

(19)



(10) **LT 4989 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **4989** (51) Int. Cl.⁷: **A61K 39/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2002 051**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2002 04 29**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2002 09 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2003 01 27**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/KR01/01492**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2001 09 04**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2002 04 29**
- (30) Prioritetas: **2000/0052055, 2000 09 04, KR**
2001/0054005, 2001 09 04, KR
- (72) Išradėjas:
Hyo Joon KIM, KR
- (73) Patento savininkas:
Hyo Joon KIM, 3-1001, Sunkyoung APT, Sungpo-dong, 425-040 Ansan, KR
- (74) Patentinis patikėtinis:
Tania STERLINA, Naugarduko g. 32/2, LT-2600 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Apolipoproteino B-100 epitopo mimeziniai peptidai, jų konkatemrai ir modifikuotieji peptidai, ir juos turinti vakcinos kompozicija

- (57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su vakcinos kompozicija, skirta gydyti nutukimą. Konkrečiau, šis išradimas apima apolipoproteino B-100 epitopo mimezinius peptidus, jų konkatemrus ir modifikuotus peptidus, o taip pat juos turinčią vakcinos kompoziciją.

Technikos sritis

Šis išradimas liečia vakcinos kompoziciją, skirtą nutukimo gydymui. Tiksliau, šis išradimas nukreiptas į vakcinos kompoziciją, kuri apima apolipoproteino B-100 epitopo mimezinį peptidą, jo konkatemerus arba modifikuotus peptidus.

Žinomas technikos lygis

Kraujo serumo lipidai yra sudaryti iš cholesterolio, trigliceridų (TG), laisvųjų riebalų rūgščių, fosfolipidų ir kt., ir kraujotakoje egzistuoja lipoproteino formoje, kuri yra lipido ir apolipoproteino kompleksas.

Iš tokių lipoproteinų, mažo tankio lipoproteinas (LDL) yra pagrindinis TG ir cholesterolio nešiklis. Skaičius pacientų, kenčiančių nuo arteriosklerozės, koronarų arterijų ligos arba širdies infarkto, atsiradusių dėl pakilusio LDL-cholesterolio lygio kraujyje, žymiai padidėjo dėl mitybos režimo arba kitų faktorių pasikeitimo.

Taigi, gydymui pacientų, kenčiančių nuo aukščiau minėtų ligų, naudojami įvairūs tyrimai, skirti LDL-cholesterolio lygio sumažinimui ir aukščiau minėtų ligų priežasčių parodymui.

LDL-cholesterolis, kaip pagrindinis suaugusiųjų ligų, surišų su lipidų metabolismu etiologinis faktorius, gali būti makrofagu paverstas į didelio tankio lipoproteiną (HLD). Priedo, LDL-cholesterolis taip pat gali būti paverstas į kitą medžiagą arba kepenyse konvertuotas į tulžies rūgštį. (Brown, M.S. and Goldstein, J. L., 1983, *Annu. Rev. Biochem.*, 52:223-261).

Apolipoproteinas B-100 yra pagrindinė LDL baltymo dalis ir taip pat egzistuoja labai mažo tankio lipoproteine (VLDL) ir chilomikrone. Kraujo LDL-cholesterolis gali būti pašalintas per makrofagų fagocitozę tokiu atveju, jeigu antikūnas kraujotakoje stimuliuotas apolipoproteino B-100 atpažinimu, kadangi apolipoproteinas B-100 indukuoja LDL daleles prisirišti ant LDL-receptorių, esančių ant ląstelės paviršiaus (Dalum I., et al., 1997, *Mol. Immunol.*, 34 (16-17): 1113-20).

Tokiu atveju, makromolekulė, tokia kaip antikūnas, surišta su apolipoproteinu B-100, kuris egzistuoja ant LDL paviršiaus, tai lipazė, tokia kaip lipoproteino lipazė,

negali hidolizuoti TG ir panašių medžiagų dėl sferinių trukdžių, sudaromų makromolekulės, prisirišusios prie apoliproteino B-100. Vadinas, laisvųjų riebalų rūgščių, kaip pagrindinio nutukimo faktoriaus, susidarymas gali būti sustabdytas antikūnu, kuris gali susiristi su apoliproteinu B-100.

Šiuo metu, eilėje tyrimų, skirtų LDL-cholesterolio lygio sumažinimui ir aterosklerozės staigaus kilimo sustabdymui vartojant vakciną, bandoma įvairiuose gyvūnų modeliuose, tokiuose kaip pelės ir triušiai. Pavyzdžiui, C. R. Alvingas pranešė, kad cholesterolis gali būti modifikuotas metabolitais arba jo oksidacija, ir kad modifikuotas cholesterolis kai kuriais atvejais gali būti stipria antigenine determinante (Alving, C.R., *et al.*, 1989, *Biochem. Soc. Trans.*, 17(4): 637-9; Alving, C.R., *et al.*, 1996, *J. Lab. Clin. Med.*, 127:40-49; Alving, C.R., *et al.*, 1996, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 210:181-6).

Be to, paskelbta, kad kraujo serume egzistuoja endogeninis antikūnas cholesterolui (Wu, J.T., L.L., 1977, *Clin. Lab. Med.*, 17(3):595-604, Apžvalga). Taip pat paskelbta, kad eksperimento sąlygomis, kuriose aterosklerozė ir hipercholesterolemija atsiranda triušiuose, kai jie maitinami cholesterolį turinčiu maistu, o hipercholesterolemijos ir aterosklerozės lygis triušiuose, imunizuotuose suleidus cholesterolio turinčią liposomą, žymiai nuslopinamas arba sumažinamas, palyginus su tais, kurie stebėti kontrolinėje grupėje.

Tokiu antikūnu, stimuliuotu cholesterolio vakcina, yra imunoglobulinas M (IgM), kuris rišasi su VLDL, vidutinio tankio lipoproteinu (IDL) ir LDL. Remiantis tuo, kas pasakyta aukščiau, tikėtina, kad galima gauti vakciną, skirtą gydyti arba apsaugoti nuo hiperlipodemijos arba aterosklerozės, atsirandančių dėl aukšto cholesterolio lygio (Bailey, J. M., 1994, *Science*, 264:1067-1068; Palinski, W. *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92(3): 821-5; Wu R. *et al.*, 1999, *Hypertension*, 33(1):53-9).

Šio išradimo autoriai atrado, kad nuo nutukimo galima efektyviai apsisaugoti apoliproteino B-100 epitopo mimeziniu peptidu, ir remdamiesi tuo, kas pasakyta anksčiau, išrado vakcinos kompoziciją, skirtą gydyti nutukimą.

Išradimo esmės atskleidimas

Taigi, šio išradimo tikslu yra apoliproteino B-100 epitopo mimezinio peptido, jo susijungusių ir modifikuotų peptidų pateikimas.

LT 4989 B

Kitu išradimo tikslu yra apolipoproteino B-100 epitopo mimezinio peptido, jo konkatemerų ir modifikuotų peptidų gavimo būdo pateikimas.

Dar kitu šio išradimo tikslu yra vakcinos kompozicijos, skirtos gydyti arba apsaugoti nuo nutukimo, kuri apima aukščiau minėtą apolipoproteino B-100 epitopo mimezinį peptidą, jo konkatemerų ir modifikuotų peptidų, pateikimas.

Šio išradimo tikslas pasiekiamas pateikiant apolipoproteino B-100 epitopo mimezinį peptidą, jo konkatemerus ir modifikuotus peptidus.

Šiame išradime panaudota fago peptido bibliotekos sistema tam, kad atrinktų žmogaus apolipoproteino B-100 epitopą, surištą monokloniniu antikūnu (MabB23). Aukščiau minėti atrinkti peptidai buvo mimeziniai peptidai, struktūriškai tapatūs antigeninei determinantei, kuri gali būti antikūno atpažinta, o šie mimeziniai peptidai susintetinti pagal atrinkto peptido aminorūgščių seką.

Peptido bibliotekos sistema yra viena iš būdo rūšių, skirtų surasti antigeninės determinantės trimatę formą. Tai yra DNR fragmentai, kurie koduoja atsitiktines peptidų sekas, įterpiami į DNR, kuri koduoja fago baltymo mažąją apvalkalą, o tada aukščiau minėtos DNR įterpiamos į DNR skaitymo rėmelį (RF) ir jų ekspresijai transformuojamos į *E. coli*. Peptidai, ekspresuoti ant *E. coli* paviršiaus, reaguoja su antigenu tam, kad atrinktų peptidus, struktūriškai tapačius antigeninei determinantei.

Tam, kad pagamintų imuninį serumą, pelės buvo imunizuotos įvedant aukščiau minėtus mimezinius peptidus. Buvo patvirtinta, kad taip gautas imuninis serumas, tuo pačiu metu atpažįsta tikrąjį apolipoproteiną B-100, mimezinius peptidus ir LDL (*Identification of Antigenic Determinants for the Murine Monoclonal Antibodies Against Apolipoprotein A-1 and Apolipoprotein B-100 by Using Phage-displayed Random Peptide Library, [Antigeninių determinantų identifikavimas pelės monokloniniams antikūnams prieš apolipoproteiną-1 ir apolipoproteiną B-100 naudojant fagu atpažintą atsitiktinę peptidų biblioteką]* Chi-Hoon Kim, Hanyang Univ., 1997).

Šio išradimo apolipoproteino B-100 epitopo mimeziniai peptidai gali būti parinkti iš peptidų sekų SEQ. ID. Nr.1, SEQ. ID. Nr.2, SEQ. ID. Nr.3 arba jų mišinių.

Šio išradimo apolipoproteino B-100 mimeziniai peptidai gali būti naudojami konkatemerų pavidalu tam, kad pagerintų jų antigenines determinantes. Kaip šio

išradimo įgyvendinimo pavyzdys, gali būti sujungti vienas su kitu du arba daugiau mimezinių peptidų. Pirmenybė teikiama konkatemerei, sudarytam iš nuo trijų (3) iki penkiolikos (15) peptidų. Pageidautina, kad šio išradimo konkatemeras turėtų sekos SEQ. ID. Nr.1 keturis (4) peptidus.

Šio išradimo aukščiau minėto mimezinio peptido "konkatemeras" reiškia polimerą, kuriame aukščiau mintų mimezinių peptidų galai susijungę vienas su kitu.

Šio išradimo aukščiau minėto mimezinio peptido "modifikuotas peptidas" reiškia mimezinių peptidų variantus, kurie gali būti atpažinti monokloniniu arba polikloniniu antikūnu, skirtu apoliproteinui B-100. Variantai apima pakeitimą, deleciją, prijungimą ir šio išradimo mimezinių peptidų vienos arba daugiau aminorūgščių cheminę pakaitų reakciją.

Kitu šio išradimo tikslu yra apoliproteino B-100 epitopo mimezinio peptido, jo konkatemero ir modifikuotųjų peptidų gavimo būdo pateikimas, kuris apima tokias pakopas: i) DNR, kurios koduoja aukščiau minėtą mimezinį peptidą, jo susijungusius ir modifikuotus peptidus, įterpimą į vektorių, ii) minėto vektoriaus transformavimą į šeimininko ląstelę, o po to jos inkubavimą, ir iii) aukščiau minėto mimezinio peptido, jo konkatemero arba jo modifikuotų peptidų išskyrimą iš aukščiau minėtų ląstelių šeimininkų.

Šio išradimo vakcinos kompozicijos vaisto forma gali būti pagaminta bet kuriuo įprastu būdu, tinkamu mimeziniam peptidui, jo konkatemerei arba jo modifikuotiems peptidams. Aukščiau minėta vaisto forma, pageidautina, kad kompozicijoje, kurios gamyboje aktyvusis junginys būtų sumaišytas arba praskiestas su imuniniu adjuvantu, vaistu, sustiprinančiu imuninę sistemą, nešikliu, užpildu ir skiedikliu, parinkta iš grupės, susidedančios iš tabletės, piliulės, granulės, miltelių, oblatės, suspensijos, emulsijos, skysčio, sirupo, aerozolio, minkštos arba kietos želatinos kapsulės, sterilizuoto injekcijų skysčio, sterilizuotų miltelių ir pan.

Imuniniu adjuvantu, kuris gali būti naudojamas šio išradimo kompozicijoje, yra savotiška baltymų rūšis, kuri turi T-ląstelių epitopą (pvz., Hepatito B viruso paviršiaus baltymas), inertinis nešiklis, toks kaip aliuminio druska, bentoninas, lateksas, akrilinės dalelės ir pan., hidrofobinis antigenas, (pvz., lipidai), vandens aliejuje ir aliejaus vandenyje emulsijos, depo sudarytojas (pvz., polisacharidas), T-

ląstelių aktyvatorius, toks kaip PPD, poliadeninas, poliuracilas ir pan.; B-ląstelių aktyvatorius (pvz., B-ląstelės mitogenas), paviršinio aktyvumo medžiaga, tokia kaip saponinas, lizolecitinas, retinalis, kvil A, liposoma ir pan.; medžiaga, sustiprinanti makrofago aktyvumą; ir alternatyvus kelias, papildantis aktyvatoriais, tokiais kaip inulinas, zimosanas, endotozinas, lebamizolis, *C. parvum* ir pan.

Šiame išradime "baltymas nešiklis" reiškia farmaciškai leidžiamą medžiagą, tokią kaip proteinas arba aliuminio druska, kurie gali nešti kraujotaka šio išradimo mimezinį peptidą, jo konkatemerą ir jo modifikuotus peptidus.

Aliuminio druska, fenoksietiletanolis, vanduo, fiziologinis druskos tirpalas, laktozė, dekstrozė, sacharozė, sorbitolis, manitolis, kalcio silikatas, celiuliozė, metilceliuliozė, amorfinė celiuliozė, polivinilpirolidonas, metilhidroksibenzoatas, propilhidroksibenzoatas, talkas, magnio stearatas ir mineralinė alyva gali būti panaudoti kaip tinkami šio išradimo kompozicijos nešikliai, užpildai ir skiedikliai.

Priedo, šio išradimo kompozicija dar gali turėti užpildą, agentą nuo sukibimo, tepalą, drėkiklį, kvapiąją medžiagą, emulsiklį ir antiseptiką.

Šio išradimo kompozicija gali būti pagaminta įprastu būdu, gerai žinomų patyrusiems šios srities specialistams, kad sukeltų imuninį atsaką žinduoliams per vieną (1) kartą arba daugiau vakcinacijų.

Šio išradimo vakcinos kompozicija, skirta nutukimo gydymui, gali būti vartojama įvairiais būdais, tokiais kaip peroraliniu, dermaliniu, interdermaliniu, įšviršiant į veną arba į raumenis, bet, geriausiai, intrakutaniniu būdu.

Šio išradimo vakcinos kompozicijos efektyvi dozė yra nuo 0,1 iki 10 μg (aktyviojo peptido) kilogramui kūno masės, geriau, kai nuo 0,5 iki 1,0 $\mu\text{g/kg}$. Tačiau vakcinos kompozicijos aktyviojo prado tikroji dozė gali būti nustatyta atsižvelgiant į eilę faktorių, tokių kaip imuninės sistemos būseną, vartojimo būdas, paciento būklė, amžius, lytis, kūno masė ir pan. Todėl minėtos dozės kiekio ribos jokių būdu nelimituoja šio išradimo apimtį.

Šio išradimo vakcinos kompozicijos pirmasis farmacinis efektas yra sustabdyti arba gydyti nutukimą per mechanizmą, kai žmogaus antikūnas sustiprintas mimezinis peptidu, jo konkatemeru arba jo modifikuotais peptidais, susiriša su apolipoproteino B-100 epitopu ant LDL paviršiaus, ir tokiu būdu lipaze erdviniai trukdo ir stabdo gamybą riebalų rūgščių, kaip pagrindinį etiologinį nutukimo faktorių.

Priedo, šio išradimo vakcinos kompozicija taip pat veikia malšindama hiperlipodemiją per mechanizmą, kuriame LDL yra aptinkama ir lengvai pašalinama makrofago pagalba dėka opsonizacijos, iššauktos žmogaus antikūnu, sustiprintu mimeziniu peptidu, jo konkatemeru arba jo modifikuotais peptidais ir konjuguotą su apolipoproteino B-100 epitopu ant LDL paviršiaus, ir tokiu būdu sutrukdo LDL specifiškai prisitvirtinti ant LDL receptorių, esančių ant ląstelės paviršiaus.

Trumpas brėžinių aprašymas

Šio išradimo minėti tikslai ir kiti pasiekimai taps aiškesni detaliai aprašant jų pageidaujamus šio išradimo įgyvendinimo pavyzdžius su nuorodomis į pridedamus brėžinius, kuriuose:

nuo Fig.1a iki 1d pateiktos vektoriaus, ekspresuojančio šio išradimo mimezinį peptidą struktūros ir sudedamosios. Fig 1a parodo vyraujančios (lyderio) kasetės struktūrą, Fig. 1b parodo LB kastės struktūrą, Fig. 1c parodo BL kastės struktūrą, o Fig. 1d parodo pBX4 ekspresijos vektoriaus struktūrą.

Fig. 2 parodo vektorius pBX1 ir pBX4, ekspresuojančius šio išradimo mimezinį peptidą, gavimo būdą.

Fig. 3 parodo elektroforezės (PAGE) poliakrilamido gelyje LB kastės indentifikavimo rezultata.

Fig. 4 parodo PAGE LB kastės, įterptos į pBlue-BL plazmidę, indentifikavimo rezultata.

Fig. 5 parodo PAGE rezultata, patvirtintą DNR, įterptos į plazmides pBX1 ir pBX3, kryptį ir kopijų skaičių.

Fig. 6 parodo vestern-blotingo rezultata ekspresuoto PB1₄ peptido indentifikacijai.

Fig. 7 parodo natrio dodecilsulfato (SDS) PAGE rezultata, patvirtinantį PB1₄ peptido išgryninimą

Fig. 8 parodo vestern-blotingo rezultata, patvirtinantį išgrynintoto PB1₄ peptido reaktyvumą prieš anti-PB1₄ serumą.

Fig. 9 parodo pelės, indukuotos PB1₄ peptidu antikūno avidiškuo matavimo rezultatus, atliktus ELISA.

Fig. 10 yra grafikas, kuris iliustruoja PB1₄ peptido efektą, stabdant didėjančią pelės kūno masę.

Fig. 11a ir 11b yra grafikas, kuris iliustruoja pelių kūno masės pasikeitimo priklausomybę nuo šio išradimo PB1₄ vakcinos įvedimo po 20 savaitių po vaisto injekcijos, kuris gali sunaikinti hipotalamą.

Fig. 12 yra grafikas, kuris parodo poveikį lipidų koncentracijai kraujo serume, priklausomai nuo PB1₄ vakcinos injekcijos.

Geriausio išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Toliau, šis išradimas bus aprašytas detaliau. Tačiau, šis išradimas, paaiškintas žemiau, duotas tik šio išradimo įgyvendinimo paaiškinimais ir neketina limituoti šio išradimo apimtį.

1 pavyzdys: oligonukleotido sintezė ir hibridinimas

Pagal šio išradimo išradėjo prašymą oligonukleotidai cheminiu būdu buvo susintetinti Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, CA, JAV) firmoje. Tam, kad sufosforintų oligonukleotidų 5' galą, 50 µl 100 pmol/µl oligonukleotido inkubuota dvi (2) valandas su 10 µl 10 mM ATP, 3 µl 10 TV/µl T4 polinukleotido kinazės (Takara, Otsu, Japonija) ir 7 µl 10X kinazės buferio 37 °C temperatūroje.

Kiekviena po 10 µl fosforintų oligonukleotidų alikvotinė dalis sumaišytos kartu, pašildytos iki 80 °C 5 minutes, o po to labai lėtai aušinamos iki kambario temperatūros, taip suhibridizuojant iki komplementariųjų vijų specifinio suporavimo.

2 pavyzdys: susiuvimas

Susiuvimo mišinys paruoštas sumaišant 1 µl DNR vektoriaus, 5 µl DNR intarpo, 1 µl DNR ligazės T4 (NEB, Beverly, MA, JAV), 1 µl 10X fermentinės reakcijos buferio tirpalo (NEB, Beverly, MA, JAV) ir 2 µl distiliuoto vandens, o po to inkubuota per naktį 16 °C temperatūroje.

3 pavyzdys: pBX ekspresijos vektoriaus, skirto apolipoproteino B-100 mimezinio peptido ekspresijai, konstravimas

1 pakopa: vektoriaus konstravimas

Mimezinio peptido ekspresijos plazmidės vektorius kaip taisyklė apima vyraujančios sekos (lyderio) kasetę ir vieną arba daugiau PB1 peptido genų. Kaip

pavaizduota Fig.1, plazmidė pBX1, kuri apima vieną (1) PB1 geną, gauta klonuojant lyderio kasetę (Fig. 1a) plazmidės pQE30 daugiakloninėje srityje (Qiagen, Hilden, Vokietija). Susidariusi plazmidė hidrolizuota *HindIII* ir *SaII* pagalba, o mažieji fragmentai, pakeisti LB kasete (Fig. 1b), duoda pBX1 plazmidę, kuri tinkama lengvai įterpti didelį skaičių BL kasečių (Fig. 1c).

Tuo tarpu plazmidė pBluescript II SK+ buvo perkirpta su *SaII* ir *XhoI* ir susiūta su BL kasetėmis, kuriose pavieniai įtarpai iš daugybinės kasetės BL kasetės vyko atsitiktinai. Laukiami pasikartojimai PB1 peptido genų plazmidėje pBlue-BL atrinkti, suskaldyti ir subklonuoti į pBX1 (Fig. 1d).

2 pakopa: PB1 mono-peptido ekspresijos vektoriaus gavimas

Lyderio kasetė pagaminta hibridizuojant SEQ. ID. Nr.10 ir SEQ. ID. Nr.11 oligonukleotidus, susintetintus tokiu pat būdu kaip ir 1 ir 2 pavyzdžiuose. Po to, pQE30 vektorius (Qiagen, Hilden, Vokietija), kuris buvo asimiliuotas su *SaII* ir *BamHI*, susiūtas su minėta lyderio kasete, duoda pQE-lyderio plazmidę. Minėto pQE30 vektoriaus ekspresijos rezultate, šešios histidino liekanos buvo papildomai įterptos į ekspresuoto baltymo N-galus tam, kad baltymas būtų lengvai išgryninamas. Minėta lyderio kasetė buvo sukonstruota apimti enterokinazės atpažinimo sritis (DDDDKI; SEQ. ID. Nr.12) tam, kad sumažintų papildomas aminorūgštis iki minimumo.

Pagal 1 pavyzdžio būdą, keturi oligonukleotidai, kurių sekos pateiktos SEQ. ID. Nr. nuo 4 iki 7, susintetinti, fosforilinti, o po to hibridizuoti su atitinkamais komplementariaisiais oligonukleotidais tam, kad susintetintų Fig. 1b (SEQ. ID. Nr.13 ir 14) LB kasetę. Susiuvimo mišinys pagamintas iš 40 µl hibridizuotų oligonukleotidų, sumaišytų su 3 µl 1 TV/ µl T4 DNR ligazės, 5 µl 10X fermentinio buferio ir 2 µl distiliuoto vandens. Po to, susiuvimo mišinys inkubuojamas per naktį, susiuvia oligonukleotidus vieną su kitu.

Po to, kai reakcija užsibaigia, reakcijos mišinys išpilamas ant 20 % poliakrilamido gelio ir vykdoma elektroforezė. LB kasetė (52 bazių porų (bp) oligonukleotidai) (Fig.3) identifikuota panardinant į gelį su etidžio bromidu (EtBr).

Fig.3 juostoje M yra DNR 20 bp "laiptų" dėmė, o juostoje 1 yra reakcijos tirpalas. LB kasetė gauta iš gelio ekstrakcijos rinkinio (Qiagen, Hilden, Vokietija) QIAEX II gelio pagalba.

Minėtas pQE-lyderis suskaldytas su *HidIII* ir *Sa1I*, o po to susiūtas su minėta LB kasete pagal 2 pavyzdį, kad gautų PB1 mimezinio peptido ekspresijos vektorių. Gautas ekspresijos vektorius pavadintas pBX1, o peptidas, ekspresuotas vektoriaus, buvo pavadintas PB1 peptidu (nuoroda į Fig.2).

3 pakopa: PB1 konkatemero ekspresijos vektoriaus gamyba

Keturi oligonukleotidai, kurių sekos parodytos SEQ ID. Nr. 4, 5, 8 ir 9, pagal 1 pavyzdžio metodiką buvo susintetinti, sufosforilinti, o po to suhibridinti su atitinkamais komplementariaisiais oligonukleotidais tam, kad susintetintų Fig. 1c (SEQ. ID. Nr. 15 ir 16) LB kasetę. Vėliau tokie oligonukleotidai susiūti vienas su kitu pagal 2 pavyzdžio metodiką, o po to elektroforezei patalpinti ant 20 % poliakrilamido gelio. Nudažant EtBr, buvo identifikuotos penkiasdešimt penkios nukleotidų bp (lyderio kasetė). LB kasetė gauta iš gelio per QIAEX II gelio ekstrakcijos rinkinį ir suskaldyta su *Sa1I* ir *XhoI*.

Tuo tarpu, pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA, JAV) suskaldyta su *Sa1I* ir *XhoI*. Vektorius paveiktas elektroforeze ant 0,8 % agarozės gelio, ir gautas iš gelio ekstrakcijos rinkinio (Qiagen, Hilden, Vokietija) QIAEX II gelio pagalba.

Pagal 2 pavyzdį buvo atliktos kelios susiuvimo reakcijos ir gauta pBlue-BL plazmidė naudojant 5 µl BL kasetės DNR ir 1 µl minėtos DNR su suskaldytu vektoriumi.

pBlue-BL suskaldyta su *Sa1I* ir *XhoI*, o BL kasetė išekstrahuota. pBX2 plazmidė pagaminta įterpiant tokią BL kasetę į pagamintą pagal 2 pakopą vektoriaus pBX1 *Sa1I* sritį. Priedo, pBX3 ir pBX4 vektoriai pagaminti keičiant BL kasetės skaičių nuo dviejų (2) iki trijų (3), kurie įterpiami į pBX1 vektoriaus *Sa1I* sritį (nuoroda į Fig. 2).

Peptidai, ekspresuoti iš pBX2, pBX3 ir pBX4 vektorių, buvo konkatemerai, kurie turi nuo dviejų (2) iki keturių (4) PB1 peptidų. Jie pavadinti atitinkamai PB1₂, PB1₃ ir PB1₄.

4 pakopa: įterpimo identifikavimas

Laštelė šeimininkė (*E. coli* M15 [pREP4]; Qiagen, Hilden, Vokietija) buvo transformuota su pBlue-BL plazmide ir išpurkšta ant 1 % agar plokštelės, o po to 16 valandų inkubuota 37 °C temperatūroje taip, kad galėtų susidaryti *E. coli* kolonijos. Viena iš kolonijų, kuri susidarė ant agar plokštelės, paskiepyta 10-tyje ml LB terpės ir inkubuota purtant 37 °C temperatūroje šešiolika (16) valandų, o po

to plazmidė išskirta per DNR gryninimo sistemą (Wizard *PLUS* SV DNR minipreparatyvinė DNR gryninimo sistema; Promega, Madison, WI, JAV). Plazmidė, išgauta iš transformuotos *E. coli*, buvo inkubuota vieną (1) val. su *Sall* ir *XhoI* restrikcijos fermentu tam, kad skaldytų 37 °C temperatūroje, ir išanalizuota naudojant 20 % PAGE (Fig. 4). Fig. 4 juosta M parodo 20 bp lyderinę DNR, 1 juosta parodo oligonukleotido produktą, gautą 3 pakopoje, 2 juosta parodo DNR BL kasetę, išskirtą naudojant 20 % PAGE, gautą 3 pakopoje, o 3 juosta reiškia rekombinantinę pBlue-BL plazmidę, paveiktą restrikcijos fermentu. Kaip rodo Fig. 4, tai patvirtina, kad pBlue-BL plazmidė turi BL kasetę.

E. coli (M15 [pREP4]) transformuota su pBX1 arba pBX3 plazmide, o DNR plazmidė išskirta taip, kaip paaiškinta aukščiau tam, kad patvirtintų DNR kasetės įterpimų skaičių ir orientaciją. Išskirta plazmidė suskaldyta su *Sall* ir *HindIII* restrikcijos fermentu, ir išanalizuota naudojant 20 % PAGE (Fig. 5). Fig 5 juosta M parodo 20 bp lyderinę DNR, 1 ir 3 juostos parodo pBX1 plazmidę, turinčią LB, bet ne BL kasetę, o 2 juosta parodo plazmidę, turinčią teisingos krypties vieną LB ir dvi BL kasetes. Iš kitos pusės, 4 juosta parodo plazmidę, turinčią vieną LB ir dvi BL kasetes, tačiau priešingos orientacijos. Kaip rodo Fig. 5, kiek B kasečių (BL ar LB kasetė) buvo įterpta ir kokia kryptimi jos buvo įterptos į pBX vektorių, galima identifikuoti restrikcijos fermento žymėjimą.

Priedo, B kasečių DNR seka, įterpta į plazmidę, kuri gali būti gauta iš transformuotos *E. coli*, patvirtinta, kad ji identiška pažymėtoms sekoms. Plazmidės pagamintos naudojantis Wizard'o *PLUS* DNR minipreparatyviniu rinkiniu ir buvo sekvenuotos naudojant Sequennase (Ver. 2.1) DNR sekvenavimo rinkinį (Amersham, Cleveland, UK).

4 pavyzdys: PB1₄ peptido ekspresija į *E. coli* ir jo gryninimas.

1 pakopa: PB1₄ peptido ekspresijos patvirtinimas

PB1₄ peptido ekspresijos patvirtinimui buvo kultivuojamos trijų rūšių transformuotos *E. coli* M15[pREP4] ant LB agaro buljono, turinčio ampicilino ir kanamicino. Viena *E. coli* M15[pREP4] transformuota plazmide pBX4, antra kopija transformuota pQE30, o dar kita buvo netransformuota *E. coli* M15[pREP4]. Kiekviena iš kolonijų, gautų iš kietųjų kultūrų, buvo atitinkamai inokuliuota skystoje LB kultūros terpėje, kuri turėjo 100 µl/ml ampicilino ir 25 µl/ml kanamicino, o po to inkubuotos per naktį. Kultūra buvo inkubuota purtant 37 °C temperatūroje vieną (1)

valandą iki O. D reikšmės, pasiektos nuo 0,5 iki 0,7 intervale prie 600 nm. Po to į kultūros terpę pridėta 1 mM izopropil-tio-β-galaktopiranozido (IPTG), kad palengvintų rekombinantinio baltymo ekspresiją, o po to papildomai kultivuota 37 °C temperatūroje dar penkias (5) valandas. Paimtas 1 ml kultūros terpės ir centrifuguotas 14 000 apsisukimų/per minutę dviejų (2) minučių laikotarpyje, kad nusodintų bakterines ląsteles. Ląstelių gumuliukas suspeduotas 50-tyje μl 2X SDS tirpale [100 mM Tris-Cl pH 6,8, 20 % (masės/tūryje) glicerolio, 4 % (masės/tūryje) SDS, 2 % 2-merkaptoetanolio, 0,001 % bromfenolio mėlynojo] kad pateiktų į SDS-PAGE. Suspenduotas tirpalas šildytas 95 °C temperatūroje penkias (5) minutes, o po to 10 μl tirpalo patalpinama ant gerai išlieto gelio ir vykdoma elektroforezė 20 mA srovėje penkias (5) valandas (Mighty Small II, Hoefer, JAV). Panaudotų pakrautojo gelio ir skiriamąjo gelio akrilamidų koncentracijos atitinkamai buvo 5 % ir 15 % , o iš anksto nudažytas standartinis SeeBlue (nuo 250 Kda iki 4 kDa; NOVEX, San Diego, CA, JAV) arba plačiai naudojamas standartinis Mark12 (nuo 200 kDa iki 2,5 kDa) buvo panaudoti kaip standartinių dydžių pažymėti baltymai. Po elektroforezės gelis nudažytas vienai (1) valandai kūmasio brilliantiniu mėlynuoju R-250, o dažas per dešimt (10) valandų išblukintas blukinančiu tirpalu (5 % metanolio ir 7 % acto rūgšties).

Patvirtinimui, kad ekspresuotas baltymas yra PB14 peptidas, baltymams elektroforezės gelyje įvykdytas vestern-blotingas naudojant triušio anti-PB1 antikūną (Fig. 6). Imuninis serumas pagamintas imunizuojant konjuguotu ovalbuminu, kuris buvo PB1 peptidas, cheminiu būdu susintetintas firmoje Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX, JAV). Fig. 6 juosta M parodo iš anksto nudažytą standarto SeeBlue žymę, juosta 1 parodo terpę, naudotą *E. coli* M15 [pREP4] inkubacijai, kuri buvo netransformuota, juosta 2 parodo terpę, naudotą *E. coli* M15 [pREP4] inkubacijai, kuri buvo transformuota vektoriumi pQE30, juosta 3 reiškia terpę, naudotą *E. coli* M15 [pREP4] inkubacijai, kuri buvo transformuota vektoriumi pBX4.

Kaip parodyta Fig. 6, tik vektoriumi pBX4 transformuota *E. coli* ekspresavo rekombinantinį PB1₄ peptidą ir parodė specifinį imunitetą su pelės anti-PB1 serumu.

2 pakopa: ekspresuoto peptido tirpumo nustatymas

E. coli M15 [pREP4], kuri buvo pakeista vektoriumi pBX4, inkubuota tokiu pat būdu, kaip ir 1 pakopoje. Ląstelių auginimui paimta 10 ml kultūros terpės ir nucentrifuguota, kad būtų gauta ląstelių. Ląstelių gumuliukai suspenduoti 5-se ml ląstelių lizvimo tirpale (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazolo, pH 8,0), kad gautų iš ląstelių gryną baltymą. Atšaldžius, gumuliukų suspensijos tirpalas per 20 ciklų veikiamas ultragarsu viršgarsine banga, kad gautų lizuotas ląsteles. Supernatantas paimtas centrifuguojant 4 °C temperatūroje 10000 apsisukimų per minutę greičiu 30 minučių laikotarpyje. Toks pat tūris 2X SDS tirpalo sumaišytas su tirpalu, o SDS-PAGE taip pat vykdomas kaip aprašyta 1 pakopoje. Po to kiekvieną tirpalą šildė 95 °C temperatūroje 5 minutes. SDS-PAGE rezultatas patvirtina, kad PB1₄ peptidas gali būti išskirtas ir išgrynintas iš tirpaus ekstrakto A, kuriame jis laikytas netirpiame nevalytame ekstrakte B.

3 pakopa: PB14 peptido gryninimas

3-1 pakopa: afininė chromatografija

Ni-NTA derva, kuri naudojama išgryninti His-pažymėtus baltymus, panaudota išgryninti 1 pakopos rekombinantinį peptidą. Afininė chromatografija, reikalaujanti įspūdingos jėgos tarp Ni⁺ prisotintos dervos ir histidino liekanos ekspresuoto baltymo gale, yra gerai žinomas būdas lengvai išgryninti reikiamą baltymą.

Pirmiausiai, *E. coli* M15 [pREP4], kuri buvo transformuota vektoriumi pBX4, inokuliuota 1-me I LB kultūros terpės ir inkubuota 37 °C temperatūroje iki tiek, kad O.D. reikšmė prie 600 nm būtų virš 0,6. Santykis tarp LB kultūros terpės ir pBX4 vektoriaus buvo penkiasdešimt (50) su vienu (1). Į galutinės koncentracijos tirpalą pridėta 1 mM IPTG ir vėl inkubuota penkias (5) valandas. Po inkubavimo kultūros terpė centrifuguota apie 30 min. prie 6,000 apsisukimų per minutę, o ląstelių gumuliukai laikyti -70 °C temperatūroje per naktį. Ląstelių gumuliukai panardinti į ledą, o po to suspenduojami tirpinimo tirpale (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazolo, pH 8,0), panaudojant 5 ml tirpinimo tirpalo 1 g gumuliukų. Ląstelės lizuojamos ardant ultragarsu pagal 2 pakopos metodiką, o po to centrifuguotos 30 min. kambario temperatūroje esant 10000 Xg. Toks pat tūris buferio (8 M karbamido, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) kaip ir gumuliukų pridėtas pakartotinam suirusios ląstelės suspendavimui ir čia esančių baltymų

denatūravimui, o suspenduotas tirpalas paveiktas trumpai ultragarso banga taip, kad buferyje būtų ištirpinta kuo daugiau baltymų. Suspensija centrifuguota 8000 apsisukimų per minutę greičiu 30 minučių, kad būtų pašalintos suirusios ląstelės, kurios nesoliubilizuotos 8 M karbamide. Į 4 ml minėto supernatanto 4 °C temperatūroje pridėta 1 ml Ni-NTA dervos ir purtyta 2 valandas prie 200 apsisukimų per minutę greičiu tam, kad baltymai, turintys His-tag būtų pagauti.

Toks supernatantas, turintis baltymo/Ni-NTA kompleksą, rūpestingai supiltas į chromatografinę kolonėlę (2 cm pločio x 2,7 cm aukščio). Buferio perteklius išleistas atidarius kranelį, esantį po derva. Kolonėlė perplauta 20 -čia ml vidutinio pH buferio (8 M karbamido, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) ir po to 20-čia ml kito buferio (8 M karbamido, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3), kad būtų išplauti baltymai, kurie nespecifiškai surišti su Ni-NTA derva. Baltymai-taikiniai, turintys žymėtąjį His, eliuoti plaunant du (2) kartus 5-iais ml žemo pH buferiu (8 M karbamido, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 5,9), po to keturis (4) kartus 5 -iais ml stiprios rūgšties buferiu (8 M karbamido, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 4,5), o po to naudota SDS-PAGE, kad patvirtintų eliuotus baltymus-taikinius naudojant 15 % akrilamido gelį (fig. 7). Fig. 7 juosta M parodo iš anksto dažytą SeeBlue žymę, o juosta 1 parodo išgrynintą B1₄ peptidą.

Aukščiau minėti išgryninti baltymai dializuoti ant PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄ ir 0,24 g/l KH₂PO₄) tam, kad būtų gautos jų pirminės konformacijos. Naudojamas dializės vamzdelis yra 3500 Da pagal žemutinę molekulinės masės ribą. Dializės metu pirmas penkias (5) valandas sunaudota 3 l PBS, turinčio 2 M karbamido, o po to per naktį du (2) kartus 5 l PBS be karbamido.

3-2 pakopa: hidrofobinė chromatografija

Hidrofobinė chromatografija atliekama tam, kad padidintų PB1₄ peptido, gauto 3-1 pakopoje, grynumą.

Amonio sulfatas dedamas pamažu iki galutinės 20 % koncentracijos į tirpalą, turintį PB1₄ peptido, eliuoto nuo Ni-NTA dervos 3-1 pakopoje, o po to pH sureguliuojamas iki 7,0. Po to, kai amonio sulfato ištirpo pilnai iki 10 %, tirpalas paliekamas trims arba daugiau valandų, o po to tirpalas patalpinamas į fenilsefarožės kolonėlę [užpildas: greitosios srovės fenilsefarožės derva (Pharmacia, Švedija); kolonėlės dydis: 1 cm (plotis) x 3 cm (aukštis)].

Kiekviena frakcija, kuri eliuota iš kolonėlės pilant eliuavimo tirpalą (8 M karbamido, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3) į kolonėlę esant tekėjimo greičiui 0,5 ml/min prie amonio sulfato atvirkštinio gradiento nuo 10 % iki 0 %, patalpinta ant SDS-PAGE gelio. Frakcija, turinti PB1₄ peptidą, surinkta ir dializuota buferio tirpale, kad taptų gėlinta, o karbamidas, kuris vartojamas kaip denatūravimo agentas, pašalintas tuo pačiu metu.

3-3 pakopa: His žymės pašalinimas

Į buferio tirpalą (50 ml NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4), kuris tinka pašalinti denatūravimo agentą ir imidazolą iš išgryninto His-žymėtojo baltymo, o taip pat suaktyvinti enterokinazę, pridėta 2 M karbamido. Dializuotas PB1₄ peptidas, kuris gautas 3-2 pakopoje, dar kartą dializuojamas naudojant aukščiau minėtą buferį, turintį karbamido, kad gėlintų PB1₄ peptidą, kurio metu karbamido koncentracija pamažu sumažėja vis kartoiant dializę iki karbamidu nuskurdinto buferio. 3 TV/ml enterokinazės pridėta į PB1₄ peptidą, turintį tirpalą, kurio buferis pakeistas minėtu antruoju buferiu, ir inkubuota 23 °C temperatūroje. Tirpalas, kuris paimamas kas valandą, analizuojamas SDS-PAGE būdu tam, kad patikrintų His žymių kiekį, pašalintų iš His-žymėtųjų PB1 (PB1₄^{+his}) peptidų.

3-4 pakopa: jonų mainų chromatografija

Nepageidaujami baltymai ir peptidai, kurie pasigamino paveikus enterokinazę, pašalinti jonų mainų chromatografija.

Tirpalas, turintis PB1₄^{-his} peptidą, gautą 3-3 pakopoje, dializuotas dializės buferyje (2 M karbamido, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Tris-HCl, pH 7,0), ir buferio kiekis buvo žymiai pakeistas. Dializuojamas tirpalas patalpintas ant DEAE sefarozės dervos (Pharmacia, Upsala, Švedija). Po to kolonėlė supusiausvirinta su pusiausvirinimo buferiu (50 ml natrio fosfato buferio, 2 M karbamido, pH 7,0) ir peptidas eliuotas pagal NaCl koncentracijos gradientą nuo 0 iki 1 M naudojant kitą buferį (50 ml natrio fosfato buferio, 2 M karbamido, 1M NaCl) (srovės greitis: 0,5 ml/min.). Kiekviena frakcija regeneruota ir norimą baltymą turinčios frakcijos sukaupiamos. Sukoncentravus dalis, PB1₄^{-his} peptido buvimas patvirtintas SDS-PAGE.

4 pakopa: PB1₄ kiekybinė analizė

Išgrynintas PB1₄ peptidas, kuris gautas pagal 3 pakopos metodiką, kiekybiškai išanalizuotas kolorimetinės analizės metodu naudojant mikro BCA reagentą (Pierce, Rokfordas, JAV).

5 pakopa: rekombinantinio PB1₄ peptido charakteristikų patvirtinimas

PB1₄ peptidų, kurie išgryninti 3 pakopoje, grynumas ir imuninio serumo, kuris gautas naudojant sintetinį PB1₄ peptidą kaip antigeną, imunogeniškumas patvirtinti wetern-bloto analize naudojant ECL (Amersham, Cleveland, UK). Atlikus SDS-PAGE (2 pavyzdys, 1 pakopa), gelis inkubuotas kartu su PVDF membrana buferyje (0,3 % Tris, 1,5 % glicinas, 20 % metanolis) pastovioje 60 V įtampoje tris (3) valandas tam, kad baltymas gelyje būtų perneštas į PVDF membraną. Po to įgertoji membrana inkubuota 1,5 valandos su 5 ml blokavimo tirpalo (TBS, pH 7,5, 5 % (masės/tūryje) nugriebto pieno miltelių, 0,02 % Tvino 20), o dar po to tris kartus plauta su TTBS (Tris-buferintas fiziologinio tirpalo tirpalas, turintis 0,1 % Tvino 20) atitinkamai 15, 5 ir 5 minutes. Imuninis serumas prieš PB1 peptidą (nuoroda į 2 pavyzdžio 1 pakopą) praskiestas TTBS tirpalu santykiu vienas (1) su penkiais tūkstančiais (5000), o po to 1,5 valandos inkubuotas su membrana tam, kad būtų patvirtintas PB1₄ peptido ir imuninio serumo prieš PB1₄ peptidą grynumas (3 pavyzdys). Po gelio plovimo su TBBS paeiliui tris kartus 15, 5 ir dar 5 minutes, membrana inkubuota 1,5 valandos kambario temperatūroje su tirpalu, kuriame šarminis fosfatazės-F(ab)'₂-ožkos anti-pelės IgG (H+L) (Zymed, San Francisko, CA) praskiestas su TTBS tirpalu santykiu vienas (1) su tūkstančiu (1000). Membrana vėl plauta su TTBS tris kartus, o po to nudažyta pridedant BCIP/NBT (5-brom-4-chlor-3-indolilfosfatas/tetrazolio nitro mėlynasis (Sigma)). Po nudažymo, BCIP/NBT tirpalas pašalintas TTBS tirpalu. Kaip vestern-blotingo rezultatas, ekspresuotas PB1₄ peptidas gali būti atpažintas anti-PB1₄ serumu.

ECL atveju, vietoje nitroceliuliozės membranos naudota PVDF membrana (Gelman Science, BioTrace®). Priedo, pirmasis antikūnas naudotas santykiu vienas (1) su dešimt tūkstančiu (10000) ir HRP-konjuguoti triušio anti-pelės IgG (Pierce, Rokfordas, IL, JAV) buvo panaudoti kaip antrasis antikūnas santykiu vienas (1) su dešimt tūkstančiu (10000). Spalvinėje reakcijoje naudotas 1 ml A tirpalo ECL+vestern-blot agento (Amersham) 25-iuose ml B tirpalo. Kai spalva buvo pakankamai generuota, membrana buvo įterpta į kasetės plėvelę, atitinkamai

5, 10, 20 ir 30 sekundžių, kad eksponuotų ant plėvelės taip, kad ruoželiai ant gelio galėtų būti aptikti (Fig. 8). Fig. 8 juosta M reiškia ECL aptikimo žymę (Gibco BRL), o juosta 1 reiškia PB1₄ peptidą. Iš Fig. 8 matyti, kad ekspresuotas PB1₄ peptidas gali būti atpažintas anti-PB1₄ serumu.

Priedo, vestern-blotingo analizė, kurioje PB1₄ peptidas, naudojantis polikloninį antikūną, išskirtą iš triušio serumo, panaudojant Protein G kolonėlę (Bio-Rad, JAV), duoda tokį pat rezultatą.

5 pavyzdys: Anti-PB1₄ peptido pelės antikūno gamyba

Čia naudotas PB1₄ peptidas yra PB1₄^{-his} peptidas, iš kurio pašalinta jo His-žymė pagal 2 pavyzdžio 3-3 pakopą.

1 pakopa: PB1₄ peptido susiuvimas su OVA

Ovalbuminas (OVA), kaip baltymas nešiklis, pridėtas į išgrynintą PB1₄ peptidą pagal 2 pavyzdžio 3 pakopą moliniu santykiu vienas (1) su dešimt (10) ir inkubuotas vieną (1) valandą 4 °C temperatūroje. Į PB1₄ -peptido-ovalbumino tirpalą tokiu pat tūriu pridėta 2 tūrio % glutaraldehido ir inkubuota vieną (1) valandą pastoviai purtant. Po to į reakcijos mišinį pridėta glicino, o kai galutinė koncentracija tampa 0,2 M, reakcija sustabdoma.

Reakcijai įvykus, likęs reakcijos mišinyje glutaraldehidas-glicinas pašalinami dialize naudojant MWCO 12000-14000 dializės membraną (Spectrum®, Dominguez, CA, JAV).

2 pakopa: pelės imunizavimas

Peptidas, su kuriuo buvo sujungtas OVA 1 pakopoje, sukonzentruotas ir panaudotas pelės imunizavimui. Antigeno kiekis, suleistas pelei buvo 5 µg ir tai buvo PB1₄-peptido kiekis prieš sujungiant su OVA. Antigenas, kuris emulguotas su tokiu pat kiekiu adjuvanto, įvestas pelei į pilvo ertmę 0,2 ml kiekiu.

Pirmai injekcijai panaudotas pilnas Freundo adjuvanto komplektas (CFA), o nepilnas Freundo adjuvanto komplektas (iFA) panaudotas kaip adjuvantas pakartotiniam imunizavimui du (2) kartus dviejų (2) savaitių intervalu. Kontrolinei pele suleistas BSA (jaučio serumo albuminas).

Po penkių (5) dienų nuo paskutinės injekcijos punktuojant širdį iš pelės paimamas kraujas, kuriam leidžiama krešėti 30 minučių 37 °C temperatūroje. Po to kraujas nucentrifuguotas per 30 minučių 4 °C temperatūroje 2500 apsisukimų per minutę greičiu, ir krešuliai pašalinti iš kraujo. Supernatantas (t. y., kraujo

serumas) inkubuotas per naktį 4 °C temperatūroje, kad likę kraujo koagulantai būtų visiškai sukoncentruoti, ir nucentrifuguotas per 20 minučių 10000 apsisukimų per minutę greičiu. Susidaręs supernatantas išpilstytas į keletą mėgintuvėlių. Kraujo serumas, kuris turi būti panaudotas eksperimente, laikytas 4 °C temperatūroje, o liekanos laikytos - 20 °C temperatūroje.

3 pakopa: anti-PB1₄-antikūno avidiškumo matavimas netiesioginiu ELISA metodu

Antikūno avidiškumas išmatuotas naudojant kraujo serumą, gautą 2 pakopoje. 100 µl PB1₄-peptido paskirstyta į kiekvieną iš 96 mikrotitravimo plokštelės (Flakonas: pro-surišimas) duobutę ir palikta stovėti 4 °C temperatūroje 6 valandoms arba daugiau, o po to plauta tris (3) kartus TTBS buferiu (Tris fiziologinio tirpalo buferis, turintis 0,05 % Tvino 20). 200 µl blokuojančio tirpalo (1 % BSA, esantis TTBS) pridedama į kiekvieną duobutę ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje vieną (1) valandą, o po to plauta tris (3) kartus su TTBS. 100 µl išskirto serumo, kuris praskiestas su blokuojančiu tirpalu santykiu vienas (1) su nuo 10² iki 10⁵ pridedami į reakcijos tirpalą ir inkubuojama 37 °C temperatūroje vieną (1) valandą, o po to plauta tris (3) kartus su 200 µl TTBS. 100 µl HPR-prijungto ožkos anti-triušio IgG antikūnas (Pierce, Rockford, IL), praskiestas su blokuojančiu tirpalu santykiu vienas (1) su 10³, pridedamas į reakcijos tirpalą ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje vieną (1) valandą, o po to plautas tris (3) kartus su 200 µl TTBS. HPR substrato rinkinio tirpalas A (Bio-Rad) sumaišytas su šio rinkinio tirpalu B santykiu devyni (9) su vienu (1). 100 µl susidariusio mišinio pridėta į reakcijos tirpalą ir dažyta trisdešimt (30) minučių, o po to reakcijos mišinio optinė sugertis išmatuota prie 405 nm naudojant ELISA lyderį (EL312e, Bio-Tek Ins.)(Fig. 9). Fig 9 patvirtina, kad pelės antikūnas, specifinis PB1₄-peptidui, gali būti panaudotas vestern-blot ir ELISA metodų analizei, esant vienam (1) tūkstančiui klosčių (figūroje X ašies 3,0).

6 pavyzdys: PB1₄-vakcinės efektas prieš nutukimą naudojant pelės modelį

1 pakopa: nutukimo sukėlimas pelei

Čia panaudotos 5 savaičių amžiaus ICR pelės (Korea Center for Animal Experiment [Korėjos eksperimentinių gyvūnų centras], Ltd., Seulas, Korėja). Pelės augintos vivariume, kuriame temperatūra palaikoma nuo 17 iki 25 °C, ir maitintos

pašaro mišiniu (Sam Yang Feed Ltd., Seulas, Korėja [ingredientai: vanduo 11,8 % arba daugiau, baltymai 20,0 % arba daugiau, nevalyti lipidai 3,0 % arba daugiau, laštelienos žaliava 10,0 % arba mažiau, nevalyti pelenai 10,0 % arba mažiau, kalcis 0,6 % arba mažiau, ir fosforas 0,4 % arba daugiau]). Pelėms duota aukso tiogliukozė (GTG), kad sukeltų nutukimą. GTG turi savybę sukelti venteromedialinio hipotalaminio branduolio (VMH) jautrumo sumažėjimą. Todėl pelės, gavusios GTG nejaučia sotumo ir pastoviai nori ēsti. Čia naudotas GTG yra labai nestabilus junginys, kuris lengvai suskyla vandenyje arba nuo drėgmės. Todėl 100 mg GTG (Sigma, Inc.) praskiestas su 1 ml sezamo aliejaus (Sigma, Inc.) ir buvo naudotas tokiu pat būdu kaip ir Brecherio su bendraautoriumi (Brechere G., Waxler, S. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 70: 498-501 (1949)) tam, kad būtų pateiktas patikimas GTG kiekis.

Pelės padalintos, kad būtų suformuota tiriamą grupę (dvidešimt (20) pelių) ir kontrolinė grupę (keturios (4) grupės), 25 ml GTG suleista bandomai grupei, o kontrolinei grupei nesuleista nieko.

Tiriamos grupės pelių kūno masė išmatuota prieš eksperimentą ir pelės, kurių kūno masės nukrypimas buvo nežymus, buvo atrinktos ir panaudotos eksperimentui. Pelių kūno masė, išmatuota po vienos (1) savaitės po GTG suleidimo buvo nuo 26,5 iki 29,5 gramo.

Septynių GTG injekuotų pelių grupė buvo su sukeltu nutukimu, tuo tarpu likusios - nebuvo. Pelėms, kurioms nutukimas nebuvo sukeltas, buvo vėl injekuotos GTG, po to nutukimas buvo sukeltas visoms pelėms.

Visos pelės su sukeltu nutukimu buvo padalintos į tris (3) grupes. Po savaitės, kai GTG buvo suleistas antrą kartą, pirmai tiriamai grupei, susidedančiai iš septynių (7) pelių buvo suleistas PB1₄-peptidas pagal 3 pavyzdžio 2 pakopą. Priedo, pelėms kitos grupės iš trijų (tiriamos 2 grupės, susidedančios iš septynių (7) pelių) vietoje PB1₄-peptido buvo suleistas ovalbuminas kaip tiriamas eksperimentas, o vakcina nebuvo suleista kitai grupei (tiriamai 3 grupei, turinčiai šešias (6) peles), kad sukeltų nutukimą. Iš kitos pusės, 0,2 ml PBS buvo suleista kontrolinei grupei, kad suly gintų su tiriamomis grupėmis, kad patvirtintų šio išradimo vakcinės efektyvumą.

Priedo, čia vartojamas pašaras sumaišytas su kiaušinio tryniu ir džiovintas 50 °C temperatūroje, kad sukeltų cholesterolio suvartojimą taip, kad cholesterolio

lygis galėtų pakilti pelės serume. Pašaras taip pat duotas pakankamu kiekiu, kad sukeltų ligas, susijusias su cholesterolio lygio padidėjimo sukeliomomis ligomis. Pelių kūno masė buvo matuojama kasdien.

Kaip parodyta Fig. 10, tiriamos 1 grupės (-▲-▲-) vakcina injekuotų pelių kūno masė per dvylika (12) savaičių nuo GTG injekcijos išaugo nuo $27 \pm 0,4$ g iki $52,2 \pm 1,7$ g. Duomenys patvirtina išvadą, kad nėra žymaus skirtumo išaugusios kūno masės tarp tiriamos 1 grupės ir kontrolinės grupės (-O-O-). Tačiau pelių kūno masė tiriamoje 2 grupėje (-●-●-), kurioje ovalbuminas įvestas po to, kai pelės nutuko, ir tiriamos grupės (-■-■-), kurioje po nutukimo vakcina nebuvo įvesta, kūno masė augo pastoviai nuo $28,3 \pm 0,5$ g iki $68,9 \pm 2,8$ g. Todėl buvo patvirtinta, kad nutukimas galėjo būti sustabdytas PB1₄-peptido vakcinos injekcija.

Figūroje 10 G1 ir G2 reiškia GTG injekcijos laiką, o V1, V2 ir V3 reiškia PB1₄-peptido vakcinos injekcijos laiką.

Figūroje 11 parodytas pelės su iššauktu nutukimu išorinis vaizdas. 20-ties savaičių pelė tiriamos 1 grupės (Fig. 11a: normalios pelės) palyginta su 20 savaičių pele tiriamos 3 grupės (fig. 11 b: nutukusios pelės). Kaip parodyta Fig 11, buvo patvirtinta, kad šio išradimo vakcina buvo efektyvi stabdant nutukimą.

2 pakopa: Cholesterolio lygio matavimas kraujyje

Po pirmosios GTG injekcijos kraujo cholesterolio lygis 12-kos savaičių kontrolinės grupės pelių palygintas su 12-kos savaičių GTG-injekuotomis tiriamų 1 ir 2 grupių pelėmis. Bendrojo cholesterolio, trigliceridų, HDL-cholesterolio ir LDL-cholesterolio koncentracijos išmatuotos fermentiniu būdu naudojant Cholestezyme-V, Triglyzyme-V, HDL-C555 (Shin Yang Chemicals, Korėja) ir LDL-EX rinkinį (Denka Bio-Research, Ltd., Tokijas, Japonija). Kiekviename eksperimente paruoštos kalibravimo kreivės O.D reikšmėms naudojant standartą Calibrater-D (Denka Bio-Research Ltd., Tokijas, Japonija), kad būtų sumažintos eksperimento paklaidos. O.D reikšmės dėl intereso buvo išskaičiuotos remiantis kalibravimo kreive, kad patvirtintų lipidų koncentraciją ir kiekį, o rezultati pateikti 1 lentelėje ir Fig. 12.

	Bendrasis cholesterolis	TG	HDL-C	
Kontrolinė grupė	79 ± 3,7	180 ± 26	59 ± 3,4	
Tiriama 1 grupė	118 ± 3,6	217 ± 47	92 ± 4,7	20 ± 1,7
Tiriamos 2 ir 3 grupės	131 ± 8,8	218 ± 70	119 ± 7,5	30 ± 4,5

TG: trigliceridai;

HDL-C: HDL-cholesterolis;

LDL-C: LDL-cholesterolis.

Kaip parodyta 1 lentelėje ir Fig. 12, kaip nutukimo sukėlimo rezultatas gautas patvirtinimas, kad abiejose tiriamose grupėse nėra jokio žymaus skirtumo cholesterolio kiekyje, o kontrolinėje grupėje cholesterolio kiekis nepadidėjo, nes bendra cholesterolio koncentracija kraujyje, o taip HDL-C ir LDL-C pakilo labai nežymiai (Fig. 12).

Pramoninis pritaikomumas

Šio išradimo vakcina, kuri turi apolipoproteino B-100 epitopo mimezinį peptidą, jo konkatemerus ir modifikuotus peptidus, gali sustabdyti atsiradusį nutukimą nesukeliant organizme autoimuniteto.

Todėl kraujotakos ligos, surištos su LDL gali būti gydomos šio išradimo vakcina efektyviau, palyginus su laikinu arba brangiai kainuojančiu įprastu būdu, kuriame inhibuojamas fermentas, surištas su cholesterolio metabolizmu.

Išradimas pateiktas aiškiai ir aprašytas su nuorodomis į jo specifinius pavyzdžius ir turi būti suprantamas šios srities specialistams, kad galimi įvairūs formos ir detalių pasikeitimai, kurie neišsina už išradimo esmės ir apimties ribų, pateikiamoje pridėtoje išradimo apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Sekos SEQ. ID. Nr. 1 apoliproteino B-100 epitopo mimezinis peptidas ir jo konkatemeras.
2. Mimezinio peptido konkatemeras pagal 1 punktą, kuriame minėtas konkatemeras apima nuo vieno (1) iki penkiolikos (15) minėtųjų mimezinių peptidų.
3. Mimezinio peptido konkatemeras pagal 1 punktą, kuriame minėtas konkatemeras apima nuosekliai sujungtus keturis (4) minėtuosius peptidus.
4. Mimezinis peptidas ir jo konkatemeras pagal 1 punktą, kuriame minėtojo mimezinio peptido aminorūgščių seka modifikuota būdu, parinktu iš grupės, susidedančios iš prijungimo, delecijos ir cheminio pakeitimo reakcijų.
5. Sekos SEQ. ID. Nr. 2 apoliproteino B-100 epitopo mimezinis peptidas.
6. Mimezinis peptidas pagal 5 punktą, kuriame minėtas konkatemeras apima nuo vieno (1) iki penkiolikos (15) minėtųjų mimezinių peptidų.
7. Mimezinio peptido pagal 5 punktą konkatemeras, kuriame minėtas konkatemeras apima nuosekliai sujungtus keturis (4) minėtuosius peptidus.
8. Mimezinis peptidas pagal 5 punktą, kuriame minėtojo mimezinio peptido aminorūgščių seka modifikuota būdu, parinktu iš grupės, susidedančios iš prijungimo, delecijos ir cheminio pakeitimo reakcijų.
9. Sekos SEQ. ID. Nr. 3 apoliproteino B-100 epitopo mimezinis peptidas.
10. Mimezinio peptido pagal 9 punktą konkatemeras, kuriame minėtas konkatemeras apima nuo vieno (1) iki penkiolikos (15) minėtųjų mimezinių peptidų.

11. Mimezinio peptido pagal 9 punktą konkatemeras, kuriame minėtas konkatemeras apima nuosekliai sujungtus keturis (4) minėtuosius peptidus.

12. Mimezinis peptidas pagal 9 punktą, kuriame minėtojo mimezinio peptido aminorūgščių seka modifikuota būdu, parinktu iš grupės, susidedančios iš prijungimo, delecijos ir cheminio pakeitimo reakcijų.

13. Vakcinų kompozicija, skirta gydyti nutukimą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji apima peptidą, parinktą iš grupės, susidedančios iš sekų SEQ. ID Nr. 1, SEQ. ID Nr. 2 ir SEQ. ID Nr. 3 apoliproteino B-100 epitopo mimezinių peptidų, jų konkaterų, jų modifikuotųjų peptidų ir jų mišinių.

14. Vakcinų kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta vakcinų kompozicija skiriama intrakutaniniu būdu.

15. Vakcinų kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos vakcinų kompozicijos tipas parinktas iš grupės, susidedančios iš tablečių, piliulių, granulių, oblečių, eliksyrų, suspensijų, emulsijų, tirpalų, sirupų, aerozolių, minkštųjų arba kietųjų želatinos kapsulių, sterilizuotųjų injekcinių tirpalų ir sterilizuotųjų miltelių.

16. Apoliproteino B-100 epitopo mimezinio peptido, jo konkatero ir jo modifikuotojo peptido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima

- i) pakopą, skirtą DNR, kuri koduoja sekų SEQ. ID Nr. 1, SEQ. ID Nr. 2 ir SEQ. ID Nr. 3 apoliproteino B-100 epitopo mimezinių peptidų, jų konkaterų, jų modifikuotųjų peptidų genetinę informaciją, įterpimui į vektorių;
- ii) pakopą, skirtą ląstelių-šeimininkių transformavimui su vektoriumi, gautu i) pakopoje ir jų inkubavimui;
- iii) pakopą, skirtą minėtojo apoliproteino B-100 epitopo mimezinio peptido, jo konkatero ir jo modifikuotojo peptido išskyrimui iš ląstelių-šeimininkių.

17. DNR, koduojanti polipeptidą, sudarytą iš SEQ. ID Nr. 1 apolipoproteino B-100 epitopo keturių (4) nuosekliai sujungtų mimezinių peptidų.

18. Ekspresijos vektorius, kuris apima DNR fragmentą, koduojantį polipeptidą, sudarytą iš SEQ. ID Nr. 1 apolipoproteino B-100 epitopo keturių (4) nuosekliai sujungtų mimezinių peptidų.

Sekų sąrašas

- <110> KIM, Hyo Joon
- 5 <120> Apolipoproteino B-100 epitopo mimeziniai peptidai, jų konkatemerai ir modifikuotieji peptidai, ir juos turinti vakcinos kompozicija
- <130> SJPA0103
- 10 <150> KR10-2000-0052055
<151> 2000-09-04
- <160> 16
- 15 <170> Kopatentln 1,71
- <210> 1
<211> 15
<212> PRT
- 20 <213> Dirbtinė seka
- <220>
<223> apolipoproteino B-100 mimezinis peptidas
- 25 <400> 1
Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe
1 5 10 15
- 30 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Dirbtinė seka
- 35 <220>
<223> apolipoproteino B-100 mimezinis peptidas

<400> 2

Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro

1 5 10 15

5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Dirbtinė seka

10

<220>

<223> apoliproteino B-100 mimezinis peptidas

<400> 3

15 Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu

1 5 10 15

<210> 4

20 <211> 23

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

25 <223> oligonukleotidas, skirtas BL arba LB kasetės konstravimui

<400> 4

tcgaccgtaa tggtcctcct atc

23

30 <210> 5

<211> 28

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

35 <220>

<223> oligonukleotidas, skirtas BL arba LB kasetės konstravimui

<400> 5 .

atcattgaag ataggaggaa cttacgg

28

5 <210> 6

<211> 29

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

10 <220>

<223> oligonukleotidas, skirtas LB kasetės konstravimui

<400> 6

ttcaatgatg ttattggat tgcattcta

29

15

<210> 7

<211> 24

<212> DNR

20 <213> Dirbtinė seka

<220>

<223> oligonukleotidas, skirtas LB kasetės konstravimui

25 <400> 7

agcttagaat gcaatccaat aaac

24

<210> 8

30 <211> 28

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

35 <223> oligonukleotidas, skirtas BL kasetės konstravimui

<400> 8

ttcaatgatg .tttattggat tgcattcc

28

<210> 9

5 <211> 23

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

10 <223> oligonukleotidas, skirtas BL kasetės konstravimui

<400> 9

tcgaggaatg caatccaata aac

23

15

<210> 10

<211> 24

<212> DNR

<213> Dirbtinė seka

20

<220>

<223> lyderio kasetės viršutinė vija

<400> 10

25 gatccgatga tgaatgacaag atcg

24

<210> 11

<211> 24

30 <212> DNR

<213> Dirbtinė seka

<220>

<223> lyderio kasetės apatinė vija

35

<400> 11

tcgacgatct tgatcatcatc atcg

24

<210> 12
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Dirbtinė seka

 <220>
 <223> enterikinazės skaldymo vieta
 10
 <400> 12
 Asp Asp Asp Asp Lys Ile
 1 5

 15
 <210> 13
 <211> 52
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
 20
 <220>
 <223> LB kasetės viršutinė vija

 <400> 13
 25 tcgaccgtaa tgttctcct atctcaatg atgtttattg gattgcattc ta 52

 <210> 14
 <211> 52
 30 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka

 <220>
 <223> LB kasetės apatinė vija
 35
 <400> 14
 agcttagaat gcaatccaat aaacatcatt gaagatagga ggaacattac gg 52

- <210> 15
 <211> 51
 5 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka

 <220>
 <223> BL kasetės viršutinė vija
 10
 <400> 15
 tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc c 51
- 15 <210> 16
 <211> 51
 <212> DNR
 <213> Dirbtinė seka
- 20 <220>
 <223> BL kasetės apatinė vija

 <400> 16
 tcgaggaatg caatccaata aacatcattg aagataggag gaacattacg g 51.

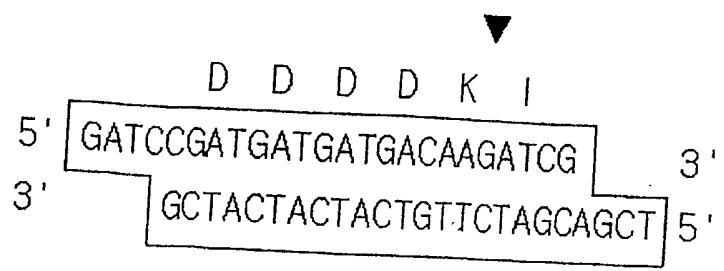


Fig. 1a

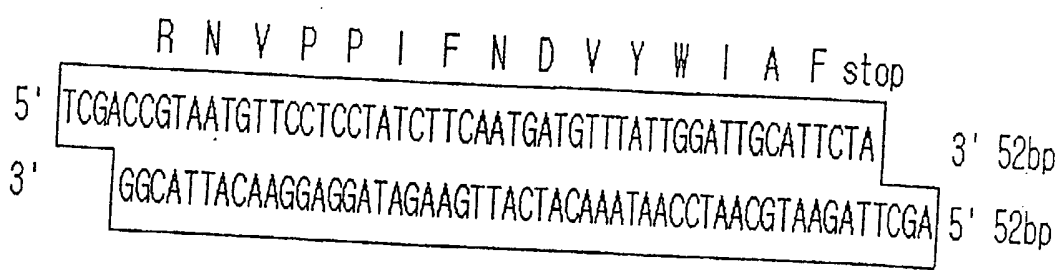


Fig. 1b

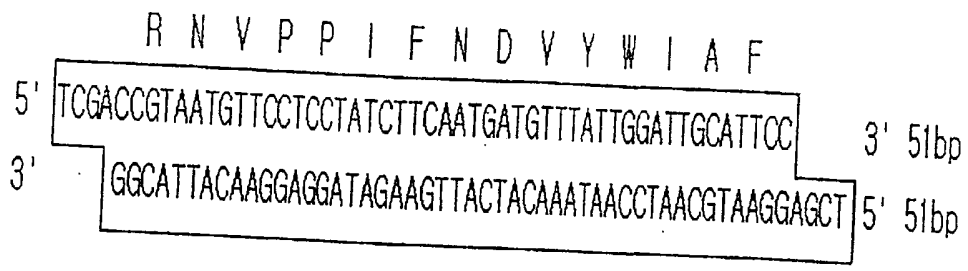


Fig. 1c

▼

HHHHH GS DDDDKI VD LD LD LD stop

His x6	Enterokinazės skaldymo vieta	BL	BL	BL	LB	
--------	------------------------------	----	----	----	----	--

Fig. 1d

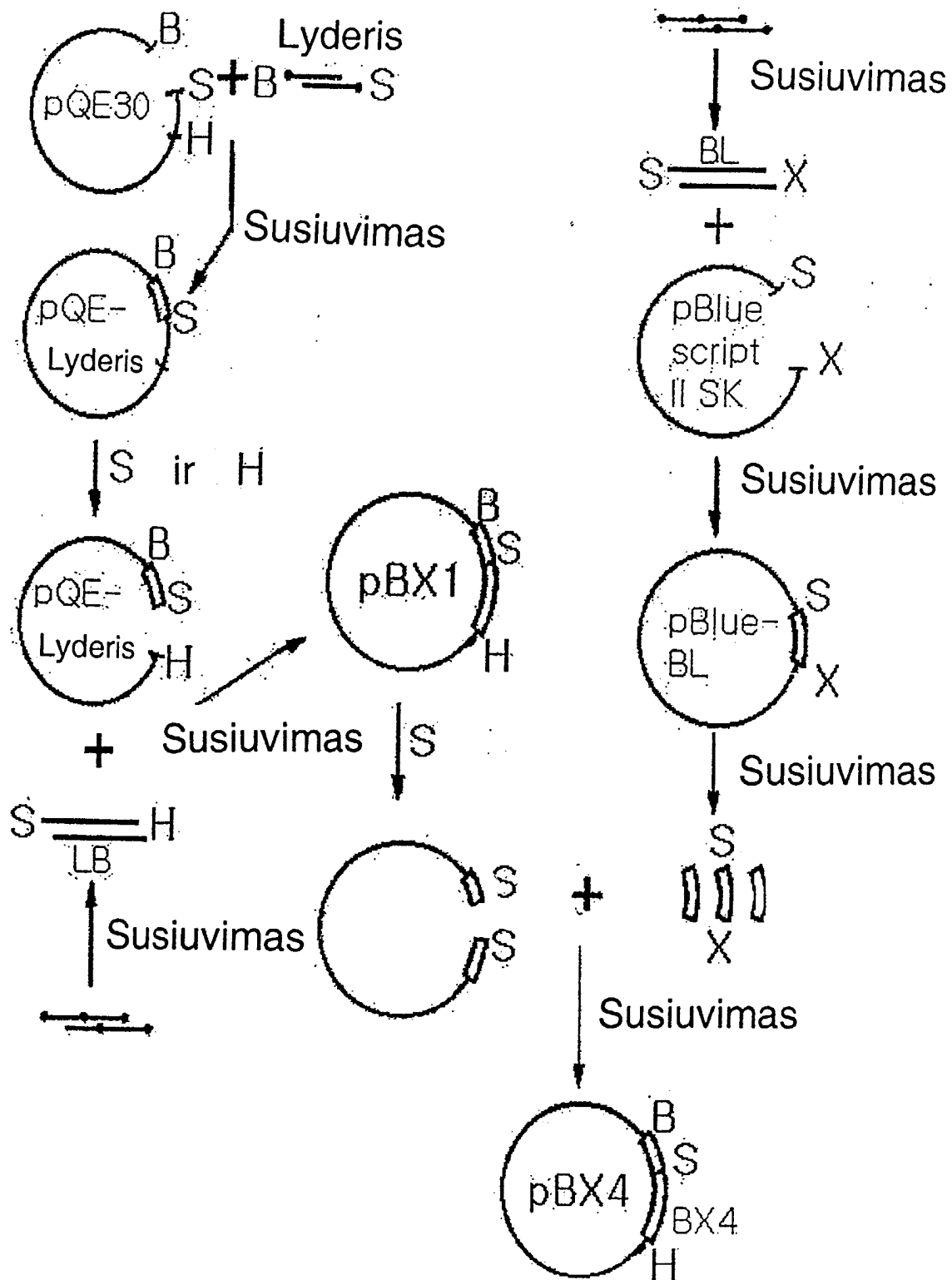


Fig. 2

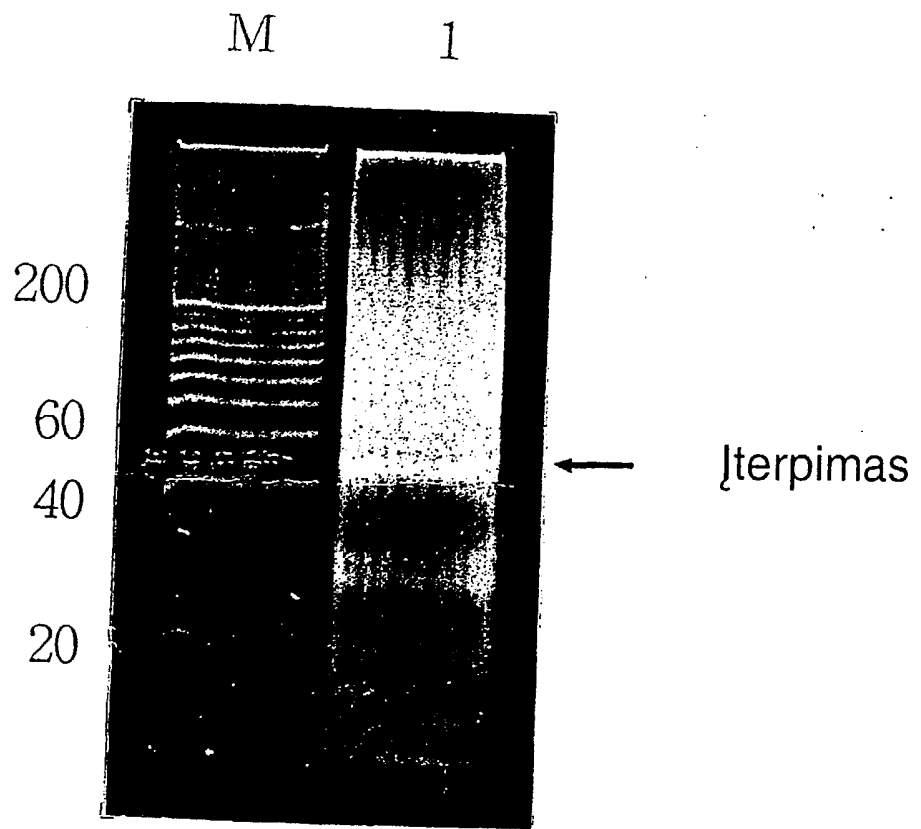


Fig. 3

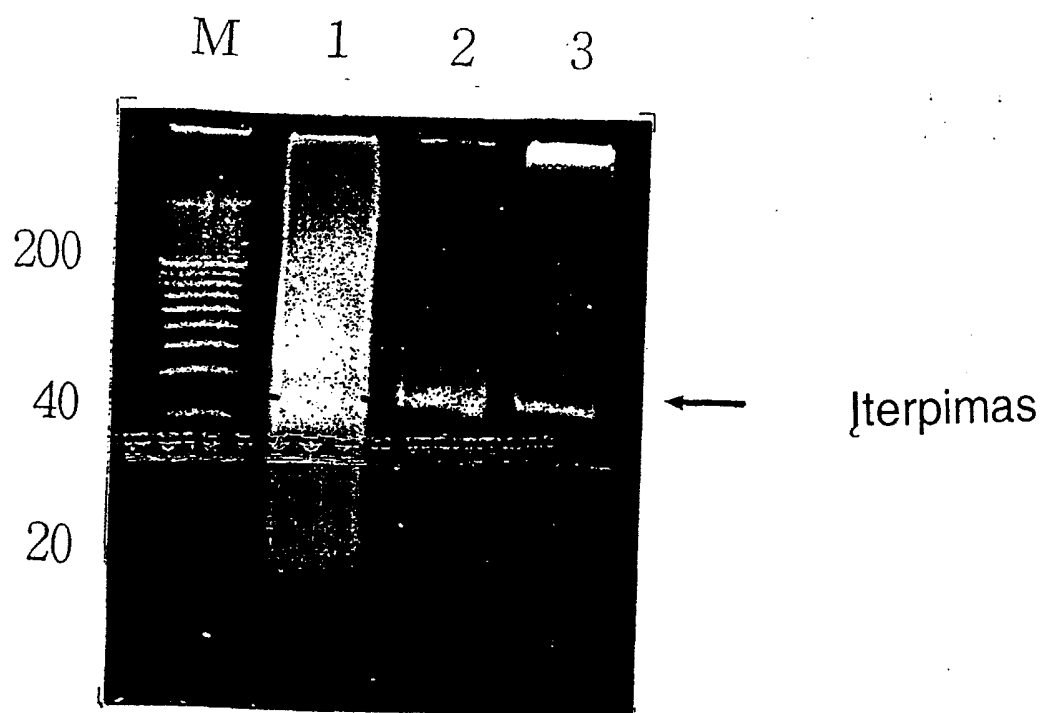


Fig. 4

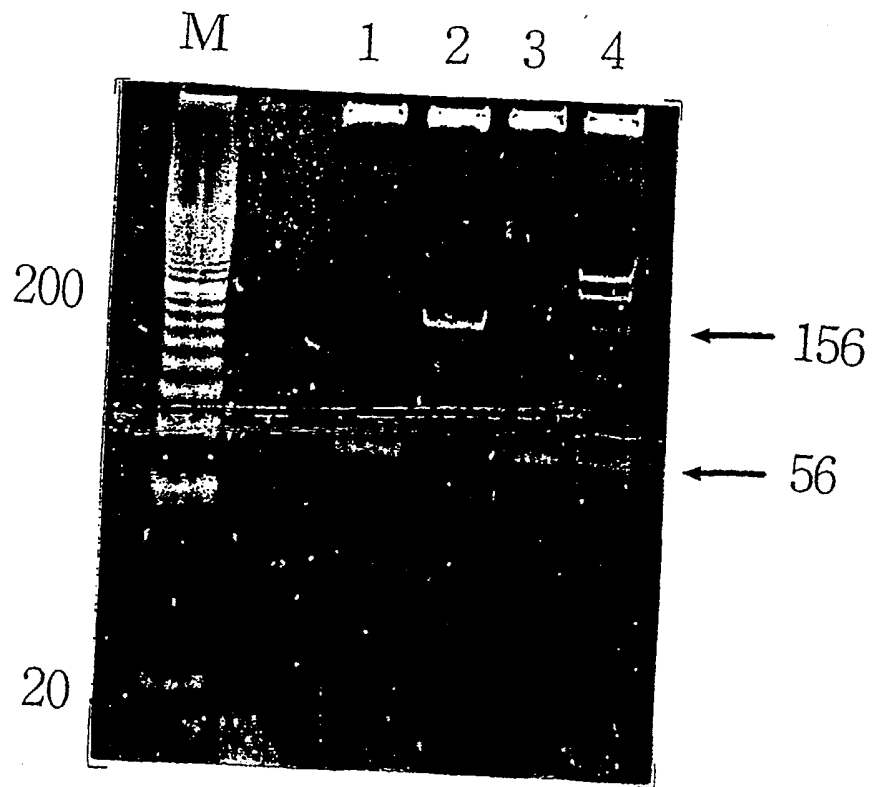


Fig. 5

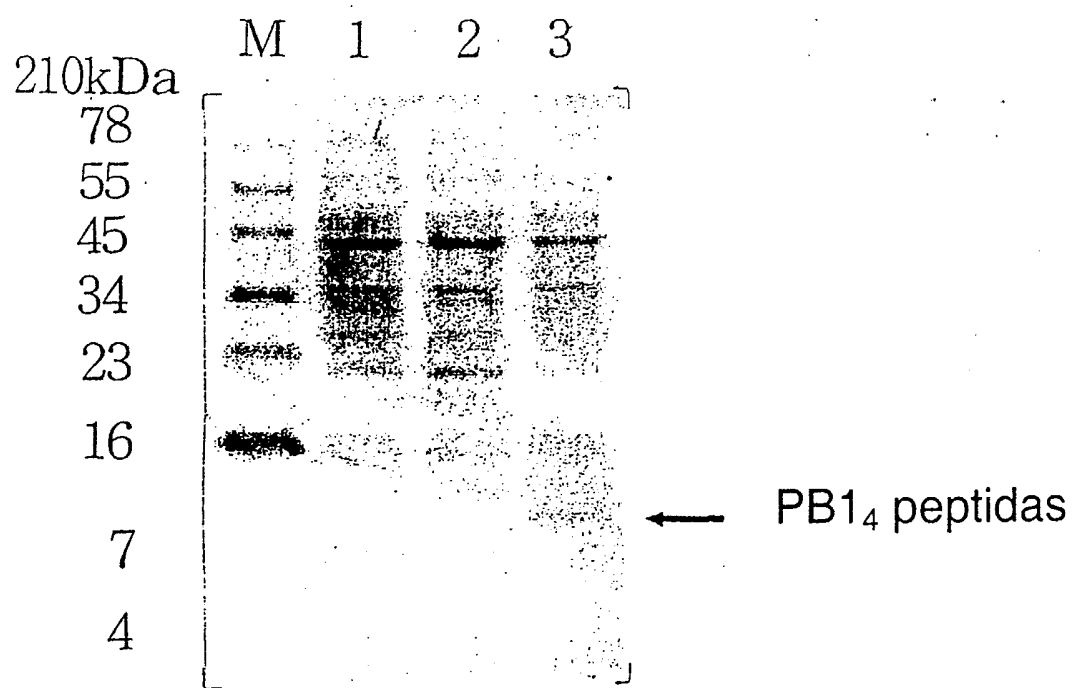


Fig. 6

7/12

A.

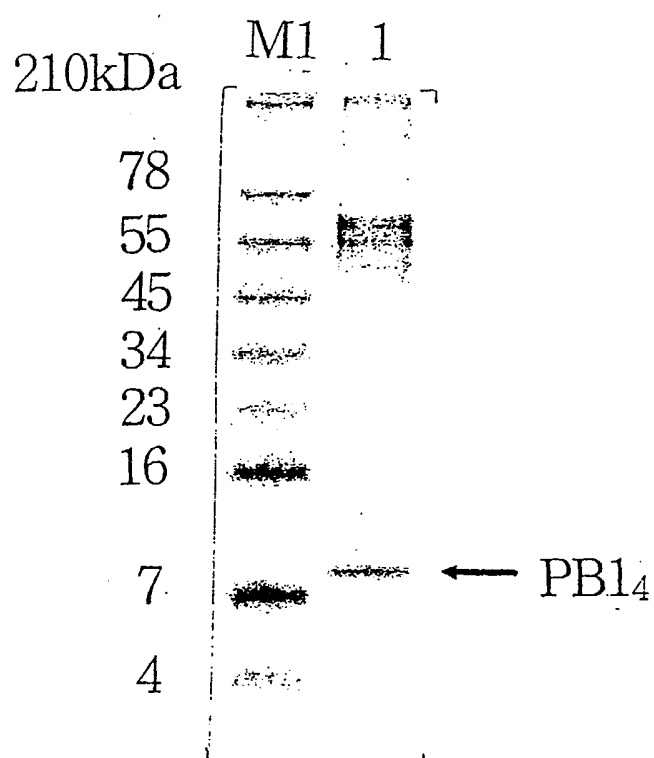


Fig. 7

B.

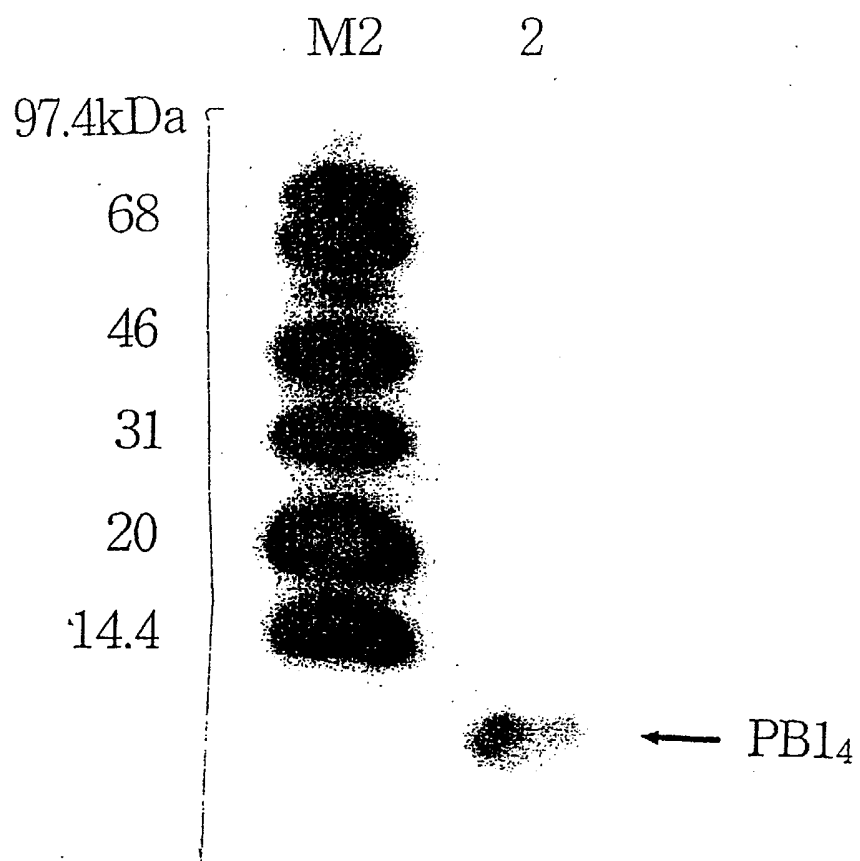


Fig. 8

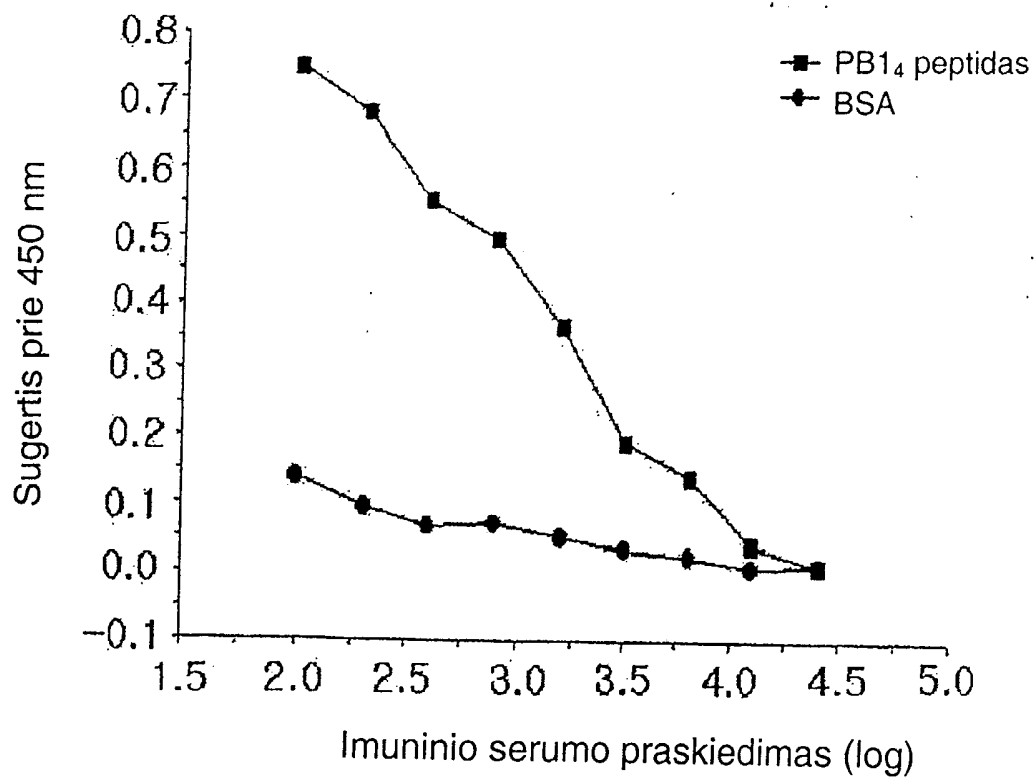


Fig. 9

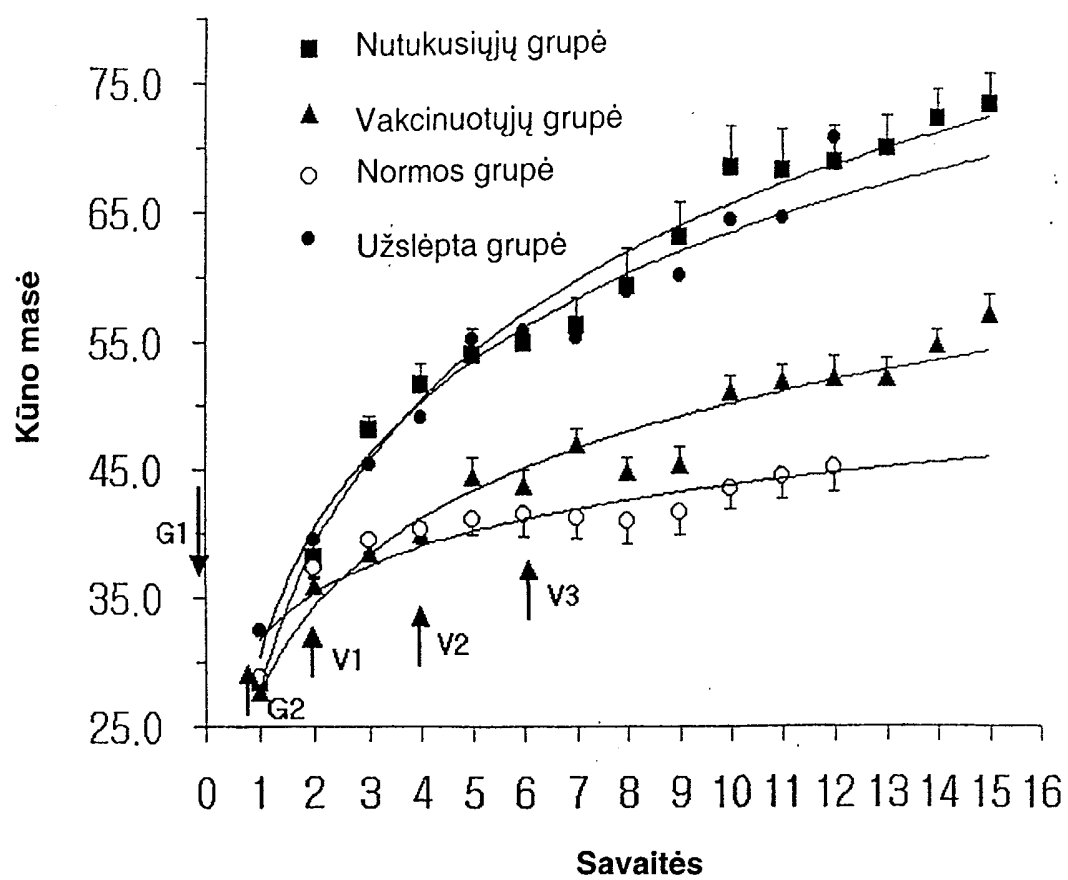


Fig. 10

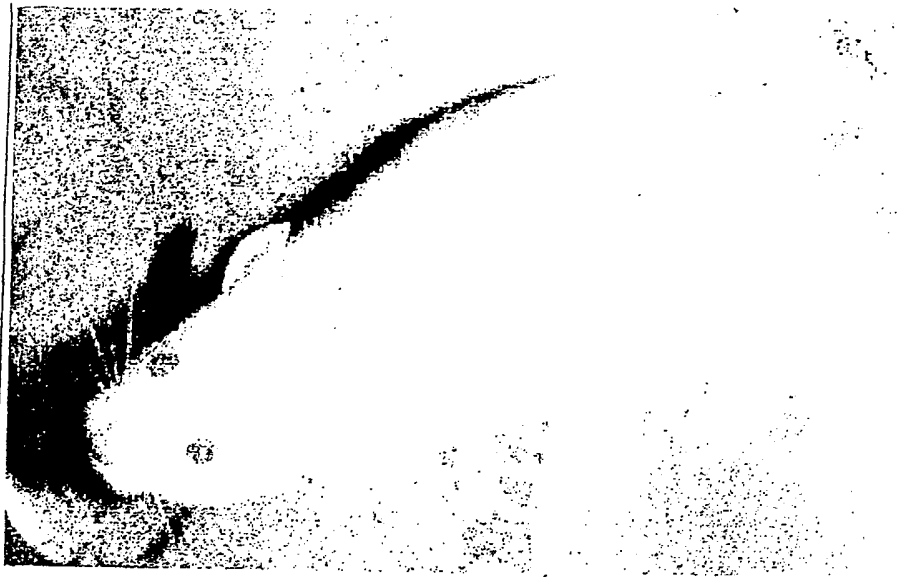


Fig. 11a



Fig. 11b

12/12

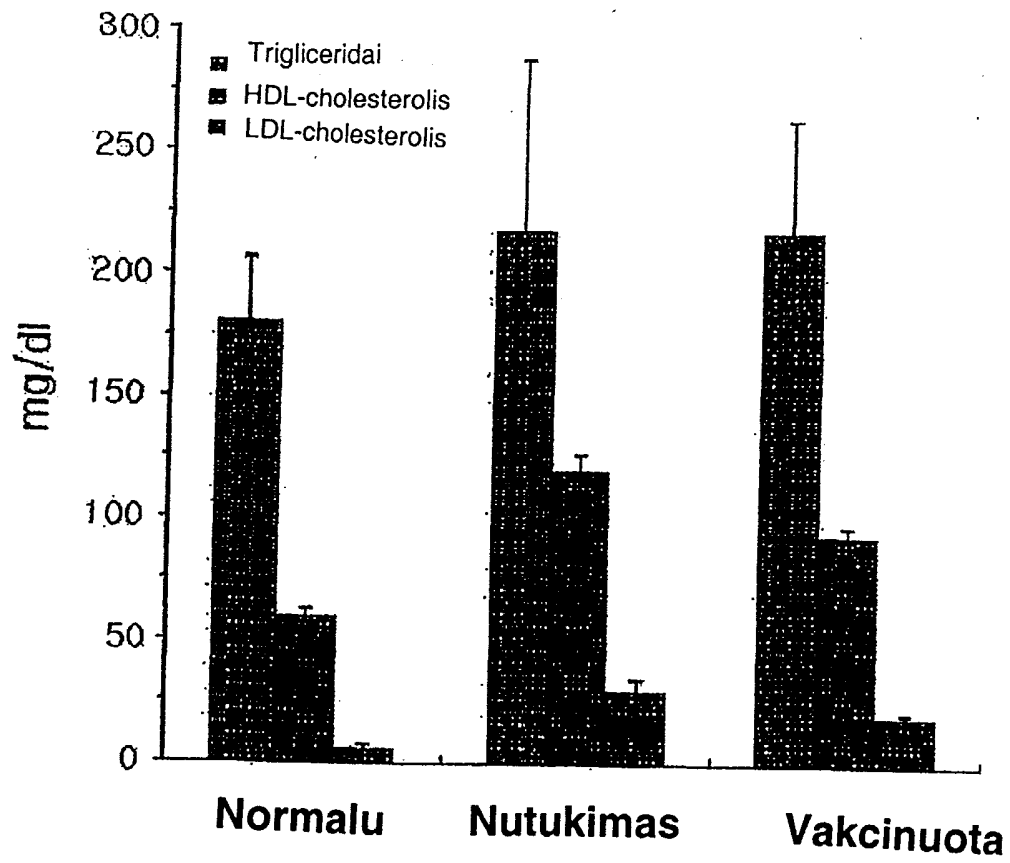


Fig. 12