

(19)



(10) **LT 2012 099 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2012 099**

(51) Int. Cl. (2014.01): **C12N 15/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2012 10 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2014 04 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(71) Pareiškėjas:

**UAB Biotechnologinės farmacijos centras „Biotechpharma“, Mokslininkų g. 4,
LT-08412 Vilnius, LT**

(72) Išradėjas:

**Vladas Algirdas BUMELIS, LT
Henrika PESLIAKAS, LT
Saulė SŪDŽIUVIENĖ, LT
Nerijus MAKASKAS, LT
Lina PUKAITĖ, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovich, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Rekombinantinio žmogaus onkostatino M baltymo paruošimo ir gryninimo
būdas**

(57) Referatas:

Išradimas susijęs su imunomodulatoriniu baltymu, naudinga kaip antivirusinė ir priešvėžinė priemonė. Pirmiausia išradimas susijęs su genu, koduojančiu subrendusį natūralųjį OSM baltymą. Taip pat šis išradimas susijęs su minėto geno įterpimu į tinkamą šeimininką, rekombinantinės kamieno kultūros gavimu ir heterologinio polipeptido raiškos stimuliavimu bei jo kaupimu netirpiuose tarpiniuose kūneliuose. Išradime numatomas OSMnat gamybos ir gryninimo būdas. Konkrečiai, išradimas susijęs su žmogaus subrendusio onkostatino M baltymo paruošimu, naudojant atitinkamą geną, įterptą į rekombinantinį *Escherichia coli* kamieną, su minėto baltymo išskyrimu ir gryninimu iš netirpios bakterinės kamieno frakcijos, didinant tirpumą, oksiduojant ir apdorojant chromatografiškai. Išskirto baltymo preparatas paruošiamas taip, kad būtų stabilus.

REKOMBINANTINIO ŽMOGAUS ONKOSTATINO M BALTYMO PARUOŠIMO IR GRYNINIMO BŪDAS

5 Išradimo sritis

Išradimas yra susijęs su imunomoduliatoriniu baltymu, kuris gali būti naudingas kaip antivirusinė ir priešnavikinė priemonė. Būtent, atskleidžiamas žmogaus subrendusio onkostatino M baltymo paruošimo ir gryninimo būdas, naudojant atitinkamą geną, įterptą į rekombinantinį *Escherichia coli* kamieną, produkuojantį N-metionilintą subrendusio baltymo formą. Išradimas taip pat susijęs su minėto baltymo išskyrimu ir gryninimu iš netirpios frakcijos, tirpinant, oksiduojant ir gryninant chromatografiškai. Siekama gauti stabilų išskirto baltymo preparatą.

Išradimo technikos lygis

- 15 Onkostatinas M (OSM) pirmą kartą identifiukuotas kaip polipeptidinis citokinas, slopinantis melanomos ir kitų solidinių navikų ląstelių augimą *in vitro*. OSM pirmine aminorūgščių seka ir numatoma antrine struktūra labai panašus į leukemijos inhibicijos faktorių (LIF), ciliarinį neurotrofininį faktorių (CNTF), granulocitų kolonijas stimuliuojantį faktorių (G-CSF), interleukiną 6 (IL-6) ir interleukiną 11 (IL-11). Šiuos baltymus koduojančių genų analizė
- 20 atskleidžia bendrą egzono struktūrą, nurodančią į evoliucinę kilmę iš bendro protėvinio geno. Dabartiniai duomenys rodo, kad kai kurie OSM *in vitro* poveikiai taip pat sutampa su kitų šios citokinių šeimos atstovų. Iš dalies sutampantys biologiniai poveikiai gali būti paaiškinami receptorių subvienetų bendrumu [Bruce A.G., Linsley P.S., Rose T.M. Oncostatin M. *Prog. Growth Factor Res.* 1992; 4 (2): 157–70].
- 25 Žmogaus OSM forma pirmą kartą buvo išskirta 1986 m. iš PMA apdorotų U-937 histiocitinės limfomos ląstelių auginimo terpių dėl galimybės slopinti ląstelių linijų, išvestų iš melanomų ar kitų solidinių navikų, augimą [Zarling J. M., Shoyab M., Marquardt H., Hanson M. B., Lioubin M. N., Todaro G. J. (1986 m. gruodžio mėn.). „Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83** (24): 9739–43]].
- 30 Pilnavertis baltymas OSM yra stabilus pH esant tarp 2 ir 11 ir atsparus vienos valandos kaitinimui 56 °C temperatūroje. Dalinė aminorūgščių seka leido išskirti žmogaus OSM kDNR ir tuomet gauti genominius klonus [Malik N., Kallestad J. C., Gunderson N. L., Austin S. D., Neubauer M. G., Ochs V., Marquardt H., Zarling J. M., Shoyab M., Wei C. M. (1989 m. liepos mėn.). „Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M“. *Mol. Cell. Biol.* **9** (7): 2847–53]. Visas hOSM kDNR klonas koduoja 252 aminorūgščių pirmtaką, kurio pirmosios 25 aminorūgštys veikia kaip signalinis sekrecijos peptidas, kurį pašalinus išskiriamas tirpus 227 aminorūgščių pro-OSM baltymas. Paskutiniųjų

31-os C-galinių aminorūgščių liekanų nuskėlimas ties tripsino atpažinimo seka suformuoja visiškai aktyvią 196 liekanų formą. hOSM yra dvi potencialios N-glikozilinimo vietos, abi išliekančios subrendusioje formoje [Linsley P. S., Kallestad J., Ochs V., Neubauer M. (1990 m. gegužės mėn.). „Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M“. *Mol. Cell. Biol.* **10** (5): 1882–90). Malik N., Graves D., Shoyab M., Purchio A. F. (1992 m.). „Amplification and expression of heterologous oncostatin M in Chinese hamster ovary cells“. *DNA Cell Biol.* **11** (6): 453–9].

196 a.r. OSM yra dominuojanti forma, išskirta iš daugybės ląstelių linijų, ir atitinka 28 kDa molekulinės masės glikoproteiną, nors didesnė 227 aminorūgščių pro-OSM forma gali būti išskirta iš transfekuotų ląstelių. Nors pro-OSM efektyvumas augimo slopinimo tyrimuose eile mažesnis, jis pasižymi panašiu jungimosi prie ląstelių giminiškumuradioligandų surišimo tyrimuose [Malik N., Graves D., Shoyab M., Purchio A. F. (1992 m.). „Amplification and expression of heterologous oncostatin M in Chinese hamster ovary cells“. **11** (6): 453–9].

Vadinasi, potransliacinis apdorojimas gali turėti didelę įtaką OSM funkcijai *in vivo*. Kaip daugelį citokinų, OSM ląstelės gamina *de novo* sinteze, po kurios jis yra atpalaiduojamas klasikiniu sekrecijos keliu. Tačiau OSM gali būti atpalaiduojamas ir iš polimorfonuklearinių leukocitų susiformavusių saugyklų degranuliacijos metu [Grenier A., Dehoux M., Boutten A., Arce-Vicioso M., Durand G., Gougerot-Pocidalo M. A., Chollet-Martin S. (1999 m. vasario mėn.). „Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils“. *Blood* **93** (4): 1413–21].

Vis dar išlieka neaišku, kaip OSM yra nukreipiamas į šias viduląstelines ertmes. Tinkamiausios rekombinantiniam žmogaus OSM gaminti ląstelės šeimininkės yra *Escherichia coli*, iš kurių rekombinantinis onkostatinas (OSM) buvo išskirtas, išgrynintas, apibūdintas ir kurių gaminamo rmetHuOSM taikymas buvo pripažintas piktybinių susirgimų, dažnai siejamų su neutropeninėmis infekcijomis gydymui, pvz., krūties vėžio, limfomos ir leukemijos [Bruce A.G., Linsley P.S., Rose T.M. Oncostatin M. *Prog. Growth Factor Res.* 1992; **4** (2): 157–70]. Yra žinoma eilė rekombinantinio OSM iš *E. coli* sintezės, išskyrimo ir gryninimo būdų. Siekiant masiškai gaminti ir naudoti klinikinėje aplinkoje, reikalingos efektyvios baltymų gryninimo procedūros, pašalinant šeimininko DNR ir priemaišas, kad žmonėms skiriamas baltymas atitiktų būtinus reikalavimus, kartu nesumažinant jo biologinio aktyvumo. Atitinkamai, buvo sukurti chromatografiniai OSM gryninimo procesai ir jų deriniai. Yra itin reikalingas toks rekombinantinio bakterinio producento kamienas, kuris galėtų prisitaikyti prie skirtingų terpių ir kultivavimo temperatūrų. Kamieno mutacijos, atsakingos už disulfidinių tiltelių formavimąsi ir taisyklingą baltymo susivyniojimą, gali būti reguliuojamos, pridėdant antrinių antibiotikų ir parenkant kultivavimo

temperatūrą. Taip sukurtas kamienas leistų gauti tiek netirpią tiek tirpią baltymo formą. Svarbu, kad gryninimo etapas būtų spartus, apimantis vienos stadijos chromatografiją.

Jei nenurodyta kitaip, išradime minimi įprasti chemijos, molekulinės biologijos, ląstelės biologijos, mikrobiologijos, rekombinantinės DNR ir imunologijos metodai, akivaizdūs eiliniam šios srities specialistui. Šie metodai žinomi iš literatūros.

Santrumpa "rmetHuOSM" apibrėžia baltymą, gaminamą mikroorganizmo, transformuoto hOSM genu, arba šio modifikacija, kuri koduoja baltymą, kurio a) aminorūgščių seka bent iš esmės yra identiška natyvaus žmogaus rmetHuOSM aminorūgščių sekai, ir b) fizikinės ir cheminės savybės yra identiškos natyvaus žmogaus OSM.

"Iš esmės identiška aminorūgščių seka" reiškia, kad sekos yra identiškos arba skiriasi viena ar daugiau konservatyvių aminorūgščių mutacijomis arba pakitimais (t. y. delecijomis, intarpais, pakeitimais), nesukeliančiomis nepalankaus funkcinio skirtumo tarp sintetinio baltymo ir natyvaus žmogaus OSM.

"Konservatyvia mutacija" čia vadinamos aminorūgščių liekanų mutacijos, kurios, palyginti su nurodyta aminorūgščių liekana, yra konservatyvios aminorūgščių savybių atžvilgiu. Aminorūgščių savybės apima liekanos dydį, hidrofobiškumą, poliškumą, krūvį, pK vertę ir kitas šioje srityje žinomas savybes.

Šiame aprašyme "rmetHuOSM gaminantis mikroorganizmas" yra genų inžinerijos būdu sukonstruotas mikroorganizmas, sukurtas gaminti baltymą, pasižymintį biologiniu aktyvumu siejamu su žmogaus OSM. rmetHuOSM gaminantis mikroorganizmas gali būti sukuriamas įvedant OSM koduojančią nukleorūgšties molekulę. Tinkama OSM koduojanti seka gali būti raiškos vektoriaus dalis. Pageidautina, kad OSM seka būtų kodonu modifikuota OSM seka, apibūdinama šiame aprašyme.

25 Raiškos vektorius

Terminais "plazmidė", "vektorinė sistema" ar "raiškos vektorius" čia vadinamas konstruktas, galintis vykdyti ekspresiją *in vivo* arba *in vitro*. Siūlomo išradimo kontekste šie konstruktai gali būti naudojami rekombinantinių genų įvedimui į ląsteles šeimininkes.

Pageidautina, kad raiškos vektorius būtų įterptas į tinkamo šeimininko organizmo genomą.

Terminas "įterptas" visų pirma apima stabilų įjungimą į genomą.

Aprašytos nukleotidų sekos, įskaitant šio išradimo nukleotidų seką, gali būti vektoriuje, kuriame nukleotidų seka yra funkciškai susieta su reguliacinėmis sekomis, galinčiomis užtikrinti tinkamo organizmo šeimininko nukleotidų sekos ekspresiją.

Išradime naudojami vektoriai gali būti transformuojami į tinkamo šeimininko ląstelę, kaip apibūdinama toliau, kad būtų užtikrinta šio išradimo polipeptido raiška.

Vektoriaus, pvz., plazmidės, kosmidės ar faginio vektoriaus pasirinkimas dažnai priklausys nuo ląstelės šeimininkės, į kurią jis bus įvedamas. Tinkami vektoriai apima pET21a+, pUC57/T ir pT7a.

5 Šiame išradime naudojami vektoriai gali turėti vieną ar daugiau atrankinių genų, pavyzdžiui, geną, suteikiantį atsparumą antibiotikui, tokiam kaip ampicilinas, kanamicinas, chloramfenikolis ar tetraciklinas. Taip pat atranka gali būti atlikta naudojant kotransformaciją. Vektoriai gali būti naudojami *in vitro*, pvz., gaminant RNR, arba naudojami siekiant transfekuoti, transformuoti, transdukuoti arba infekuoti ląstelę šeimininkę.

10 Išradimui įgyvendinti siūlomas būdas, kaip gauti šio išradimo nukleotidų sekas įvedant nukleotidų seką į replikuojamą vektorių, įvedant vektorių į tinkamo šeimininko ląstelę ir auginant ląstelę šeimininkę vektoriaus replikaciją sukeliančiomis sąlygomis.

Vektorius gali papildomai turėti nukleotidų seką, leidžiančią jam replikuotis atitinkamoje ląstelėje šeimininkėje. Tokių sekų pavyzdžiai yra plazmidžių pUC19, pACYC177, pUBHO, pE194, pAMBI, pIJ702 ir pETI I replikacijos pradžios taškai.

15

Reguliacinės sekos

Kai kuriais atvejais išradime naudojama nukleotidų seka yra funkciškai susijusi su reguliacine seka, galinčia užtikrinti nukleotidų sekos raišką, pvz., pasirinktoje ląstelėje šeimininkėje. Pavyzdžiui, išradimas apima vektorių, turintį šio išradimo nukleotidų seką, funkciškai susietą su reguliacine seka, t. y. vektorius yra raiškos vektorius.

20

Terminas "funkciškai susijusi" nurodo, kad greta esantys aprašyti komponentai yra sujungti su galimybe funkcionuoti kaip jiems būdinga. Reguliacinė seka, funkciškai susijusi su koduojančia seka, yra sujungta taip, kad koduojančios sekos raiška pasiekama kontroliuojančioms sekoms tinkamomis sąlygomis.

25

Terminas "reguliacinės sekos" apima promotorius, stipriklius ir kitus raiškos reguliacijos signalus. Terminas "promotorius" vartojamas įprasta šioje srityje reikšme, pvz., RNR polimerazės jungimosi vieta.

30

Nukleotidų sekos, koduojančios OSM pagal išradimą, sustiprinta raiška gali būti taip pat pasiekama pasirenkant heterologines reguliacines sritis, pvz., promotoriaus, sekrecijos lyderinę ar terminatoriaus sritis.

Optimaliai šio išradimo nukleotidų seka yra funkciškai susijusi bent su promotoriumi.

Tinkamų promotorių, skirtų nukleotidų sekos transkripcijai tinkamose bakterijų ląstelėse šeimininkėse valdyti, pavyzdžiai šioje srityje yra gerai žinomi.

35

Ląstelės šeimininkės

Terminas „ląstelė šeimininkė“ šio išradimo kontekste apima bet kokią ląstelę, turinčią arba aukščiau aprašytą nukleotidų seką, arba aukščiau aprašytą raiškos vektorių ir naudojamą produkto, turinčio specifines šiame išradimo aprašyme apibūdintas specifines savybes, gamyboje genų inžinerijos būdu.

Šio išradimo įgyvendinimas numato ląstelės šeimininkės, transformuotos ar transfekuotos nukleotidų seka, ekspresuojančią OSM, kaip aprašoma išradime. Ląstelės pasirenkamos tokios, kad būtų suderinamos su minėtu vektoriumi; tai gali būti, pavyzdžiui, prokariotų (pvz., bakterinės), grybų, mielių ar augalų ląstelės. Optimaliai ląstelės šeimininkės yra prokariotų ląstelės. Tinkamų bakterinių šeimininkų organizmų pavyzdžiai yra gramteigiamų arba gramneigiamų bakterijų rūšys.

Ląstelės šeimininkės genotipas gali būti modifikuotas siekiant pagerinti ekspresiją. Ląstelių šeimininkių modifikacijų pavyzdžiai apima proteazių delecijas, papildymą retomis tRNR ir citoplazmos redukuojančio potencialo modifikaciją, siekiant palengvinti disulfidinių ryšių formavimąsi.

Pavyzdžiui, ląstelė šeimininkė *E. coli* gali ekspresuoti retų tRNR perteklių, kad būtų pagerinama heterologinių baltymų, apibūdintų Kane [Curr. Opin. Biotechnol. (1995 m.), 6, 494–500 „Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*“], raiška. Ląstelėje šeimininkėje gali trūkti kelių redukuojančių fermentų, dėl ko susidarytų palankesnės sąlygos formuoti stabiliems disulfidiniams ryšiams, kaip nurodo Bessette [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999 m.), 96, 13703–13708 „Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm“].

Tinkamos bakterinės ląstelės šeimininkės yra *E. coli*. Tinkami *E. coli* kamienai yra *Rosetta gami-2*, *JMI09* ir *K802*, kaip aprašoma toliau.

Gryninimas

„Išskirtas“ ir/arba „išgrynintas“ reiškia, kad OSM baltymas yra santykinai grynas, t.y., mažiausiai apie 90 %, arba mažiausiai apie 95 % arba mažiausiai apie 98 % grynumo.

Taikant šį išradimą gali būti naudojamos įvairios išskyrimo terpės.

Gali būti naudojamos įvairios gelfiltracijos kolonėlės, pasirenkamos iš grupės, kurią sudaro: Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-75, Sephacryl S-200HR, Sephacryl S-100HR, Superose 12, Superose 6, Superdex 75, TSKgel G-2500PW, TSK gel G-3000 PW, Bio-Gel P-60, Bio-Gel P-100 ir kitos. Pageidautina naudoti Sephadex G-25.

Gali būti naudojamos įvairios katijonų mainų chromatografijos kolonėlės, pasirenkamos iš grupės, kurią sudaro: SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, CM Sepharose FF, TSK gel SP-5PW, TSK gel SP-5PW-HR, Toyopearl SP-650M, Toyopearl SP-650S, Toyopearl SP-650C,

Toyopearl CM-650M, Toyopearl CM-650S, Macro-Prep High S kolonėlė, Macro-Prep S kolonėlė, Macro-Prep CM kolonėlė ir t. t.

Išradimo esmė

- 5 Pagrindinis išradimo objektas - rekombinantinio žmogaus onkostatino M baltymo (OSMnat) paruošimo ir gryninimo būdas, apimantis stadijas, kuriose:
 - kultivuoja rekombinantines bakterijas *Escherichia coli*, turinčias OSMnat geną;
 - augina minėtas rekombinantines bakterijas *Escherichia coli* sudėtinėje mitybinėje terpėje, kad būtų gaminamas OSMnat baltymas;
- 10 - išskiria ir grynina rekombinantinį OSMnat baltymą iš intarpinių kūnelių arba tirpiųjų baltymų frakcijos.

Minėtas OSMnat genas apima SEQ ID Nr. 1.

- 15 Pagal siūlomą būdą minėtas rekombinantines bakterijas *Escherichia coli*, turinčias OSMnat geną, kultivuoja amplifikuojant minėtą geną ir klonuoja minėtą amplifikuotą modifikuotą OSMnat geną į tarpinį arba raiškos vektorių, amplifikuojant ir išskiriant OSMnat geną iš minėto klonuoto vektoriaus, ir transformuoja minėtą raiškos vektorių į bakterijas *Escherichia coli*, kur *Escherichia coli* yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* K802 ir *Escherichia coli* Rosetta gami-2.
- 20 Bakterija *Escherichia coli*, šeimininkės bakterijos padermės atžvilgiu, optimaliai yra atspari antibiotikams, pavyzdžiui, ampicilinui, kanamicinui, chloramfenikoliui ir tetraciklinui.
Tinkamas vektorius yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš pET21a+, pT7a, pJET1.2blunt, pQE-T7, optimaliai pET21a+.
- 25 Pagal išradimą OSMnat genas yra klonuotas į pET21a+ vektorių už ankstyvojo bakteriofago T7 promotoriaus, laikant kad genas yra atvirojo skaitymo rėmelyje nuo promotoriaus, o *lac* operonas prieš T7 promotorių, ir konstrukto, kuriame yra OSMnat genas, raiška yra griežtai kontroliuojama ir nutraukiama T7 terminatoriumi.
- 30 Mitybinė terpė yra pasirinkta iš sudėtinių terpių, tokių kaip LB, YPD, TB, M9 arba M9m, kur mitybinė terpė apima vieną arba daugiau azoto šaltinių, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro amonio druskos, nitratai, triptonas, mielių ekstraktas ir amonio hidroksidas, ir anglies šaltinį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš glicerolio, gliukozės, fruktozės ir panašiai, pageidautina gliukozės.

Biomasės dalis sudėtinėje terpėje yra intervale nuo 2 iki 15 g/l, pageidautina 5–7 g/l, skaičiuojant pagal drėgnų ląstelių svorį, ir minėtos mitybinės terpės parametrus palaiko tokius: a) pH yra nuo 3,0 iki 8,0, pageidautina nuo 6,0 iki 6,8 esant sudėtinei terpei, b) temperatūra intervale nuo 25 iki 45 °C, pageidautina nuo 37 iki 42 °C, ir c) ištirpęs deguonis – 20–80 % įsotinimo, pageidautina 20–40 %; ir minėtas kultivavimas tęsiamas nuo 4 iki 10 valandų, pageidautina 6 valandas.

Rekombinantinio OSMnat baltymo raiška yra indukuojama pasiekus atitinkamą biomasės dalį, naudojant tinkamą *lac* operono induktorių, tokį kaip laktoze ir panašiai, optimaliai IPTG 0,1 - 1 mM koncentracijos, pageidautina 0,25 mM koncentracijos.

10

Išradimo įgyvendinimo variantai apima OSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM produkuojančių mikroorganizmų būdą, apimančį tokias stadijas: a) mikroorganizmų lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra OSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos ląstelių medžiagos; b) OSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; c) OSM oksidavimą esant oksiduojančio / redukuojančio agento porai; d) tirpalo chromatografiją; e) išgryninto OSM išskyrimą.

15

Optimaliai OSM yra rekombinantinis metionilintas žmogaus onkostatinas M (rmetHuOSM).

Viename optimalių išradimo įgyvendinimo variantų oksiduojančio/redukuojančio agento pora yra oksiduojančio/redukuojančio glutationo sistema, kur molinis oksiduojančio ir redukuojančio glutationo santykis yra nuo 1:5 iki 1:20, optimaliai 1:20.

20

c) stadijoje OSM iš netirpios frakcijos gali būti tirpinamas naudojant chaotropinę medžiagą, pageidautina vidutinės koncentracijos chaotropinę medžiagą, pH esant 8,00-9,00.

Išradimo būdo įgyvendinimo variantas papildomai apima persivyniojusio OSM atskyrimą nuo chaotropo, kur korektiškai persivyniojęs OSM atskiriamas nuo chaotropo gelfiltracijos būdu, optimaliai naudojant gelfiltracinę kolonėlę *Sephadex G-25*.

25

d) stadijos chromatografija optimaliai yra vienos stadijos chromatografinis gryninimas, geriausiai vienos stadijos jonų mainų chromatografija.

Išradimo būdo b) stadijos tirpinimui gali būti naudojamas guanidino hidrokloridas, kurio koncentracija yra nuo 3,0 iki 7,0 M, optimaliai 6,0 – 6,2 M.

Išradimo būdo d) stadija atlieka *CM-Sepharose* arba *SP-Sepharose* kolonėlėje, optimaliai pH esant nuo 5,2 iki 5,6.

30

rmetHuOSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM produkuojančio mikroorganizmo būdas pagal išradimą apima tokias stadijas: a) mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra rmetHuOSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos medžiagos; b) rmetHuOSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; c) rmetHuOSM oksidavimą naudojant oksiduojantį glutationą

35

esant redukuojančio glutationo; d) korektiškai persivyniojusio rmetHuOSM atskyrimą nuo chaotropinės medžiagos; e) vienos stadijos chromatografinį rmetHuOSM gryninimą.

Vienas svarbiausių išradimo objektų yra išgryninto OSM baltymo preparatas, gautas išradime siūlomu būdu.

5

Trumpas brėžinių aprašymas:

Rekombinantinio žmogaus onkostatino M baltymo gavimas yra iliustruotas Fig. 1-9:

Fig. 1 - raiškos vektoriaus žemėlapis. Pateikiamas vektorius – plazmidė pET21a+ su onkostatino M genu, įterptu per NdeI ir HindIII restrikcijos endonukleazės taikinius.

10 Fig. 2 - rekombinantinio žmogaus metionilinto onkostatino M geno seka ir jos transliavimas į polipeptidinę grandinę. Fig. 2 taip pat atvaizduoja ir baltymo aminorūgščių seka.

Fig. 3 parodo trijų *E.coli* kamienų raiškos palyginimus, gautus atliekant NDS-PAAG ir Western blot tyrimus. Galima matyti, kad *E.coli* K802 ir BL21(DE3) kamienuose OSM geno raiška yra itin žema ir stebima tik WB metodu, o *Rosetta gami-2* kamienne – pastebima abiem
15 metodais. Baltymų molekulinio svorio markerio žymės NDS-PAAG geliuose ir Western blot membranose atitinka 10; 15; 25; 35; 40; 55; 70; 100; (130; 170) kDa.

Fig. 4 iliustruoja parametrus iš kontroliuojamo *E.coli* *Rosetta gami-2*/pET21a+/OSM kamieno auginimo 3L bioreaktoriuje modifikuotoje M9 terpėje. Pateikiami parametrai stebimi tiesiogiai bioreaktoriuje (temperatūra, įsotinimas deguonimi, maišymo greitis, pH ir oro srautas) ir/arba
20 matuojami periodiškai – optinis tankis. Baltymo raiškos indukcija atliekama trečią auginimo valandą, augimo kreivės viduryje.

Fig. 5 iliustruoja tipinį NDS-PAAG elektroforezės vaizdą, gaunamą atlikus eksperimentą po biosintezės proceso. Pirmame takelyje yra užneštas molekulinis masių markeris (atitinkantis Fig.3 rekšmes), antrame ir trečiame – atitinkamai po 10 mikrogramų tirpių ir netirpių ląstelės
25 baltymų frakcijos. Galima stebėti, kad rekombinantinis OSM kaupiasi netirpioje baltymų frakcijoje.

Fig. 6 pateiktas redukuojančios NDS-PAAG elektroforezės vaizdas. Elektroforezė buvo vykdoma su baltymu, kuris buvo išaugintas, išgrynintas ir suformuluotas taip, kaip aprašyta šiame išradime. Pirmajame takelyje užneštas molekulinis masių markeris, o antrame –
30 ketvirtame takeliuose atitinkamai 1,25, 0,5 ir 0,25 mikrogramai išgryninto onkostatino M baltymo. Iš šios elektroforezės vaizdo matyti, kad baltymas pagal pateikiamą gryninimo ir formulavimo schema yra grynus ir stabilus.

Fig. 7 atvaizduoja tolimesnę pagal šį išradimą išgryninto baltymo grynumo analizę. Pateikiama smailė yra gauta išanalizavus onkostatino M baltyminį preparatą (tirpalą)
35 atvirkščių fazių aukšto veiksmingumo skysčių chromatografu (RP-HPLC). Iš smailės ploto

integravimo matome, kad išgryninto baltymo grynumas siekia 91,2% su 0,5% redukuotos jo formos.

Fig. 8 rodo du tipinius masių spektrus gautus su iš elektrojonizuojančios spinduliuotės/skrydžio laiko masių spektrometru (ESI-TOF); A – su prisijungusia glutathiono molekule, B – su nuskelta glutathiono molekule. Pilnas proceso aprašymas pateiktas septintajame pavyzdyje. Iš masių spektrų nustatytos dvi onkostatino M baltymo masės – 22449 Da masė baltymui su prisijungusia redukuoto glutathiono molekule, ir 22149 Da masė rekombinantinio onkostatino masė, nustatyta po švelnios redukcijos pašalinus glutationą.

Fig. 9 pateikiamas teorinės baltymo sekos palyginimas su realia onkostatino M seka. Galima matyti, kad N-galinis metioninas yra pašalinamas gryninimo metu ir galutiniame preparato tirpale turimas baltymas yra pilnai atitinkantis natyvią onkostatino M seką.

Detalus išradimo aprašymas

Šio išradimo tikslas yra sukurti rekombinantinės DNR, koduojančios polipeptidą, kurio fizikinės ir cheminės savybės tokios kaip subrendusio žmogaus onkostatino (196) M savybės, gamybos būdą. Kitas šio išradimo siekis yra gaminti OSM196 kontroliuojamos fermentacijos būdu. Dar vienas šio išradimo siekis yra gauti gryną OSM baltymą. Papildomas šio išradimo tikslas yra paruošti preparatą (tirpalą), kurio sudėtyje būtų minėtas rekombinantinis žmogaus OSM baltymas.

Kaip geno amplifikacijos matrica panaudota pCMV nešančioji plazmidė, kurioje yra visa atvirojo skaitymo rėmelio seka tiek su prepeptidine, tiek su propeptidine seka. Seka yra kDNR kilmės. Taip, viena vertus, šiame išradime pateikiama išskirta nukleorūgšties molekulė, kurios nukleotidų seka pavaizduota Fig.2 (SEQ ID Nr:1):

```

25      1 ATGGGGGTAC TGCTCACACA GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGCACT
      51 CCTGTTTCCA AGCATGGCGA GCATGGCGGC TATAGGCAGC TGCTCGAAAG
    101 AGTACCGCGT GCTCCTTGGC CAGCTCCAGA AGCAGACAGA TCTCATGCAG
    151 GACACCAGCA GACTCCTGGA CCCCTATATA CGTATCCAAG GCCTGGATGT
    201 TCCTAAACTG AGAGAGCACT GCAGGGAGCG CCCCAGGGGCC TTCCCCAGTG
    30 251 AGGAGACCCT GAGGGGGCTG GGCAGGCGGG GCTTCCTGCA GACCCTCAAT
    301 GCCACACTGG GCTGCGTCCT GCACAGACTG GCCGACTTAG AGCAGCGCCT
    351 CCCCAGGCC CAGGATTTGG AGAGGTCTGG GCTGAACATC GAGGACTTGG
    401 AGAAGCTGCA GATGGCGAGG CCGAACATCC TCGGGCTCAG GAACAACATC
    451 TACTGCATGG CCCAGCTGCT GGACAACTCA GACACGGCTG AGCCCACGAA
    35 501 GGCTGGCCGG GGGGCCTCTC AGCCGCCAC CCCCACCCCT GCCTCGGATG
    551 CTTTTAGCG CAAGCTGGAG GGCTGCAGGT TCCTGCATGG CTACCATCGC
    601 TTCATGCACT CAGTGGGGCG GGTCTTCAGC AAGTGGGGGG AGAGCCCGAA
    651 CCGGAGCCGG AGACACAGCC CCCACCAGGC CCTGAGGAAG GGGGTGCGCA
    701 GGACCAGACC CTCCAGGAAA GGCAAGAGAC TCATGACCAG GGGACAGCTG
    40 751 CCCCAGACGC GTGTTTAA
  
```

OSM geno seka, gauta iš šio vektoriaus ir pateikta Fig. 2, apima visą atvirojo skaitymo rėmelį, su signaline prepeptidine seka baltymo N gale (čia pateikiama kaip pabraukta teksto dalis) ir propeptidine seka baltymo C gale (pateikiama kaip pasvirasis tekstas). Geno seka be pre- ir propeptidinės sekų apibrėžta kaip OSM(196), atsižvelgiant į subrendusio baltymo aminorūgščių grandinės ilgį. Būtent tokį baltymą koduojanti DNR seka ir yra klonuojama į raiškos kasetę.

Kita vertus, pateikiama raiškos plazmidė, turinti nukleorūgšties molekulę su nukleotidų seka, taip pat pavaizduota Fig.2. N-galinis metioninas yra bakterinės raiškos sistemos artefaktas.

10 Minėtos sekos yra šio aprašymo dalis.

Optimaliai raiška reguliuojama T7 promotoriumi. Pageidautina, kad raiškos plazmidė būtų pET21a+/OSM. Taip pat atskleidžiama ląstelė šeimininkė, apimanti raiškos plazmidę pagal išradimą. Tinkama ląstelė šeimininkė yra *E. coli*. Vienu įgyvendinimo atveju *E. coli* yra *E. coli* kamienas *Rosetta gami-2*, turinti papildomą pRARE plazmidę, koduojančią retų kodonų tRNR. *Rosetta gami-2* kamienas taip pat turi dvi mutacijas: *trx* ir *gor*, kurios leidžia rekombinantiniam baltymui susivynioti į taisyklingą formą. Šios mutacijos papildomai derintos žemesnėms, nei optimalios kultivavimo temperatūroms.

15

Be to, yra pateikiamos pradmenų sekos modifikuotai hOSM sekai amplifikuoti. Atitinkamai pradmenų sekos yra tokios:

20 TIESIOGINIS PRADMUO: 5'-AAACATATGGCGGCTATAGGCAGCT-3';
ATVIRKŠTINIS PRADMUO 5'-TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT-3'.

Rekombinantinė DNR iš pCMV nešančiosios plazmidės yra amplifikuojama naudojant rekombinantinę DNR polimerazę, pvz., Pfu arba Taq. Po amplifikacijos PGR produktas yra tiesiogiai klonuojamas į tarpinę plazmidę arba karpomas restrikcijos endonukleazėmis NdeI ir HindIII ir klonuojamas į atitinkamai apdorotą plazmidę pET21a+. Po transformacijos į tarpinį *E. coli* kamieną, pvz., *JM109* arba *RR1*, klonai yra atrenkami, patikrinami ir pakartotinai transformuojami į raiškos kamieną. Naudojant modifikuotą M9 arba kitą sudėtinę terpę, atliekama patikrinto raiškos klonos biosintezė. Fermentacijos procesas atliekamas bioreaktoriuje, naudojant išeigos valdiklius, pvz., pO₂ ir pH elektrodus, termoporą arba maišiklį. Prieš indukciją kultivavimo temperatūra yra padidinama nuo +37 °C iki +42 °C, jei pageidaujama gauti netirpų baltymą.

25

30

Šiame išradime taip pat aprašomas originalus rmetHuOSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM gaminančio mikroorganizmo būdas.

35 Atitinkamai išradimas numato OSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM gaminančio organizmo procesą, apimantą tokias stadijas: a) mikroorganizmų lizavimo ir netirpios medžiagos,

turinčios OSM, atskyrimo nuo tirpios baltymingos medžiagos; b) OSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimo; c) OSM oksidavimo esant oksiduojančio/redukuojančio agento porai; d) tirpalo chromatografijos; e) išgryninto OSM išskyrimo.

Prieš ardymą (lizę), ląstelės surenkamos iš kultūros ir, jei reikia, gali būti koncentruojamos filtruojant, centrifuguojant ar kitais įprastais metodais. Pageidautini šio išradimo įgyvendinimo mikroorganizmai, gaminantys OSM, yra *E. coli*. Tinkamos gamybai *E. coli* padermės yra žinomos šios srities specialistui.

Pagal išradimą mikroorganizmų ląstelių membranos ardomos įprastais metodais, pvz., taikant homogenizaciją, ultragarso poveikį arba slėgio ciklus. Pageidautini metodai yra ultragarso poveikis arba homogenizacija naudojant Rannie homogenizatorių.

Suardžius ląsteles, tarpiniai kūneliai, turintys rmetHuOSM, yra atskiriami nuo skystosios lizato fazės ir pakartotinai suspenduojami tinkamame buferiniame tirpale. Tarpiniai kūneliai gali būti optimaliai plaunami, kad iš jų būtų pašalinami vandenyje tirpūs *E. coli* baltymai. rmetHuOSM tarpiniuose kūneliuose tirpinamas esant tirpinančiai medžiagai didesnio už neutralų pH sąlygomis. Tirpinančioji medžiaga yra chaotropinė medžiaga (t. y. baltymus denatūruojanti medžiaga, kuri nutraukia vandenilinius ryšius ir paveikia tretinę baltymų struktūrą, sukeldama jų išsivyniojimą), paprastai vandeninio buferiniame tirpale.

Atitinkamai vienu išradimo įgyvendinimo atveju netirpioje frakcijoje esantis OSM yra tirpinamas naudojant chaotropinę medžiagą. Tipinės chaotropinės medžiagos apima karbamidą ir guanidino hidrochloridą. Guanidino hidrochloridas yra stipresnė chaotropinė medžiaga ir ją patogiau naudoti, nes išvengiama polipeptido grandinės karbamoilinio, galimo naudojant koncentruoto karbaminio tirpalą. Atitinkamai, vienu išradimo įgyvendinimo atveju b) stadija apima inkubaciją su guanidino hidrochloridu. Chaotropinės medžiagos koncentracija priklausys nuo konkrečios naudojamos medžiagos ir esamo ląstelinės medžiagos kiekio. b) stadijoje guanidino hidrochlorido koncentracija yra nuo 3,0 iki 7 M, o geriausia naudoti 6 M guanidino hidrochlorido tirpalą.

pH gali būti koreguojamas pridėdant tinkamų buferinių medžiagų. Optimalus pH intervalas yra nuo maždaug 7,0 iki maždaug 9,0, tinkamiausias pH intervalas – 8,4–8,8.

Po rmetHuOSM ištirpinimo netirpios kietosios dalelės atskiriamos ir pašalinamos. Tirpus rmetHuOSM oksiduojamas esant redukuojančio/oksiduojančio agento porai. Tinkami poriniai redukuojantys/oksiduojantys agentai yra, pvz., cisteinas ir cistinas, ditiotreitolis ir jo oksiduotoji forma, glutationas ir oksiduotasis glutationas [B. Fischer, I. Summer ir P. Goodenough. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechn. Bioengn.*, 41, 3–13 (1993 m.); V.

Lozanov, C. Guarnaccia, A. Patthy, S. Foot ir S. Pongor. Synthesis and cystine/cysteine-catalyzed oxidative folding of the Amaranth α -amylase inhibitor. *J. Peptide Res.*, 50, 65–72 (1997 m.); Y-J. Li, D. M. Rothwarf ir H. A. Scheraga. An unusual adduct of dithiothreitol with a pair of cysteine residues of a protein as a stable folding intermediate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 120, 2668–2669 (1998 m.)). Nustatytas palankus faktas, kad tinkamai susivyniojusio rmetHuOSM, t. y. oksiduotojo rmetHuOSM, turinčio natūraliąją taisyklingą disulfidinių ryšių konformaciją, išeiga gali būti padidinama, naudojant glutationo oksidacijos-redukcijos buferinį tirpalą (glutationo ir oksiduotojo glutationo sistema), taip palengvinant disulfidinių ryšių persitvarkymą. Atitinkamai vienu išradimo įgyvendinimo atveju redukuojančio/ oksiduojančio agento pora, naudojama c) stadijoje, yra glutationo oksidacijos-redukcijos buferinis tirpalas (glutationo ir oksiduotojo glutationo sistema). rmetHuOSM yra oksiduojamas oksiduotoju glutationu, o redukuojančio agento – glutationo – buvimas oksidacijos-redukcijos buferyje gerokai sumažina netaisyklingai susivyniojusio rmetHuOSM formavimąsi, t. y. rmetHuOSM su netaisyklingais disulfidiniais ryšiais. Glutationo ir oksiduotojo glutationo santykis oksidacijos-redukcijos buferyje yra aiškus eiliniam specialistui. Pageidautina naudoti glutationo perteklių. Optimalus glutationo ir oksiduotojo glutationo santykis būtų nuo 5:1 iki 20:1 (skaičiuojant molekulinės masės pagrindu). Tinkamiausias 20:1 molinis glutationo ir oksiduotojo glutationo santykis. rmetHuOSM persivyniojimas esant oksidacijos-redukcijos buferiui, turinčiam redukuotojo/oksiduotojo glutationo porą, atliekamas naudojant vidutinės koncentracijos chaotropinę medžiagą. Vienu išradimo įgyvendinimo atveju tinkamas baltymo persivyniojimas vyksta naudojant tarpinės koncentracijos guanidino hidrochloridą. Tinkama guanidino hidrochlorido koncentracija yra nuo 3 M iki 7 M, geriausia, jei buferiniame tirpale yra nuo 6,0 iki 6,2 M guanidino hidrochlorido.

Korektiškai susivyniojusio rmetHuOSM išeiga labai priklauso nuo renatūracijos buferio, turinčio vidutinės koncentracijos guanidino hidrochlorido ir oksidacijos-redukcijos sistemą, pH vertės. Pageidautina, persivyniojimo reakcija būtų atliekama buferinio tirpalo pH palaikant nuo 7,0 iki 9,8, tinkamiausias pH intervalas – 8,4–8,8. Pageidautina, kad gautas tirpalas, turintis korektiškai susivyniojusį rmetHuOSM, būtų centrifuguojamas arba filtruojamas, pašalinant kietąsias daleles, o gautas tirpalas būtų pakeičiamas buferiu, siekiant pašalinti likusią chaotropinę medžiagą, pvz., guanidino hidrochloridą, bei oksidacijos-redukcijos sistemos komponentus, pvz., glutationą ir oksiduotą glutationą.

Prieš gelfiltraciją baltyminis tirpalas, kuriame yra didelė koncentracija chaotropo yra atskiedžiamas renatūracijos buferiniu tirpalu, kuriame yra redukuoto/oksiduoto glutationo. Baltyminio tirpalo ir renatūracijos baltyminio tirpalo mišinys paliekamas 20-90 valandų, kad redukuota OSM forma korektiškai susivyniotų į natūriąją formą.

Kitas išradimo įgyvendinimo variantas papildomai apima korektiškai persivyniojusio OSM atskyrimą nuo chaotropo.

Kai chaotropinė medžiaga yra guanidino hidrochloridas, ją galima pašalinti iš persivyniojusio rmetHuOSM turinčio tirpalo gelfiltracijos metodu. Tinkamos gelfiltracijos terpės specialistams yra žinomos. Vienu išradimo įgyvendinimo atveju gelfiltracijos terpė yra chromatografijos medžiaga *Sephadex G-25*. Atitinkamai buferinio tirpalo pH yra koreguojamas iki gelfiltracijai tinkamo pH. Kai gelfiltracijos terpė yra *Sephadex G-25*, tinkamas pH koreguojamas iki tinkamo taip, kad būtų maždaug 5,2–5,6, pageidautina 5,4.

Gautas mišinys filtruojamas ir surinktas filtratas brandinamas. Optimaliai brandinama maždaug 20-90 val., kad subręstų taisyklingai susivyniojęs rmetHuOSM. rmetHuOSM tuomet atskiriamas nuo bet kokių likusių priemonių atliekant chromatografijos procedūras.

Išgrynintam rmetHuOSM išskirti pageidautina naudoti jonų mainų skysčių chromatografiją. Tinkami jonų mainų skysčių chromatografijos metodai yra žinomi specialistams. Vienu išradimo įgyvendinimo atveju chromatografija d) stadijoje yra vienos stadijos chromatografinis gryninimas. Tinkama chromatografija yra vienos stadijos jonų mainų chromatografija. Optimaliu šio išradimo įgyvendinimo atveju didelė išgryninto rmetHuOSM išeiga gaunama naudojant *CM-Sepharose* ar *SP-Sepharose* jonų mainų kolonėles, kurios geriau veikia chromatografijos buferio pH esant nuo 5,2 iki 5,6, tinkamiausias pH – apie 5,4.

Atitinkamai, optimalus šio išradimo įgyvendinimo atvejis numato rmetHuOSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM gaminančių mikroorganizmų būdą, apimantį: 1) mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra rmetHuOSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos medžiagos; 2) rmetHuOSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; 3) rmetHuOSM oksidavimą naudojant oksiduotą glutationą esant redukuotojo glutationo; 4) persivyniojusio rmetHuOSM atskyrimą nuo chaotropo; 5) vienos stadijos chromatografinį rmetHuOSM gryninimą.

Kitas išradimo įgyvendinimo variantas numato būdą, apimantį tokias stadijas: 1) mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra rmetHuOSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos medžiagos; 2) rmetHuOSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; 3) rmetHuOSM oksidavimą naudojant redukuojančiosios ir oksiduojančios agento porą; 4) rmetHuOSM atskyrimą nuo tirpinimo medžiagos; 5) nuo laiko priklausančio rmetHuOSM brandinimą; 6) selektyvų taisyklingai susivyniojusio rmetHuOSM atskyrimą nuo netaisyklingai susivyniojusio, agreguoto ir pakitusio rmetHuOSM, taikant katijonų mainų chromatografiją; 7) labai išgryninto, taisyklingai susivyniojusio rmetHuOSM stabilaus skysto preparato paruošimą, taikant chromatografiją per gelfiltracijos kolonėlę.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Toliau pateikiamuose pavyzdžiuose kaip laikino šeimininko kamienas naudota *Escherichia coli* kamienas *JM109*, o transformacijai su vektoriumi kaip raiškos kamienas naudotas *E. coli* kamienas *Rosetta gami-2*. Transformuota šio išradimo šeimininkė *E. coli* turėjo raiškos vektorių, paruoštą iš pET21a+ (Novagen). Šis vektorius buvo sujungtas su amplifikuota sutrumpinta natyvaus OSM DNR seka po abiejų NdeI+HindIII restriktazių apdorojimo. Fermentacijos procesas apėmė stiprios raiškos ląstelių kultūros, apibūdintos šiame išradime, taikymą. OSM baltymas yra sukaupiamas intarpiniuose kūneliuose ir gryninamas taikant įprastus metodus, apibūdintus šiame aprašyme.

10

Visos aprašyme minimos publikacijos ir minėtų publikacijų citatos laikomos įtrauktos pagal nuorodas. Įvairios šio išradimo būdų ir sistemų modifikacijos bei variantai, akivaizdūs šios srities specialistams, iš esmės nenukrypstant nuo šio išradimo apimties ir esmės. Nors išradimas pateiktas su optimaliais įgyvendinimo pavyzdžiais, suprantama, kad išradimas neapribojamas vien šiais įgyvendinimo pavyzdžiais. Išties įvairios pavyzdžiuose aprašytų būdų modifikacijos, akivaizdžios molekulinės biologijos ir susijusių sričių specialistams, laikytinos apimamos išradimo apibrėžtimi.

1 PAVYZDYS. SUBRENDUSIO OSM GENO AMPLIFIKACIJA

20

OSM geno paruošimas klonavimui apėmė dviejų stadijų procesą: PGR optimizavimą ir geno amplifikaciją naudojant PGR, pridodant NdeI kirpimo vietą 5' gale ir HindIII kirpimo vietą 3' gale. Naudoti pradmenys buvo: TIESIOGINIS PRADMUO: 5'-AAACATATGGCGGCTATAGGCAGCT-3'; ATVIRKŠTINIS PRADMUO 5'-TTTAAGCTTCTATCTCCGGCTCCGGTT-3'. Tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų sekos pateiktos nuo 5' į 3' kryptimi. Buvo atliktas OSM geno PGR optimizavimas, siekiant specifiškai amplifikuoto PGR produkto reikamas koncentracijas. Optimizavimo parametrai apėmė MgSO₄ koncentraciją (1–4 mM), pradmenų koncentraciją (0,1–1 μM) ir prilydimo temperatūrą (58–72 °C), išplečiant eksperimentą iki 48 skirtingų reakcijos sąlygų variantų. Dėl klaidų taisymo galimybės, gero veikimo greičio ir mažo klaidų dažnio amplifikacijai atlikti naudota DNR polimerazė Pfu (rekombinantinė, *Fermentas, Thermo Fisher Scientific*). Geriausios sąlygos OSM PGR produktui (609 b. p. ilgio) buvo tokios: 2 mM MgSO₄, 0,1 μM kiekvieno pradmens ir programa su dviejų stadijų prilydymo etapu.

35

Lentelė 1

Ciklo Nr.	Stadija	Temperatūra	Laikas
	Pradinė denatūracija	95 °C	10 min
20	Matricinės DNR denatūracija	95 °C	30 s
	Pradmenų prilydymas	59,8 °C	45 s
	DNR sintezė	72 °C	80 s
25	Matricinės DNR denatūracija	95 °C	30 s
	Pradmenų prilydymas	72 °C	80 s
	DNR sintezė	72 °C	10 min

Pasiekama PGR produkto koncentracija buvo 100–120 ng/ µl.

5 2 PAVYZDYS. OSM GENO KLONAVIMAS Į PET21A+ PLAZMIDĘ

- Gautas PGR produktas gryninamas naudojant *Fermentas GeneJet* PCR gryninimo rinkinį ir karpomas naudojant dvi restrikcijos endonukleazes – NdeI ir HindIII. Restrikcija vykdoma per naktį +37 °C temperatūroje. Po restrikcijos DNR fragmentai pakartotinai gryninami naudojant rinkinį, pašalinant trumpus nukleotidų fragmentus ir restriktazes. pET21+a plazmidė (Novagen) apdorojama ir gryninama analogiškai, tik naudojamas ilgiems DNR fragmentams skirtas *GenJet* plazmidžių gryninimo rinkinys. Lipnūs plazmidės galai defosforilinami naudojant CIAP fermentą, kuris prieš ligavimo reakciją inaktyvuojamas. Genas su plazmide liguojami esant moliniam santykiui 10:1, naudojant T4 DNR ligazę (5 vnt. reakcijos mišinyje), proceso trukmė 16 valandų, temperatūra +4 °C. Ligavimo mišinys transformuojamas į chemiškai tinkamą *E. coli JM109* kamieną. Teisingo dydžio inserto klonas (teigiamas klonas) transformuojamas į *E. coli* raiškos kamieną *Rosetta gami-2*. pET21a+/OSM klonas kultivuojamas, plazmidės DNR struktūra patvirtinama restrikcinės analizės būdu. Plazmidės žemėlapis pavaizduotas Fig.1 kartu su tipine elektroferezės schema.
- pET21a+/OSM plazmidė palyginimo tikslais taip buvo klonuota į *E. coli* padermes *BL21(DE3)* ir *K802*. Teigiami klonai buvo identifikuojami atliekant restrikcinę analizę ir pagal atsparumą antibiotikams. Fig.3 pateikiamas trijų *E. coli* kamienų NDS-PAAG ir *Western* bloto rezultatų palyginimas. *E. coli* kamieno *BL21(DE3)*, *K802* ir *Rosetta gami-2* pateikiamos atitinkamai 1–2, 3–4 ir 5–6 takeliuose. Pirmas mėginys yra tirpi ląstelės baltymų frakcija, antras – netirpi. Iš rezultatų matosi, kad tik *E. coli Rosetta gami-2* kamienas pasižymi stipria geno raiška.

25

3 PAVYZDYS. TYRIMO LĄSTELIŲ ŠEIMININKIŲ BANKO PARUOŠIMAS

Po pirminio apibūdinimo *Rosetta gami-2* pET21a+/OSM klonas užsėtas į LB terpę 150 ml kolboje ir kultivuojamas per naktį +37 °C temperatūroje. Po 16 valandų kultūra persėta į 150 ml LB terpę, pradiniu optiniu tankiu 0,1 O. V., ir toliau kultivuojama keturias valandas

mikrobiologinėje purtyklėje +37 °C temperatūroje. Galutinis optinis tankis prieš konservavimą buvo 3,4 O. V. Į ląstelių suspensiją buvo pridėta 10 % galutinės koncentracijos sterilaus glicerolio ir ji išpilstyta į mėgintuvėlius po 1 ml. Mėginiai užšaldomi ir laikomi –75 °C temperatūroje.

5

4 PAVYZDYS. BIOSINTEZĖS PROCESAS

Fermentacijos metu vykdoma pH, temperatūros ir ištirpusio deguonies kontrolė. 7 l talpos fermentatoriuje paruošta, sterilizuota ir pasėjama kultūra užsėta 4,7 l sudėtinės terpės taip, kad galutinis optinis tankis būtų 0,2 O. V. Maišymo greitis kito nuo 200 iki 900 apsisukimų per minutę. Aeravimo greitis svyravo nuo maždaug 0,3 l/min iki maždaug 3,6 l/min tiekiamo suspausto oro srauto. M9m terpės (fermentacijai) sudėtis (g/l): mielių ekstraktas – 20,0, amonio chloridas – 5,0, magnio sulfato heptahidratas – 0,5, dinatrio vandenilio fosfatas – 4,7, kalio divandenilio fosfatas – 4,5, gliukozės monohidratas – 22; 50 ng/l ampicilino ir 34 ng/l chloramfenikolio. Esant būtinybei, tiekiamas oras buvo maišomas su pakankamai deguonies, kad būtų palaikomas ištirpusio deguonies prisotinimas nuo maždaug 20 iki 60 %. Fermentuota +37 °C temperatūroje 3 valandas. Po 3 valandų pradėta indukcija su 0,25 mM galutinės koncentracijos IPTG tirpalu ir temperatūra pakelta iki 42 °C. Po 2 valandų indukcijos ląstelės surinktos 30 minučių centrifuguojant kultūros terpę 8 000 apsisukimų per minutę greičiu +4 °C temperatūroje. Tipinis biosintezės serijos įrašas pateikiamas Fig. 4, kur pateikti *E. coli* Rosetta gami-2/pET21a+/OSM augimo 3 l fermentatoriuje operaciniai automatiniai ir neautomatiniai parametrai, pvz., prisotinimas deguonimi, pH, temperatūra, maišiklio greitis, oro srauto greitis ir optinis tankis. Fig. 5 vaizduoja NDS-PAAG elektroforezės po biosintezės proceso rezultata; pirmame takelyje užneštas molekulinio svorio standartas, 10 mikrogramų tirpios frakcijos buvo užnešta antrame takelyje ir 10 mikrogramų netirpios ląstelių frakcijos buvo užnešta trečiame takelyje.

25

5 PAVYZDYS. TOLESNIS PROCESAS

Ląstelių biomasė, kurioje yra rmetHuOSM transformuotose *E. coli* ląstelėse, tokia kaip gauta 4 pavyzdyje, suspenduota maišant 0,1 M Tris buferyje (pH 7,50, su 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM DTT) (santykis 1g biomasės: 10mL ardymo buferinio tirpalo) apytiksliai +5 °C temperatūroje. Suspensija buvo leidžiama per Rannie aukšto slėgio homogenizatorių du kartus arba paveikta ultragarsu 3 min normuojant 1 g biomasės. Homogenatas centrifuguotas apytiksliai +5 °C temperatūroje. Netirpi suardytos biomasės frakcija suspenduota dešimtyje 0,025 M Tris buferinio tirpalo (pH 8,0, su 0,5 M NaCl, 0,1 % polisorbato-80) tūrio dalių, maišant IKA maišykle, o gautas mišinys centrifuguotas +5 °C temperatūroje. Supernatantas nupiltas ir likusios nuosėdos pakartotinai suspenduotos IKA

35

maiškykle 0,025 M *Tris* buferyje (pH 7,00, su 1,3 M karbamido), santykių 1 g biomasės : 10 ml plovimo buferinio tirpalo. Supernatantas nupiltas ir likusios nuosėdos pakartotinai suspenduotos IKA maiškykle 0,025 M *Tris* buferyje (pH 8,00, su 0,6 M karbamido), santykių 1 g biomasės : 10 ml plovimo buferinio tirpalo. Gautas mišinys centrifuguotas +5°C

5 temperatūroje, o supernatantas nupiltas ir likusios nuosėdos suspenduotos IKA maiškykle 0,025 M *Tris* buferyje (pH 8,50, su 0,5 M NaCl), santykių 1 g biomasės: 10 ml plovimo buferinio tirpalo. Gautas mišinys centrifuguotas +5 °C temperatūroje, o supernatantas nupiltas. Gautos nuosėdos suspenduotos IKA maiškykle santykiu 1 g biomasės : 6 ml tirpinimo buferinio tirpalo, pH 8,7 (50 mM, glicino / NaOH 6 M GdmHCl, 0,5 M NaCl ir 20 mM

10 DTT), trukmė 2–18 valandų, temperatūra +5 °C.

Gautas mišinys centrifuguotas +5°C temperatūroje, o supernatantas surinktas. Supernatantas sulašintas į renatūravimo tirpalą (25 mM glicino / NaOH buferis, pH 8,7, galutinėje koncentracijoje turintis 4 mM GSH, 0,2 mM GSSG, 0,5 M L-arginino) santykiu 1:3. Gautas mišinys pH koreguotas iki 8,7, ir jis laikomas apytiksliai +5 °C temperatūroje 60

15 valandų. Tirpalas užneštas ant *Sephadex G-25* kolonėlės +5 °C temperatūroje ir išplautas 20 mM natrio acetatu (pH 5,30, turintis 50 mM NaCl). Eliuatas užneštas ant *CM-Sepharose* kolonėlės +25 °C temperatūroje. Biologiškai aktyvus rmetHuOSM išplautas iš kolonėlės tiesiniu gradientu nuo 20 mM natrio acetato, 50 mM NaCl (pH 5,3) iki 20 mM natrio acetato, 400 mM NaCl (pH 5,3). Eliuatas, turintis labai gryno rmetHuOSM, atskiestas buferiu iki 20

20 mM Na acetato, 250 mM NaCl galutinės koncentracijos, pH 5,3. Fig. 6 pateikiamas pagal siūlomą išradimą apdoroto ir paruošto rmetHuOSM grynumas, įvertinus pagal NDS-PAAG redukuojančiomis sąlygomis rezultatus. Pirmame takelyje – dažytų 10, 25, 35, 40, 55, 70, 100 ir 130 kDa molekulinio standarto baltymai, baltymų žymeklis iš *Thermo Fisher Scientific* (*Fermentas*), antrame–ketvirtame takeliuose – išgrynintas OSM redukuojančiomis sąlygomis,

25 atitinkamai ant takelių užnešta 1,25, 0,5 ir 0,25 mikrogramo mėginio.

6 PAVYZDYS. RP-HPLC ANALIZĖ

OSM baltymo grynumui įvertinti taikytas RP-HPLC metodas. Šis metodas tiksliniam baltymui buvo pritaikytas siekiant įvertinti OSM grynumą gryninimo stadijose bei galutinio preparato

30 tirpalo grynumą. Detalės nurodytos toliau.

Eksperimentinės detalės:

Judrioji fazė: **A** – 70 % vandens, 30 % acetonitrilo ir 0,2 % TFA; **B** – 20 % vandens, 80 % acetonitrilo ir 0,2 % TFA.

Kolonėlė: *Symmetry 300 C18*, 4,6*250 mm, dalelių dydis – 5 µm.

35 Chromatografinė sistema: HPLC sistema, Alliance, Waters.

Detekcijos bangos ilgis: 280 nm. Srautas: 1 ml/min.

RP-HPLC instrumentinis metodas.

Lentelė 2

Nr.	Srautas, ml/min	Laikas, min	Judrioji fazė		Pastabos
			A, %	B, %	
1	1.0	0	80	20	Pradinis
2	1.0	1	80	20	Izokratinis
3	1.0	20	64	36	Gradientinis
4	1.0	21	10	90	Gradientinis
5	1.0	22	10	90	Izokratinis
6	1.0	23	80	20	Gradientinis
7	1.0	27	80	20	Izokratinis

Fig. 7 iliustruoja pagal išradimą apdoroto ir galutinai paruošto rmetHuOSM preparato grynumą, įvertinus pagal atvirkštinės fazės HPCL rezultatus.

Pikų analizė:

Lentelė 3

	Piko pavadinimas	Užlaikymo laikas, min	Užlaikymo laiko santykis su pagrindiniu pikų	Plotas	Ploto santykis %
1		7.4	0.619	1995	0.3
2		10.5	0.881	9145	1.6
3		11.0	0.921	31863	5.4
4	OSM	11.9	1.000	534633	91.0
5		13.7	1.144	5332	0.9
6	OSM (redukuotas)	14.5	1.214	2950	0.5

7 PAVYZDYS. ONKOSTATINO M MOLEKULINĖS MASĖS NUSTATYMAS NAUDOJANT MASIŲ SPEKTROMETRĄ

Išgrynintam baltymui identifikuoti masių spektrometrijos būdais buvo atliktas molekulinės masės matavimas bei dalinis OSM sekos nustatymas. Naudota MicroTOF q2 įranga su ESI šaltiniu, Bruker. Medžiagos: acetonitrilas, skruzdžių rūgštis, *PD MiniTrap G-25* kolonėlės, 5 mM amonio bikarbonato buferis.

Mėginio paruošimas: Mėginio buferis pakeičiamas į 5 mM amonio bikarbonato buferį, tai atliekama naudojant *PD MiniTrap G-25* pagal gamintojo instrukcijas. Jei reikia, mėginio tirpalas koncentruojamas iki 1 mg/ml. Prieš atliekant mėginio MS analizę, jis skiedžiamas 1:1 (t:t) acetonitrilu, 0,2 % skruzdžių rūgšties tirpalu iki galutinės 0,5 mg/ml koncentracijos. Masių spektrometro parametrų nustatymai:

Lentelė 4

Parametras	Vertė
Purkštuvas	0,3 bar
Sausosios dujos	4,0 l/min

Džiovinimo temperatūra	180 °C
Masių intervalas	50–3 000 m/z

Masių spektrai gaunami 5 min, tuomet vidurkinami ir išskleidžiami naudojant maksimalios entropijos algoritmą (žr. Fig.8). Fig. 8 pateikiami du masių spektrai, gauti ESI-TOF masių spektrometru. Išmatuota onkostatino M masė yra 22449 Da (kaip matyti Fig. 8, A dalyje).

5 Išmatuota masė nuo teorinės skiriasi 300 Da. Taip yra dėl glutationo molekulės, kuri yra prisijungusi prie Cys80 liekanos. Po baltymų redukcijos glutationo molekulė pašalinama, kaip matyti Fig.8, B dalyje (nustatyta masė lygi 22149 Da; atitinka natyvaus baltymo molekulinę masę).

10 Onkostatino M sekos analizė Maldi-Tof masių spektrometru buvo atlikta naudojant *Autoflex speed*, Bruker. Naudotos tokios medžiagos: acetonitrilas, trifluoracto rūgštis, *PD MiniTrap G-25* kolonėlės, 25 mM amonio bikarbonato buferis ir α -ciano-4-hidroksicinamono rūgštis.

Mėginio paruošimas: Mėginio buferis pakeičiamas į 25 mM amonio bikarbonato buferį. Tai atliekama naudojant *PD MiniTrap G-25* pagal gamintojo instrukcijas. Pridedama tripsino santykiu 1:50 (proteazė : baltymas) ir šis tirpalas laikomas 37 °C temperatūroje 12 valandų. 15 Mėginys išvalomas naudojant *ZipTip* (pagal gamintojo instrukcijas), vienodais tūriais sumaišomas su α -ciano-4-hidroksicinamono rūgštimi, ištirpinta 50 % acetonitrile su 0,1 % trifluoracto rūgštimi. Paruoštas mėginys (0,5–1 μ l) perkeliamas ant nerūdijančiojo plieno Maldi lėkštelės, lašeliai paliekami visiškai išdžiūti. Masių spektrometro parametrai nustatomi:

20

Lentelė 5

Parametras	Vertė
1 jonų šaltinis	19,6 kV
2 jonų šaltinis	16,7 kV
Sklaitytuvas	7,8 kV
Reflektorius	21,1 kV
Matricos slopinimas	iki 430 Da

Į kiekvieno mėginio vietą nukreipiama 500–1500 lazerio šūvių. Peptidai, gaunami apdorojant onkostatiną M, yra analizuojami ir lyginami su teorinėmis peptidų masėmis. Teorinis sekų palyginimas su gautais duomenis pateikiamas Fig. 9. Kaip galima matyti, N-galinis metioninas po gryninimo proceso pašalinamas ir gaunama tiksliai natyviai OSM seka. 25 Dalinių sekų nustatymo rezultatai patvirtina, kad išgrynintas baltymas yra 196 a. r. onkostatinas M ir kad N-gale jis neturi metionino liekanos. Nuskaityta 89 % sekos (toleruotina paklaida - 0.50Da)

30

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

- 5 1. Rekombinantinio žmogaus onkostatino M baltymo (OSMnat) paruošimo ir gryninimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima stadijas, kuriose:
- paruošia rekombinantines bakterijas *Escherichia coli*, turinčias OSMnat geną;
 - auginama minėtas rekombinantines bakterijas *Escherichia coli* sudėtinėje mitybinėje terpėje, kad būtų gaminamas OSMnat baltymas;
 - 10 - išskiria ir grynina rekombinantinį OSMnat baltymą iš tarpinių kūnelių arba tirpiųjų baltymų frakcijos.
- 15 2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas OSMnat genas apima SEQ ID Nr. 1.
- 15 3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas rekombinantines bakterijas *Escherichia coli*, turinčias OSMnat geną, paruošia amplifikuojant minėtą geną ir klonuojant minėtą amplifikuotą modifikuotą OSMnat geną į tarpinį arba raiškos vektorių, amplifikuojant ir išskiriant minėtą OSMnat geną
- 20 iš minėto klonuoto vektoriaus ir transformuojant minėtą raiškos vektorių į minėtas bakterijas *Escherichia coli*, kur *Escherichia coli* yra pasirinkta iš grupės, susidedančios iš *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* K802 ir *Escherichia coli* Rosetta gami-2.
- 25 4. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas vektorius yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš pET21a+, pT7a, pJET1.2blunt, pQE-T7, optimaliai pET21a+.
- 30 5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas OSMnat genas klonuotas į pET21a+ vektorių už ankstyvojo bakteriofago T7 promotoriaus, laikant kad genas yra atvirojo skaitymo rėmelyje nuo promotoriaus, o *lac* operonas prieš T7 promotorių, ir konstrukto, kuriame yra OSMnat genas, raiška yra griežtai kontroliuojama ir nutraukiama T7 terminatoriumi.

6. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta bakterija *Escherichia coli*, šeimininkės bakterijos padermės atžvilgiu, yra atspari antibiotikams, tokiems kaip, ampicilinas, kanamicinas, chloramfenikolis ir tetraciklinas.
- 5
7. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta mitybinė terpė yra pasirinkta iš sudėtinių terpių, tokių kaip LB, YPD, TB, M9 arba M9m, kur mitybinė terpė apima vieną arba daugiau azoto šaltinių, pasirinktų iš grupės, kurią sudaro amonio druskos, nitratai, triptonas, mielių ekstraktas ir
- 10
- amonio hidroksidas, ir anglies šaltinį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš glicerolio, gliukozės, fruktozės, pageidautina gliukozės.
8. Būdas pagal 1-7 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad biomasės dalis sudėtinėje terpėje yra intervale nuo 2 iki 15 g/l, pageidautina 5–7 g/l, skaičiuojant pagal drėgnų ląstelių svorį, ir tuo kad minėtos mitybinės terpės parametrus palaiko tokius: a) pH yra nuo 3,0 iki 8,0, pageidautina nuo 6,0 iki 6,8 esant sudėtinai terpei, b) temperatūra intervale nuo 25 iki 45 °C , pageidautina nuo 37 iki 42 °C, ir c) ištirpęs deguonis – 20–80 % prisotinimo, pageidautina 20–40 %; ir minėtas kultivavimas tęsiamas nuo 4 iki 10 valandų, pageidautina 6 valandas.
- 15
9. Būdas pagal 1-8 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad rekombinantinio OSMnat baltymo raiška yra indukuojama pasiekus atitinkamą biomasės dalį, naudojant tinkamą *lac* operono induktorių, tokį kaip laktoze, optimaliai IPTG 0,1 - 1 mM koncentracijos, pageidautina 0,25 mM koncentracijos.
- 20
10. OSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM produkuojančių mikroorganizmų būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima tokias stadijas: a) mikroorganizmų lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra OSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos ląstelių medžiagos; b) OSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; c) OSM oksidavimą esant oksiduojančio / redukuojančio agento porai; d) tirpalo chromatografiją; e) išgryninto OSM išskyrimą.
- 25
- 30
11. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad OSM yra rekombinantinis metionilintas žmogaus onkostatinas M (rmetHuOSM).

12. Būdas pagal 10-11 punktus, besiskiriantis tuo, kad oksiduojančio/redukuojančio agento pora yra oksiduojančio / redukuojančio glutationo sistema, kur molinis oksiduojančio ir redukuojančio glutationo santykis yra optimaliai 1:20.
- 5 13. Būdas pagal 10-12 punktus, besiskiriantis tuo, kad c) stadijoje OSM netirpioje medžiagoje yra tirpinamas naudojant chaotropinę medžiagą, pageidautina vidutinės koncentracijos chaotropinę medžiagą, pH esant 8,00-9,00.
- 10 14. Būdas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad papildomai apima persivyniojusio OSM atskyrimą nuo chaotro, kur korektiškai persivyniojęs OSM atskiriamas nuo chaotro gelfiltracijos metodu, optimaliai naudojant gelfiltracinę kolonėlę *Sephadex G-25*.
15. Būdas pagal bet kurį iš 10-14 punktų, besiskiriantis tuo, kad d) stadijos chromatografija yra vienos stadijos chromatografinis gryninimas, optimaliai vienos stadijos jonų mainų chromatografija.
- 15 16. Būdas pagal bet kurį iš 10-15 punktų, besiskiriantis tuo, kad b) stadijos tirpinimui naudoja guanidino hidrochloridą, kurio koncentracija yra nuo 3,0 iki 6,0 M.
- 20 17. Būdas pagal bet kurį iš 10-16 punktų, besiskiriantis tuo, kad d) stadija atlieka *CM-Sepharose* arba *SP-Sepharose* kolonėlėje, optimaliai pH esant nuo 5,2 iki 5,6.
- 25 18. rmetHuOSM išskyrimo ir gryninimo iš OSM produkuojančio mikroorganizmo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima tokias stadijas: a) mikroorganizmo lizavimą ir netirpios medžiagos, kurioje yra rmetHuOSM, atskyrimą nuo tirpios baltymingos medžiagos; b) rmetHuOSM, esančio netirpioje medžiagoje, tirpinimą; c) rmetHuOSM oksidavimą naudojant oksiduojantį glutationą esant redukuojančio glutationo; d) korektiškai persivyniojusio rmetHuOSM atskyrimą nuo chaotropinės medžiagos; e) vienos stadijos chromatografinį rmetHuOSM gryninimą.
19. Išgryninto OSM baltymo preparatas, gautas būdu pagal bet kurį iš 1-18 punktų.

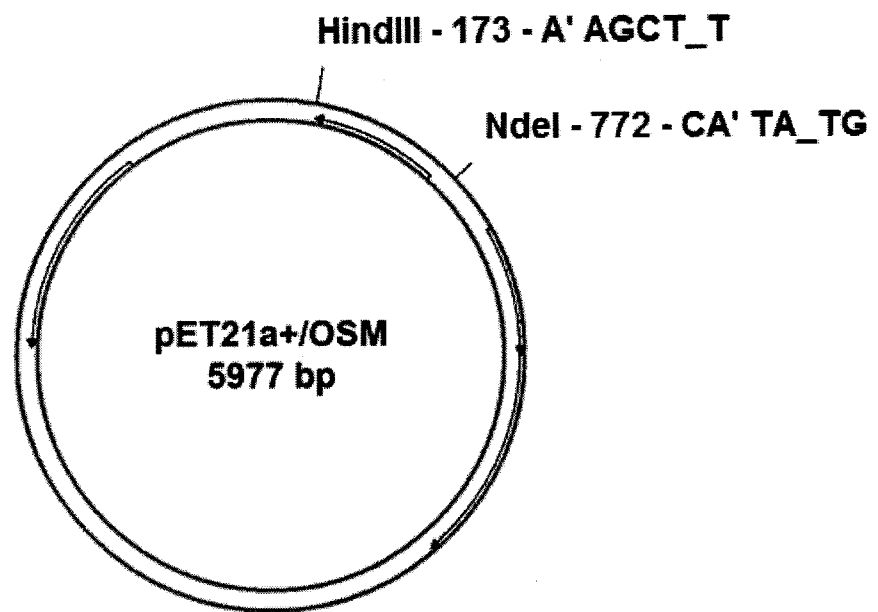


Fig. 1

1 ATGGGGGTAC TGCTCACACA GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGC ACT
51 CCTGTTTCCA AGCATGGCGA GCATGGCGGC TATAGGCAGC TGCTCGAAAG
101 AGTACCGCGT GCTCCTTGGC CAGCTCCAGA AGCAGACAGA TCTCATGCAG
151 GACACCAGCA GACTCCTGGA CCCCTATATA CGTATCCAAG GCCTGGATGT
201 TCCTAAACTG AGAGAGCACT GCAGGGAGCG CCCCGGGGCC TTCCCCAGTG
251 AGGAGACCCT GAGGGGGCTG GGCAGGCGGG GCTTCCTGCA GACCCTCAAT
301 GCCACACTGG GCTGCGTCCT GCACAGACTG GCCGACTTAG AGCAGCGCCT
351 CCCCAAGGCC CAGGATTTGG AGAGGTCTGG GCTGAACATC GAGGACTTGG
401 AGAAGCTGCA GATGGCGAGG CCGAACATCC TCGGGCTCAG GAACAACATC
451 TACTGCATGG CCCAGCTGCT GGACAACATCA GACACGGCTG AGCCCACGAA
501 GGCTGGCCGG GGGGCCTCTC AGCCGCCAC CCCACCCCT GCCTCGGATG
551 CTTTTCAGCG CAAGCTGGAG GGCTGCAGGT TCCTGCATGG CTACCATCGC
601 TTCATGCACT CAGTGGGGCG GGTCTTCAGC AAGTGGGGGG AGAGCCCGAA
651 CCGGAGCCGG AGACACAGCC CCCACCAGGC CCTGAGGAAG GGGGTGCGCA
701 GGACCAGACC CTCCAGGAAA GGCAAGAGAC TCATGACCAG GGGACAGCTG
751 CCCCGGACGC GTGTTTAA

MAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETL
 RGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNI
 YCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSK
 WGESPNRSRR

Fig. 2

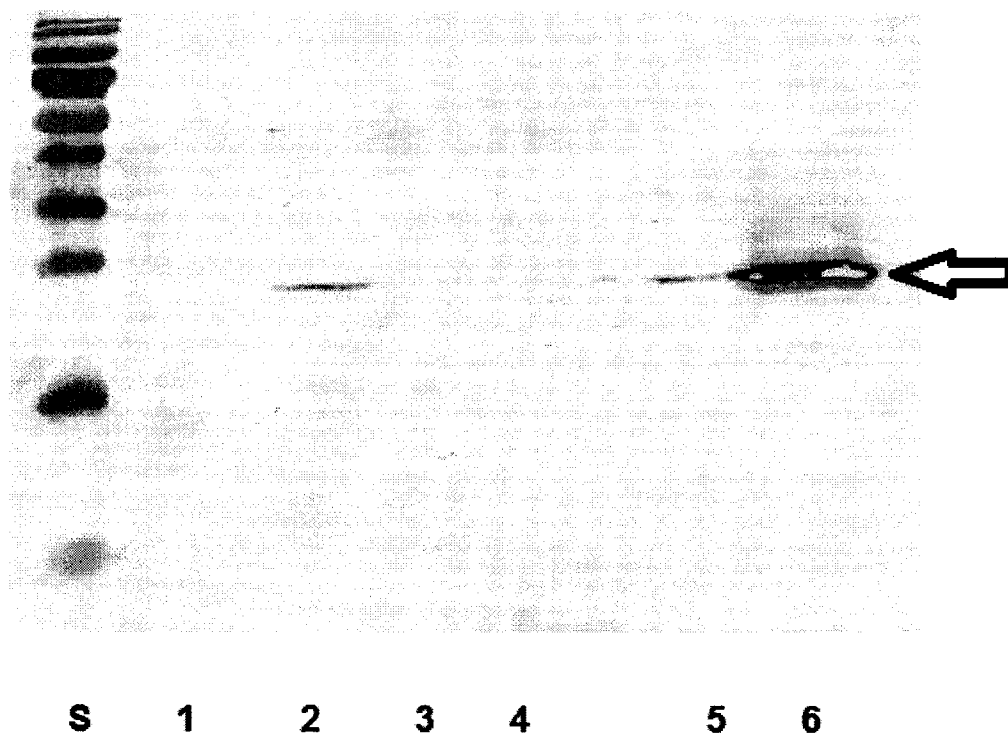
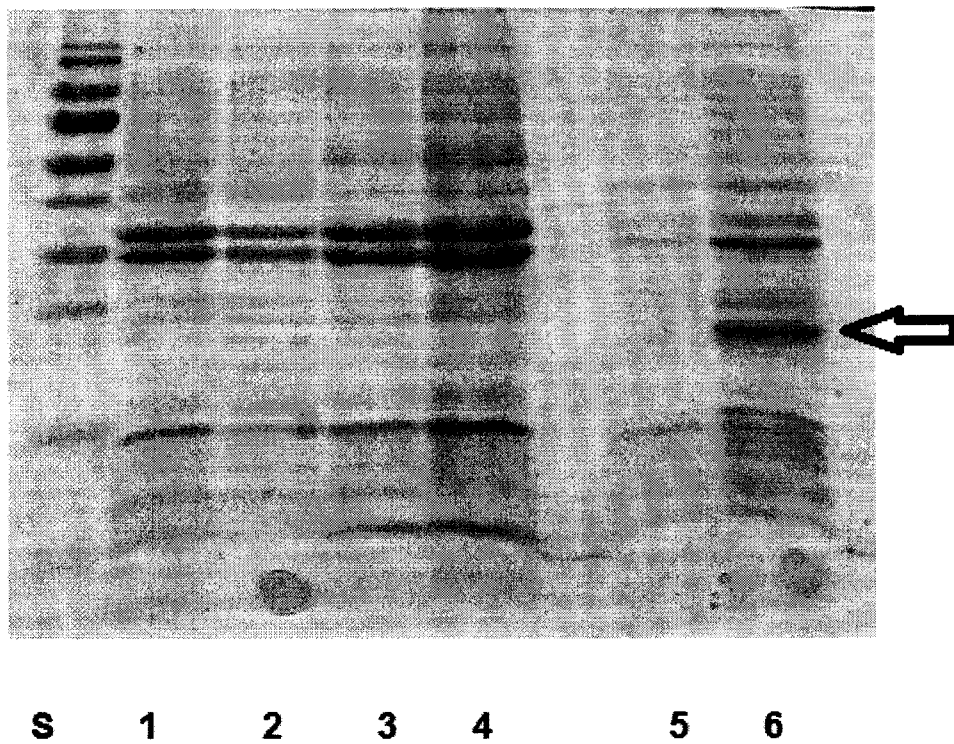


Fig. 3

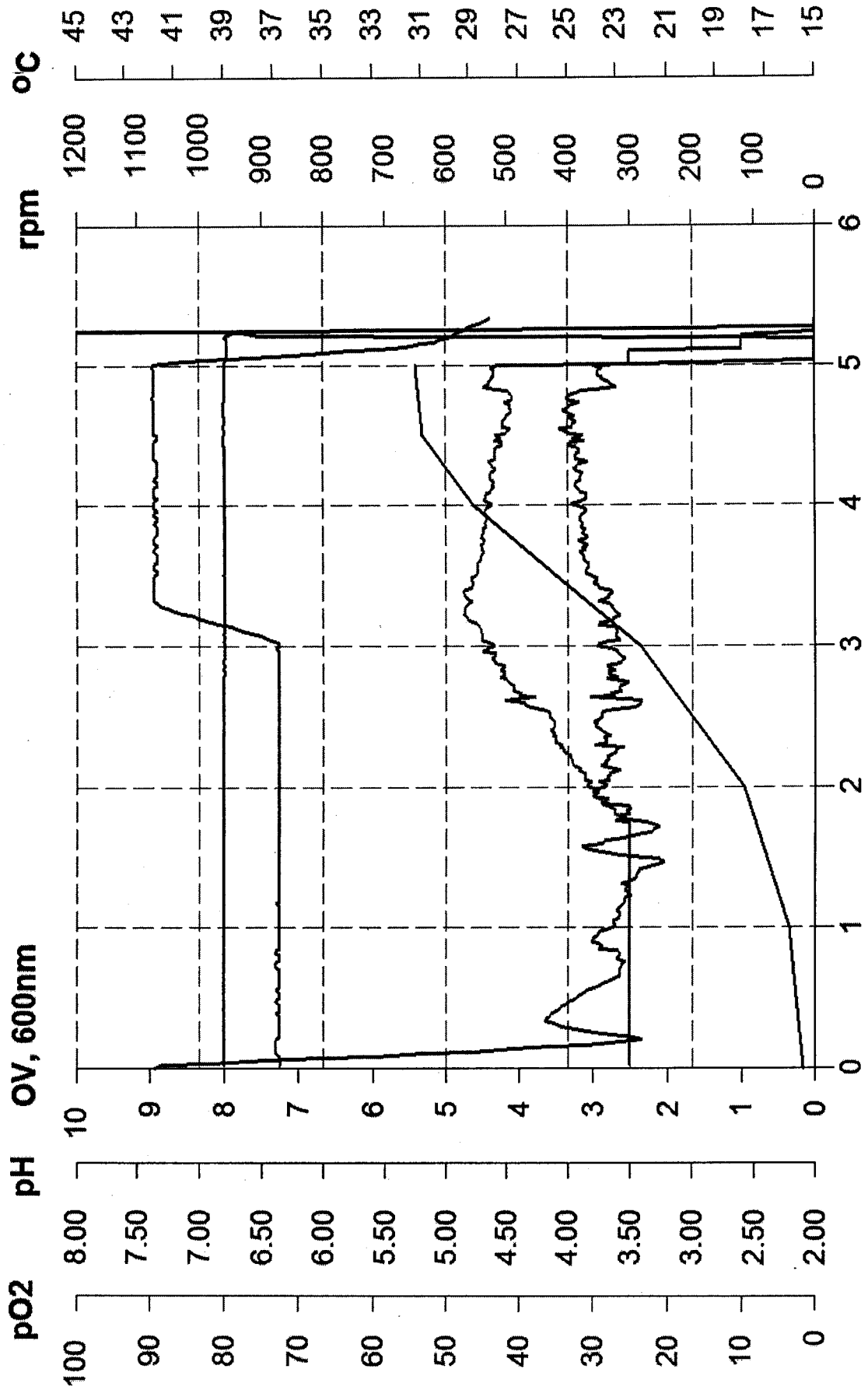


Fig. 4

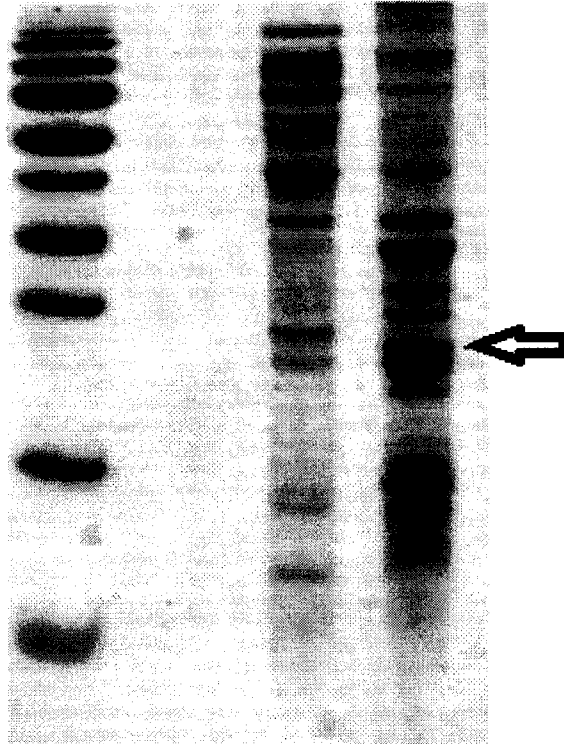
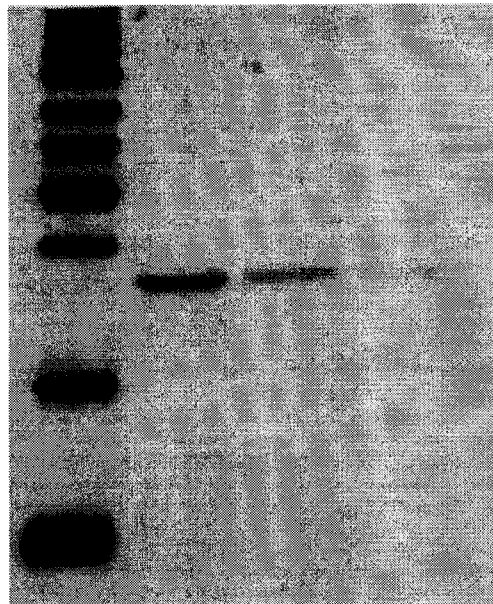


Fig. 5

**Fig. 6**

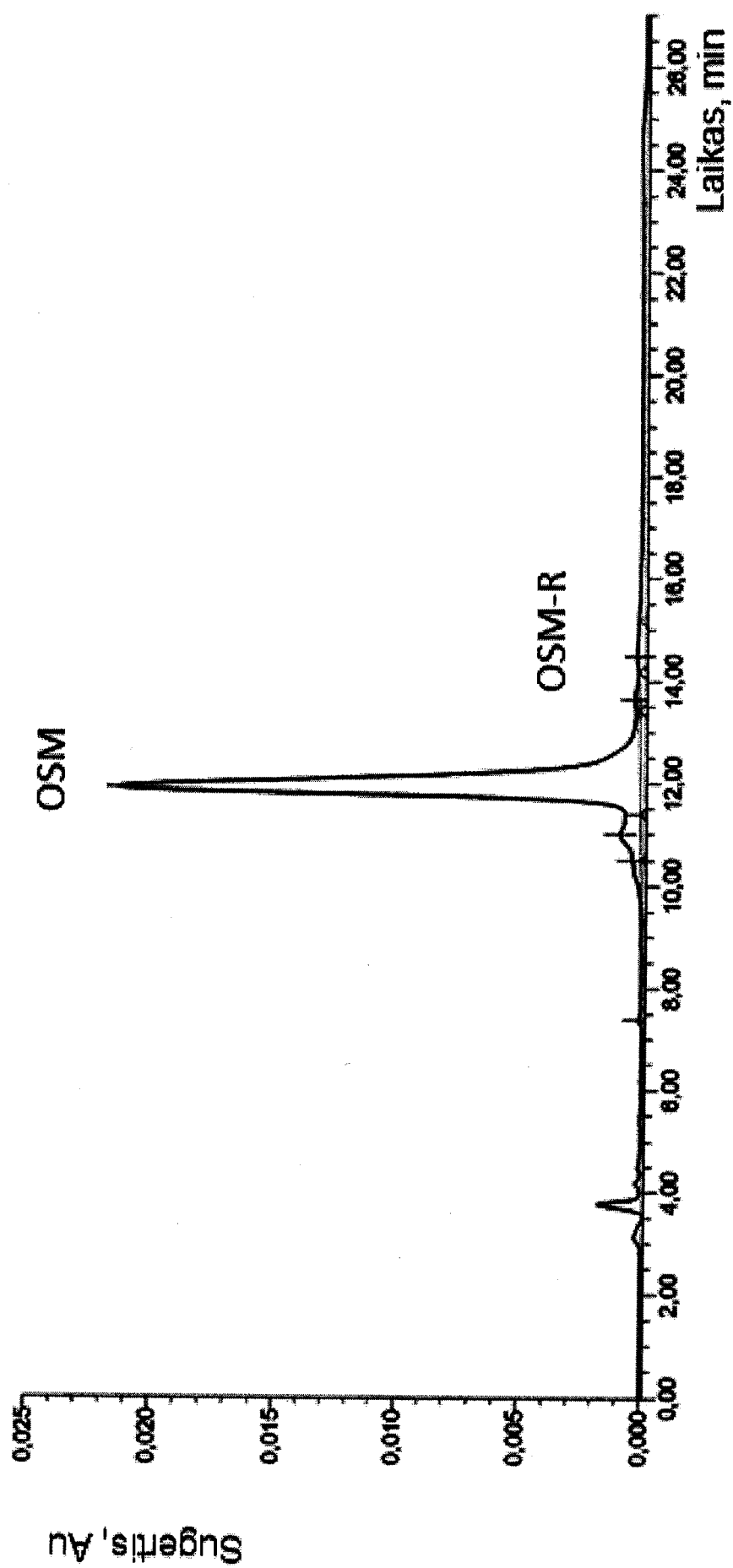


Fig. 7

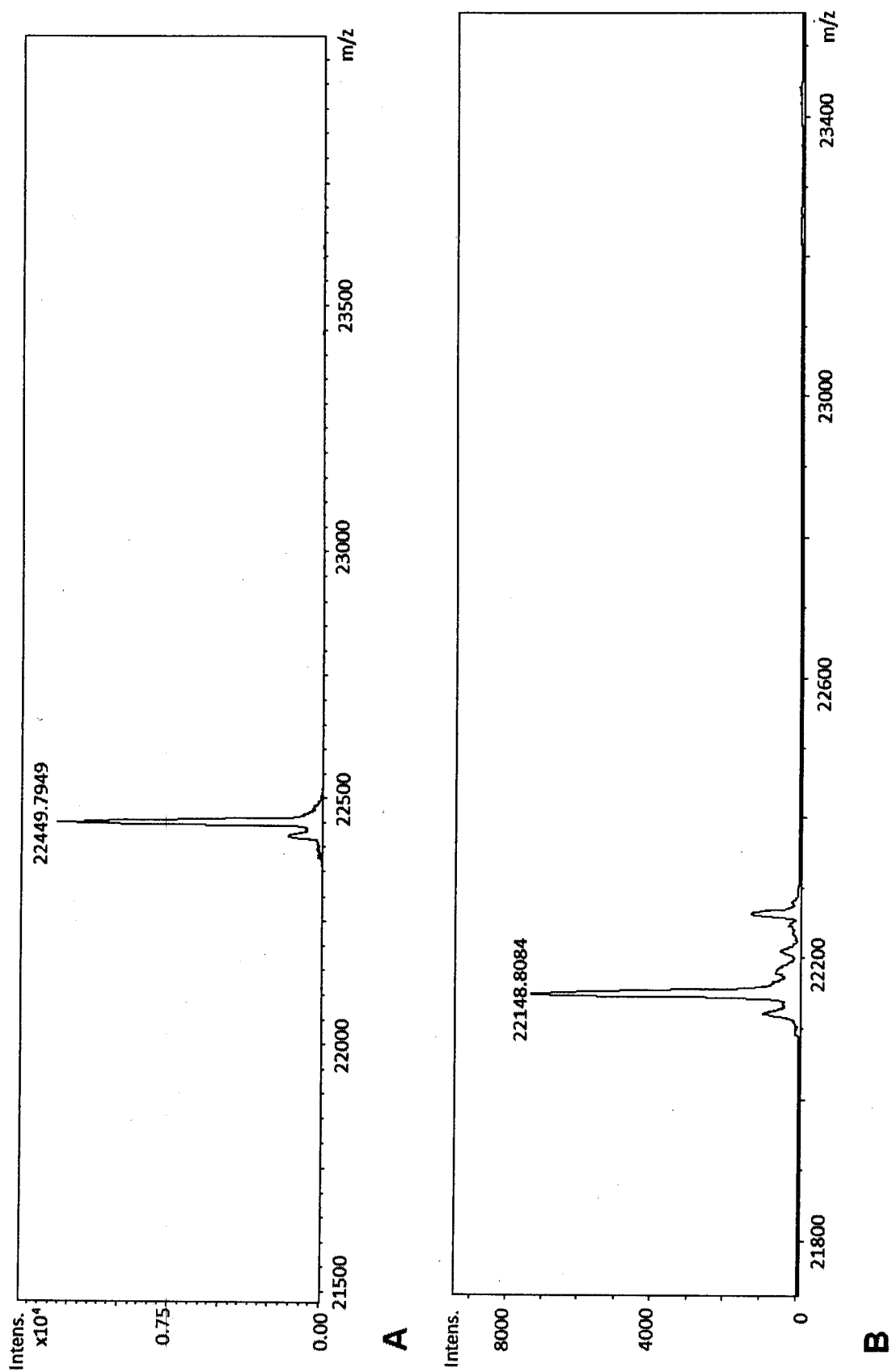


Fig. 8

10	20	30	40	50	60	70	80	90
AYGSCSREY	RVLLOOLQKQ	TDLNOSTERL	LDPYIRIQGL	DVPKLEKNCR	ERNQCAFPSEZ	TLEOLGRRGY	LQTLNATLOC	VLEMLADLEQ
100	110	120	130	140	150	160	170	180
ALPRAQDLER	SOLNIEDLEK	LQIARPNILG	LBNNITCMAG	LLENSTAEK	TRAGOCASQP	PITPASPDAF	ORLEZGCRFL	NOTNRFHRSV
190	200							
GRVTSKUGLS	PNHEPR							

Fig. 9