoriai atliks padidintą funkciją, bet nebus sumarinio arba sinergetinio efekto. Pareiškėjų atlikti eksperimentai netikėtai parodė, kad naudojant apibrėžtyje nurodytą promotorių derinį gaunamas sinergetinis efektas. Šioje srityje yra žinomi ir kiti promotoriai, ir pagal šį išradimą jie gali būti naudojami derinyje su tac arba lac promotoriais. Tokiais promotoriais yra (bet jais neapsiribojama) lpp, ara B, trpE, gal K.

Geriausia, kai kontrolinėje srityje yra tiksliai du promotoriai. Jeigu vienas iš promotorių yra tac, geriausia, kad šis tac promotorius būtų į 5' pusę nuo kito kontrolinės srities promotoriaus. Jeigu vienas iš promotorių yra lac, geriausia, kad šis lac promotorius būtų į 3' pusę nuo kito kontrolinės srities promotoriaus. Viename išradimo įgyvendinimo variante yra ir tac, ir lac promotoriai; geriausia, kai lac promotorius yra į 3' pusę nuo tac promotoriaus.

Koduojanti sritis

Koduojanti sritis apima nukleorūgštis, koduojančias dominantį peptidinį produktą, sujungtas skaitymo rėmelyje pagal kryptį nuo nukleorūgščių, koduojančių signalinį peptidą, ir koduojanti sritis koduoja peptidą, apimantį atitinkamai nuo signalo N-galo iki C-galo ir peptidinį produktą. Pagal teoriją nelaikant, kad jį reikia prijungti, tikimasi, kad signalinis peptidas gali šiek tiek apsaugoti peptidinį produktą nuo proteolitinio skaldymo bei dalyvauti jo sekrecijoje į periplazmą.

Daugelio peptidų signalinės sekos yra žinomos ir gali būti naudojamos šiame išradime. Tokiomis sekomis yra gerai žinomų ląstelių-šeimininkų išorinių membranų baltymų signalinės sekos ir bet kokios sekos, kurios gali perkelti peptidinį produktą į periplazmą ir kurias po transliacijos atskelia šeimininkas dėl translokacijos. Tinkami signaliniai peptidai yra (bet jais neapsiribojama) Omp A, pel B, Omp C, Omp F, Omp T, β -1a, Pho A, Pho S ir Staph A.

Pageidaujama, kad peptidinis produktas būtų pakankamai mažas, todėl nesant šio išradimo, pagal ankstesnę technologiją būtų reikalingas suliejimo partneris. Paprastai peptidinis produktas turi molekulinę masę mažesnę nei 10 KDa. Dar geriau, kai peptidinis produktas C-gale turi gliciną ir yra naudojamas kaip pirmtakas fermentinėje amidinimo reakcijoje, paverčiančioje C-galinį gliciną į aminogrupę, tokiu būdu gaunant amidintą peptidą. Smulkiau tokia konversija yra aprašyta toliau. Daug fiziologiškai svarbių peptidinių hormonų ir neuropeptidų yra šio tipo amidinti peptidai. Pavyzdžiui, koduojančios srities koduotas peptidinis produktas gali būti lašišos kalcitonino pirmtakas arba su kalcitonino genu susijęs peptidinis pirmtakas; abu šie peptidai C-gale turi gliciną ir abu gali būti fermentiškai amidinami iki subrendusio lašišos kalcitonino arba subrendusio su kalcitonino genu susijusio peptido. Kiti amidinti peptidai, kurie gali būti produkuojami pagal šį išradimą, yra (bet jais neapsiribojama) augimo hormoną išlaisvinantis faktorius, vazodilatorinis žarnyno peptidas ir galaninas. Šioje srityje yra gerai žinomi ir kiti amidinti peptidai.

Pagal šį išradimą taip pat gali būti produkuojami paratiroidinio hormono analogai. Pavyzdžiui, peptidas, turintis paratiroidinio hormono pirmas 34 aminorūgštis, gali atlikti funkciją, panašią į paties paratiroidinio hormono funkciją, kaip ir 34 aminorūgščių analogo amidinta versija. Pastarasis gali būti produkuojamas, ekspresuojant pagal vieną arba daugiau čia aprašytų ekspresijos sistemų ir būdų paratiroidinio hormono pirmąsias 34 aminorūgštis, po kurių yra prijungtas glicinas-35. Po to čia aprašyto fermentinio amidinimo būdu šis glicinas gali būti paverčiamas į aminogrupę.

Nepaisant to, kad čia aprašytų tiesioginių ekspresijos sistemų tinkamiausiose įgyvendinimo variantuose produkuojami peptidai C-gale turi gliciną, manoma, kad naudojant čia aprašytus vektorius, šeimininkus ir/arba fermentacijos metodikas, bus gautos bet kokio peptido geros išeigos ir bus lengva jį išgauti.

Tinkamiausių šio išradimo vektorių kiti galimi aspektai arba kiti vektoriai, kuriuos galima ekspresuoti tame pačiame šeimininke kaip išradimo vektorius

Represorius

Esant reikalui, tinkamiausias šio išradimo vektorius gali turėti nukleorūgštis, koduojančias represorinį peptidą, galintį slopinti ekspresiją, kurią kontroliuoja bent vienas iš promotorių. Tačiau kitu atveju nukleorūgštys, koduojančios represorinį peptidą, gali būti atskirame vektoriuje ląstelėje-šeimininke su šio išradimo vektoriumi. Šioje srityje daugeliui operatorių yra žinomi atitinkami represoriai. Geriau, kai koduojančios represorių nukleorūgštys koduoja lac represorių tinkamiausiuose šio išradimo įgyvendinimo variantuose, kadagi jis slopina lac operatorių, kuris yra ir tac, ir lac promotoriuose, o bent vienas iš jų visada yra tinkamiausiuose šio išradimo vektoriuose.

Selekcijos žymė

Pageidautina, kad šio išradimo vektoriuje būtų kuris nors iš didelio skaičiaus selekcinių žymių genų (pvz. genas, koduojantis atsparumą kanamicinui). Tai duotų galimybę atrinkti atitinkamas specifines ląstelių-šeimininkus, kurios yra efektyviai transformuotos arba transfekuotos naujaisiais šio išradimo vektoriais.

Sekreciją stiprinantis peptidas

Šio išradimo vektoriuje gali būti nukleorūgštys, koduojančios bent vieną sekreciją stiprinantį peptidą. Kitu atveju, sekreciją stiprinantį peptidą koduojančios nukleorūgštys gali būti atskirame vektoriuje, kurios ekspresuojasi tose pačiose ląstelėse-šeimininkuose kaip ir peptidinį produktą koduojantis vektorius. Geriausia, kai sekreciją stiprinantis peptidas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš SecY (prlA) arba prlA-4. Pažymima, kad SecY ir prlA yra vienodi, abu terminai šioje srityje yra naudojami kaip sinonimai. prlA-4 yra žinoma prlA modifikacija ir atlieka panašią funkciją. Kitas sekreciją stiprinantis peptidas yra SecA, taip pat žinomas kaip "prlG"; šis terminas yra naudojamas kaip "SecA" sinonimas. Geriausia, kai koduojama keletas sekreciją skatinančių peptidų, bent vienam iš jų esant SecE, o kitą

pasirenkant iš grupės, susidedančios iš SecY (prlA) ir prlA-4. Manoma, kad abu šie peptidai sąveikauja padėdami perkelti peptidinį produktą iš citoplazmos į periplazmą. Pagal teoriją nelaikant, kad juos reikia prijungti, šie sekreciją stiprinantys peptidai, apart jų sekreciją skatinančių funkcijų, gali padėti apsaugoti peptidinį produktą nuo citoplazminių proteazių poveikio.

Ląstelė-šeimininkas

Šiame išradime taip pat pateikiama ląstelė-šeimininkas, transformuota arba transfekuota bet kuriuo iš šio išradimo vektorių. Geriau, kai ląstelė-šeimininkas yra bakterinė ląstelė. Dar geriau, kai ląstelė-šeimininkas yra gram-neigiama bakterinė ląstelė. Dar geriau, kai ląstelė-šeimininkas yra *E. coli* ląstelė. Dar geriau, kai *E. coli* yra BLR, BL21 arba WA837 kamienas. Geriausia, kai *E. coli* yra BLR kamienas. Visų geriausia, kai ląstelė-šeimininkas ekspresuoja dar ir bent vieną sekreciją stiprinantį peptidą.

Šiame išradime taip pat pateikiama ląstelė-šeimininkas, transformuota ekspresijos vektoriumi, kuriame yra genas lašišos kalcitonino pirmtakui arba su kalcitonino genu susijusio peptido pirmtakui ekspresuoti; ši ląstelė-šeimininkas yra *E. coli* BLR kamienas. Tikimasi, kad šių dviejų peptidų ekspresija BLR bus ypatingai efektyvi net ir tuo atveju, jeigu ekspresijai bus naudojami anksčiau žinomi vektoriai. Kitaip tariant, nemanoma, kad gerai šių peptidų ekspresijai BLR šeimininke gauti reikia naudoti čia aprašytus naujuosius vektorius.

Heterologinio peptido produkavimo būdas

Išradime pateikiamos naujos fermentavimo sąlygos ląstelėms-šeimininkams išauginti iki labai didelių ląstelių tankių kultivavimo sąlygomis, kurios suteikia galimybę peptidiniam produktui difunduoti arba išsiskirti į augimo terpę didelėmis išeigomis.

Naujai fermentacijai tinkamos ląstelės-šeimininkai yra (bet jomis neapsiribojama) aukščiau aptartos ląstelės-šeimininkai ir/arba ląstelės-šeimininkai, transformuotos arba transfekuotos vienu arba daugiau aukščiau

aptartų naujųjų ekspresijos vektorių. Gali būti naudojamos ir kitos genų inžinerijos būdu gautos ląstelės-šeimininkai, kurios ekspresuoja peptidinį produktą su signaline sritimi. Ląstelės yra patalpinamos į fermentatorių, kuriame pageidautina, kad būtų atitinkamos priemonės orui arba kitoms dujoms, anglies šaltiniui ir kitiems terpės komponentams tiekti ir priemonės promotoriaus indukcijai. Taip pat pageidautinos deguonies kiekio, ląstelių tankio, pH ir pan. kontrolės priemonės.

Pareiškėjai rado, kad peptidinio produkto, tiesiogiai ekspresuojamo į augimo terpę, žymiai padidinta išeiga yra gaunama kruopščiai kontroliuojant vidutinį ląstelių augimo greitį, kurio kritinės ribos yra tarp 0,05 ir 0,20 padvigubėjimų. Pageidautina, kad šis kontroliuojamas augimas prasidėtų ankstyvoje kultivavimo lag fazėje. Dar svarbiau išlaikyti vidutinį ląstelių augimo greitį fermentacijos laikotarpiu (t.y. čia aprašyto kontroliuojamo ląstelių augimo laikotarpiu) tarp 0,10 ir 0,15 padvigubėjimų per valandą, geriausia 0,13 padvigubėjimų per valandą. Augimo greitis gali būti kontroliuojamas reguliuojant bet kurį iš toliau duodamame skyrelyje, pavadintame "sCTgly produkavimas (fermentacija)" minėtų parametrų pagal formulę, rišančią tiekimo greitį "Q" su įvairiais kitais parametrais. Pareiškėjai nustatė, kad anglies šaltinio tiekimo fermentuojamos ląstelėms greičio keitimas yra geriausias būdas palaikyti augimo greitį kritinėse ribose. Norint palaikyti palyginti pastovų augimo greitį, anglies šaltinio kiekio tiekimas į fermentatorių turi būti didinamas proporcingai ląstelių skaičiaus didėjimui.

Pareiškėjai taip pat atrado, kad daug geresnę išeigą galima gauti pateikiant induktorių šiame kontroliuojamo augimo fermentacijos laikotarpyje. Kaip ir anglies šaltinio atveju, reikiamų induktoriaus kiekių padavimas reiškia tiekimo greičio didėjimą proporcingai ląstelių skaičiaus didėjimui. Kadangi pageidautina didinti ir anglies šaltinio, ir induktoriaus tiekimą su ląstelių augimu susijusiu būdu, pareiškėjai nustatė, kad geriausia yra sumaišyti maistą ir induktorių kartu, ir jų abiejų mišinį tiekti reikiamu greičiu ląstelių augimui kontroliuoti (anglies šaltiniu), tuo pačiu metu palaikant nepertraukiamą induktoriaus, kurio santykis išlieka pastovus anglies šaltinio atžvilgiu, tiekimą. Tačiau suprantama, kad anglies šaltinį ir induktorių galima

tiekti atskirai. Tačiau net ir tokiu atveju, jeigu yra naudojamas cheminis induktorius, kurio dideli kiekiai gali būti toksiški ląstelėms, pageidautina, kad induktoriaus ir anglies šaltinis būtų pridedami kiekvieną kultivavimo valandą tokiais kiekiais, kad tam tikrą valandą pridedamo induktoriaus masės santykis su tą pačią valandą pridedamo anglies šaltinio mase nesikeistų daugiau nei 50 %, skaičiuojant nuo induktoriaus, pridėto per visą fermentacijos procesą (kontroliuojamo augimo laikotarpį) kiekio santykio su anglies šaltinio, pridėto per visą fermentacijos procesą, kiekiu. Šis 50 % kitimas yra matuojamas nuo mažiausio dviejų lyginamų santykių santykio. Pavyzdžiui, jei per visą fermentaciją anglies šaltinio santykis su induktoriumi yra 2:1, geriausia, kai šis santykis bet kurią duotą valandą bus ne didesnis nei 3:1 ir ne mažesnis nei 1,333:1. Augimo metu taip pat galima indukuoti vieną arba daugiau promotorių kitokiais būdais, kaip antai kultivavimo temperatūros pakeitimu arba tam tikro junginio, arba maistinės medžiagos koncentracijos pakeitimu.

Jeigu kaip ląstelių augimo kontroliavimo būdas yra naudojamas išorinis anglies šaltinio tiekimas, yra naudinga palaukti, kol pradžioje esantys terpėje (prieš išorinį anglies tiekimą) anglies šaltiniai išsiekvos iki tokio lygio, kada ląstelių augimo jau nebegalima ilgiau palaikyti be išorinio anglies padavimo. Tai užtikris išorinio tiekimo tiesioginę kontrolę ląstelių augimui, žymiai netrukdamat pradiniam (netiekiamam) anglies šaltiniui. Į fermentacijos terpę pageidautina nepertraukiamai tiekti deguonies šaltinį, matuojant ištirpusio deguonies kiekį. Aukštyt kylanti deguonies kiekio smailė rodo žymų ląstelių augimo sumažėjimą, kas savo ruožtu gali rodyti pradinio anglies šaltinio išsiekvojimą ir reikšti, kad jau laikas pradėti išorinį padavimą.

Netikėtai buvo rasta, kad peptidinio produkto išėiga didėja, didėjant fermentacijos terpės prisotinimui deguonimi. Tai yra teisinga ir tuo atveju, kai ląstelių augimui palaikyti pakanka mažesnių prisotinimo kiekių. Taigi, per visą fermentacijos procesą pageidautina, kad į fermentacijos terpę būtų tiekiamas deguonis arba deguonimi praturtintas šaltinis, ir būtų pasiekiamas bent 20 %, geriau bent 50 % prisotinimas deguonimi. Čia naudojamas terminas "prisotinimas deguonimi" reiškia deguonies procentus fermentacijos terpėje, kai terpė yra visiškai prisotinta paprastu oru. Kitaip tariant, fermentacijos

terpė prisotinta oru turi 100 % "prisotinimą deguonimi". Nors ir sunku palaikyti daug didesnį nei 100 %, t.y. daugiau nei deguonies kiekis ore, fermentacijos terpės prisotinimą deguonimi, tai yra galima ir netgi pageidautina, nes didesni deguonies kiekiai duoda geresnes išeigas. Tai gali būti pasiekama, paduodant į terpę dujas, turinčias didesnį nei oras deguonies kiekį.

Žymus išeigos padidėjimas gali būti pasiekiamas, palaikant ne mažesnį nei 70 %, ypač ne mažesnį nei 80 %, fermentacijos terpės prisotinimą deguonimi. Tokius lygius yra palyginti nesunku palaikyti.

Prisotinimo deguonimi padidinimui gali padėti greitesnis maišymas. Kai fermentacijos terpė pradeda tirštėti, pasidaro sunkiau palaikyti prisotinimą deguonimi, ir todėl bent jau šioje stadijoje rekomenduojama tiekti dujas, turinčias didesnį, nei oras, deguonies kiekį. Pareiškėjai nustatė, kad geram prisotinimui deguonimi palaikyti iki palyginti vėlyvo fermentacijos laikotarpio gali pakakti paprasto oro. Vėlesniame fermentacijos laikotarpyje pareiškėjai tiekiamą orą papildė 50 % deguonies arba tiekė 100 % deguonį. Pageidautina ląsteles-šeimininkus kultivuoti 20-32 val. (prasidėjus kontroliuojamam augimui), geriau 22-29 val., geriausia apie 24-27 val.

Pageidautina ląsteles-šeimininkus ląsteles inkubuoti 20-35 °C temperatūroje, geriau 28-32 °C temperatūroje, geriausia 29,5-30,5 °C temperatūroje. Keliose pareiškėjų atliktose fermentacijose optimali temperatūra buvo 30 °C.

Pageidautina, kad kultivavimo terpės pH būtų 6,0-7,5 intervale, geriau 6,6-7,0 intervale, ypač gerai 6,78-6,83 (pvz. 6,8) intervale.

Tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose fermentacija vykdoma naudojant šeimininkus, transformuotus ekspresijos vektoriumi, turinčiu kontrolinę sritį, į kurią įeina ir tac, ir lac promotorius, ir koduojančią sritį, apimančią signalinį peptidą koduojančius nukleotidus, esančius prieš kryptį nuo lašišos kalcitonino pirmtaką koduojančių nukleotidų. Geriausia, kai tokiam ekspresijos vektoriuje yra keletas, ypač dvi transkripcijos kasetės, esančios viena už kitos. Čia naudojamas terminas "transkripcijos kasetės, esančios viena už kitos" reiškia, kad po kontrolinės ir koduojančios

srities yra bent viena papildoma kontrolinė sritis ir viena papildoma koduojanti sritis, koduojanti tą patį peptidą kaip ir pirmoji koduojanti sritis. Tai reikia skirti nuo dicistroninės ekspresijos, kurioje viena kontrolinė sritis kontroliuoja dviejų koduojančios srities kopijų ekspresiją. Toks apibūdinimas leidžia pakeitimus koduojančioje srityje, kurie neturi ryšio su peptidiniu produktu, pavyzdžiui, nukleotidų, koduojančių skirtingą signalinį peptidą, nei tas, kurį koduoja pirmoji transkripcijos kasetė, įterpimą antroje transkripcijos kasetėje.

Šiam tikslui yra žinomi įvairūs anglies šaltiniai. Buvo rasta, kad veiksmingas yra glicerolis. Tinkamiausiais indukcijos būdais yra cheminių induktorių, tokių kaip IPTG ir/arba laktozės pridėjimas. Gali būti naudojami ir kiti būdai, kaip antai temperatūros arba maitinimo medžiagų kiekių pakeitimas. Taip pat gali būti naudojamos kitos indukavimo metodikos, tinkančios kontrolinės srities operatoriui arba promotoriui (arba vienam iš keleto naudojamų promotorių, kai kontrolinėje srityje jų atsiranda daugiau nei vienas).

Būdinga, kad peptidinio produkto produkcija smarkiai sumažėja maždaug tuo pačiu metu, kai ląstelių augimas fermentacijos terpėje tampa nebeišlaikomas aukščiau aptarto pageidautino augimo greičio ribose. Tada fermentacija stabdoma, anglies šaltinio ir induktoriaus tiekimas ir deguonies srautas nutraukiamas. Pageidautina kultūrą greitai atšaldyti, kad būtų nuslopinamas proteazių aktyvumas ir sumažinama peptidinio produkto degradacija. Taip pat pageidautina pakeisti pH iki tokio lygio, kuris iš esmės sumažintų proteolitinį aktyvumą. Jeigu produkuojamas lašišos kalcitoninas naudojant tinkamiausius šio išradimo vektorius ir ląsteles-šeimininkus, proteolitinis aktyvumas sumažėja mažinant pH. Geriausia parūgštinimą vykdyti kartu su terpės atšaldymu¹. Tinkamiausios pH ribos smulkiau bus aptariamos toliau. Degradacijai esant skirtingiems pH išmatuoti gali būti naudojamas tas pats testas, kaip ir fermentacijos produktui matuoti, tokiu būdu nustatant duoto peptido optimalią pH reikšmę ir jo priemaišas.

Heterologinio peptido išgavimas

Toliau šiame išradime pateikiamas peptidinio produkto išgavimo būdas, kuris susideda iš šeimininko ląstelių atskyrimo nuo kultūrinės terpės ir po to kultūrinės terpės chromatografavimo pagal bent vieną chromatografijos tipą, pasirinktą iš gel-filtracijos, jonų mainų (geriausia katijonų mainų, jei peptidas yra kalcitoninas), atvirkštinių fazių, afininės ir hidrofobinės sąveikos chromatografijos. Jeigu peptidas turi cisteino liekanas, norint apsaugoti nuo agregacijos ir taip padidinti monomerinio peptido išeigą, prieš gryninimo stadijas arba jų metu turi būti atliekamas S-sulfoninimas. Pageidautina naudoti tris chromatografijos stadijas tokia tvarka: jonų mainų chromatografija, atvirkštinių fazių chromatografija ir kita jonų mainų chromatografija.

¹ arba galima parūgštinti pašalinus bakterines ląsteles.

Kai pasibaigia fermentacija, norint sumažinti proteolitinį aktyvumą galima pakeisti kultūrinės terpės pH. Testas, naudojamas produkto produkcijai matuoti, taip pat gali būti naudojamas produkto degradacijai nustatyti ir geriausiam pH stabilumo atžvilgiu nustatyti. Jeigu yra produkuojamas šio išradimo lašišos kalcitonino pirmtakas, pageidautinas pH yra 2,5-4,0, ypač 3,0-3,5, intervale. Manoma, kad toks pH reikšmių intervalas padeda sulaikyti lašišos kalcitonino pirmtaką katijonų mainų kolonėlėse, ir tokiu būdu čia aprašytos tinkamiausios gryninimo metodikos metu gauti geresnį išgryninimą.

Taip pat, jeigu pageidaujama, po fermentacijos galima sumažinti terpės temperatūrą iki žemesnės už 10 °C temperatūros, geriau tarp 3 °C ir 5 °C, geriausia 4 °C. Manoma, kad tai sumažina nepageidaujamą proteazinį aktyvumą.

Šiame išradime taip pat pateikiamas amidinto peptidinio produkto produkavimo būdas, susidedantis iš tokių stadijų: bet kurio šio išradimo ląstelių-šeimininkų, kurios ekspresuoja peptidinį produktą, C-gale turintį gliciną, kultivavimas augimo terpėje; minėto peptidinio produkto išgavimas iš minėtos augimo terpės; minėto peptidinio produkto amidinimas, veikiant minėtą peptidinį produktą deguonimi ir redukcijos agentu, esant

peptidilglicin- α -amidinančios monooksigenazės arba peptidilglicin- α -hidroksilinančios monooksigenazės. Jeigu anksčiau nebuvo naudojama peptidilglicin- α -amidinanti monooksigenazė ir jeigu reakcijos mišinys dar nėra bazinis, tada didinamas reakcijos mišinio pH, kol jis tampa bazinis. Po to amidintas peptidas gali būti išgaunamas iš reakcijos mišinio, geriausia naudojant toliau duodamame 6 pavyzdyje aprašytą gryninimo metodiką.

Pageidautina ląsteles-šeimininkus kultivuoti augimo terpėje esant induktoriaus, palaikant vidutinį ląstelių augimo greitį kultivavimo metu tarp 0,05 ir 0,20 padvigubėjimų per valandą.

EKSPERIMENTŲ DETALĖS

pSCT-037 ir pSCT-038 klonavimo strategija

pSCT-038 ir pSCT-037 konstravimas yra sudarytas iš aštuonių dalių, sueinančių į tarpinių vektorių, reikalingų galutinei norimai ekspresijos plazmidei sukurti, sukonstravimą. Visi genai ir fragmentai, kurie buvo panaudoti arba sukonstruoti šiam projektui ir nepateko į aprašymą yra išvardinti 1 lentelėje.

I dalis. pSCT-018D konstravimas

TAC promotoriaus kasetė (1 lentelė) buvo įklonuota į pGEM11ZF+ (1 lentelė) kaip Hind III-Bam HI fragmentas, gaunant pGEM11ZF+TAC. pelB-sCTgly cas2 genas (1 lentelė) įjungiamas pagal kryptį nuo tac promotoriaus (pGEM11ZF+TAC) į Bam HI vietą, gaunant ekspresijos vektorių pSCT-013B. Iš pSCT-13B, naudojant Hind III ir Eco RI, išpjaunamas tac-pelBsCTgly operonas. Po to šis fragmentas kartu su Hind III-Pst I adapteriu įjungiamas į pSP72 (1 lentelė), gaunant pSCT-015B. Po to į pSCT-015B Pst I kirpimo vietą įjungiamas atsparumo kanamicinui genas, gaunant pSCT-016B. β -Laktamazės geno (atsparumas ampicilinui) 5' koduojanti sritis pašalinama perkerpant vektorių Pvu II ir Fsp I, o po to vėl sujungiama, gaunant pSCT-017B. Po to iš pSP72 T1-T2 (1 lentelė) iškerpamas T1-T2 transkripcijos terminatorius ir įjungiamas į PCCT-017B naudojant Sal I ir Bgl II kirpimo

vietas, gaunant pSCT-018B. Po to į pSCT-018B Bgl II - Eco RI kirpimo vietas įjungiamas LAC-IQ genas (1 lentelė), turintis Bam HI ir Eco RI kirpimo vietas, gaunant pSCT-018D (žr. fig. 1A ir 1B).

II dalis. pSCT-019 konstravimas

Trigubu sujungimu į pSP72 Pst I ir Eco RI kirpimo vietas įterpiamas lac P/O fragmentas (1 lentelė) su Pst I ir Hind III kirpimo vietomis ir Hind III-Eco RI fragmentas iš pSCT-013B (turintis tac-pelBsCTgly). Kaip aprašyta pSCT-017B konstravime, įterpiamas Kan-R genas, ir iš pSCT-015A pašalinamas β-laktamazės genas, gaunant pSCT-016A ir pSCT-017A. Iš pSP72-OMPA iškerpamas lpp-lac-ompAsCTgly (1 lentelė) Pst I -Acc I fragmentas (taip pat yra sCTgly 5' koduojančios srities 17 bazių porų) ir įjungiamas į pSCT-017A suderinamas kirpimo vietas, gaunant pSCT-019 (žr. fig. 2).

III dalis. pSCT-025 konstravimas

PGR amplifikuoto operono lac-ompAsCTgly (1 lentelė) Bam HI fragmentas įjungiamas į pSCT-018D Bam HI kirpimo vietą, pakeičiant pelBsCTgly geną, gaunant pSCT-023(-). Ženklas (-) rodo, kad tarpas buvo įterptas atvirkščia kryptimi tac promotoriaus atžvilgiu. Po to, naudojant Bam HI ir Sal I, iš pSCT-023(-) iškerpamas lac-ompAsCTgly operonas ir įjungiamas į pSCT-017B suderinamas kirpimo vietas, gaunant pSCT-017 DELTA. Iš pSCT-017 DELTA iškerpami didesnis Bgl I-Bgl II fragmentas, turintis atsparumo kanamicinui geną, tac-lac promotorius ir ompAsCTgly ir įjungiamas į pSCT-018D Bgl I-Bam HI kirpimo vietas, gaunant pSCT-025 (žr. fig. 3).

IV dalis. pSCT-029A konstravimas

RRNB T1-T2-20 PGR produktas (1 lentelė), turintis Xho I ir Eco RI kirpimo vietas, įjungiamas į pSCT-025 Sal I - Eco RI kirpimo vietas, gaunant pSCT-025A. Iš pSCT-025 iškirptas Hind III-Sac I fragmentas, turintis tac-lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2 terminatorių genų kasetę, įjungiamas į pSpSP72 suderinamas kirpimo vietas, gaunant pCPM-01. pCMP-01A vektorius buvo

sukonstruotas, panaudojant tą patį metodą, kaip aprašyta pSCT-025A atveju. pSCT-025A ir pCPM-01A plazmidės skiriasi nuo pSCT-025 ir pSCT-01 plazmidžių restrikcijos vietų, esančių prieš kryptį ir pagal kryptį nuo RRNB T1-T2 transkripcijos terminatoriaus, tipais. Xho I-Eco RI fragmentas, turintis tac-lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2 terminatorių genų kasetę, iškerpamas iš pCPM-01A ir įjungiamas į pSCT-025A Sal I-Eco RI vietas, gaunant digeninį ekspresijos vektorių pSCT-029A (fig.4). pSCT-029A sukūrimui panaudoti metodai gali būti pakartojami, gaunant papildomus poligeninius ekspresijos vektorius, kaip parodyta toliau pSCT034 konstrukcijos atveju.

V dalis. pSEC-E konstravimas

pCPM-01 vektorių karpomas Pst I ir Xba I, iškerpant lac P/O, kuris po to įjungiamas į pSP72 suderinamas kirpimo vietas. PGR būdu amplifikuotas secE genas (1 lentelė), turintis Xba I ir Bam HI klonavimo vietas, įjungiamas į ompAsCTgly T1-T2 cistroninio klonavimo vektoriaus (1 lentelė) suderinamas vietas, gaunant pCM-SECE. Iš pCM-SECE iškerpami secE ir T1-T2 terminatoriai kaip Xba I-Eco RI fragmentas ir kartu su Xba I-Sal I fragmentu, turinčiu lac P/O (iškirptas iš pSP72-lac), įjungiami į pSP72 Sal I-Eco RI kirpimo vietas, gaunant pSEC-E (žr. fig. 5).

VI dalis. pPRLA-4 (prlA-4 yra prlA mutantinė alelė arba secY genas) konstravimas

Naudojant Bam HI ir Sma I, iškerpama ompAsCTgly T1-T2 cistroninio vektoriaus T1-T2 terminatoriaus sritis, kuri po to įjungiama į pSP72 Pvu II ir Bam HI kirpimo vietas, gaunant PRLA4-INT tarpinį klonavimo vektorių. Iš pSP72-LAC su Xba I ir Sac I iškerpamas lac P/O ir kartu su prlA-4 fragmentu (1 lentelė), turinčiu Xba I ir Bam HI kirpimo vietas, įjungiamas į PRL4-INT Sac I - Bam HI kirpimo vietas, gaunant pPRLA-4 (žr. fig.6).

VII dalis. pSEC-EY konstravimas

Sintetinis oligonukleotidinis fragmentas, turintis trpE P/O seką (1 lentelė) įklonuojamas į pCPM-01A Xho I-Xba I kirpimo vietas, gaunant pCPM-

08. Iš pRLA-4 su Xba I ir Xho I iškerpamos prlA-4 ir T1-T2 sekos ir įjungiamos su Sal I-Eco RI fragmentu iš pSEC-E, turinčiu lac-secE-T1-T2 operoną, į pCPM-08 Xba I ir Eco RI kirpimo vietas, gaunant pSEC-EY (žr. fig.7).

VIII dalis. pSCT-037 ir pSCT-038 konstravimas

Iš pSEC-EY su Xho I ir Bgl II iškerpama secE ir prlA-4 koduojanti sritis. Po to gautas fragmentas įjungiamas į pSCT-025A ir pSCT-029A Sal I-Bgl II kirpimo vietas, gaunant atitinkamai pSCT-037 ir pSCT-038 (žr. fig.8).

pSCT-034 konstravimas

pSCT-034 yra trigeninė ekspresijos plazmidė, turinti Tac-Lac-ompAsCTgly RRNB T1-T2 transkripcijos kasetės tris kopijas. Šis vektorius (žr. fig.9) sukonstruojamas įterpiant į pSCT-029A Sal I ir Eco RI kirpimo vietas aprašytą kasetę iš pSPM-01A, pridėdant trečiąją ekspresijos kasetės kopiją. Konstravimo metodas yra identiškas pSCT-029A konstravimo iš pCPM-01A ir pSCT-025A metodui. Vėl sukuriamos 3' Sal I ir Eco RI kirpimo vietas gaunant vietas, kurių reikia, kad būtų galima pridėti daugiau kasečių kopijų.

1 lentelė

Klonavimo fragmentas	Komponento tipas	Kilmė arba matrica
pGEM 11 ZF(+)	Plazmidė	Promega
pGEX 1N	Plazmidė	Pharmacia Biosciences
pSP 72	Plazmidė	Promega
Tac promotorius	tac promotorius DNR blokas	Pharmacia Biosciences
pelB-sTCgly-cas2*	PGR amplifikuotas genas	pelB-sTCgly genas, surinktas iš sintetinių oligonukleotidų
atsparumo kanamicinui genas	genų blokas	Pharmacia Biosciences
RRNB T1-T2	PGR fragmentas	ribosominio proteino geno T1 ir T2 transkripcijos terminatoriai iš pKK 233-2
pSP72 T1-T2	subklonas	įklonuotas iš aukščiau nurodyto PGR fragmento į pSP72
lac represorius (LAC-IQ)	PGR amplifikuotas genas	pGEX 1-N plazmidė
lac promotorius/	PGR amplifikuotas	pGEM11ZF+

operatorius (P/O)	fragmentas	
lpp-lac-ompAsCTgly (nepilnas)	PGR amplifikuotas produktas (3' PGR pradmuo turintis 17 pirmųjų sCTgly nukleotidų)	pIN IIIA
pSP 72-ompA	aukščiau nurodyto fragmento subklonas	įklonuotas iš aukščiau nurodyto PGR fragmento į pSP72
lac-ompAsCTgly	PGR amplifikuotas operonas	pSCT-019
RRNS T1-T2-02	PGR amplifikuotas produktas	pSCT-025
OMPASCTGLY T1-T2 CISTRONAS	ompAsCTgly PGS amplifikuotas produktas įklonuotas į pSP72 T1-T2	pSCT-025 matrica
SEC E	PGR amplifikuotas genas	<i>E. coli</i> WA 837 genomine DNR

PRLA-4	PGR amplifikuotas genas	<i>E. coli</i> prlA 4 genas iš pRLA41++ vektoriaus
TRP P/O	iš sintetinių oligonukleotidų surinktas genas	<i>E. coli</i> triptofano E promotoriaus/operatoriaus seka iš literatūros

* pelB - pektatiazės B geno signalinė seka iš *Erwinia carotovora*.
 ++ pRLA41 vektorių pateikė Tom Silhavy iš Princetono universiteto. prlA-4 mutantinė alelė gali turėti savybes, kurios suteikia galimybę lengviau translokuoti heterologinius peptidus ir baltymus. Tačiau gamtinis prl1A (secY) genas taip pat turėtų funkcionuoti.

E. coli BLR transformacija pSCT-029A arba pSCT-038

Sukonstravus pSCT-029A arba pSCT-038 plazmides, t.y. sujungus įvairius DNR fragmentus, būtina panaudoti galutinį sujungimo mišinį *E. coli* šeimininko kamienui, skirtam plazmidės padauginimui ir būsima baltymo ekspresijai, transformuoti. Norint atlikti šią transformaciją, reikia *E. coli* ląsteles padaryti imliomis DNR priėmimui. Imliosios ląstelės gali būti paruošiamos įvairiais būdais, tokiais kaip apdorojimas CaCl_2 ir elektroporacija. Tinkamiausių ląstelių linijų (UGL 165 ir UGL 703) paruošimui mes panaudojome abu būdus iš eilės pagal toliau duodamas metodikas.

I. Pirminė transformacija į *E. coli* K-12 (BB4) šeimininką

Ši pirmoji transformacija yra neesminė, tačiau ji yra pageidautina, nes *E. coli* BB4 K-12 šeimininkas pasižymi dideliu efektyvumu transformacijos, kuri duoda daugybę transformantų ir didelę tikimybę identifikuoti įvairius pageidaujamus klonus.

A. Imlių BB4 ląstelių paruošimas, panaudojant apdorojimą CaCl_2

BB4 genotipas...LE392.32 [F' lac^QZΔMI5proAB Tn 10 (Tet^R)]

1. Paruošiama per naktį prisotinta ląstelių kultūra.
2. Pagaminama šviežių ląstelių kultūra, inokuliuojant 100 ml terpės iki 0,5 % (t/t) ir auginama iki $A_{600 \text{ nm}} = 0,02-0,03$.
3. Kultūra auginama iki $A_{600 \text{ nm}} = 0,15-0,3$, apytikriai 3 padvigubėjimai.
4. Ląstelės palaikomos 10 min. leduose.

5. Atskiriamos ląstelės nuo kultivavimo terpės centrifuguojant (5K aps/min x 10 min).
6. Nusodintos ląstelės vėl suspenduojamos 0,5 tūrio ledu atšaldyto 0,1M CaCl_2 , palaikoma leduose 30 min., po to ląstelės nusodinamos aukščiau aprašytu būdu.
7. Nusodintos ląstelės vėl suspenduojamos 0,1 tūrio 0,1M CaCl_2 ; prieš naudojant palaikoma leduose 1 val.

B. Transformavimo metodika

1. Į 100 μl imliųjų ląstelių, pagamintų kaip aprašyta aukščiau, pridedama 1-2 μl sujungimo mišinio, kuriame turi būti tiksliai 2-10 ng plazmidinio vektoriaus DNR.
2. Mišinys laikomas leduose 30 min.
3. Mišinys paveikiamas šiluminiu šoku, padedant jį į 37 °C temperatūros šildymo bloką arba vandens vonią.
4. Į mišinį pridedama 1 ml sušildytos kultivavimo terpės, ir mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje 30-60 min.
5. Tam tikras kiekis transformavimo mišinio paskleidžiamas ant tinkamos kietos terpės, turinčios reikiamą selektyvų antibiotiką, ir lėkštelės inkubuojamos 18-24 val., kol atsiranda kolonijos.

II. Antrinė transformacija

Transformantai identifikuojami įvairiais būdais. Pasirenkama keletas klonų perkėlimui į antrąjį šeimininką (*E. coli* B šeimininko kamienas, BLR). BLR yra šeimininko kamienas, pasirinktas fermentacijai ir baltymo ekspresijai.

BLR genotipas yra $F^- \text{omp}^T \text{hsdS}_B (r_B^- \text{m}_B^-)$ gal dcm $\Delta(\text{srl-recA})$ 306::Tn10(Tc^R). *E. coli* ląstelės priims DNR, palaikius jas elektriniame lauke kontroliuojamomis ir tiksliai apibrėžtomis sąlygomis. *E. coli* B šeimininko kamienai yra lengviau transformuojami sveika plazmide, lyginant su sujungimo mišiniu, ir geriau priima svetimą DNR, kai padaromi imliais panaudojant elektroporaciją, o ne apdorojimą CaCl_2 .

A. *E. coli* BLR imliųjų ląstelių paruošimas tolimesnei elektroporacijai

1. Paruošiama per naktį prisotinta ląstelių kultūra.
2. Paruošiama šviežių ląstelių kultūra, inokuliuojant 100 ml terpės iki 1,0 % (t/t) ir auginama iki $A_{600\text{ nm}} = 0,3-0,5$.
3. Pašaldžius kultūrą leduose 15 min., ląstelės nucentrifuguojamos.
4. Nuopilas nupilamas, pašalinant kiek galima daugiau terpės. Ląstelės vėl suspenduojamos iš viso 100 ml ledu atšaldyto 10 % (m/t) vandeninio glicerolio (glicerolis turi būti labai geros kokybės). Suspenduotos ląstelės tuoj pat vėl nucentrifuguojamos.
5. Ląstelės vėl suspenduojamos 50 ml ledu atšaldyto 10 % (m/t) glicerolio. Vėl nucentrifuguojama.
6. Ląstelės vėl suspenduojamos 25 ml ledu atšaldyto 10 % (m/t) glicerolio. Vėl nucentrifuguojama.
7. Pakartojama 6 stadija.
8. Ląstelės vėl suspenduojamos galutiniame 2 ml tūryje ledu atšaldyto 10 % (m/t) glicerolio. Galutinė ląstelių koncentracija turi būti $1-3 \times 10^{10}$ ląstelių/ml. Ląstelės galima laikyti iki 1 metų $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

B. Transformavimas elektroforacijos metodu

1. Sterilios kiuvetės ir baltosios kameros rėmeliai palaikomi 10 min. leduose. Leduose taip pat palaikoma keletas polipropileninių mėgintuvėlių.
2. Sumaišoma 40 μl ląstelių suspensijos su 1-2 μl plazmidinę DNR turinčio tirpalo Tris/EDTA, kurio apytikrė koncentracija yra 100 pg/ μl . (Šis DNR mišinys turi turėti kaip galima mažiau druskų, kad būtų galima išvengti įrangos kibirkščiavimo). Tirpalas gerai sumaišomas ir palaikomas leduose 0,5-1,0 min.
3. Įjungiamas Gene-Pulser prietaisas, nustatant 25 μF . Nustatoma 200 omų pulsacijas kontroliuojančio įtaiso varža. Gene-Pulser prietaise nustatoma 2,5 Kv 0,2 cm kiuvetėms arba 1,5-1,8 Kv, jei naudojamos 1,0 cm kiuvetės. Ląstelių ir DNR mišinys perpilamas į šaltą

elektroporacijos kiuvetę ir suspensija sukratoma į kiuvetės dugną, pašalinant visus oro burbuliukus. Kiuvetė patalpinama į šaldomos apsauginės kameros rėmelius ir stumiami rėmeliai į kamerą tol, kol kiuvetė atsiduria tarp kontaktų kameros apačioje.

4. Kiuvetė vieną kartą paveikiama srovės pulsacija, esant aukščiau nurodytiems prietaiso parametrams.
5. Tuo pat į kiuvetę pridedama 1 ml SOC (20 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 0,5 g NaCl, 1 l H₂O ir 20 mM gliukozės) buferinės terpės ir ląstelės vėl suspenduojamos.
6. Suspensija perpilama į sterilius 17x100 mm polipropileninius mėgintuvėlius ir 37 °C temperatūroje inkubuojama 1 val.
7. Elektroporuotu mišiniu padengiamos selektyvios terpės lėkštelės.

sCTgly produkavimas (fermentacija)

Fermentacijos vonios terpė pagaminama naudojant 2 lentelėje išvardintus komponentus. Ši fermentacija inokuliuojama vėlyvosios log fazės kultūra, išauginta inokuliavimo terpėje (2 lentelė). Inokuliavimo tūris nustatomas pagal inokulo kiekį (ląstelių skaičių), kurio reikia, kad pradinio fermentacijos mišinio A₆₀₀ nm būtų tarp 0,015 ir 0,24. pH, DO₂ ir temperatūros parametrai, reikalingi fermentacijos vykdymui, duoti 3 lentelėje. Fermentacijos palaikymo stadija pradedama tada, kai išsenka partijos terpėje esantis glicerolis (Glicerolio išsekimą galima nustatyti pagal ištirpusio deguonies kreivės smailę ir/arba pagal glicerolio testą). Padavimo greitis nustatomas toks, kad būtų palaikomas pastovus ląstelių dalijimosi greitis, nustatytas pagal ląstelių masę (sausų ląstelių masė) glicerolio išsekimo metu. Papildymo komponentai yra duoti 2 lentelėje. Padavimo greitis remiasi tokia formule:

$$Q = \frac{(V) \times (Mu) \times (dcw) \times (e^{Mu \times t})}{(Yx/s \times [Feed])}$$

kurioje:

Mu = augimo greitis (padvigubėjimai per valandą),

dwc = sausų ląstelių masė (gramais litre terpės) padavimo pradžioje, nustatomas empiriškai atskiriems *E. coli* kamienams,

t = laikas (valandos),

$Y_{x/s}$ = šeimininko glicerolio sunaudojimo konstanta (*E. coli* WA 837 yra 0,327; panaši ir BLR),

V = fermentacijos tūris (litrai),

[feed] = gramai glicerolio litre paduodamos terpės (visuose čia duotuose pavyzdžiuose buvo 629 gramai),

Q = glicerolio padavimo greitis (litrai per valandą).

Indukcijos procesas vykdomas naudojant gradientinę indukciją, susietą su padavimo greičiu, laikui bėgant didinant induktoriaus (IPTG) kiekį, atitinkantį nustatytą augimo greitį.

Fermentacijos eiga kontroliuojama matuojant sugertį esant 600 nm bangos ilgiui, drėgnų ląstelių masę g/l, apart terpės mėginių CEX chromatografinės analizės sCTgly buvimui ir jo koncentracijai (mg/l) nustatyti.

Norint padidinti išorinės membranos laidumą, į fermentacijos terpę galima pridėti glicino. Glicino galima pridėti į vonios terpę arba į papildymo mišinį. Geriau pridėti glicino į papildymo mišinį taip, kad glicino koncentracija fermentacijos kultūroje didėtų priklausomai nuo ląstelių augimo greičio. Optimali glicino koncentracija turėtų būti 0,1-1 g 100-ui ml besibaigiant fermentacijai. Praktiškai pridedamo į papildymo mišinį glicino kiekis yra apskaičiuojamas taip, kad fermentacijos gale būtų pasiekama norima glicino koncentracija. Konkretus pridedamo glicino kiekis priklauso nuo fermentacijos trukmės (po indukavimo) ir norimos galutinės glicino koncentracijos. Mūsų naudoti būdai: į fermentacijos papildymą pridedama 24 g/l glicino, kuris praėjus 26 val po indukcijos, duoda 5 g/l glicino koncentraciją. Mes nustatėme, kad glicino pridėjimas į papildymo mišinį yra efektyvesnis už glicino pridėjimą į vonios terpę.

2 lentelė - Terpės komponentų sąrašas

Inokuliacijos terpė		Vonios terpė		Papildymo terpė	
Komponentai	Kiekis g/l	Komponentai	Kiekis g/l	Komponentai	Kiekis g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,00	(NH ₄) ₂ SO ₄	14,80	Glicerolis	629
KH ₂ PO ₄	2,00	KH ₂ PO ₄	4,40	IPTG	2,80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,10		
CaCl ₂	0,25	CaCl ₂	0,53		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,11		
natrio citratas	1,50	natrio citratas	2,20		
N-Z Case+	5,00	N-Z Case+	10,60		
Hy Yeast 412	2,00	Hy Yeast 412	3,10		
L-metioninas	4,50	L-metioninas	4,50		
Kanamycinas	0,05	Kanamycinas	0,05		
Glicerolis	18,00	Glicerolis	2,50		

3 lentelė - Fermentacijos parametrų nustatytos sąlygos

Parametras	geriausias	geresnis	geras
pH	6,78-6,85	6,50-7,00	6,00-7,5
Temp. °C	29,5-30,5	28,0-32,0	20,0-35,0
DO (prisotinimas deguonimi)	>80 %	>70 %	>50 %
Mu reikšmė	0,12-0,14	0,10-0,16	0,05-0,20
Fermentacijos laikas (val. po indukcijos)	24-27	22-29	20-32

sCTgly išskyrimas

Kondicionuota terpė apdorojama atskiriant ląsteles nuo terpės, panaudojus arba tangentinio srauto filtravimą arba centrifugavimą; terpė surenkama, o ląstelės atmetamos. Išsiskyręs sCTgly stabilizuojamas terpėje pridedant 2,0 N HCl iki galutinio pH 3,0. Glicinu pailgintas lašišos kalcitoninas yra stabilus ilgesnį laiką esant pH 3,0. Atskyrus ląsteles ir stabilizavus pH, peptidas gryninamas katijonų mainų ir atvirkštinių fazių chromatografijos metodais. Nors atvirkštinių fazių chromatografija ir po jos vykdoma katijonų mainų chromatografija gali duoti gerą išgryninimą, pageidautina, kad prieš atvirkštinių fazių skysčių chromatografiją būtų vykdoma pradinė katijonų mainų stadija. Gryninant didelius kiekius, tai sumažina į atvirkštinių fazių chromatografiją paduodamą tūrį, tokiu būdu sumažinant aplinkosaugos ir

saugumo faktorius, išskylančius dėl būtinumo naudoti didelius kiekius organinių tirpiklių, tokių kaip acetonitrilas.

Kita pageidautina modifikacija yra lašišos kalcitonino peptidinio pirmtako cisteino liekanų S-sulfoninimas prieš gryninimą arba jo metu, norint pagerinti monomerinio peptido išeigas.

Klonų aprašymas

Monogeninis UGL 172 klonas yra *E. coli* BLR kamienas, turintis pSCT-025A vektorių, kuriame yra viena transkripcijos kasetė (monogeninė), koduojanti lašišos kalcitoniną su glicinu C-gale (sCTgly)². Digeninis UGL 165 klonas yra *E. coli* BLR kamienas, turintis pSCT-029A vektorių, kuriame yra dvi viena po kitos einančios kasetės (digeninis), ir kiekviena jų koduoja lašišos kalcitoniną su glicinu C-gale (sCTgly). Trigeninis UGL 168 klonas yra *E. coli* BLR kamienas, turintis pSCT-034 vektorių, kuriame yra trys viena po kitos einančios kasetės (trigeninis), ir kiekviena jų koduoja lašišos kalcitoniną su glicinu C-gale (sCTgly). Monogeninis UGL 702 klonas yra *E. coli* BLR kamienas, turintis pSCT-037 vektorių, kuriame yra 1 transkripcijos kasetė ir sekrecijos faktoriaus genai. Digeninis UGL 703 klonas yra *E. coli* BLR kamienas, turintis pSCT-038 vektorių, kuriame yra 2 viena po kitos einančios kasetės ir sekrecijos faktoriaus genai.

1 pavyzdys - 1 l apimties UGL 165 fermentacija

UGL 165 klono fermentacija buvo vykdoma taip, kaip aprašyta skyrelyje "Eksperimentų detalės". Fermentacijos parametrai ir rezultatai susumuoti 4 lentelėje. Trumpai tariant, UGL 165 klono ląstelės buvo auginamos inokuliavimo terpėje ir panaudotos užsėti fermentacijos talpai, turinčiai 1 l terpės, gaunant

² Tinkamiausioje transkripcijos kasetėje yra dvigubas tac/lac promotorius, po kurio eina ribosomų surišimo vieta, o po jos sekos OmpA signaliniam peptidui ir po jų sekos sCTgly, po kurių eina transkripcijos terminacijos sekos rrnB T1-T2.

pradinį $A_{600 \text{ nm}} = 0,06$. Ląstelės buvo auginamos 6,25 val., kol terpėje išseko glicerolis. Po to buvo pradėta fermentacijos vonios papildymo stadija ir be pertraukos buvo tiekiama papildoma terpė 25,5 val. Sąlygos nuliniam laikui (papildymo ir indukcijos pradžia) buvo tokios: prisotinimas deguonimi 94 %, temperatūra 30 °C ir pH 6,8. Sąlygos fermentacijos gale (25,5 val) buvo tokios: prisotinimas deguonimi 40 %, temperatūra 31 °C ir pH 6,8. Be to, fermentacijos pabaigoje sugertis esant 600 nm bangos ilgiui buvo 113,3, o drėgnų ląstelių masė g/l buvo 168 g. Fermentacijos pabaigoje taip pat buvo išmatuota sCTgly produkcija, ir ji yra 222 mg/litre terpės (žr. fig.10 ir 4 lentelę).

4 lentelė - UGL 165 fermentacijos santrauka

Laikas po papildymo, val.	$A_{600 \text{ nm}}$	Drėgnų ląstelių masė, g/l	sCTgly, mg/l**	Papildymo tūris, pridėta ml	[IPTG] μM	Maišymas, aps./min.
-6,25	0,06	-	-	-	-	500
0***	11,1	-	-	-	-	1300
15	51,7	83,3	netirta	44,1	528	1000
17	48,7	92,3	netirta	51,3	614	1200
19	53,6	100,5	38	78,2	948	1300
21	67,6	117,3	77	104,8	1256	1300
22	86,7	130,9	111	120,4	1442	1350
23	92,6	140,0	104	138,2	1654	1350
24	106,5	153,7	156	158,4	1896	1350
25	108,5	162,8	183	181,2	2174	1400
25,5	113,3	168	222	194,1	2324	1400

** sCTgly nustatytas naudojant CEX-HPLC testą, kaip aprašyta 4 pavyzdyje.

*** per naktį ir 2 val nuo papildymo pradžios maišyta esant 1450 aps/min.

2 pavyzdys - 1 l apimties UGL 703 fermentacija

Rekombinantinis *E. coli* UGL 703 buvo deponuotas Amerikos tipinių kultūrų kolekcijoje (ATCC) su žyme ATCC 98395 pagal Budapešto sutartį dėl mikroorganizmų patentiniams tikslams deponavimo. UGL 703 klonų fermentacija buvo vykdoma taip, kaip aprašyta skyrelyje "Eksperimentų detalės". Fermentacijos parametrai ir rezultatai susumuoti 5 lentelėje. Trumpai tariant, UGL 703 klonas buvo auginamas inokuliavimo terpėje ir panaudotas užsėti fermentacijos talpai, turinčiai 1 l terpės, gaunant pradinį

$A_{600} \text{ nm} = 0,06$ (geriausia 0,06-0,12). Ląstelės buvo auginamos 6,25 val.(geriausias intervalas yra 6,0-7,0 val), kol terpėje išseko glicerolis. Po to buvo pradėta fermentacijos vonios papildymo stadija ir be pertraukos buvo tiekiama papildoma terpė 26 val. Sąlygos nuliniam laiko taške (papildymo ir indukcijos pradžia) buvo tokios: prisotinimas deguonimi 95 %, temperatūra 30 °C ir pH 6,8. Sąlygos fermentacijos gale (26 val) buvo tokios: prisotinimas deguonimi 80 %, temperatūra 31 °C ir pH 6,8. Be to, fermentacijos pabaigoje sugertis esant 600 nm bangos ilgiui buvo 80,9, o drėgnų ląstelių masė g/l buvo 129,1 g. Fermentacijos pabaigoje taip pat buvo išmatuota sCTgly produkcija, ir ji yra 284 mg/litre terpės (žr. fig.11 ir 5 lentelę).

5 lentelė - UGL 703 fermentacijos santrauka

Laikas po papildymo, val.	A_{600}	Drėgnų ląstelių masė, g/l	sCTgly, mg/l**	Papildymo tūris, pridėta ml	[IPTG] μM	Maišymas, aps./min.
-6,25	0,06	-	-	-	-	500
0***	8,1	-	-	-	-	1300
15,5	22,6	7,3	~18	47,5	570	1150
19	36,5	83,1	25	72,9	948	1250
21	53,5	94,2	53	104,8	1256	1350
22	61,3	100,8	58	120,4	1442	1450
23	59,7	106,0	69	138,2	1654	1550
24	73,3	119,0	83	158,4	1898	1580
25	74,1	119,1	203	181,1	2174	1620
26	80,9	129,1	284	207,6	2487	1620

** sCTgly nustatytas naudojant CEX-HPLC testą, kaip aprašyta 4 pavyzdyje.

Išvados

Kiti eksperimentai buvo atlikti panašiomis bendromis sąlygomis, naudojant UGL 172, UGL 168 ir UGL 702 klonus. Fig. 12 ir 13 rodo, kad digeninis UGL 165 klonas geriausiai tinka sCTgly produkavimui, o trigeninis UGL 165 klonas yra antroje vietoje lyginant su monogeniniu UGL 173 klonu. Tačiau UGL 165 sCTgly produkavimą galima dar labiau pagerinti esant koekspresuojamiems sekrecijos faktoriams (UGL 703) (plg. fig. 10 ir 11, ir 17).

Kai dėl prisotinio deguonimi fermentacijos metu, fig.14A ir 14B paremia išvadą, kad į fermentacijos terpę pridėtas deguonis neturi kritiško

poveikio UGL 165 ląstelių augimui, bet yra labai svarbus sCTgly produkcijos padidinimui.

Fig. 15A, 15B ir 16 aiškiai rodo, kad *E. coli* BLR kamienas geriausiai tinka sCTgly produkuoti.

sCTgly produkavimą galima dar labiau padidinti pridėjus glicino, kaip pridedamo papildomo komponento.

3 pavyzdys - sCTgly išskyrimas iš UGL 165 kultivavimo terpės: katijonų mainų chromatografija #1

Apie 1000 l kultivavimo terpės, kuri buvo atskirta nuo ląstelių arba tangentinio srauto filtracija, arba centrifugavimu, parūgštinama pakankamu tūriu 2N vandenilio chlorido rūgšties, kad pH sumažėtų iki 3,0. Po to terpė praskiedžiama pakankamu kiekiu vandens, kad laidumas būtų sumažintas iki $\leq 7,5$ mS. Praskiesta terpė įkraunama į katijonų mainų kolonėlę (Pharmacia SP-Sepharose Big Beads, 99,0 cm x 13,0 cm), kuri buvo išlyginta su 10 mM citrinos rūgštimi pH 3,0, esant 25 l/min (3,25 cm/min.) srauto greičiui. Kai įkrovimas buvo baigtas, kolonėlė plaunama 10 mM citrinos rūgštimi pH 3,0, esant 8 l/min (1,0 cm/min.) srauto greičiui maždaug 40 min. (3 įkrovos tūriai) arba tol, kol pasiekiamas stabili UV bazinė linija. Produktas (sCTgly) eliuuojamas 10 mM citrinos rūgštimi, 350 mM natrio chloridu, pH 3,0, esant 8 l/min (1,0 cm/min.) srauto greičiui. Kolonėlė išvaloma ir regeneruojama 0,5 M natrio hidroksidu, 1,0 M natrio chloridu per 60,0 min (5 įkrovos tūriai), esant 8 l/min (1,0 cm/min.) srauto greičiui.

Į maišomą baką, kuriame yra gautas eliuatas CEX#1 (apytikriai 100 l), pridedama 60,57 g trometamino. Tirpalas maišomas tol, kol ištirpsta visa kieta medžiaga. Naudojant 2 M NaOH, tirpalas pašarminamas iki pH 8,25 (intervalas: 8,0-8,5). Pridedama 23,64 g TRIS·HCl (tris[hidroksimetil]-aminometano hidrochlorido), ir tirpalas maišomas tol, kol ištirpsta visa kieta medžiaga. Į baką maišant supilama 1,0 kg natrio sulfito, ištirpinto TRIS·HCl, ir 200 g natrio tetrionato, ištirpinto TRIS·HCl. Reakcijos mišinys maišomas 15 min. Jeigu reikia, pakoreguojamas pH iki 8,25 (intervalas: 8,0-8,5) su 2 M

NaOH. Reakcijos mišinys maišomas per naktį kambario temperatūroje. Reakcijos mišinio pH sumažinamas iki 2,25 (intervalas: 2,0-2,5) su 2M HCl.

Atvirkštinių fazių chromatografija #1 (RP #1)

Gautas S-sulfoninimo reakcijos mišinys (apytikriai 100 l) įkraunamas tiesiai į atvirkštinių fazių kolonėlę (Toso Haas Amberchrom CG300md, 25,0 cm x 18,0 cm), kuri buvo išlyginta 0,1 % trifluoracto rūgštimi, esant 2,0 l/min (4,0 cm/min) srauto greičiui. Kai įkrovimas buvo baigtas, kolonėlė plaunama 0,1 % trifluoracto rūgštimi, esant 750 ml/min (1,5 cm/min.) srauto greičiui, kol pasiekiamas stabili UV bazinė linija. Kolonėlė plaunama 0,1 % trifluoracto rūgštimi 20 % acetonitrilu, esant 750 ml/min (1,5 cm/min.) srauto greičiui, kol buvo visiškai išplauta pagrindinė priemaišų smailė. Produktas (sCTgly) eliuuojamas 0,1 % trifluoracto rūgštimi, 40 % acetonitrilu, esant 750 ml/min (1,5 cm/min.) srauto greičiui. Kolonėlė valoma 0,1 % trifluoracto rūgštimi, 80 % acetonitrilu 30 min., esant 750 ml/min (1,5 cm/min.) srauto greičiui.

Katijonų mainų chromatografija #2 (CEX #2)

Gautas RP #1 eliuatas (apytikriai 8,0 l) įkraunamas tiesiai į katijonų mainų kolonėlę (E. Merck Fractogel EMD SO3 650M, 18,0 cm x 24,0 cm), kuri buvo išlyginta su 25 mM MES (2-[N-morfolino]etansulfonrūgštis), pH 5,8, esant 500 ml/min. (2,0 cm/min) srauto greičiui. Kai įkrovimas buvo baigtas, kolonėlė plaunama, esant 750 ml/min. (3,0 cm/min) srauto greičiui, 25 mM MES (2-[N-morfolino]etansulfonrūgštis), pH 5,8 tol, kol ištekėjusio iš kolonėlės skysčio pH grįžta iki 5,8 (intervalas: 5,6-5,9). Pagrindinėms peptidinėms priemaišoms pašalinti kolonėlė plaunama 25 mM MES (2-[N-morfolino]etansulfonrūgštis), pH 5,8, dar 30 min. esant 750 ml/min. (3,0 cm/min) srauto greičiui. Produktas (sCTgly) eliuojamas 25 mM MES, 100 mM natrio chloridu, pH 5,8, esant 750 ml/min. (3,0 cm/min) srauto greičiui. Jeigu tuoj pat nevykdomas amidinimas, produkto frakcija parūgštinama iki pH 3,0-5,0 su 1,0 M HCl. Kolonėlė išvaloma ir regeneruojama 0,1 M natrio hidroksidu, 1,0 M natrio chloridu per 60 min., esant 750 ml/min (3,0 cm/min.) srauto greičiui.

Amidinimo reakcija

Gautas CEX #2 eliuatas su sureguliuotu pH turi išgrynintą sCTgly ir yra tinkamas substrato tirpalas, kurį galima naudoti sCTgly *in vitro* konversijai į tikrą lašišos kalcitoniną; šią reakciją katalizuoja peptidilgliciną α -amidinantis fermentas (PAM), kaip parodyta tolimesniame 5 pavyzdyje.

4 pavyzdys - Analitinė katijonų mainų HPLC sCTgly kiekiui nustatyti

sCTgly surinktose chromatografinėse frakcijose identifikuojamas ir jo kiekis nustatomas analitinės CEX-HPLC metodu. Kiekvienos frakcijos alikvota supilama į katijonų mainų kolonėlę (The Nest Group, polisulfoetilaspartamidas, 4,6 mm x 50 mm), kuri buvo išlyginta su 10 mM natrio fosfatu pH 5,0, esant 1,2 ml/min srauto greičiui. Atskiriama panaudojant tiesinį gradientą nuo 10 mM natrio fosfato pH 5,0 iki 10 mM natrio fosfato, 250 mM natrio chlorido pH 5,0, esant 1,2 ml/min srauto greičiui per 15 min. Ištekantis iš kolonėlės skystis kontroliuojamas pagal UV sugertį esant 220 nm bangos ilgiui. sCTgly identifikuojamas palyginant jo sulaikymo trukmę su išgryninto etaloninio sCTgly sulaikymo trukme. sCTgly kiekis nustatomas pagal smailės plotą, lyginant su etaloninio sCTgly plotu. Šis analizės metodas taip pat buvo naudojamas sCTgly kiekiui nustatyti fermentacijos terpėje.

5 pavyzdys - Glicinu pailginto lašišos kalcitonino pavertimas tikru kalcitoninu naudojant α -amidinantį fermentą

Norint gauti optimalias amidinto lašišos kalcitonino išėigas, reikalingi tokie kritiniai parametrai:

1) Siekiant išvengti nespecifinės peptido adsorbcijos ant reakcijos indo sienelių, amidinimo reakcija vykdoma silanizuotame stikliniame inde.

2) Reakcijos mišinyje palaikomi dideli ištirpusio deguonies kiekiai purškiant ir/arba maišant. Pageidautina, kad ištirpusio deguonies kiekis būtų $\geq 75\%$.

3) Inkubacijos temperatūra amidinimo metu palaikoma 35 °C - 39 °C ribose.

- 1) Amidinimo reakcijos pH palaikomas 6,0 - 6,5 ribose.
- 2) Glicinu pailginto lašišos kalcitonino pradinė koncentracija amidinimo reakcijos mišinyje turėtų būti 3,5-10,5 mg/ml (0,95-2,9 mM) ribose.
- 3) Jeigu į reakcijos mišinį pridedama 12000-24000 vienetų/ml iš esmės neturinčio proteazių α -amidinančio fermento (peptidilgliciną α -amidinančios monooksigenazės, čia žymimos "PAM") ir substrato koncentracija yra tokia kaip nurodyta 5) abzace, reakcijai leidžiama vykti 4-6 valandas. Tačiau reakcijos laikas gali būti pailgintas iki 24 valandų be kenksmingo poveikio produktui.
- 4) Siekiant išvengti, kad amidinimo reakciją pradėtų limituoti askorbatas, maždaug reakcijos viduryje pridedamas papildomas ekvivalentas askorbato.

Amidinimo reakcijos komponentai yra tokie:

- 3,5-10,5 mg/ml S-sulfoninto glicinu pailginto lašišos kalcitonino,
- 30 mM MES buferio, pH 6,0-6,5,
- 0,5-1,0 μ M CuSO₄ (pvz. 0,5)
- 4-15 mM KI (pvz. 5)
- 1-5 % etanolio (pvz. 1 %)
- 10-100 μ g/ml katalazės (pvz. 35)
- 1,5-3,0 mM askorbato (pvz. 1,5)

peptidilgliciną α -amidinančios monooksigenazės (12000-24000 vienetų mililitrui reakcijos mišinio. 1 vienetas yra DansilTyr-Val-Gly substrato 1 pikomolio per minutę konversija į produktą 37 °C temperatūroje, pH 7). PAM fermentas gali būti gaunamas pagal Miller et al., ABB 298: 380-388 (1992), U.S. Patent 4,708,934, European Publication 0 308 067 ir 0 382 403 bei Biotechnology, Vol. II (1993) pp. 64-70, kurie čia duodami kaip literatūros šaltiniai.

Prieš amidinimą glicinu pailgintas lašišos kalcitoninas gali būti produkuojamas 1 arba 2 pavyzdyje aprašytos fermentacijos būdu ir išgryninamas taip, kaip aprašyta 3 pavyzdyje.

Tais atvejais, kai amidinimui naudojamas fermentas yra peptidilgliciną α -hidroksilinti monooksigenazė (PHM), naudojamas toks pats reakcijos

mišinys, kaip aprašytas aukščiau, PAM'ę pakeičiant PHM'e. Be to, 4-6 valandų inkubacijos laikotarpio pabaigoje reakcijos mišinio pH padidinamas iki 8-9, pridedant bazės. Prieš nutraukiant reakciją, šis reakcijos mišinys pamaišomas dar 4-8 val. Peptidilgliciną α -hidroksilinti monooksigenazė gali būti gaunama ekspresuojant tik N-galinę PAM dalį (maždaug 40 pirmųjų kDa). Žr. pvz. Mizuno et al. BBRC Vol. 148, No., pp.546-52 (1987) kurio aprašymas (kiek jis susijęs su Mizuno "AE1") duodamas kaip literatūros šaltinis. Yra žinoma, kad gamtoje PHM ekspresuoja varlės oda.

Pabaigus amidinimo reakciją, reakcijos mišinys praskiedžiamas tokiu kiekiu vandens, kad galutinė peptido koncentracija būtų mažesnė už 3,0 mg/ml. Į mišinį pridedama tiek 1M TRIS pH 9,0, kad galutinė TRIS koncentracija būtų apytikriai 100 mM. Jeigu reikia, pakoreguojamas pH (8,0-9,0) 2M NaOH. Maišant į reakcijos mišinį lėtai pridedama 3,0 kartus didesnis, skaičiuojant pagal galutinę SO_3 -sCT koncentraciją (mM), kiekis L-cisteino. Jeigu reikia, pakoreguojamas pH (8,0-9,0) 2M NaOH. Renatūracijos reakcijos mišinys maišomas 1 valandą kambario temperatūroje. Reakcija nutraukiama parūgštinant 10 % fosfato rūgštimi iki pH 2,0 (1,9-2,3).

6 pavyzdys - Gryninimas po amidinimo

Katijonų mainų chromatografija #3 (CEX #3)

Ši kolonėlė naudojama sCT gryninimui po α -amidinimo ir renatūracijos. Pagrindinė priemonė po α -amidinimo/renatūracijos yra sCTG. CEX #3 chromatografijoje naudojama Amicon Vantage-A kolonėlė (18,0 x 16,0 cm) pripildyta Toyopearl SP650S dervos. Vienkartinė operacija atliekama naudojant injekcijoms skirtą vandenį (WFI) ir 0,5 M, 50 mM ir 175 mM natrio chlorido tirpalus kartu su natrio fosfatu pH 5,5. Toliau duodamas trumpas šio proceso stadijų aprašymas:

- 1) Nustatomas 750 ml/min operatyvinis srauto greitis.
- 2) Naudojant LC sistemos kontroliavimo įtaisą, nustatomi tokie chromatografijos kontroliavimo parametrai:
 - UV bangos ilgis 230 nm,
 - intervalas 0,64 AUFS,

laidumas X1000.

3) Iš pradžių kolonėlė plaunama WFI mažiausiai 5 min., esant 750 ml/min srauto greičiui.

4) Skiedimo siurblys (150 mM natrio fosfatas, pH 5,0) pastatomas ant 50 ml/min reikšmės ir kolonėlė lyginama 10 mM natrio fosfatu, esant 750 ml/min. srauto greičiui tol, kol gaunama stabili pH bazinė linija.

5) Kolonėlė vėl lyginama 10 mM natrio fosfatu, esant 750 ml/min. srauto greičiui tol, kol gaunama stabili pH bazinė linija žemiau 6,0. (Atkreipkite dėmesį: jeigu kolonėlės pH nėra žemiau 6,0, tada reikia plauti 150 mM natrio fosfatu). Jeigu atliekamas plovimas 150 mM natrio fosfatu pH 5,5, prieš pereinant prie tolimesnės stadijos, kolonėlė vėl turi būti išlyginama naudojant 10 mM natrio fosfatą.

6) Po papildomo išlyginimo kolonėlė eliuuojama 175 mM natrio chloridu, 10 mM natrio fosfatu pH 5,5 4 min., esant 750 ml/min. srauto greičiui (tuščiasis eliuavimas).

7) Kolonėlė vėl lyginama 10 mM natrio fosfatu pH 5,5, esant 750 ml/min. srauto greičiui tol, kol gaunama stabili pH bazinė linija.

8) Kai pasiekiamas išlyginimas, amidinto/renatūruoto produkto, turinčio 10-25 g sCT, pH sukoreguojamas iki 3,5 naudojant 2N natrio hidroksidą ir produktas įkraunamas į CEX #3 kolonėlę 400 ml/min greičiu. Po mėginio įkrovimo įkrovimo konteineris perplaunamas 500 ml WFI.

9) Po įkrovimo kolonėlė plaunama 10 mM natrio fosfatu pH 5,5 esant 750 ml/min srauto greičiui 30 min, kol kolonėlės pH stabilizuojasi ties daugiau nei 5,0.

10) Kai kolonėlės pH stabilizavosi ties daugiau nei 5,0, kolonėlė plaunama 750 ml/min greičiu 50 mM natrio chloridu, 10 mM natrio fosfatu pH 5,5 100 minučių, kol pasirodo sCTgly smailė.

11) Kai praeina 100 min., prie sistemos prijungiamas 175 mM natrio chloridas. Kolonėlė plaunama 175 mM natrio chloridu, 10 mM natrio fosfatu pH 5,5, esant 75 ml/min srauto greičiui ir eliuuojamas produktas. Visa produkto smailė surenkama į vieną talpą. Nustatoma gauto po CEX3

produkto masė ir į frakciją pridedama 1N acto rūgšties (10 % frakcijos masės).

12) Kolonėlė valoma 0,5 M natrio chloridu, 10 mM natrio fosfatu pH 5,5, esant 750 ml/min srauto greičiui, 15 min.

13) Išvalius kolonėlę, prie sistemos prijungiamas 1,0 M natrio chloridas/0,25 M natrio hidroksidas. Skiedimo siurblys pastatomas į 0,000 ml/min., ir kolonėlė plaunama 1,0 M natrio chloridu/0,25 M natrio hidroksidu, esant 600 ml/min. srauto greičiui, mažiausiai 30 min.

14) Kolonėlė plaunama WFI 5 minutes, esant 750 ml/min srauto greičiui.

15) Kolonėlė plaunama 10 mM natrio hidroksidu 30 minučių, esant 500 ml/min srauto greičiui. Kolonėlė laikoma tokiomis sąlygomis.

Atvirkštinių fazių chromatografija (RP #2)

Ši stadija eina po CEX#3 ir yra naudojama kaip druskos ir buferio pakeitimo stadija prieš liofilizaciją. Pagrindinis šios stadijos tikslas yra pakeisti druską acetatu. RP #2 chromatografijoje naudojama Amicon Vantage-A kolonėlė (13,0 x 12,5 cm), pripildyta Amberchrom CG300md dervos. Vienkartinė operacija atliekama naudojant injekcijoms skirtą vandenį, etilo alkoholį, 250 mM natrio acetatą ir 0,5 % acto rūgštį. Toliau duodamas trumpas šio proceso stadijų aprašymas:

1) CEX#3 eliuatas (apytikriai 4 litrai) parūgštinamas iki pH 2,0 fosfato rūgštimi, po to praskiedžiamas 3 lygiais tūriais 333 mM natrio acetato tirpalo ir paliekamas stovėti mažiausiai 1 valandą.

2) Nustatomas 320 ml/min srauto greitis, o skiedimo siurblys (0,5 % acto rūgštis) nustatomas 80 ml/min., gaunant 400 ml/min bendrą operatyvinį srauto greitį.

3) Naudojant LC sistemos kontroliavimo įtaisą, nustatomi tokie chromatografijos kontroliavimo parametrai:

UV bangos ilgis 230 nm,

intervalas 2,54 AUFS,

laidumas X1000.

4) Iš pradžių kolonėlė plaunama 0,1 % acto rūgštimi, esant 400 ml/min srauto greičiui, kol gaunama stabili laidumo bazinė linija.

5) Kolonėlė valoma 80 % etilo alkoholiu, 0,1 % acto rūgštimi, esant 400 ml/min srauto greičiui, kol gaunama stabili pH bazinė linija.

6) Kolonėlė plaunama 0,1 % acto rūgštimi, kol gaunama stabili pH bazinė linija.

7) Po plovimo atliekamas kolonėlės testas dervos išvalymui patikrinti. Kolonėlė eliuuojama 40 % etilo alkoholiu, 0,1 % acto rūgštimi 6 min, esant 400 ml/min srauto greičiui (tuščiasis eliuavimas). Surinktas kolonėlės tikrinimo eliuatas analizuojamas QC metodu.

8) Kolonėlė plaunama 0,1 % acto rūgštimi, esant 400 ml/min srauto greičiui, kol gaunama stabili laidumo bazinė linija.

9) Pabaigus plauti, nuo įleidimo atjungiamas WFI ir prijungiamas 250 mM natrio acetatas. Skiedimo siurblys pastatomas į 0,000 ml/min. padėtį. Kolonėlė lyginama 250 mM natrio acetatu, esant 400 ml/min srauto greičiui, kol gaunama stabili pH bazinė linija.

10) Pasiekus išlyginimą, į RP #2 kolonėlę 400 ml/min greičiu įkraunamas CEX #3 eliuatas. Po mėginio įkrovimo įkrovimo konteineris perplaunamas 1,0 l 250 mM natrio acetato.

11) Kolonėlė plaunama 250 mM natrio acetatu, esant 400 ml/min srauto greičiui, 60 minučių.

12) Po plovimo natrio acetatu natrio acetatas atjungiamas nuo padavimo ir prijungiamas WFI. Skiedimo siurblys grąžinamas į 80 ml/min. srauto greičio padėtį, ir kolonėlė plaunama 0,1 % acto rūgštimi, esant 400 ml/min srauto greičiui, 25 minutes.

13) Po plovimo 0,1 % acto rūgštimi produktas eliuojamas naudojant 40 % etilo alkoholį, 0,1 % acto rūgštį, esant 400 ml/min srauto greičiui. Surenkama visa produkto smailė, ir tirpalas liofilizuojamas gaunant išgryninto sCT miltelius.

14) Kolonėlė valoma 80 % etilo alkoholiu, 0,1 % acto rūgštimi, esant 400 ml/min srauto greičiui, mažiausiai 20 minučių.

15) Išvalius kolonėlę, skiedimo siurblys pastatomas į 0,000 ml/min. padėtį, ir kolonėlė plaunama WFI, esant 400 ml/min. srauto greičiui, mažiausiai 5 minutes.

16) Po plovimo WFI WFI atjungiamas nuo padavimo ir prijungiamas 0,5 N natrio hidroksidas. Kolonėlė plaunama 0,5 N natrio hidroksidu mažiausiai 20 minučių, esant 400 ml/min srauto greičiui.

17) Nuo sistemos atjungiamas 0,5 N natrio hidroksidas ir prijungiamas WFI. Kolonėlė plaunama 50 % etilo alkoholiu, esant 400 ml/min srauto greičiui, mažiausiai 30 min. Kolonėlė laikoma tokiomis sąlygomis.

18) RP #3 eliuatas laikomas 2-8 °C temperatūroje.

Nors šis išradimas buvo aprašytas remiantis konkrečiais jo įgyvendinimo variantais, specialistams bus aiškos įvairios kitos jo variacijos ir modifikacijos ir kitokie panaudojimo variantai. Todėl šis išradimas neapsiriboja čia duotais konkrečiais atvejais; jį apriboja toliau duodama apibrėžtis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Ekspresijos vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš:

a) koduojančios srities, kurioje yra peptidinį produktą koduojančios nukleorūgštys, sujungtos skaitymo rėmelyje 3' kryptimi nuo signalinį peptidą koduojančių nukleorūgščių, ir

b) kontrolinė sritis, funkciškai sujungta su koduojančia sritimi; šioje kontrolinėje srityje yra daug promotorių ir bent viena ribosomų prisirišimo vieta, o bent vienas iš minėtų promotorių yra tac.

2. Vektorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra daug transkripcijos kasečių, ir kiekvienoje kasetėje yra minėta kontrolinė sritis ir minėta koduojanti sritis.

3. Vektorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtoje kontrolinėje srityje yra tiksliai du promotoriai.

4. Vektorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame minėtoje kontrolinėje srityje minėtas tac promotorius yra 5' kryptimi nuo kito promotoriaus.

5. Vektorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto peptidinio produkto C-galinė aminorūgštis yra glicinas.

6. Vektorius pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame yra dar ir nukleorūgštys, koduojančios bent vieną sekreciją skatinantį peptidą.

7. Vektorius pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šį sekreciją skatinantį peptidą pasirenka iš grupės, susidedančios iš secY ir prlA-4.

8. Ląstelė-šeimininkas, transformuota arba transfekuota vektoriumi pagal 1 punktą.

9. Ląstelė-šeimininkas, transformuota arba transfekuota vektoriumi pagal 6 punktą.

10. *E. coli* šeimininkas, turintis ir ekspresuojantis ekspresijos vektorių, kuriame yra daug sujungtų viena paskui kitą transkripcijos kasečių, kur kiekvienoje kasetėje yra:

a) koduojanti sritis, turinti peptidinį produktą koduojančias nukleorūgštis, sujungtas skaitymo rėmelyje 3' kryptimi nuo signalinį peptidą koduojančių nukleorūgščių, ir

b) kontrolinė sritis, funkciškai sujungta su koduojančia sritimi, ir šioje kontrolinėje srityje yra daug vienas paskui kitą einančių promotorių ir bent viena ribosomų prisirišimo vieta, kur bent vienas iš minėtų promotorių yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš *tac* ir *lac*.

11. Ląstelė-šeimininkas, transformuota ekspresijos vektoriumi, kuriame yra lašišos kalcitonino pirmtaką ekspresuojantis genas, ir ši ląstelė-šeimininkas yra *E. coli* BLR kamienas.

12. Ląstelė-šeimininkas, transformuota ekspresijos vektoriumi, kuriame yra su kalcitonino genu susijusį peptidinį pirmtaką ekspresuojantis genas, ir ši ląstelė-šeimininkas yra *E. coli* BLR kamienas.

13. Peptidinio produkto produkavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i t u o, kad jis susideda iš ląstelių-šeimininkų pagal 8 punktą kultivavimo augimo terpėje ir po to šio peptidinio produkto išgavimo iš terpės, kurioje buvo kultivuotos ląstelės-šeimininkai.

14. Peptidinio produkto produkavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad jis susideda iš ląstelių-šeimininkų pagal 9 punktą kultivavimo augimo terpėje ir po to šio peptidinio produkto išgavimo iš terpės, kurioje buvo kultivuotos ląstelės-šeimininkai.

15. Peptidinio produkto produkavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad jis susideda iš tokių stadijų:

(a) ląstelių-šeimininkų pagal 8 punktą kultivavimo, augimo terpėje esant anglies šaltiniui ir indukuojant peptidinio produkto ekspresiją, kontroliuojant minėtų ląstelių augimo greitį tarp 0,05 ir 0,20 padvigubėjimų per valandą; ir po to

(b) minėto peptidinio produkto išgavimo iš terpės.

16. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad bent jau minėto kontroliuojamo augimo metu terpėje yra membraną padarantis laidžia glicino kiekis.

17. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto peptidinio produkto išgavimas susideda iš:

- (a) ląstelių-šeimininkų atskyrimo nuo kultivavimo terpės;
- (b) terpės chromatografavimo atvirkštinių fazių chromatografijos metodu, ir peptidinį produktą turinčių frakcijų išskyrimo;
- (c) minėtų (b) stadijos frakcijų chromatografavimo katijonų mainų chromatografijos metodu; ir po to
- (d) peptidinį produktą turinčių frakcijų išskyrimo.

18. Amidinto peptido produkavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš:

- (a) ląstelių-šeimininkų, kurios ekspresuoja peptidinį produktą, turintį C-galinį gliciną kartu su N-galiniu signaliniu peptidu, kultivavimo kontroliuojamomis sąlygomis, kad minėtų ląstelių augimo greitis būtų 0,05-0,20 padvigubėjimų per valandą ribose, kuriose kultivavimas yra indukuojamas tam tikrą minėto kontroliuojamo augimo laikotarpį;
- (b) minėto peptidinio produkto išgavimo iš augimo terpės; ir
- (c) minėto peptidinio produkto pavertimo į amidintą peptidą, paverčiant minėtą C-galinį gliciną amino grupe.

19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pavertimą amidintu peptidu vykdo:

- (a) pagamindami reakcijos mišinį, kuriame minėtą peptidinį produktą veikia deguonimi ir redukcijos agentu esant peptidilgliciną α -amidinančios monooksigenazės arba peptidilgliciną α -hidroksilinančios monooksigenazės;
- (b) jeigu (a) stadijoje nenaudojama peptidilgliciną α -amidinanti monooksigenazė ir jeigu reakcijos mišinys dar nėra pakankamai bazinis, padidina reakcijos mišinio pH kol jis tampa bazinis; ir
- (c) išgauna minėtą amidintą peptidą iš minėto reakcijos mišinio.

20. Tiesioginės peptidinio produkto ekspresijos į augimo terpę būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš tokių stadijų:

- (a) ląstelių-šeimininkų, kurios ekspresuoja peptidinį produktą kartu su signaliniu peptidu, kultivavimo kontroliuojamomis sąlygomis, kuriose minėtų ląstelių augimo greitis būtų 0,05-0,20 padvigubėjimų per valandą ribose ir

kuriuose kultivavimas yra indukuojamas tam tikrą minėto kontroliuojamo augimo laikotarpį; ir

(b) minėto peptidinio produkto išgavimo iš kultivavimo terpės.

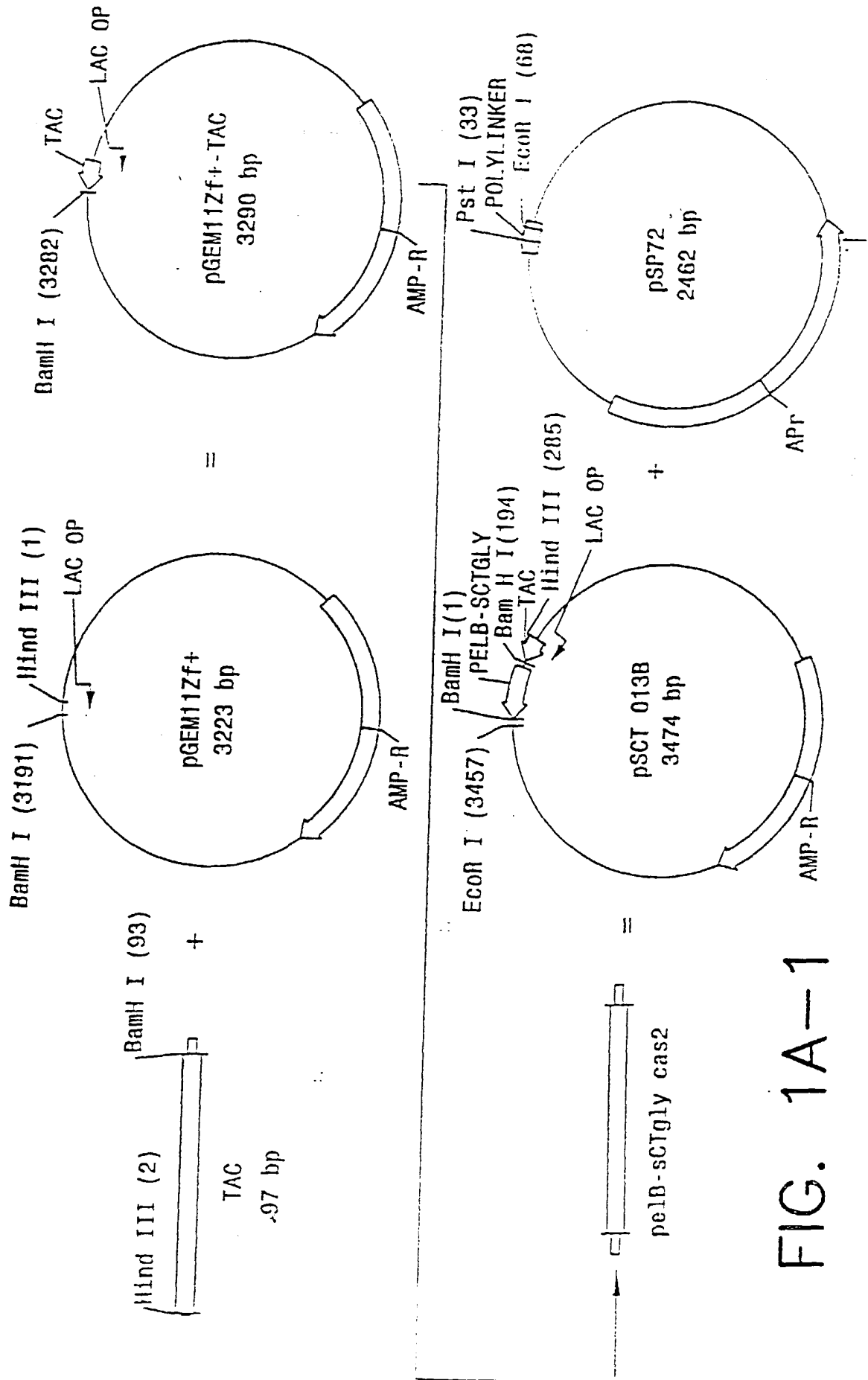


FIG. 1A-1

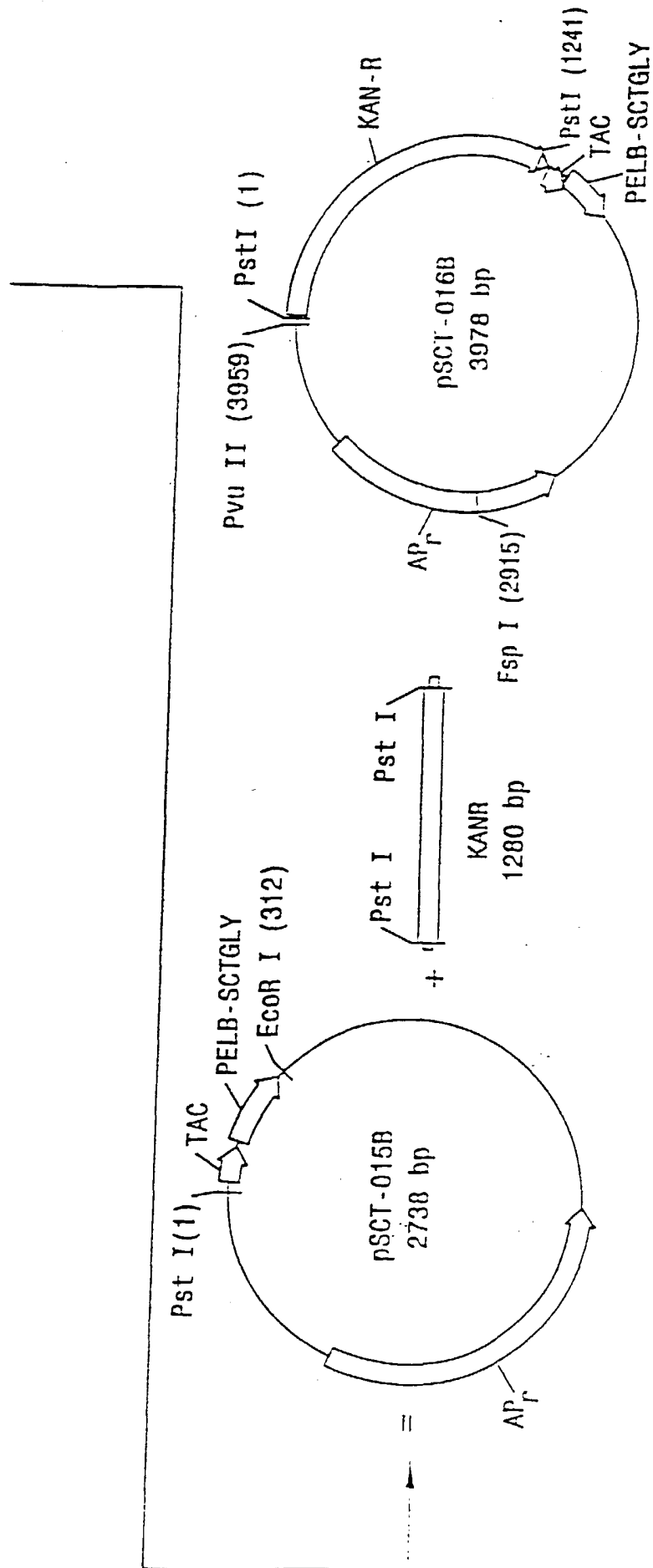


FIG. 1A-2

3/27

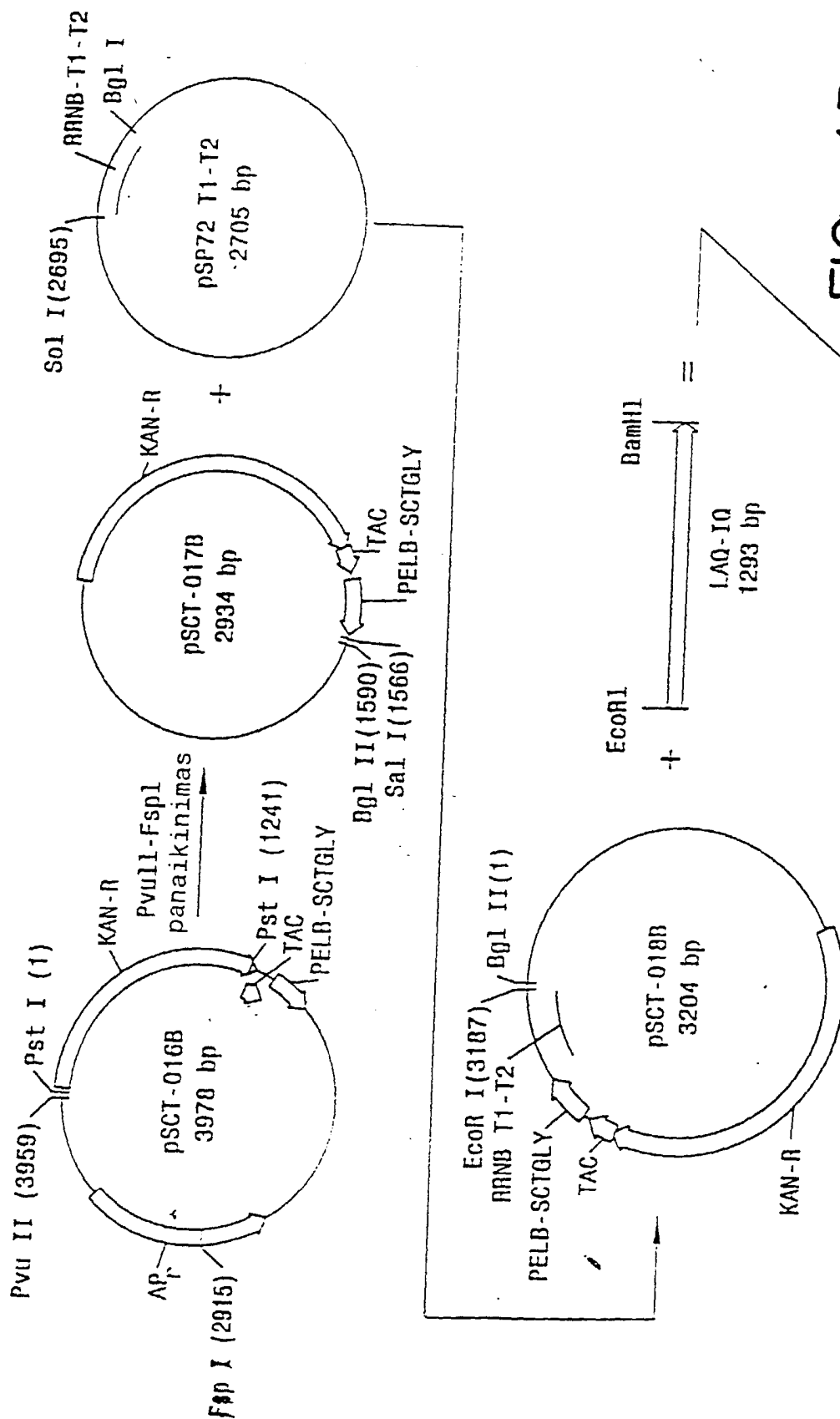


FIG. 1B-1

4/27

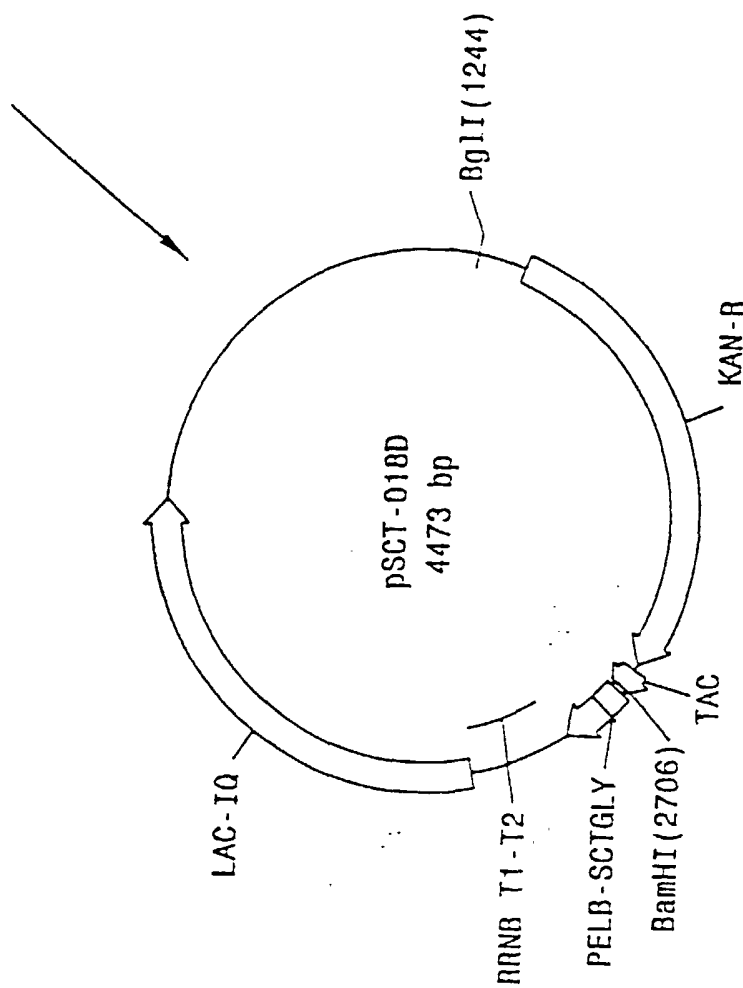


FIG. 1B-2

5/27

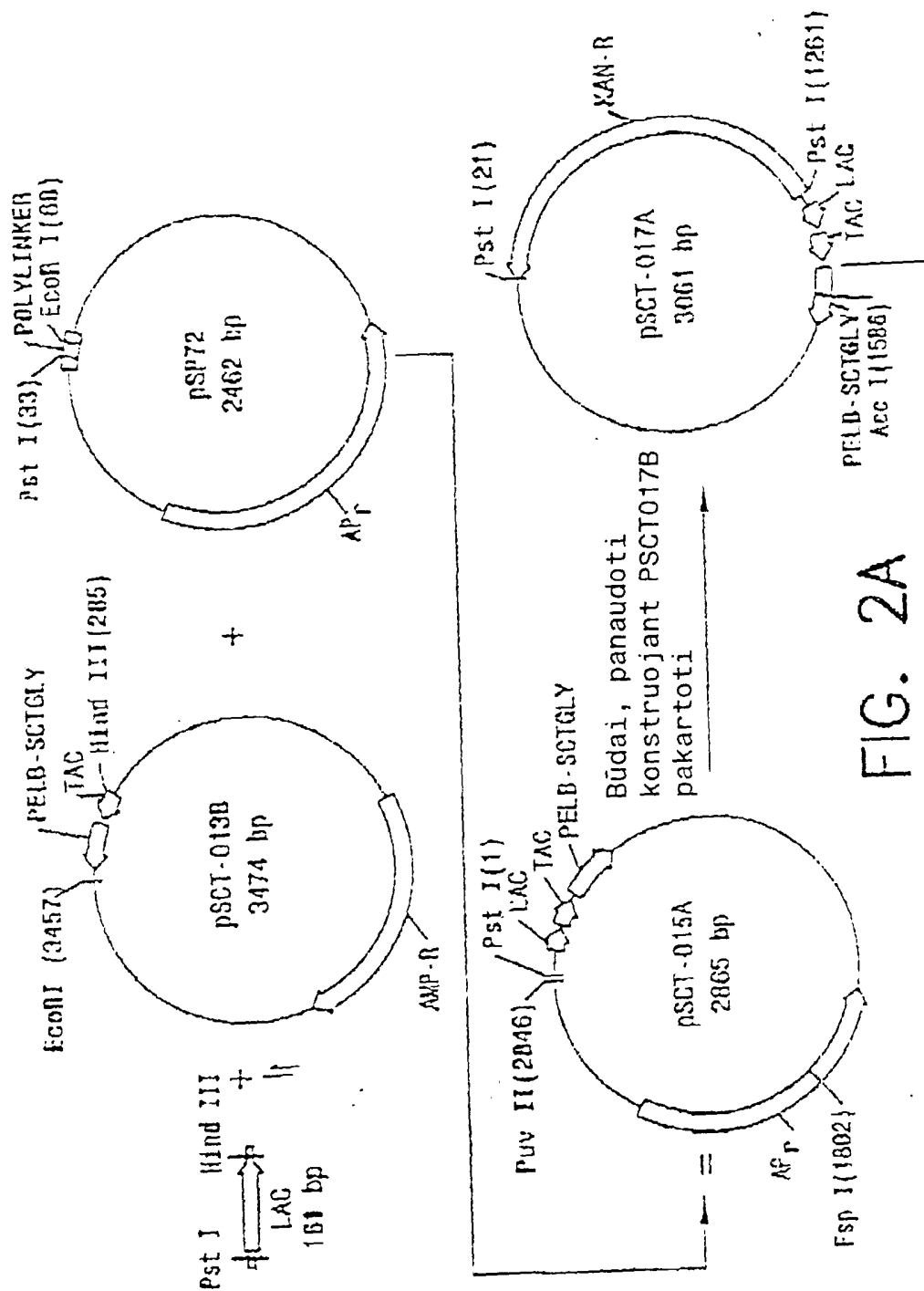


FIG. 2A

6/27

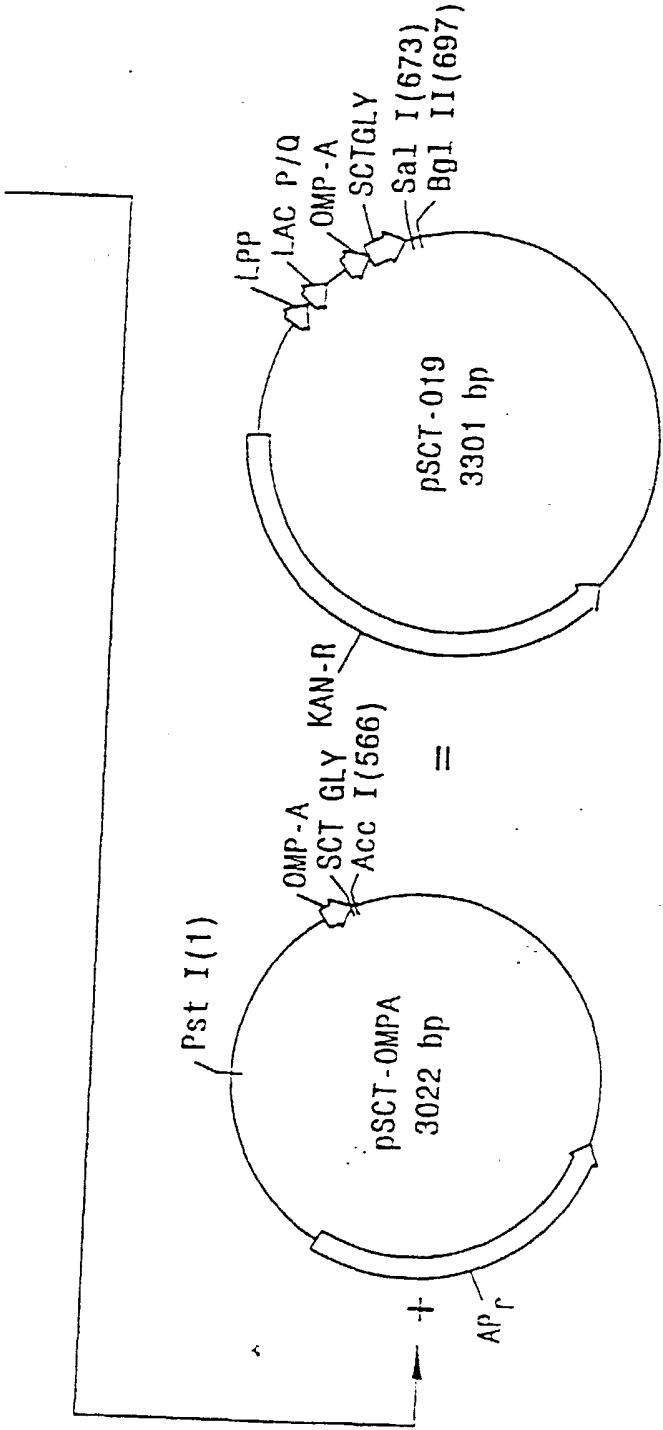


FIG. 2B

7/27

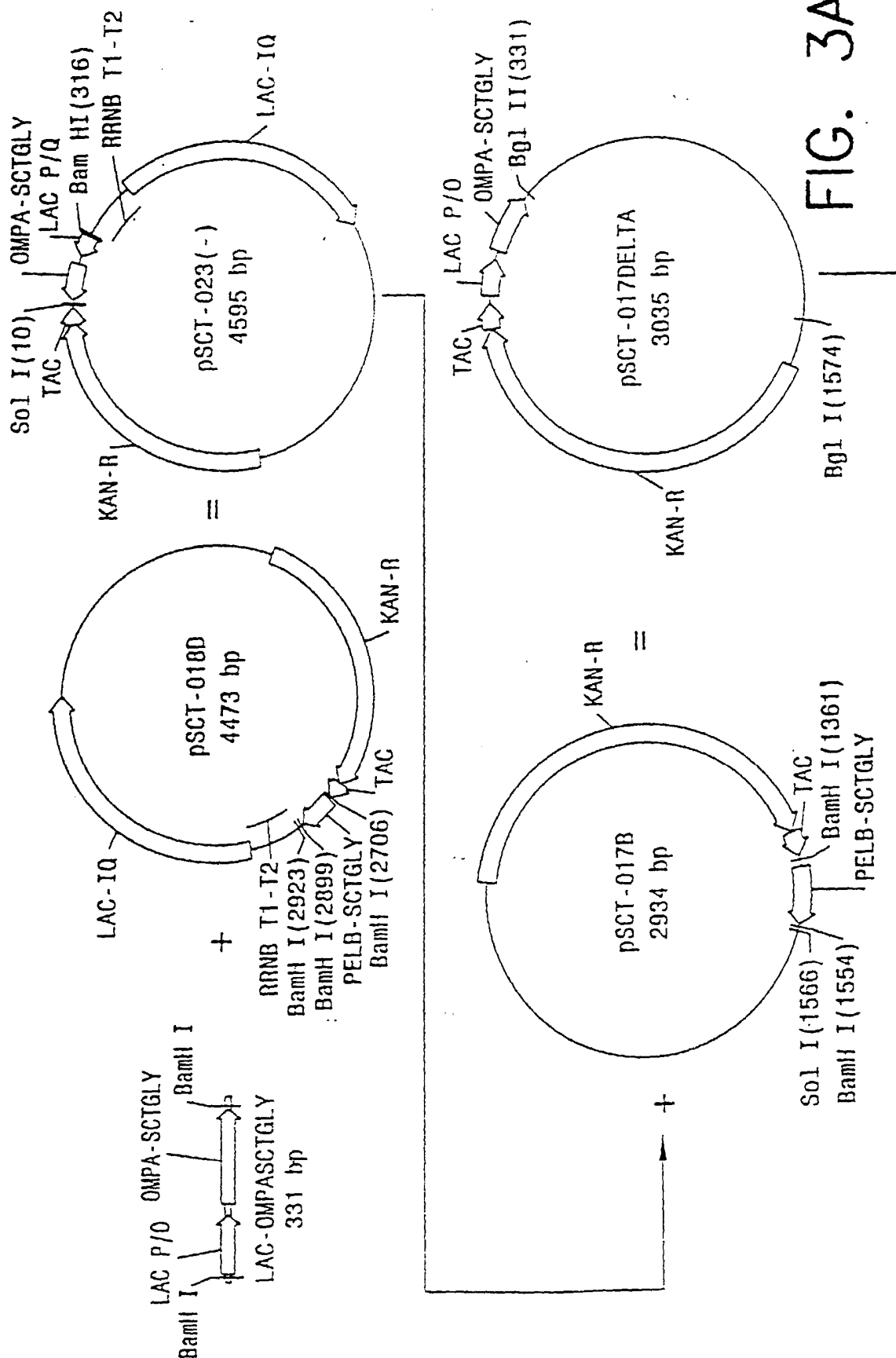


FIG. 3A

8/27

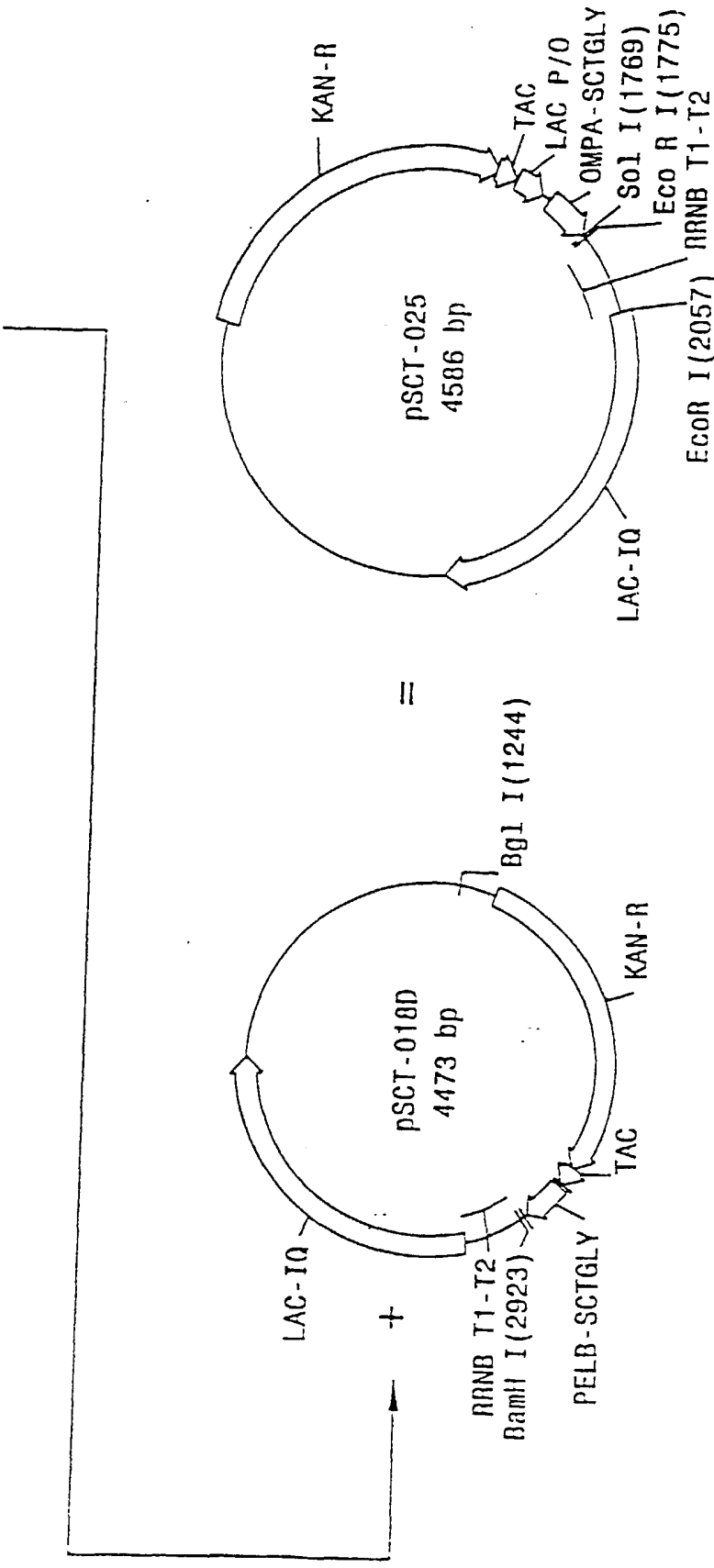


FIG. 3B

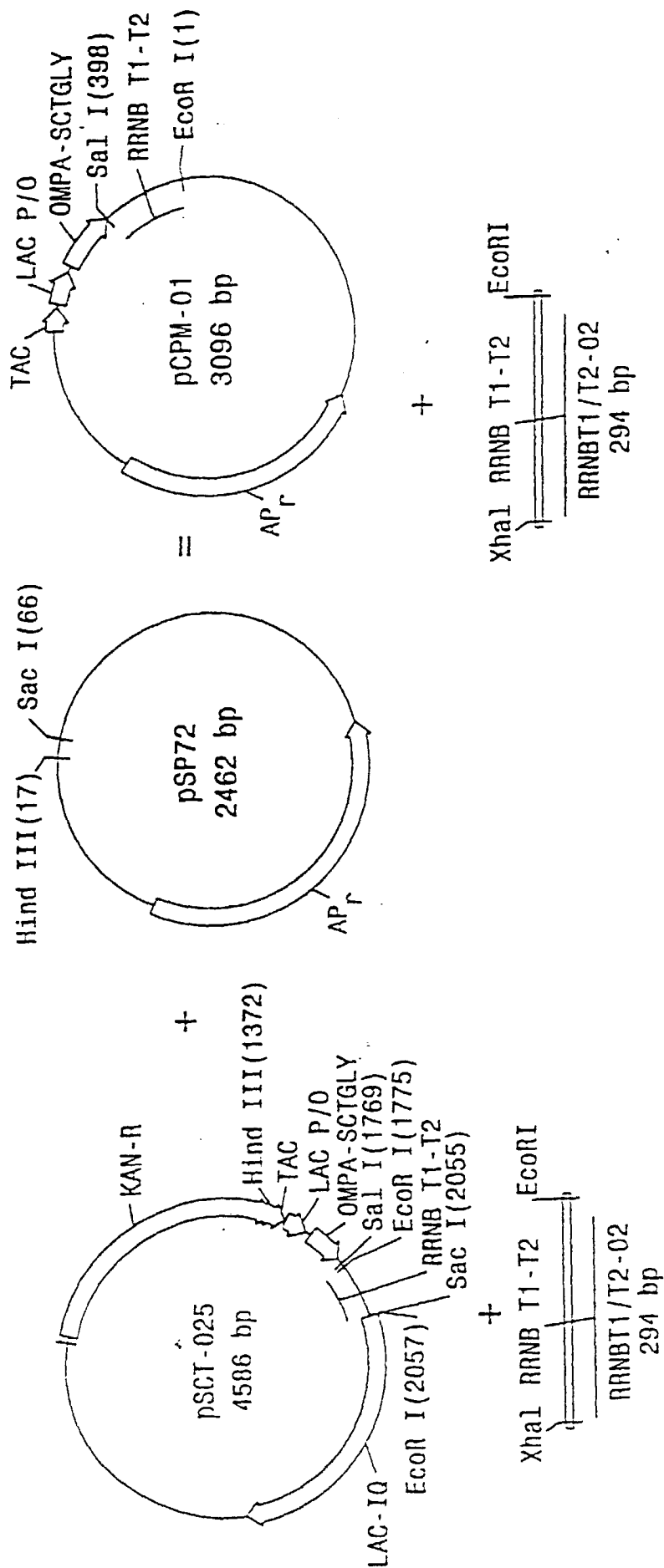


FIG. 4A

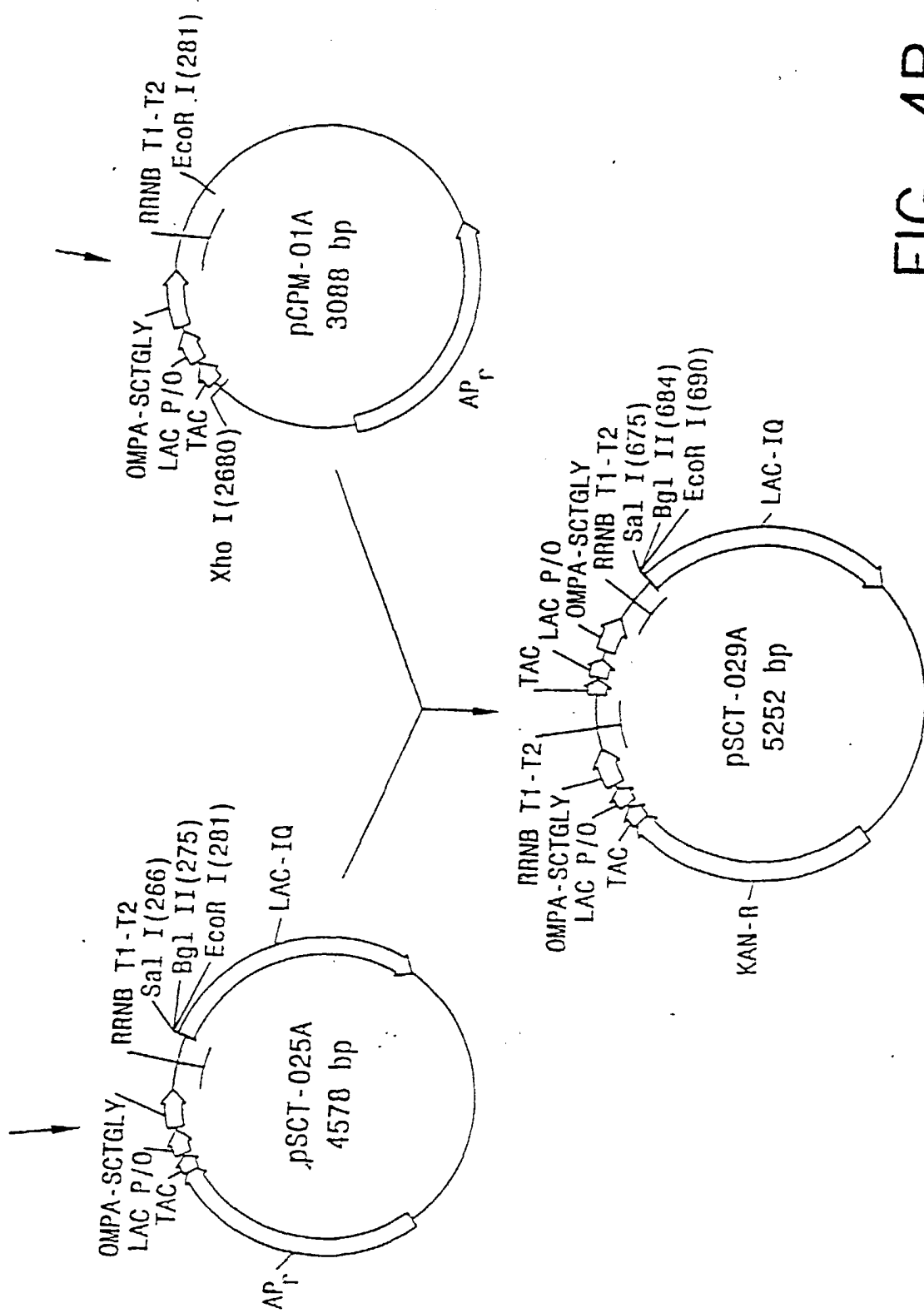


FIG. 4B

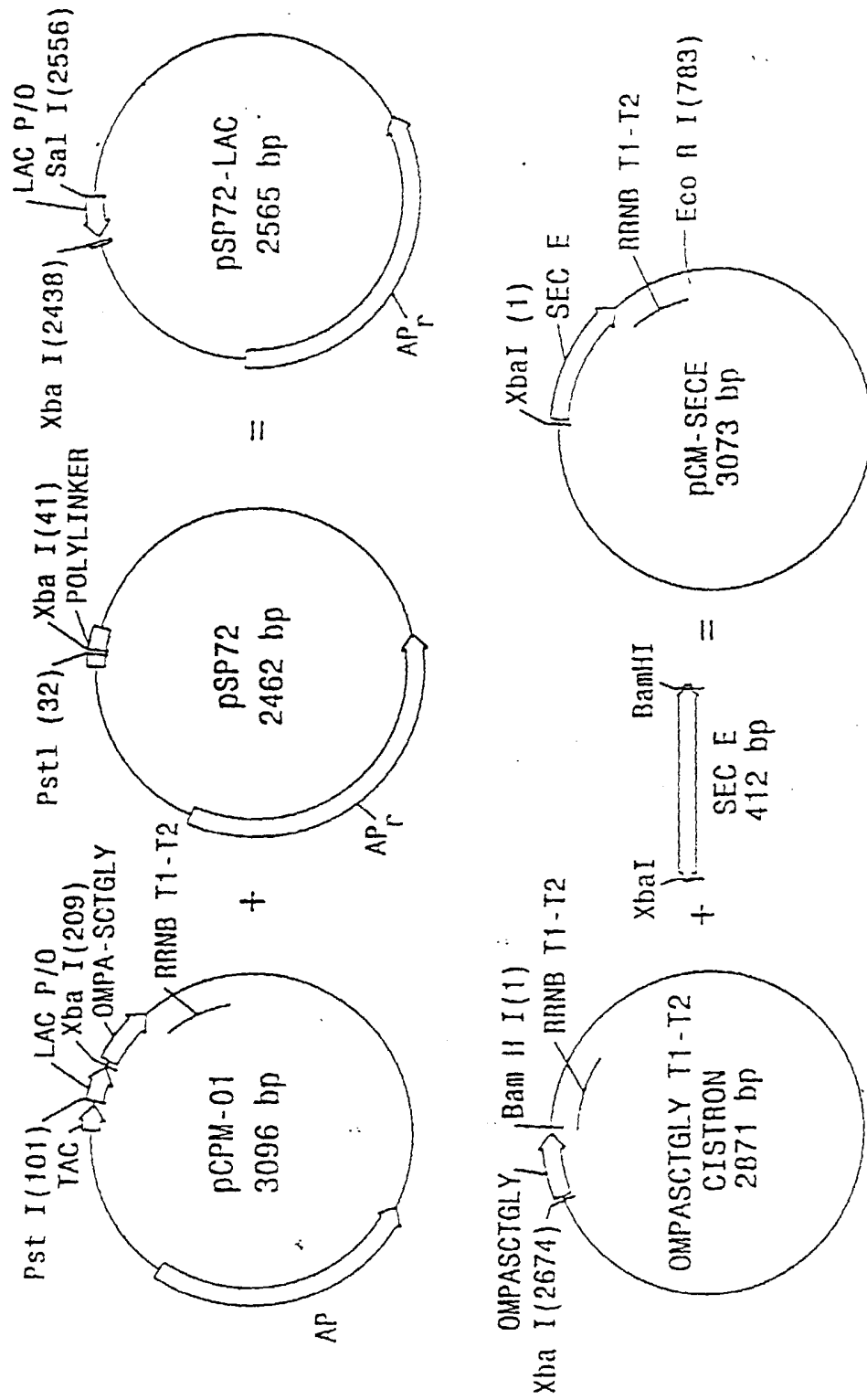


FIG. 5A

12/27

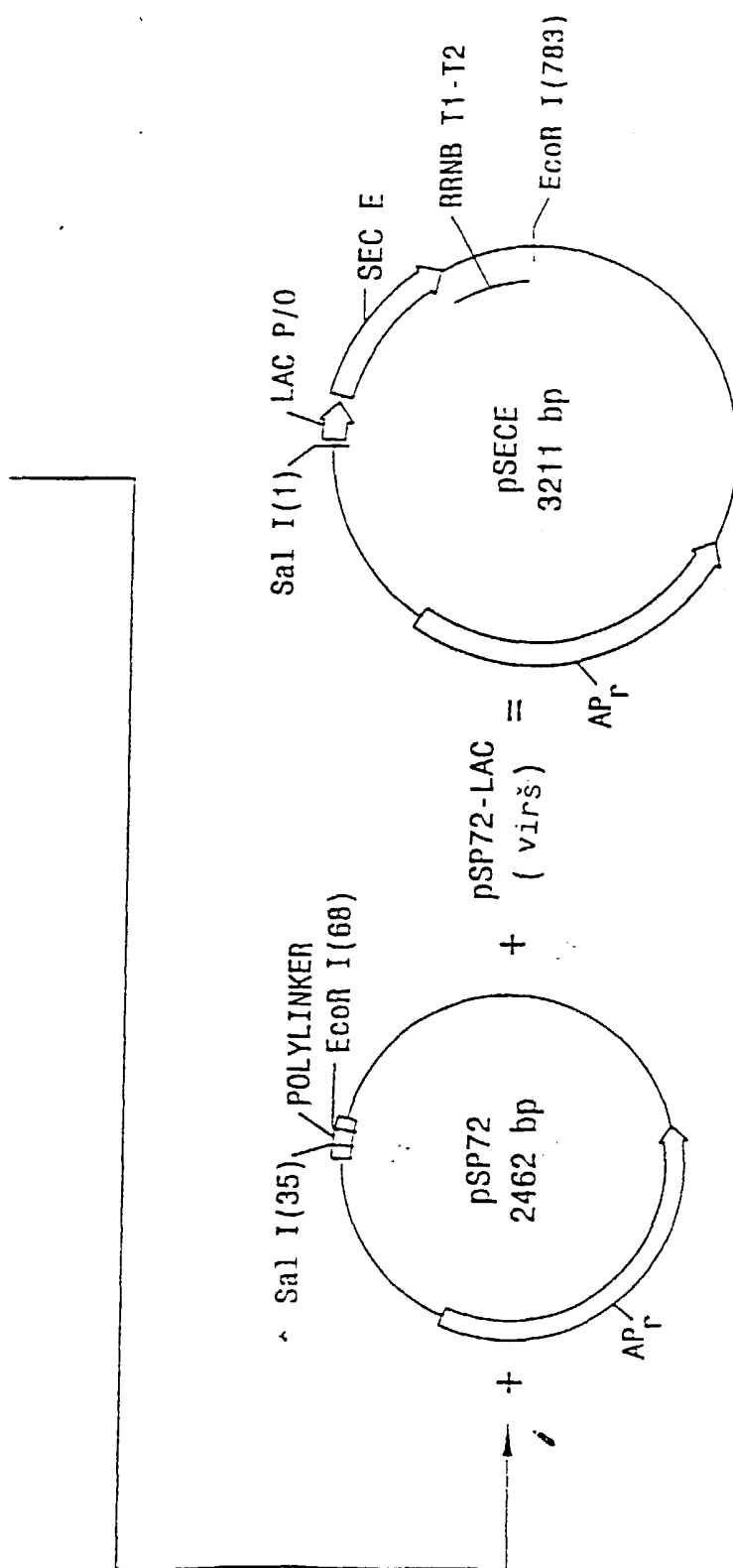


FIG. 5B

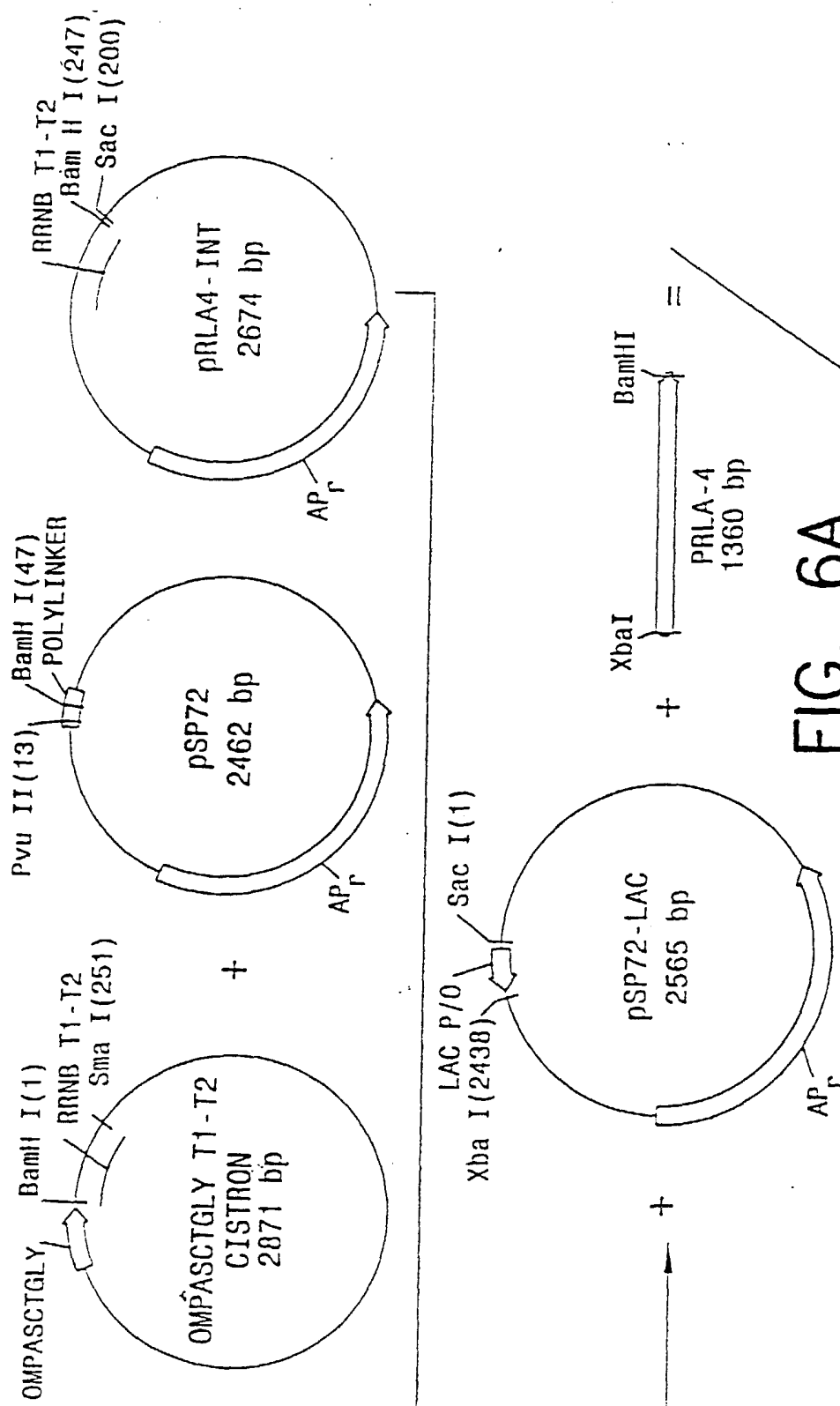


FIG. 6A

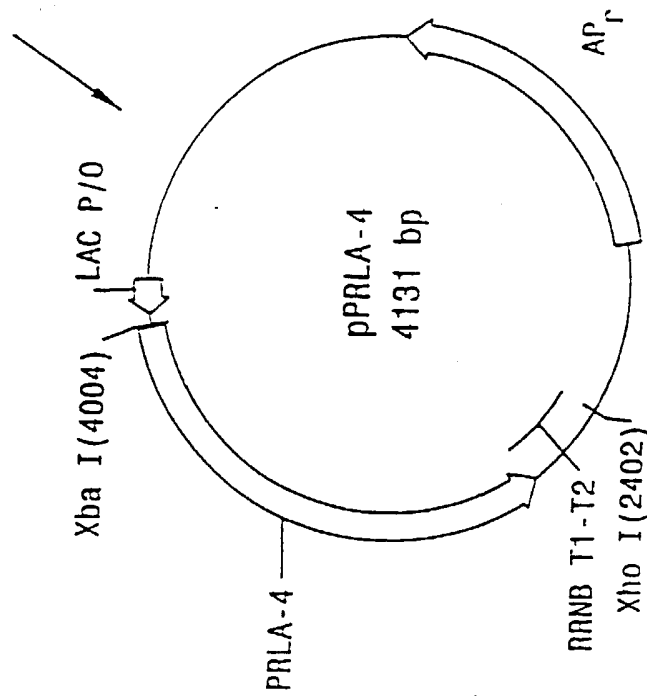


FIG. 6B

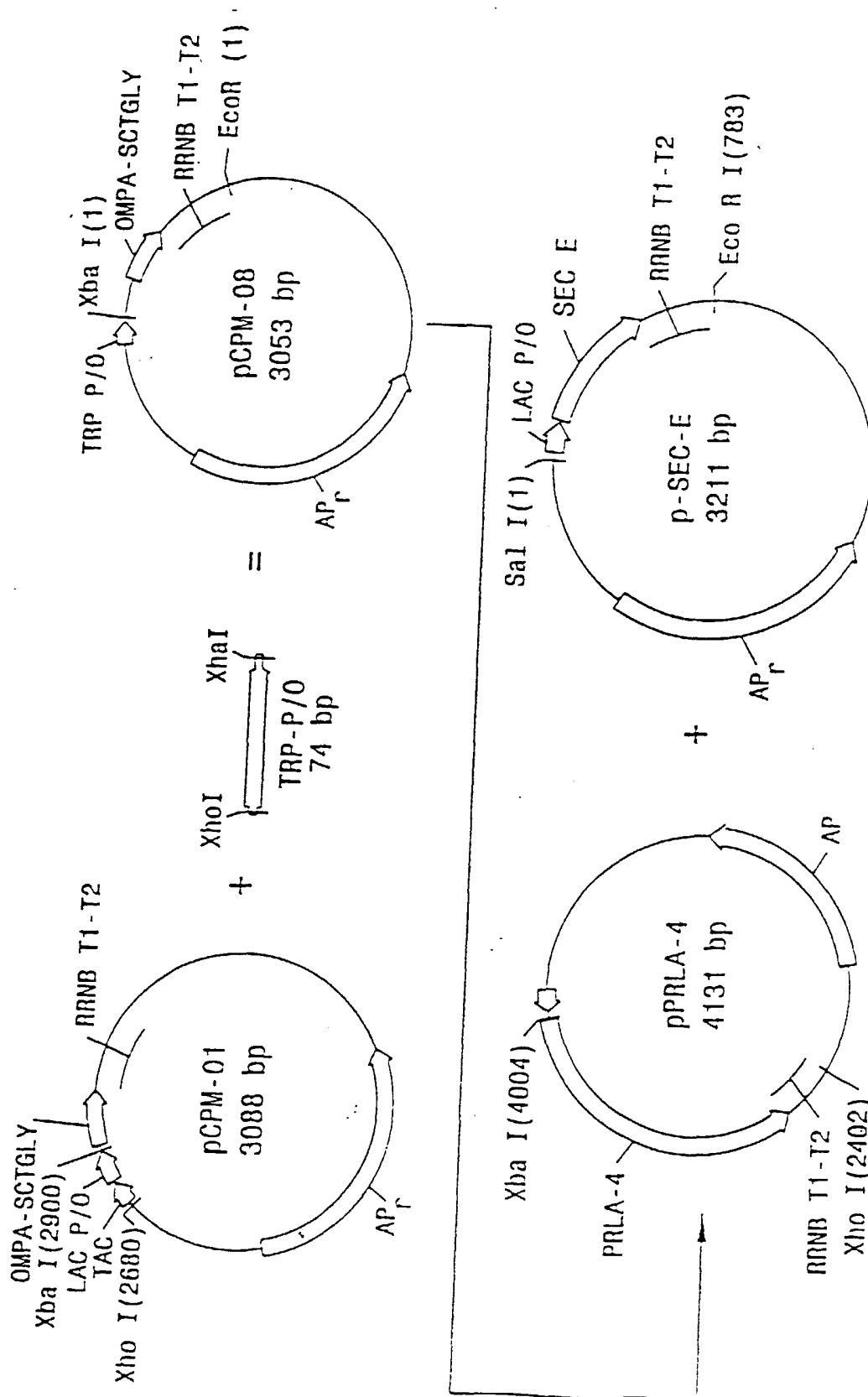


FIG. 7A

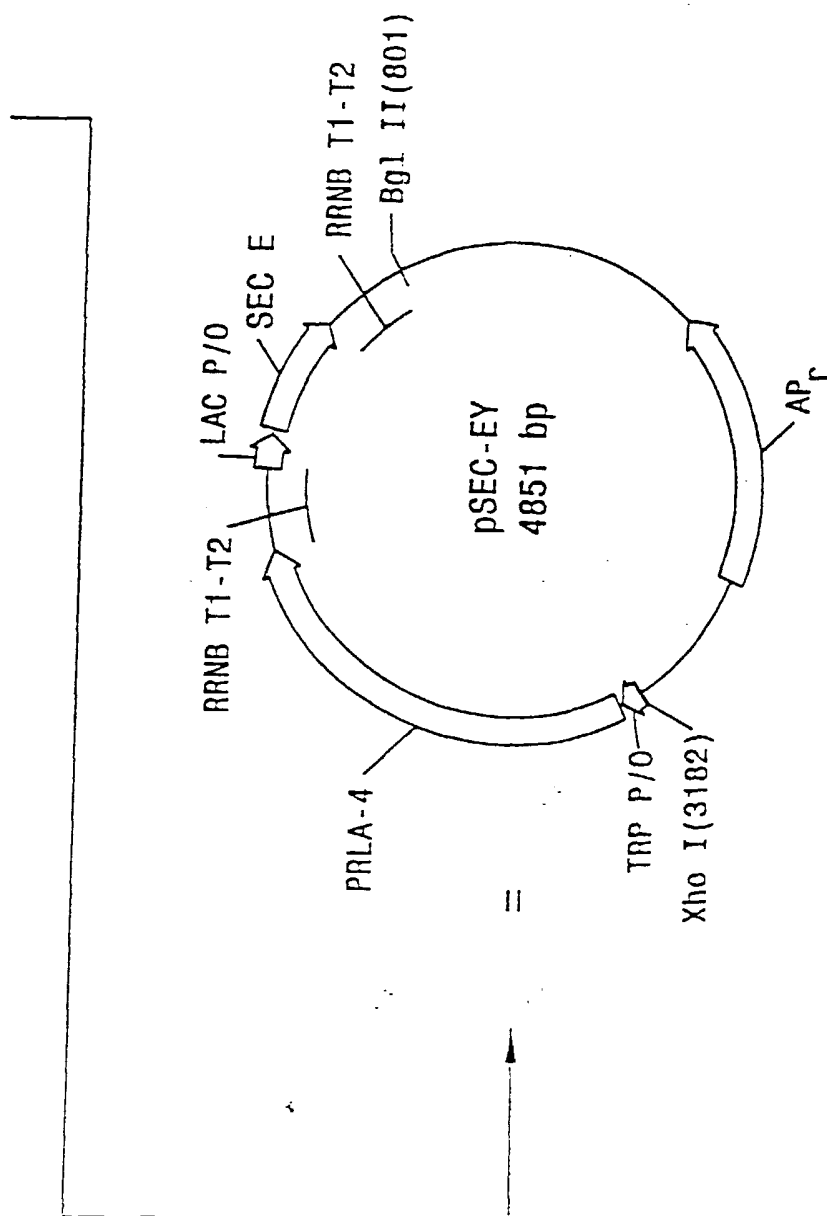


FIG. 7B

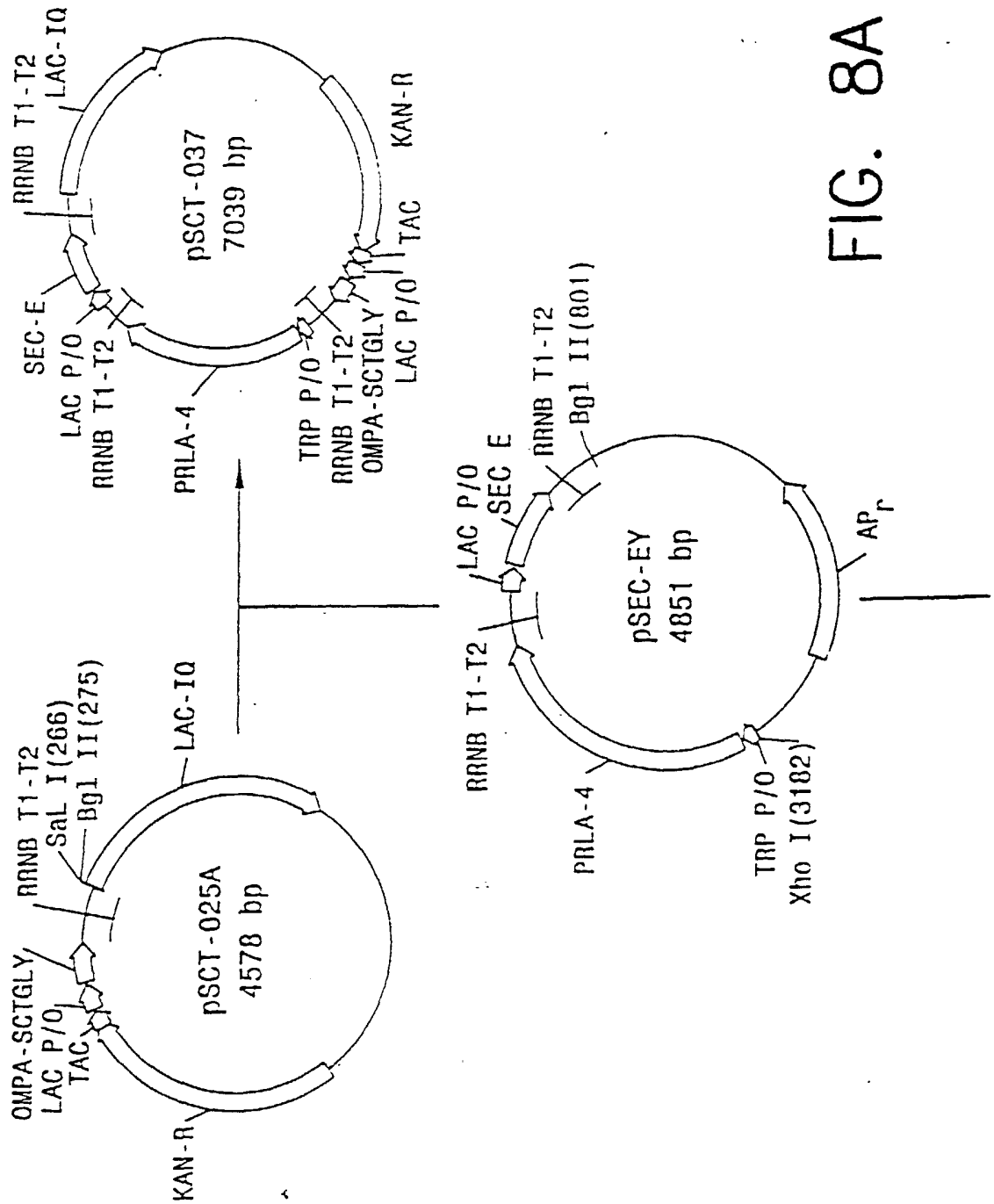


FIG. 8A

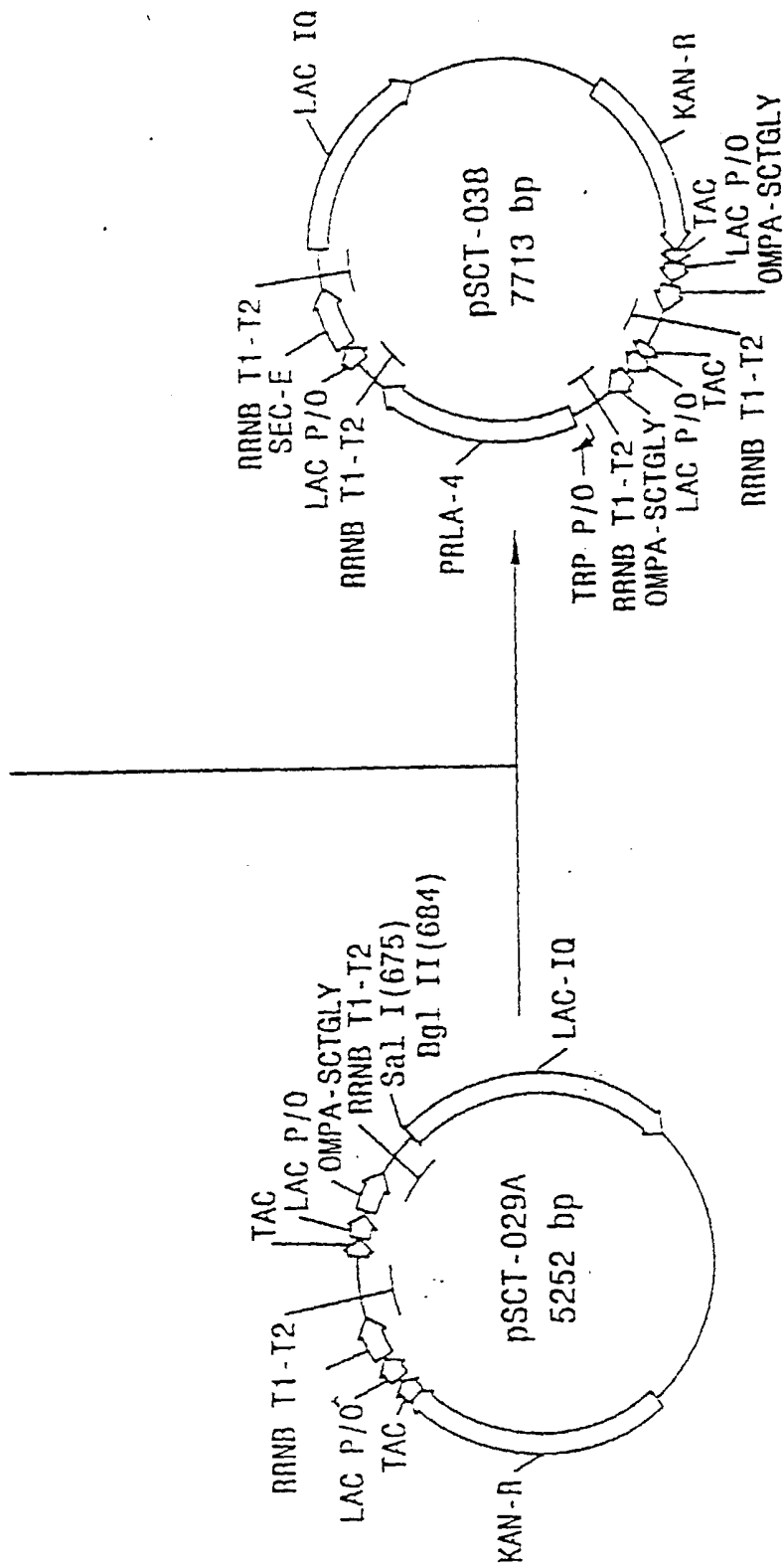


FIG. 8B

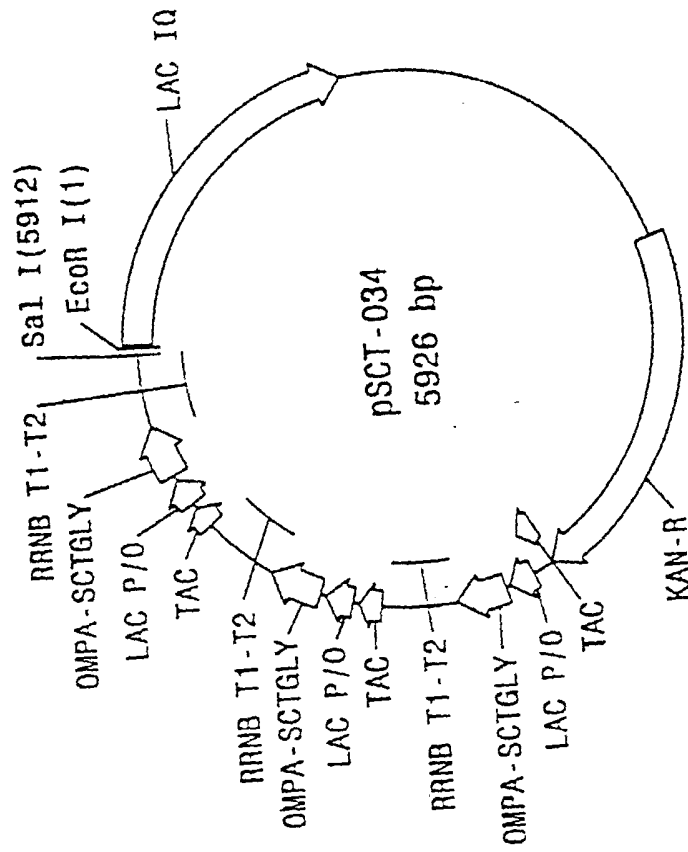


FIG. 9

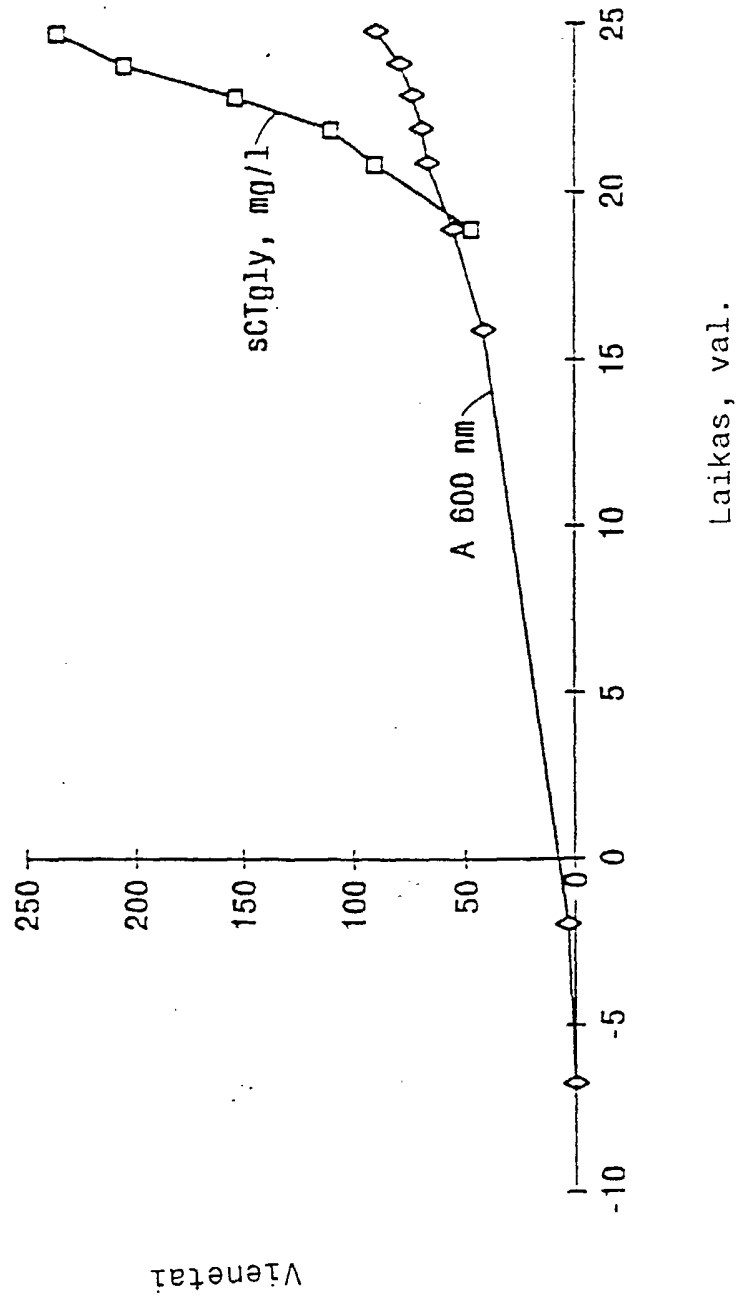


FIG. 10

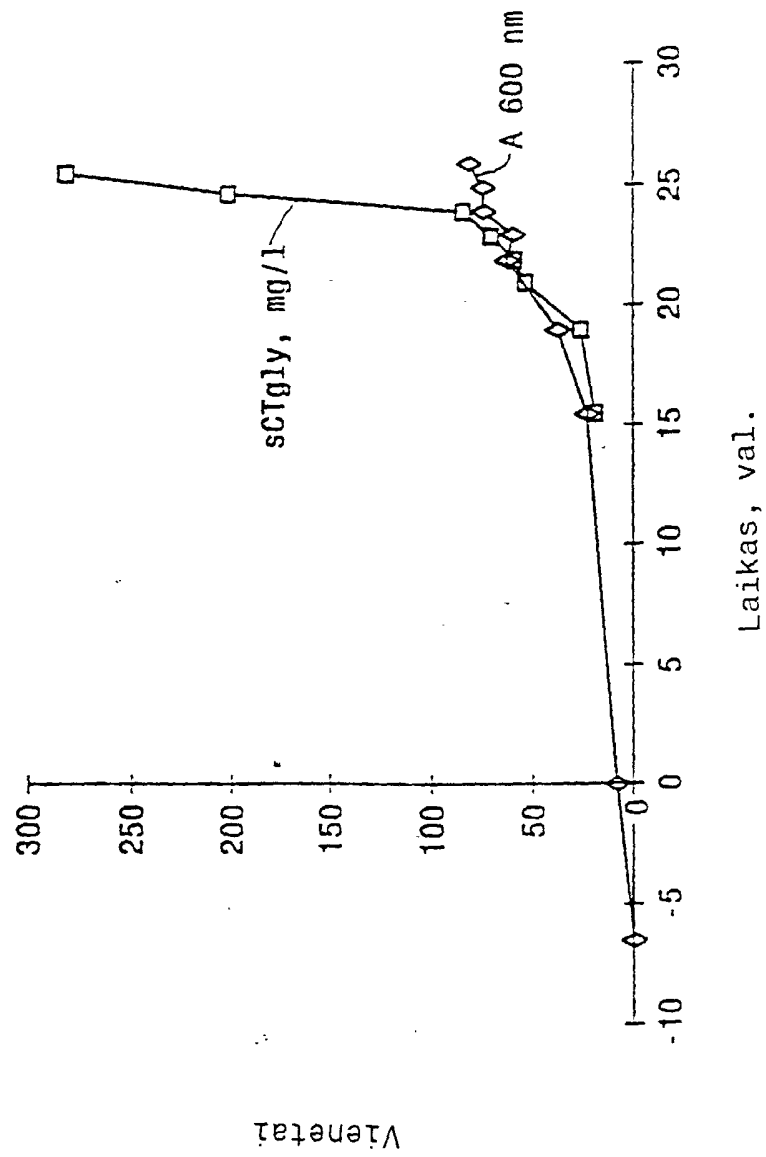


FIG. 11

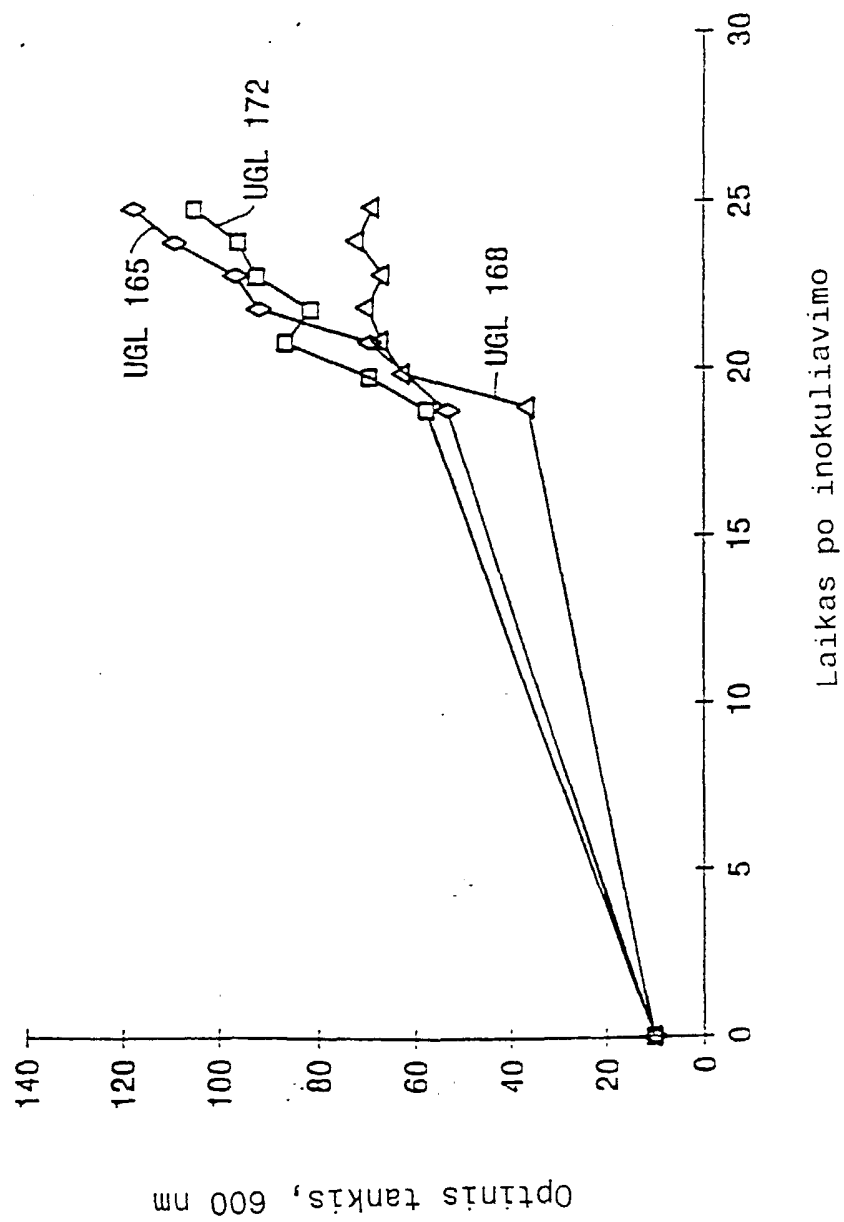


FIG. 12

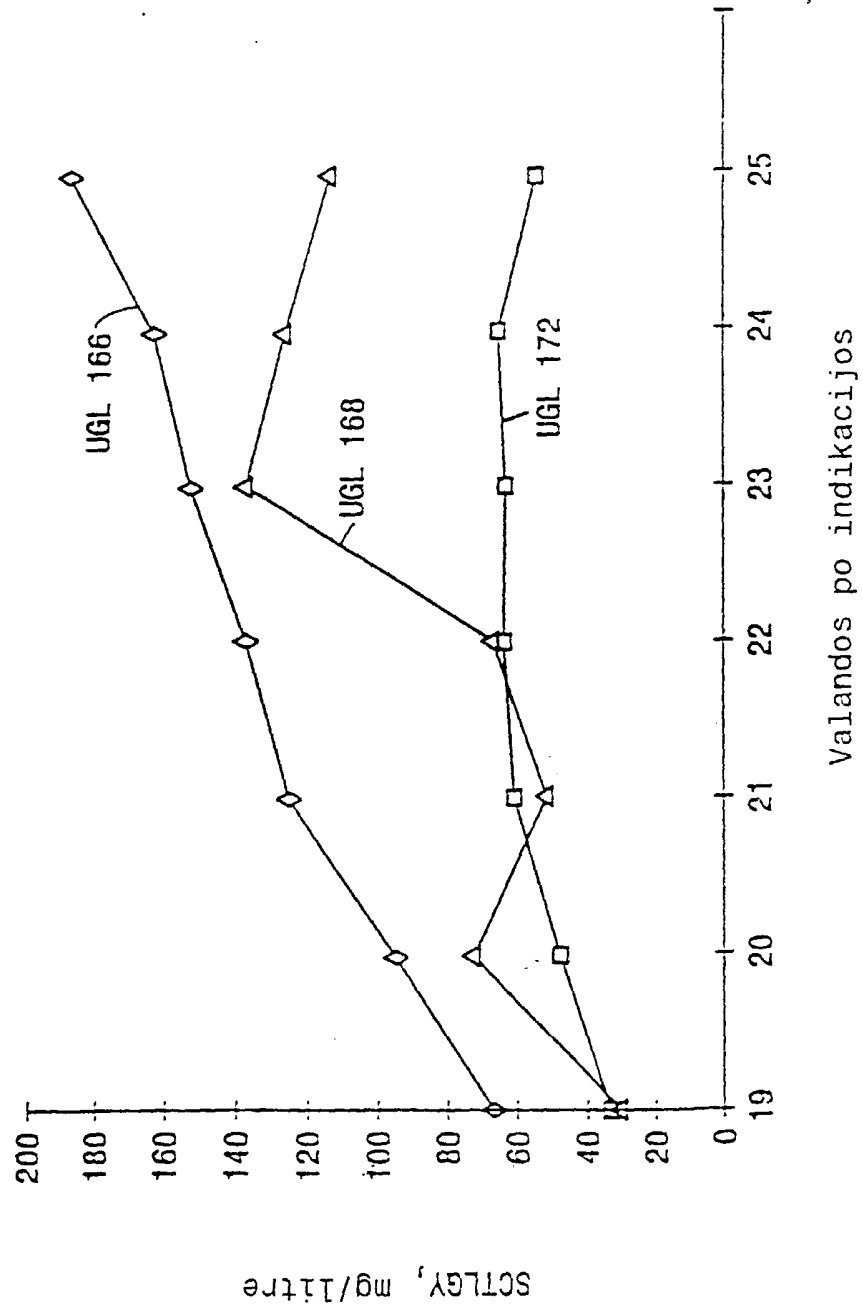
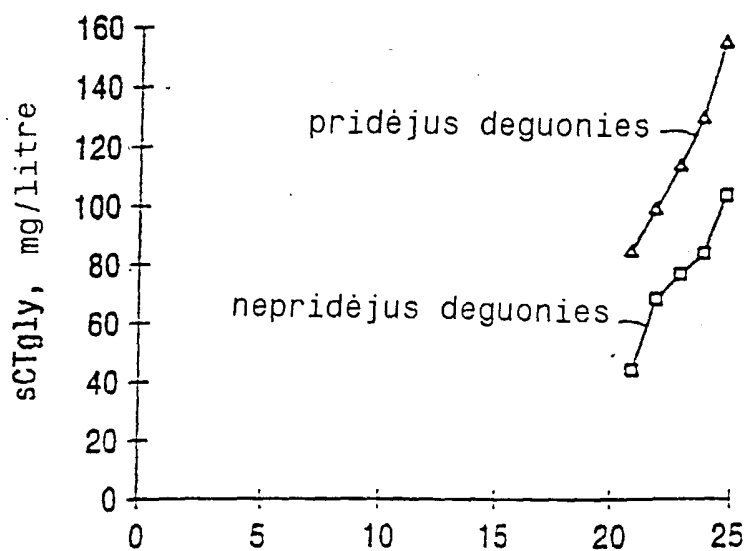
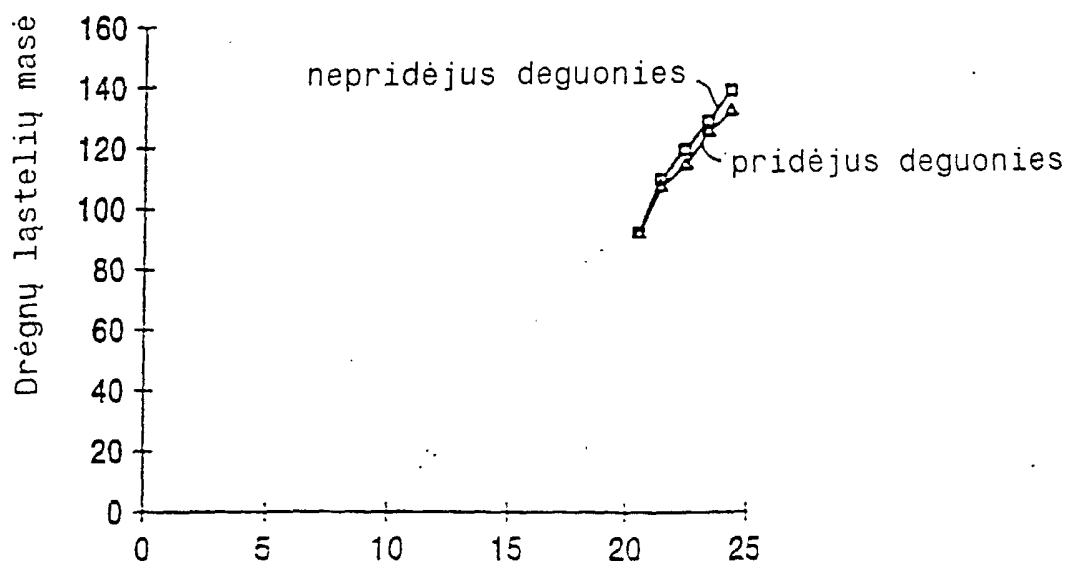


FIG. 13



Laikas po papildymo ir indukcijos, val.

FIG. 14A



Laikas po papildymo ir indukcijos, val.

FIG. 14B

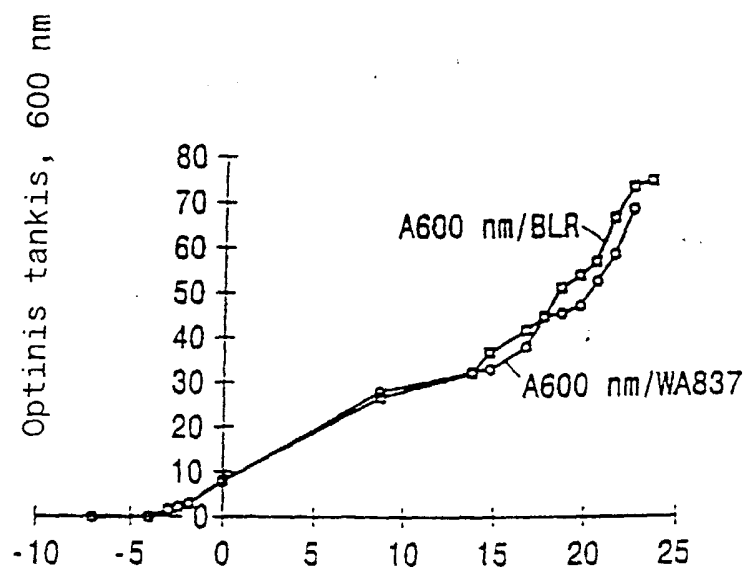
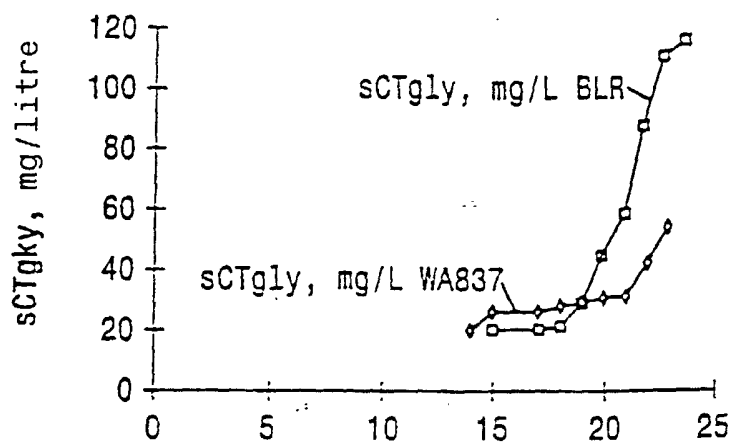


FIG. 15A



Laikas po papildymo ir indukcijos, val.

FIG. 15B

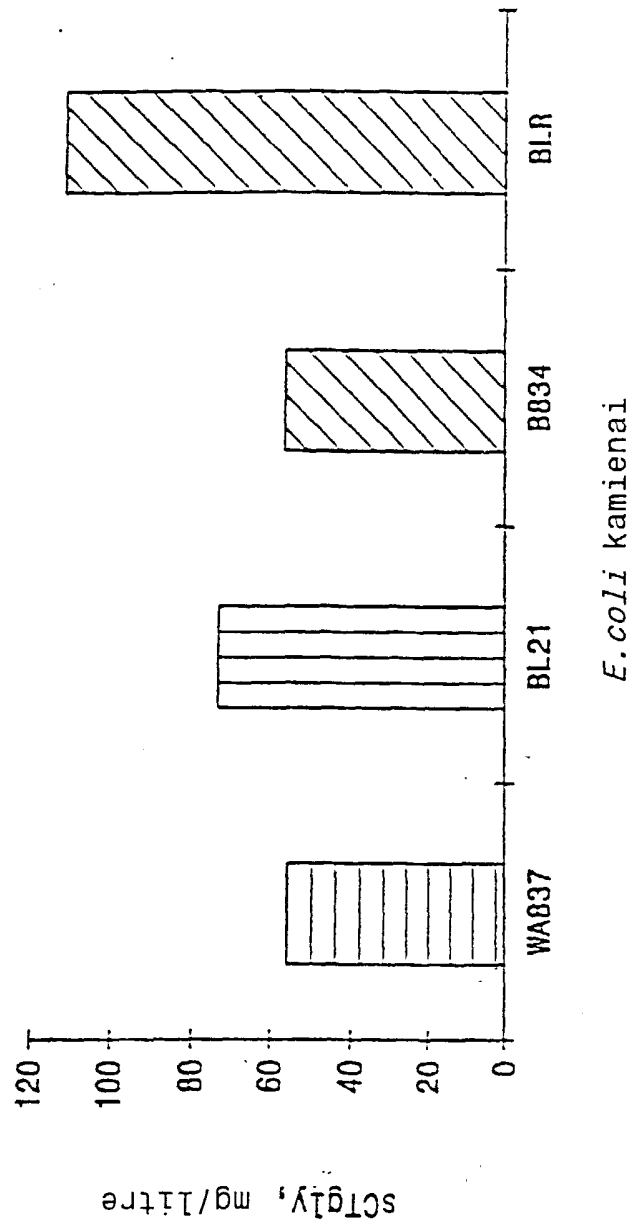
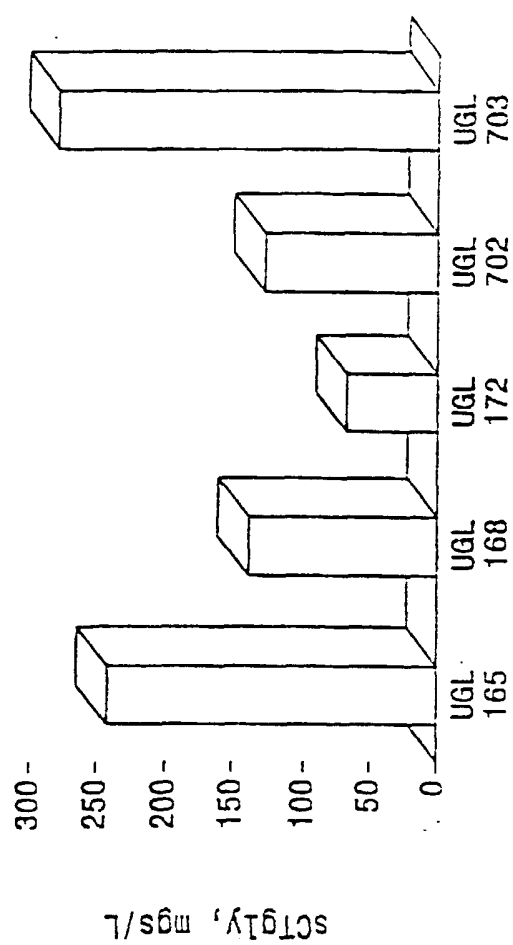


FIG. 16



Fermentacijos

FIG. 17