URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

DOKUMENT PATENTOWY

Na podstawie przepisów ustawy z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej (tekst jedn.: Dz.U. z 2017 r., poz. 776) został udzielony na rzecz:

BIOVENTURES INSTITUTE SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Poznań, Polska

PATENT

NR **228341**

NA WYNALAZEK PT.

Sposób uzyskiwania białka poliepitopowego oraz wektor DNA do realizacji tego sposobu

przedstawiony w opisie patentowym
włączonym do niniejszego dokumentu

Patent trwa od dnia: **2014-04-21**

Warszawa, dnia 2018-03-08

Z upoważnienia Prezesa
Urzędu Patentowego

Elżbieta Głowacka
ST. INSPEKTOR

PWPW S.A.

RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **228341**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **407950**

(22) Data zgłoszenia: **21.04.2014**

(51) Int.Cl.
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(54) **Sposób uzyskiwania białka poliepitopowego oraz wektor DNA do realizacji tego sposobu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
26.10.2015 BUP 22/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.03.2018 WUP 03/18

(73) Uprawniony z patentu:
BIOVENTURES INSTITUTE SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Poznań, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
PIOTR SKOWRON, Gdańsk, PL
AGNIESZKA ŻYLICZ-STACHULA, Gdańsk, PL
OLGA ŻOŁNIERKIEWICZ, Gdańsk, PL
MAŁGORZATA SKOWRON, Gdynia, PL
ŁUKASZ JANUS, Poznań, PL
JOANNA JEŻEWSKA-FRĄCKOWIAK, Gdańsk, PL
ANETA SZYMAŃSKA, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek

PL 228341 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób uzyskiwania białka poliepitopowego oraz wektor DNA do realizacji tego sposobu. Uzyskiwane zgodnie z wynalazkiem białka mogą znaleźć szereg zastosowań, w szczególności być wykorzystane do wytwarzania ulepszonych szczepionek.

Shen, S-H *P.N.A.Sci USA* 81:4627–4631 (1984) ujawnia sposób uzyskiwania multimerycznej proinsuliny (do 7 kopii). Multimery uzyskano za pomocą sekwencyjnego łączenia odcinków DNA przy zastosowaniu syntetycznych fragmentów DNA, ciętych endonukleazą restrykcyjną klasy IIS – SfaNI, alkalicznej fosfatazy, kinazy polinukleotydowej i ligazy DNA. Metoda nie pozwalała jednak na łatwe uzyskanie wielokrotnego powielania odcinka DNA w jednej reakcji, ponieważ każdorazowo mogła być dodana tylko jedna, dodatkowa kopia monomeru.

Lennick i in. *Gene* 61:103–112 (1987) ujawnia multimeryczny gen kodujący 8 kopii hormonu peptydowego – przedsionkowego peptydu natriuretycznego. W opisanej metodzie nie stosowano wektora umożliwiającego powielanie kopii sekwencji kodującej peptyd, a otrzymany in-vitro gen multimeryczny został sklonowany ostatecznie do ogólnie stosowanego wektora ekspresyjnego. Metoda również nie pozwala na łatwe uzyskanie wielokrotnego powielania odcinka DNA w jednej reakcji, ponieważ każdorazowo mogła być dodana tylko jedna, dodatkowa kopia monomeru.

Kim, S. C. and Szybalski, W., *Gene* 71:1–8 (1988) ujawnia sposób kierunkowego powielania klonowanego fragmentu DNA za pomocą endonukleazy restrykcyjnej klasy IIS – BspMI, wektora DNA pSK3 oraz ligazy DNA. Uzyskano 30 kopii monomeru w konkatamerze. Jednak stosowanie enzymu BspMI jest w praktyce utrudnione, ponieważ nie trawi on w pełni substratu DNA. W efekcie uniemożliwia to zachowanie ciągłości Otwartej Ramy Odczytu translacji (ORF), a powielanie wprowadza dodatkowe sekwencje DNA do powielonego konkatameru. Opisany sposób nie pozwala na powtórzenie cyklu powielania co istotnie ogranicza możliwość osiągnięcia pożądanej ilości kopii powielonego segmentu DNA. Ujawniony wektor nie był wektorem ekspresyjnym.

Lee, J. H. i in., *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 13:139–145 (1996) ujawnia sposób kierunkowego powielania klonowanego fragmentu DNA za pomocą endonukleazy restrykcyjnej klasy IIS – BspMI i BbsI, wektora DNA pBBS1 oraz ligazy DNA. Metoda, oparta na autoligacji 4-nukleotydowych (nt) kohezyjnych końców DNA uniemożliwia zachowanie ciągłości ORF, stanowi jednak istotne usprawnienie opisanej wcześniej metody, gdyż pozwalała na powtórzenie cyklu powielania, celem osiągnięcia pożądanej ilości kopii powielonego segmentu DNA. Zastosowany wektor nie był wektorem ekspresyjnym. Metodę zastosowano dla powielenia krótkiego genu peptydu przeciwbakteryjnego – mogaininy (108 kopii).

Lee, J. H. i in., *Protein Expression and punfication* 12:53–60 (1998) ujawnia kolejny wariant sposobu opierającego się na wcześniej opisanym wektorze pBBS1. Zastosowany wektor nie był wektorem ekspresyjnym. Zastosowano enzym BbsI do generowania 4-nt kohezyjnych końców, poważnie utrudniając tym samym utrzymanie ciągłości ORF. Opisano uzyskanie nie więcej niż 6 kopii monomeru DNA w powielonym odcinku. Metodę zastosowano dla powielenia genu peptydu przeciwbakteryjnego – mogaininy oraz buforyny II.

Wang, Y.-Q and Cai, J.Y. *Appl Biochem Biotechnol.* 141:203–13 (2007) ujawnia kolejny wariant zastosowania multimeryzacji genów kodujących antybiotyki peptydowe przy zastosowaniu autoligacji syntetycznych fragmentów DNA, zawierających asymetryczne kohezyjne końce w obecności 2 adapterów DNA. Adaptery zawierały sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjnych SalI i EcoRI. Procedura nie wykorzystuje wektora, powielanie jest trudne do kontroli, pracochłonne i wymaga dodawania podczas reakcji kolejnych porcji syntetycznego monomeru DNA. W wyniku ujawnionej metody składania polimerycznego genu, opracowanej do celów produkcji peptydów przeciwbakteryjnych, uzyskano 8 kopii monomeru w polimerycznym białku.

Celem wynalazku jest dostarczenie sposobu pozwalającego na łatwe uzyskiwanie białka poliepitopowego o dowolnej długości oraz wektora nadającego się do realizacji takiego sposobu. Uzyskiwane białka poliepitopowe mogą znaleźć szereg zastosowań, w szczególności nadają się do wytwarzania ulepszonych szczepionek o podwyższonej skuteczności.

Przedmiotem wynalazku jest wektor DNA zawierający sekwencję modułu powielającego obejmującą dwie konwergentnie skierowane sekwencje DNA rozpoznawane przez endonukleazę SapI i znajdującą się pomiędzy nimi sekwencję DNA zawierającą miejsce służące do wklonowania insertu rozpoznawane przez endonukleazę SmaI, przy czym korzystnie moduł powielający posiada sekwencję

GCTCTTCACCCGGGCCCAGAAGAGC (Sekw. Id. Nr 11). Korzystnie wektor DNA według wynalazku jest wektorem ekspresji białek, który zawiera dodatkowo origin replikacji, korzystnie p15A, gen oporności na antybiotyk, korzystnie chloramfenikol, promotor transkrypcji, korzystnie PR bakteriofaga lambda, gen represora, korzystnie cI 857 ts, sygnał inicjacji translacji, ewentualnie sekwencję kodującą 6-ciu reszt histydyny, oraz sekwencję kodującą sygnał stopu translacji. Korzystnie wektor DNA według wynalazku zawiera sekwencję wybraną spośród sekwencji 1–6 przedstawionych również na Fig. 2. Korzystnie wektor DNA według wynalazku posiada sekwencję 7 (pAMP1-HisA).

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób uzyskiwania białka poliepitopowego charakteryzujący się tym, że:

a) posiadającą tępe końce sekwencję DNA kodującą epitop wklonowuje się do wektora DNA określonego w zastrz. 1–4 w miejscu rozpoznawanym przez endonukleazę SmaI,
b) uzyskany wektor namnaża się w gospodarzu bakteryjnym, izoluje się i trawi się endonukleazą restrykcyjną pod-Typu IIS – SapI, a następnie izoluje się fragment zawierający sekwencję DNA kodującą epitop, zmodyfikowaną w taki sposób, że opatrzona jest ona jednonicowymi kohezyjnymi końcami, warunkującymi kierunkową ligację insertu do konkatameru,
c) prowadzi się autoligację wyizolowanego fragmentu,
d) produkt autoligacji wklonowuje się do wektora DNA określonego w zastrz. 1–4 w miejscu rozpoznawanym przez endonukleazę restrykcyjną pod-Typu IIS – SapI i
e) uzyskanym wektorem transformuje się gospodarza bakteryjnego i prowadzi się ekspresję, a następnie izolację białka poliepitopowego,

przy czym w celu zwiększenia wielkości białka poliepitopowego, przed przystąpieniem do realizacji etapu e) powtarza się etapy od b) do d).

Poniższe przykłady zawierają szczegółowy opis jednego z możliwych wariantów realizacji sposobu według wynalazku. Alternatywną metodą wklonowania insertu jest zastosowanie wektora przeciętego SapI z wypełnionymi kohezyjnymi końcami polimerazą DNA w obecności trójfosforanów deoksyrybonukleotydów. Postępując zgodnie z przedmiotowym wynalazkiem specjalista jest w stanie zaproponować kolejne warianty jego realizacji. Korzystnie, epitopem jest epitop HBV, zwłaszcza kodowany przez syntetyczną sekwencję 9 (patrz również Fig. 3). Korzystnie, powielany odcinek monomeru może zawierać różne epitopy, pochodzące z różnych białek lub różnych rejonów tego samego białka, korzystnie kodowane przez syntetyczną sekwencję (porównaj schemat przedstawiony na Fig. 1).

Ujawniono sposób konstrukcji oraz zastosowanie nie istniejących w naturze sztucznych genów za pomocą technologii inżynierii genetycznej oraz syntezy chemicznej, zawierających wielokrotne kopie DNA kodującego powtarzające się segmenty, zawierające powielone jednostki monomeryczne jednego lub więcej peptydów. Poddanie procedurze powielania genu, kodującego peptyd (epitop) o określonej funkcji biologicznej lub chemicznej prowadzi do zwielokrotnienia pożądanego oddziaływania otrzymanego (poli)peptydu ze specyficznym ligandem. W szczególności tak otrzymane poliepitopowe białka znajdą zastosowanie m.in. jako: (i) sztuczne antygeny – szczepionki nowej generacji o zwielokrotnionym potencjale stymulacji układu immunologicznego; (ii) poliproteiny zawierające moduły chelatujące jony metali rzadkich, celem ich pozyskiwania przemysłowego lub remediacji środowiska naturalnego; (iii) moduły wiążące kofaktory enzymów (m.in. kationy, aniony, molekuły organiczne) m.in. proteinaz działających w obrębie ran, celem zahamowania ich działania destrukcyjnego; (iv) multiepitopowe białka osłonowe, zawierające zwielokrotnione moduły peptydowe będące aktywatorami lub inhibitorami funkcji biologicznych celem leczenia chorób molekularnych, wirusowych i bakteryjnych; (v) multiepitopowe białka, zawierających multimery hormonów peptydowych lub biologicznie czynne fragmenty białek sygnałowych i stymulujących procesy regeneracji tkanek. Białka takie, umieszczone w ranie, stopniowo uwalniałyby pod wpływem proteinaz biologicznie czynne peptydy, stymulujące regenerację tkanek. W szczególności, zaprojektowano układ wektorowo-enzymatyczny, służący do powielania segmentu DNA. Powielany segment DNA może być pochodzenia naturalnego lub uzyskany na drodze syntezy chemicznej.

P r z y k ł a d 1. Ogólny schemat realizacji sposobu według wynalazku.

Ogólny schemat sposobu według wynalazku omówiony na przykładzie powielania antygenu powierzchniowego wirusa HBV ilustruje Fig. 1. Przedstawia ona schemat ideowy wektora powielającego oraz reakcji powielania epitopu (na rysunku: syntetycznego epitopu HBV).

Wektor powielający zawiera 2 konwergentnie skierowane sekwencje DNA rozpoznawane przez endonukleazę restrykcyjną pod-Typu IIS, preferencyjnie rozpoznającą względnie długą sekwencję w DNA oraz przecinającą DNA generując 3-nt (lub wielokrotność 3 nt) kohezyjne końce. Zastosowano

endonukleazę SapI, której cechą szczególną jest to, że rozpoznaje ona relatywnie długą sekwencję 7-miu par zasad (zatem unikatową w wektorze i powielanym segmencie DNA) oraz przecina DNA w odległości 1 nt w łańcuchu górnym oraz 4 nt w łańcuchu dolnym, tym samym generując 3-nt kohezyjne końce, czyli odpowiednik jednego kodonu. Miejsca SapI sąsiadują w wektorze z sekwencją klasycznej endonukleazy Typu II, przeznaczonej do wklonowania powielanego insertu DNA. Zastosowano endonukleazę SmaI, przecinającą DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanej, generując tzw. „tępe" końce. Do wektora przeciętego SmaI można wklonować dowolny segment DNA syntetycznego lub naturalnego, mający ulec powieleniu. W korzystnej realizacji powielany segment DNA koduje antygen lub sekwencję aminokwasową obejmującą kilka identycznych lub różnych antygenów. Jedynym ograniczeniem jest długość fragmentu powielanego, podyktowana maksymalną długością insertu DNA akceptowanego przez daną klasę wektorów DNA. Moduł powielający może być przeniesiony drogą klonowania do różnych klas wektorów.

P r z y k ł a d 2. Seria 6-ciu zaprojektowanych wektorów pAMP1.

W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 2 zaprojektowano 1-szą serię wektorów pAMP, opartych na szkielecie wektora, zawierającego origin replikacji p15A. Spośród zaprojektowanych wektorów skonstruowano wektor pAMP1-A (nie zawierający fuzyjnego znacznika His6) oraz pAMP1-HisA (zawierający fuzyjny znacznik His6). Dodatkowo, w serię wektorów pAMP wbudowano opcję wysokiej ekspresji białek pod kontrolą promotora bakteriofaga lambda PR oraz opcję fuzji ze znacznikiem His6, pozwalającym na izolowanie poliepitopowego białka wydajną metodą chromatografii metalopowinowactwa.

Wektory zawierają origin replikacji p15A, gen oporności na antybiotyk chloramfenikol, silny promotor transkrypcji PR bakteriofaga lambda, gen represora cI 857 ts, sygnały inicjacji translacji, sekwencje 6-ciu reszt histydyny o powinowactwie do jonów niklu, układ miejsc restrykcyjnych do fuzji z kodonem startu translacji ATG oraz moduły do kierunkowego powielania fragmentu DNA z zachowaniem ramy odczytu ORF. Warianty różnią się między sobą możliwościami manipulacji trzema ramami odczytu (co może być istotne przy powielaniu naturalnych, niesyntetycznych odcinków DNA) oraz obecnością lub brakiem znacznika His6, znakomicie ułatwiającego późniejszą izolację eksprymowanego poliepitopowego białka, niezależnie od jego ładunku, rozpuszczalności i innych parametrów biochemicznych. Wariant nr 4 został zastosowany do opisanego w poniższym przykładzie powielania epitopu antygenu powierzchniowego wirusa HBV.

Pełna sekwencja wektora pAMP1-HisA zastosowanego w przykładzie 3 została przedstawiona jako sekwencja 7. Ponadto, na Fig. 8 przedstawiono mapę restrykcyjną wektora pAMP1-HisA, a na Fig. 9 mapę restrykcyjną wektora pAMP1-HisA z wklonowanym 13-merem peptydu antygenowego.

P r z y k ł a d 3. Wytwarzanie poliepitopowego białka zawierającego modelowy 7-mio aminokwasowy epitop antygenu powierzchniowego wirusa HBV.

Modelowy 7-mio aminokwasowy epitop antygenu powierzchniowego wirusa HBV poddany reakcji powielania został przedstawiony na Fig. 3.

Syntetyczny odcinek DNA, kodujący epitop antygenu powierzchniowego wirusa HBV poddano pilotowemu doświadczeniu powielania w wektorze pAMP1-HisA. Uzyskano >60 kopii epitopu w konkatamerze DNA *in vitro* oraz 13 kopii w hybrydowym białku poliepitopowym, klonowanym *in vivo*.

Na Fig. 4 zostały przedstawione wyniki reakcji powielania *in vitro* 7-mio aminokwasowego epitopu modelowego białka otoczki wirusa HBV przy pomocy wektora pAMP1-HisA, endonukleazy SapI oraz ligazy DNA.

Analizowano produkty reakcji powielania przy użyciu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Do plazmidu powielającego pAMP1-HisA wklonowano syntetyczny odcinek DNA długości 21 par zasad, kodujący 7-mio aminokwasowy epitop wirusa HBV. Plazmid zawierający monomer epitopu HBV strawiono endonukleazą SapI, wycinając zmodyfikowany gen epitop z konstruktu plazmidowego. Modyfikacja polegała na dodaniu do niego 3-nt jednoniciowe kohezyjne 5'-końce. Poza funkcją powielania, końce te w polimerycznym hybrydowym białku odpowiedzialne są za dodanie reszty aminokwasu proliny (ang. „*helical breaker*"), oddzielające monomery epitopów i ułatwiające niezależne zwijanie epitopów do struktur 3-cio rzędowych, tym samym zachowując ich naturalną strukturę przestrzenną. Ilość dodanych „*helical breaker*" można dowolnie regulować, poprzez inkorporowanie kodujących je aminokwasów do końca syntetycznego epitopu (na poziomie kodującego DNA). Wycięte zmodyfikowane DNA kodujące epitopy poddano autoligacji *in vitro*. Ścieżki od 5 do 160 min ukazują kinetykę autoligacji. Produkty reakcji analizowano elektroforetycznie, uzyskując w stosunku do kontrolnej reakcji bez ligazy DNA (K) szereg odcinków DNA o wzrastającej długości, stanowiące kierunkowe konka-

tamery (polimery) genu epitopu. Tak uzyskane *in vitro* konkatamery zostały ponownie wklonowane do wektora pAMP1-HisA, gdzie można je poddać kolejnemu cyklowi powielania lub ekspresji kodowanego multimerycznego białka.

Na Fig. 5 przedstawione zostały wyniki analizy klonów hybrydowych genów kodujących białka poliepitopowe HBV, uzyskane w wyniku pierwszej rundy powielania.

Mieszaninę spolimeryzowanych *in vitro* syntetycznych genów epitopu HBV (Fig. 4, ścieżka MIX) za pomocą układu: wektor powielający pAMP1-HisA/endonukleaza SapI/ligaza DNA klonowano ponownie do wektora powielającego pAMP1-HisA, celem utrwalenia wariantów poli-genów epitopu HBV, ekspresji kodowanych białek poliepitopowych oraz powtórzenia cyklu powielania. W pierwszej rundzie reakcji powielania uzyskano szereg klonów, zawierających od 2 do 13 kopii epitopu (ścieżki 1–13, analiza PCR, fragmenty DNA migrują coraz wolniej podczas elektroforezy ze względu na wzrastającą długość, bezpośrednio odzwierciedlającą ilość połączonych kopii epitopu). Analiza sekwencyjna DNA wykazała ciągłość otwartej ramy odczytu (ORF) w uzyskanych konstruktach, zatem każdy taki sztuczny poli-gen koduje inne białko poliepitopowe HBV, co jest istotne z punktu widzenia docelowej roli tych sztucznych białek, gdyż różne ich warianty, będą wywoływały różne natężenie odpowiedzi immunologicznej oraz będą różniły się rozpuszczalnością. Po ponownym wycięciu SapI, każdy z wariantów konkatamerycznych genów może być w całości poddany kolejnej reakcji powielania, prowadząc do uzyskania kolejnych poli-genów, składającego się z setek kopii genu epitopu HBV (przedzielonych resztami proliny), w obrębie hybrydowego konstruktu, zachowującego ciągłość ORF w układzie nad- ekspresyjnym bakterii *Escherichia coli*. Tym samym każda kolejna runda powielania zwiększa ilość kopii monomeru w konkatamerze w postępie geometrycznym, prowadząc w krótkim czasie do uzyskania planowanej ilości kopii w docelowym konstrukcie plazmidowym.

Na Fig. 6 zostały przedstawione wyniki drugiej rundy powielania pięciomerowego konkatameru epitopu HBV.

Odcinek DNA wycięto endonukleazą SapI z konstruktu pAMP1-HisA, zawierającego wklonowany konkatamer 5-ciu kopii epitopu, uzyskanego w wyniku 1-szej rundy powielania i poddano ponownej reakcji amplifikacji. Największy widoczny na granicy rozdzielczości żelu agarozowego konkatamer zawierał 12 kopii 5-cio meru, stanowiąc zatem 60-cio krotnie kierunkowo spolimeryzowany epitop HBV. Ewidentnie widoczne są jednak większe konkatamery, jakkolwiek nierozdzielone do dyskretnych prążków. Uzyskane produkty drugiej rundy powielania zostały wklonowane ponownie do wektora pAMP-HisA i mogą być poddane trzeciej rundzie powielania, prowadząc docelowo do uzyskania setek lub tysięcy kopii epitopu HBV, ułożonych w obrębie jednego długiego rekombinantowego polipeptydu (białka), z zachowaniem ciągłości ORF.

Na Fig. 7 została przedstawiona analiza rezultatów ekspresji hybrydowego genu kodującego białko poliepitopowe HBV, uzyskanej w wyniku modelowej, pierwszej rundy powielania (13-mer) w wektorze pAMP1-HisA (Sekw. Id. Nr 7, Fig. 8). Wykonana została analiza elektroforetyczna eksprymowanego 13-meru poliepitopu HBV w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, barwionego Coomassie Blue. Nietypowe, czerwone zabarwienie prążka 13-meru, którego zawartość zwiększa się w miarę trwania czasu indukcji ekspresji w hodowli bakterii (kolejne ścieżki), wynika prawdopodobnie z uporządkowanego ułożenia barwnika na powtarzających się segmentach sekwencji aminokwasowej. Eksperymentowi ekspresji (syntezy białka *in vivo*) poddano klon zawierający wariant 13-kopijnego konkatamerycznego genu, uzyskanego w wyniku powielania 7-aminokwasowego epitopu wirusa HBV, gdzie każdy epitop jest oddzielony resztą aminokwasu proliny (plazmid ekspresyjny patrz: Sekw. Id. Nr 8, Fig. 9). Technologia pozwala na zachowanie ciągłości ramy odczytu ORF. Ekspresję prowadzono w układzie bakterii *Escherichia coli* / promotor PR bakteriofaga lambda uzyskując nadprodukcję sztucznego białka poliepitopowego HBV. Uzyskane białko stanowi prototypową szczepionkę przeciw HBV.

Wykaz sekwencji

<110> BioVentures Institute Sp. z o.o.
<120> Sposób uzyskiwania białka poliepitopowego oraz wektor DNA do realizacji tego sposobu
<130> PK/2483/RW
<160> 11
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 41
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-A: moduł powielający
<400> 1
atgcgctctt cacccgggcc cagaagagct aagtaagtaa g 41
<210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-B: moduł powielający
<400> 2
atggctcttc acccgggccc agaagagcta agtaagtaag 40
<210> 3
<211> 42
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-C: moduł powielający
<400> 3
atgccgctct tcacccgggc ccagaagagc taagtaagta ag 42
<210> 4
<211> 59
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-HisA: moduł powielający
<400> 4
atgcaccacc accaccacca cagctcttca cccgggccca gaagagctaa gtaagtaag 59
<210> 5
<211> 58
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-HisB: moduł powielający
<400> 5
atgcaccacc accaccacca cgctcttcac ccgggcccag aagagctaag taagtaag 58
<210> 6
<211> 60
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> pAMP1-HisC: moduł powielający
<400> 6
atgcaccacc accaccacca cccgctcttc acccgggccc agaagagcta agtaagtaag 60
<210> 7
<211> 3003
<212> DNA
<213> artificial
<220>

<223> wektor pAMP1-HisA
<400> 7
catgcaccac caccaccacc acagctcttc acccgggccc agaagagcta agtaagtaag 60
agctcgaccc ggtcgaattt gctttcgaat ttctgccatt catccgctta ttatcactta 120
ttcaggcgta gcaccaggcg tttaagggca ccaataactg ccttaaaaaa attacgcccc 180
gccctgccac tcatcgcagt actgttgtaa ttcattaagc attctgccga catggaagcc 240
atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt cgccttgcgt 300
ataatatttg cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 360
atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt ggctgagacg aaaaacatat tctcaataaa 420
ccctttaggg aaataggcca ggttttcacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatatgtg 480
tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtattc actccagagc gatgaaaacg tttcagtttg 540
ctcatggaaa acggtgtaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct caccgtcttt 600
cattgccata cggaattccg gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaaggc 660
cggataaaac ttgtgcttat ttttctttac ggtctttaaa aaggccgtaa tatccagctg 720
aacggtctgg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gcctcaaaat gttctttacg 780
atgccattgg gatatatcaa cggtggtata tccagtgatt tttttctcca ttttagcttc 840
cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgccc ggtagtgatc ttatttcatt 900
atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cattttcgcc aaaagttggc 960
ccagggcttc ccggtatcaa cagggacacc aggatttatt tattctgcga agtgatcttc 1020
cgtcacaggt atttattcgg cgcaaagtgc gtcgggtgat gctgccaact tactgattta 1080
gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag tggcttctgt ttctatcagc tgtccctcct 1140
gttcagctac tgacggggtg gtgcgtaacg gcaaaagcac cgccggacat cagcgctagc 1200
ggagtgtata ctggcttact atgttggcac tgatgagggt gtcagtgaag tgcttcatgt 1260
ggcaggagaa aaaaggctgc accggtgcgt cagcagaata tgtgatacag gatatattcc 1320
gcttcctcgc tcactgactc gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc ggaaatggct 1380
tacgaacggg gcggagattt cctggaagat gccaggaaga tacttaacag ggaagtgaga 1440
gggccgcggc aaagccgttt ttccataggc tccgcccccc tgacaagcat cacgaaatct 1500
gacgctcaaa tcagtggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 1560
ctggcggctc cctcgtgcgc tctcctgttc ctgcctttcg gtttaccggt gtcattccgc 1620
tgttatggcc gcgtttgtct cattccacgc ctgacactca gttccgggta ggcagttcgc 1680
tccaagctgg actgtatgca cgaacccccc gttcagtccg accgctgcgc cttatccggt 1740
aactatcgtc ttgagtccaa cccggaaaga catgcaaaag caccactggc agcagccact 1800
ggtaattgat ttagaggagt tagtcttgaa gtcatgcgcc ggttaaggct aaactgaaag 1860
gacaagtttt ggtgactgcg ctcctccaag ccagttacct cggttcaaag agttggtagc 1920
tcagagaacc ttcgaaaaac cgccctgcaa ggcggttttt tcgttttcag agcaagagat 1980
tacgcgcaga ccaaaacgat ctcaagaaga tcatcttatt aatcagataa aatatttcta 2040
gatttcagtg caatttatct cttcaaatgt agcacctgaa gtcagcccca tacgatataa 2100
gttgtaattc tcatgtttga cagcatgcca tcgatcgcga tcttgctcaa ttgttatcag 2160
ctatgcgccg accagaacac cttgccgatc agccaaacgt ctcttcaggc cactgactag 2220
cgataacttt ccccacaacg gaacaactct cattgcatgg gatcattggg tactgtgggt 2280
ttagtggttg taaaaacacc tgaccgctat ccctgatcag tttcttgaag gtaaactcat 2340
cacccccaag tctggctatg cagaaatcac ctggctcaac agcctgctca gggtcaacga 2400
gaattaacat tccgtcagga aagcttggct tggagcctgt tggtgcggtc atggaattac 2460
cttcaacctc aagccagaat gcagaatcac tggctttttt ggttgtgctt acccatctct 2520
ccgcatcacc tttggtaaag gttctaagct caggtgagaa catccctgcc tgaacatgag 2580
aaaaaacagg gtactcatac tcacttctaa gtgacggctg catactaacc gcttcataca 2640
tctcgtagat ttctctggcg attgaagggc taaattcttc aacgctaact ttgagaattt 2700
ttgcaagcaa tgcggcgtta taagcattta atgcattgat gccattaaat aaagcaccaa 2760
cgcctgactg ccccatcccc atcttgtctg cgacagattc ctgggataag ccaagttcat 2820
ttttcttttt ttcataaatt gctttaaggc gacgtgcgtc ctcaagctgc tcttgtgtta 2880
atggtttctt ttttgtgctc atacgttaaa tctatcaccg caagggataa atatctaaca 2940
ccgtgcgtgt tgactatttt acctctggcg gtgataatgg ttgcatgtac taaggaggtt 3000
gtt 3003
<210> 8
<211> 3348
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> wektor pAMP1-HisA-13-epitop
<400> 8
catgcaccac caccaccacc acagctcttc acccaccaaa ccgaccgacg gtaacgggcc 60

caccaaaccg accgacggta acgggcccac caaaccgacc gacggtaacg ggcccaccaa 120
accgaccgac ggtaacgggc ccaccaaacc gaccgacggt aacgggccca ccaaaccgac 180
cgacggtaac gggcccacca aaccgaccga cggtaacggg cccaccaaac cgaccgacgg 240
taacgggccc accaaaccga ccgacggtaa cgggcccacc aaaccgaccg acggtaacgg 300
gcccaccaaa ccgaccgacg gtaacgggcc caccaaaccg accgacggta acgggcccac 360
caaaccgacc gacggtaacg ggcccagaag agctaagtaa gtaagagctc gacccggtcg 420
aatttgcttt cgaatttctg ccattcatcc gcttattatc acttattcag gcgtagcacc 480
aggcgtttaa gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac gccccgccct gccactcatc 540
gcagtactgt tgtaattcat taagcattct gccgacatgg aagccatcac agacggcatg 600
atgaacctga atcgccagcg gcatcagcac cttgtcgcct tgcgtataat atttgcccat 660
ggtgaaaacg ggggcgaaga agttgtccat attggccacg tttaaatcaa aactggtgaa 720
actcacccag ggattggctg agacgaaaaa catattctca ataaaccctt tagggaaata 780
ggccaggttt tcaccgtaac acgccacatc ttgcgaatat atgtgtagaa actgccggaa 840
atcgtcgtgg tattcactcc agagcgatga aaacgtttca gtttgctcat ggaaaacggt 900
gtaacaaggg tgaacactat cccatatcac cagctcaccg tctttcattg ccatacggaa 960
ttccggatga gcattcatca ggcgggcaag aatgtgaata aaggccggat aaaacttgtg 1020
cttatttttc tttacggtct ttaaaaaggc cgtaatatcc agctgaacgg tctggttata 1080
ggtacattga gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct ttacgatgcc attgggatat 1140
atcaacggtg gtatatccag tgatttttt ctccatttta gcttccttag ctcctgaaaa 1200
tctcgataac tcaaaaaata cgcccggtag tgatcttatt tcattatggt gaaagttgga 1260
acctcttacg tgccgatcaa cgtctcattt tcgccaaaag ttggcccagg gcttcccggt 1320
atcaacaggg acaccaggat ttatttattc tgcgaagtga tcttccgtca caggtattta 1380
ttcggcgcaa agtgcgtcgg gtgatgctgc caacttactg atttagtgta tgatggtgtt 1440
tttgaggtgc tccagtggct tctgtttcta tcagctgtcc ctcctgttca gctactgacg 1500
gggtggtgcg taacggcaaa agcaccgccg gacatcagcg ctagcggagt gtatactggc 1560
ttactatgtt ggcactgatg agggtgtcag tgaagtgctt catgtggcag gagaaaaaag 1620
gctgcaccgg tgcgtcagca gaatatgtga tacaggatat attccgcttc ctcgctcact 1680
gactcgctac gctcggtcgt tcgactgcgg cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga 1740
gatttcctgg aagatgccag gaagatactt aacagggaag tgagagggcc gcggcaaagc 1800
cgtttttcca taggctccgc ccccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt 1860
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctggc ggctccctcg 1920
tgcgctctcc tgttcctgcc tttcggttta ccggtgtcat tccgctgtta tggccgcgtt 1980
tgtctcattc cacgcctgac actcagttcc gggtaggcag ttcgctccaa gctggactgt 2040
atgcacgaac cccccgttca gtccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag 2100
tccaacccgg aaagacatgc aaaagcacca ctggcagcag ccactggtaa ttgatttaga 2160
ggagttagtc ttgaagtcat gcgccggtta aggctaaact gaaaggacaa gttttggtga 2220
ctgcgctcct ccaagccagt tacctcggtt caaagagttg gtagctcaga gaaccttcga 2280
aaaaccgccc tgcaaggcgg tttttcgtt ttcagagcaa gagattacgc gcagaccaaa 2340
acgatctcaa gaagatcatc ttattaatca gataaaatat ttctagattt cagtgcaatt 2400
tatctcttca aatgtagcac ctgaagtcag ccccatacga tataagttgt aattctcatg 2460
tttgacagca tgccatcgat cgcgatcttg ctcaattgtt atcagctatg cgccgaccag 2520
aacaccttgc cgatcagcca aacgtctctt caggccactg actagcgata actttcccca 2580
caacggaaca actctcattg catgggatca ttgggtactg tgggtttagt ggttgtaaaa 2640
acacctgacc gctatccctg atcagtttct tgaaggtaaa ctcatcaccc ccaagtctgg 2700
ctatgcagaa atcacctggc tcaacagcct gctcagggtc aacgagaatt aacattccgt 2760
caggaaagct tggcttggag cctgttggtg cggtcatgga attaccttca acctcaagcc 2820
agaatgcaga atcactggct tttttggttg tgcttaccca tctctccgca tcacctttgg 2880
taaaggttct aagctcaggt gagaacatcc ctgcctgaac atgagaaaaa acagggtact 2940
catactcact tctaagtgac ggctgcatac taaccgcttc atacatctcg tagatttctc 3000
tggcgattga agggctaaat tcttcaacgc taactttgag aatttttgca agcaatgcgg 3060
cgttataagc atttaatgca ttgatgccat taaataaagc accaacgcct gactgcccca 3120
tccccatctt gtctgcgaca gattcctggg ataagccaag ttcatttttc tttttttcat 3180
aaattgcttt aaggcgacgt gcgtcctcaa gctgctcttg tgttaatggt ttctttttg 3240
tgctcatacg ttaaatctat caccgcaagg gataaatatc taacaccgtg cgtgttgact 3300
attttacctc tggcggtgat aatggttgca tgtactaagg aggttgtt 3348

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> sekwecja kodująca epitop HBV

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(21)
<400> 9
acc aaa ccg acc gac ggt aac 21
Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn
1 5
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 10
Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn
1 5
<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> moduł powielający
<400> 11
gctcttcacc cgggcccaga agagc 25

Zastrzeżenia patentowe

1. Wektor DNA zawierający sekwencję modułu powielającego obejmującą dwie konwergentnie skierowane sekwencje DNA rozpoznawane przez SapI i znajdującą się pomiędzy nimi sekwencję DNA zawierającą miejsce służące do wklonowania insertu rozpoznawane przez SmaI, przy czym korzystnie moduł powielający posiada sekwencję GCTCTTCAC-CCGGGCCCAGAAGAGC.
2. Wektor DNA według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jest on wektorem ekspresji białek, zawiera dodatkowo origin replikacji, korzystnie p15A, gen oporności na antybiotyk, korzystnie chloramfenikol, promotor transkrypcji, korzystnie PR bakteriofaga lambda, gen represora, korzystnie cI 857 ts, sygnał inicjacji translacji, ewentualnie sekwencję kodującą 6-ciu reszt histydyny, oraz sekwencję kodującą sygnał stopu translacji.
3. Wektor DNA według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera sekwencję wybraną spośród sekwencji 1–6.
4. Wektor DNA według zastrz. 1, **znamienny tym**, że posiada sekwencję 7.
5. Sposób uzyskiwania białka poliepitopowego, **znamienny tym**, że:
   a) posiadającą tępe końce sekwencję DNA kodującą epitop wklonowuje się do wektora DNA określonego w zastrz. 1–4 w miejscu rozpoznawanym przez SmaI,
   b) uzyskany wektor namnaża się w gospodarzu bakteryjnym, izoluje się i trawi się SapI, a następnie izoluje się fragment zawierający sekwencję DNA kodującą epitop, zmodyfikowaną w taki sposób, że opatrzona jest ona jednoniciowymi kohezyjnymi końcami, warunkującymi kierunkową ligację insertu do konkatameru,
   c) prowadzi się autoligację wyizolowanego fragmentu,
   d) produkt autoligacji wklonowuje się do wektora DNA określonego w zastrz. 1–4 w miejscu rozpoznawanym przez SapI i
   e) uzyskanym wektorem transformuje się gospodarza bakteryjnego i prowadzi się ekspresję, a następnie izolację białka poliepitopowego,

   przy czym w celu zwiększenia wielkości białka poliepitopowego, przed przystąpieniem do realizacji etapu e) powtarza się etapy od b) do d).

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że epitopem jest epitop HBV, korzystnie kodowany przez syntetyczną sekwencję 9.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że powielany odcinek monomeru zawiera różne epitopy, pochodzące z różnych białek lub różnych rejonów tego samego białka, korzystnie kodowane przez sekwencję syntetyczną.

Rysunki

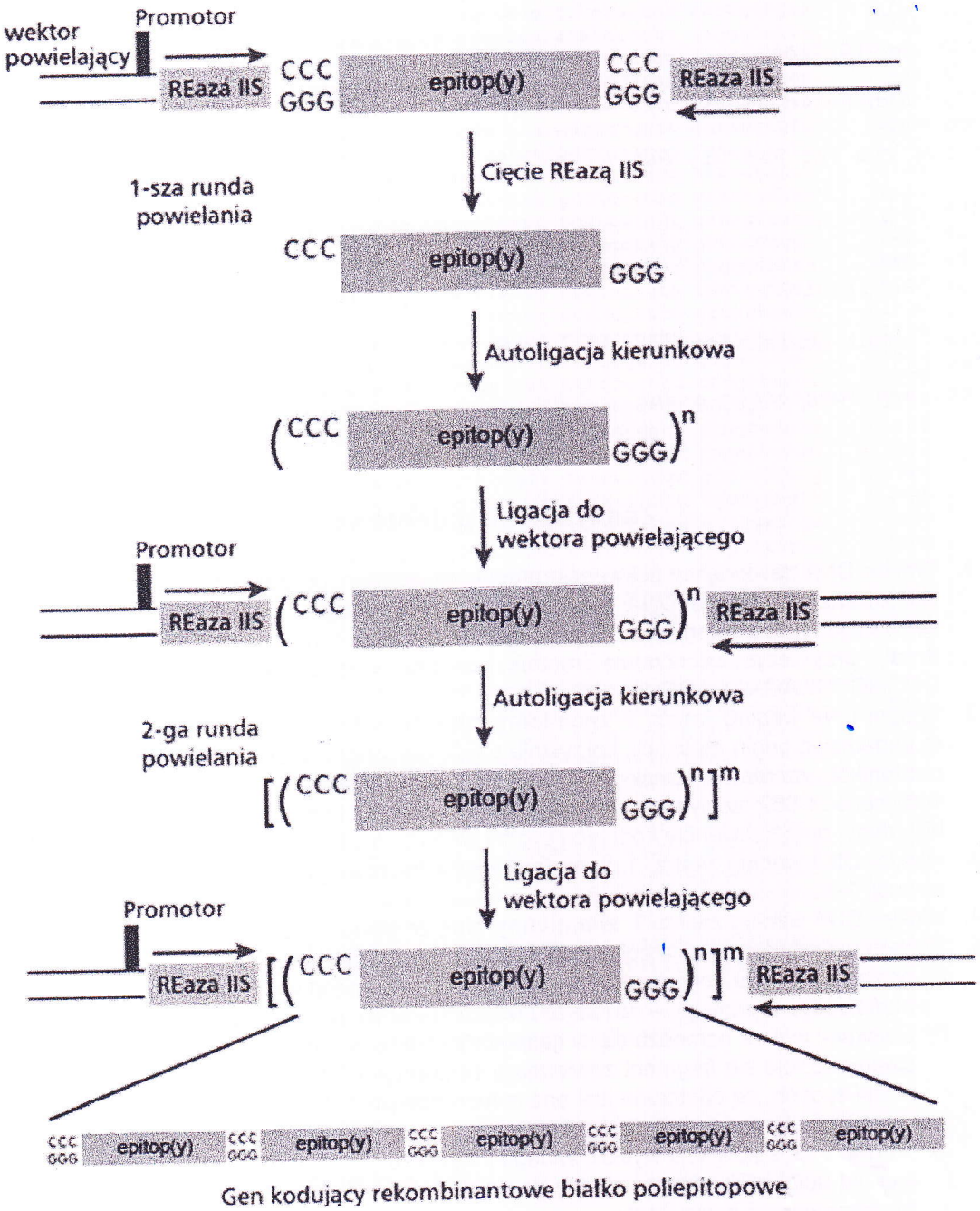

Fig. 1

Wektor 1: **pAMP1-A**: ORF A (w fazie odczytu miejsce cięcia SmaI)

SapI SmaI SapI STOP (3 ORF)

ATG C GCTCTTC A**CCC|GGG CCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met Arg Ser Ser Pro

Wektor 2: **pAMP1-B**: ORF B (faza -1 pz)

SapI SmaI SapI STOP (3 ORF)

ATG GCTCTTC A**CCC|GGGCCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met Ala Leu His

Wektor 3: **pAMP1-C**: ORF C (faza +1 pz)

SapI SmaI SapI STOP (3 ORF)

ATG CC GCTCTTC A**CCC|GGG CCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met Pro Leu Phe Thr

Wektor 4: **pAMP1-HisA**: ORF A /znacznik N- His_6 (w fazie odczytu miejsce cięcia SmaI)

His_6 SapI SmaI SapI STOP (3 x ORF)

ATG **CAC CAC CAC CAC CAC CAC** A GCTCTTC A**CCC|GGG CCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met His His His His His His Ser Ser Ser Pro

Wektor 5: **pAMP1-HisB**: ORF B (faza -1 pz) / znacznik N- His_6

His_6 SapI SapI STOP (3 x ORF)

ATG **CAC CAC CAC CAC CAC CAC** GCTCTTC A**CCC|GGGCCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met His His His His His His Ala Leu His

Wektor 6: **pAMP1-HisC**: ORF C (faza +1 pz) / znacznik N- His_6

His_6 SapI SapI STOP (3 x ORF)

ATG **CAC CAC CAC CAC CAC CAC** CC GCTCTTC A**CCC|GGGCCC** AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG

Met His His His His His His Pro Leu Phe Thr

Fig. 2

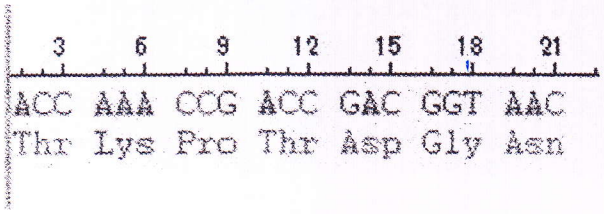

Fig. 3

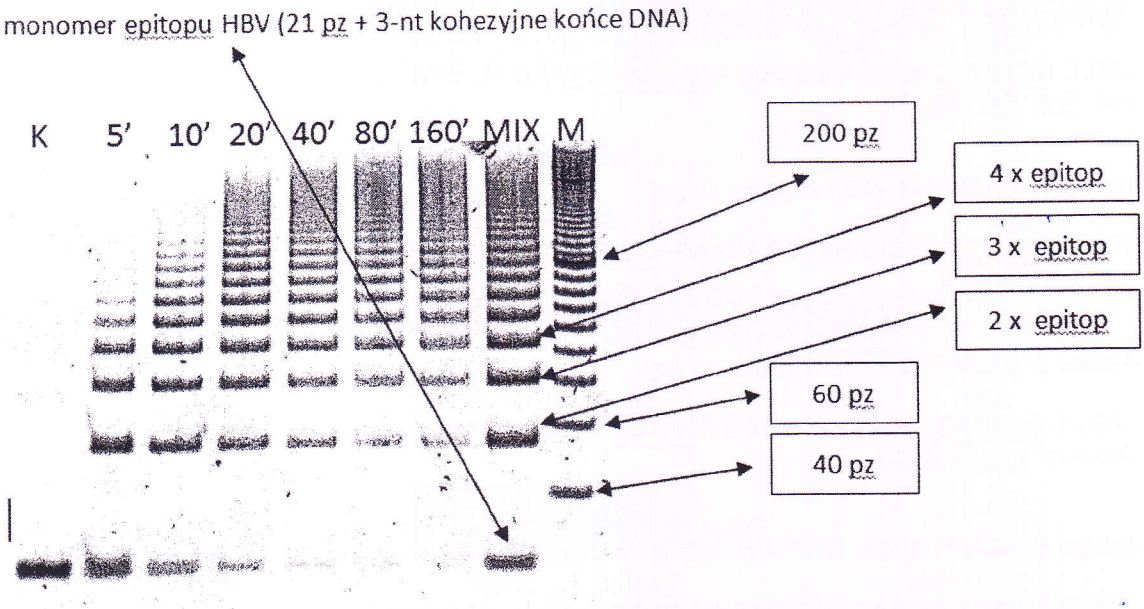
monomer epitopu HBV (21 pz + 3-nt kohezyjne końce DNA)
K
5'
10'
20'
40'
80'
160'
MIX
M
200 pz
4 x epitop
3 x epitop
2 x epitop
60 pz
40 pz

Fig. 4

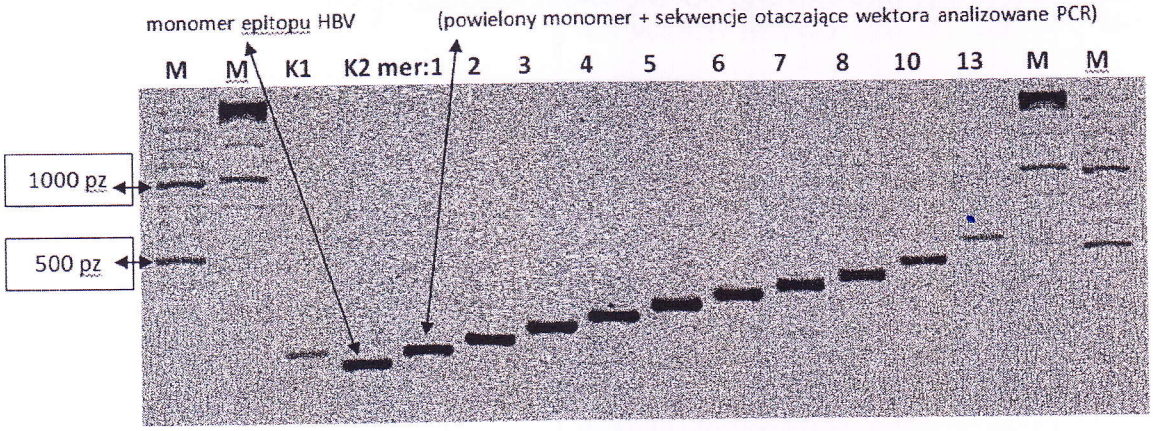
monomer epitopu HBV
(powielony monomer + sekwencje otaczające wektora analizowane PCR)
M
M
K1
K2 mer:1
2
3
4
5
6
7
8
10
13
M
M
1000 pz
500 pz

Fig. 5

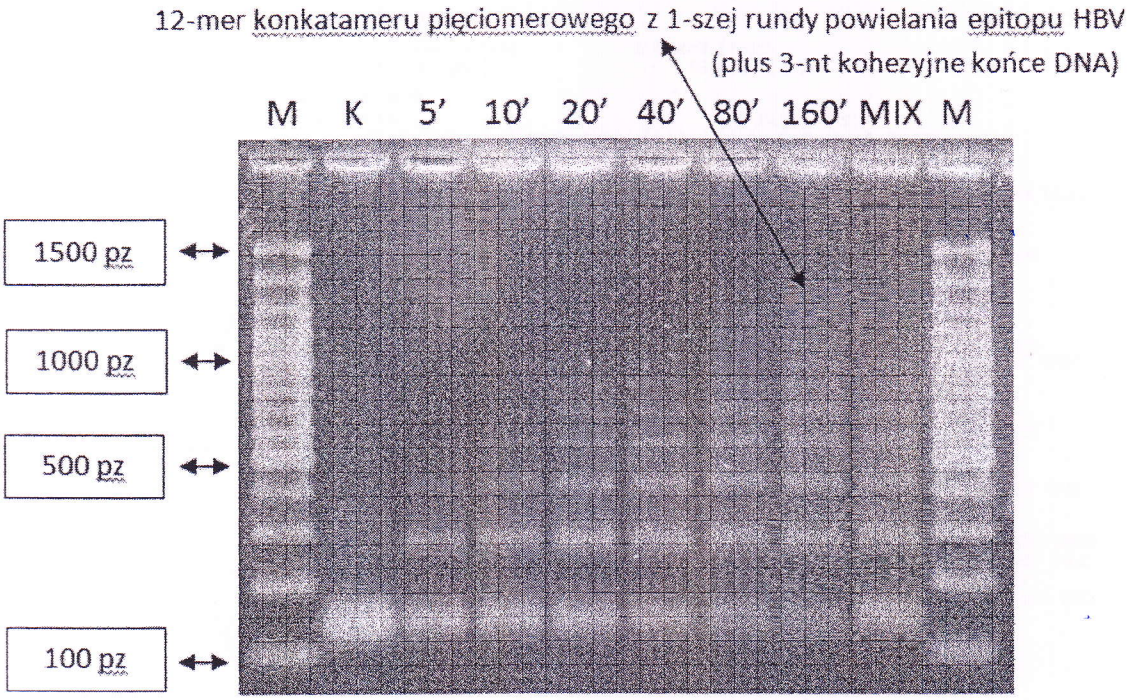
12-mer konkatameru pięciomerowego z 1-szej rundy powielania epitopu HBV
(plus 3-nt kohezyjne końce DNA)
M K 5' 10' 20' 40' 80' 160' MIX M
1500 pz
1000 pz
500 pz
100 pz

Fig. 6

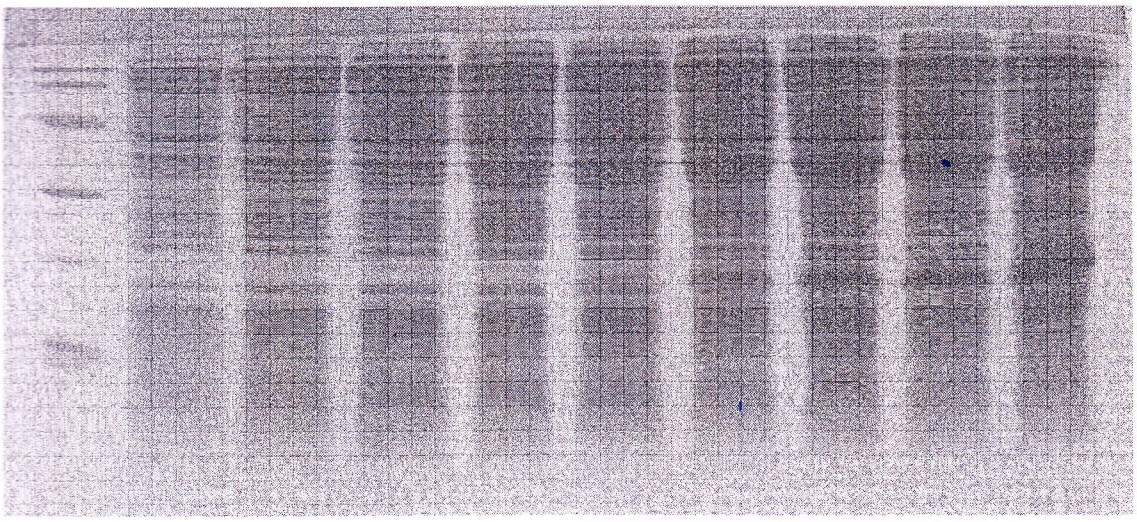

Fig. 7

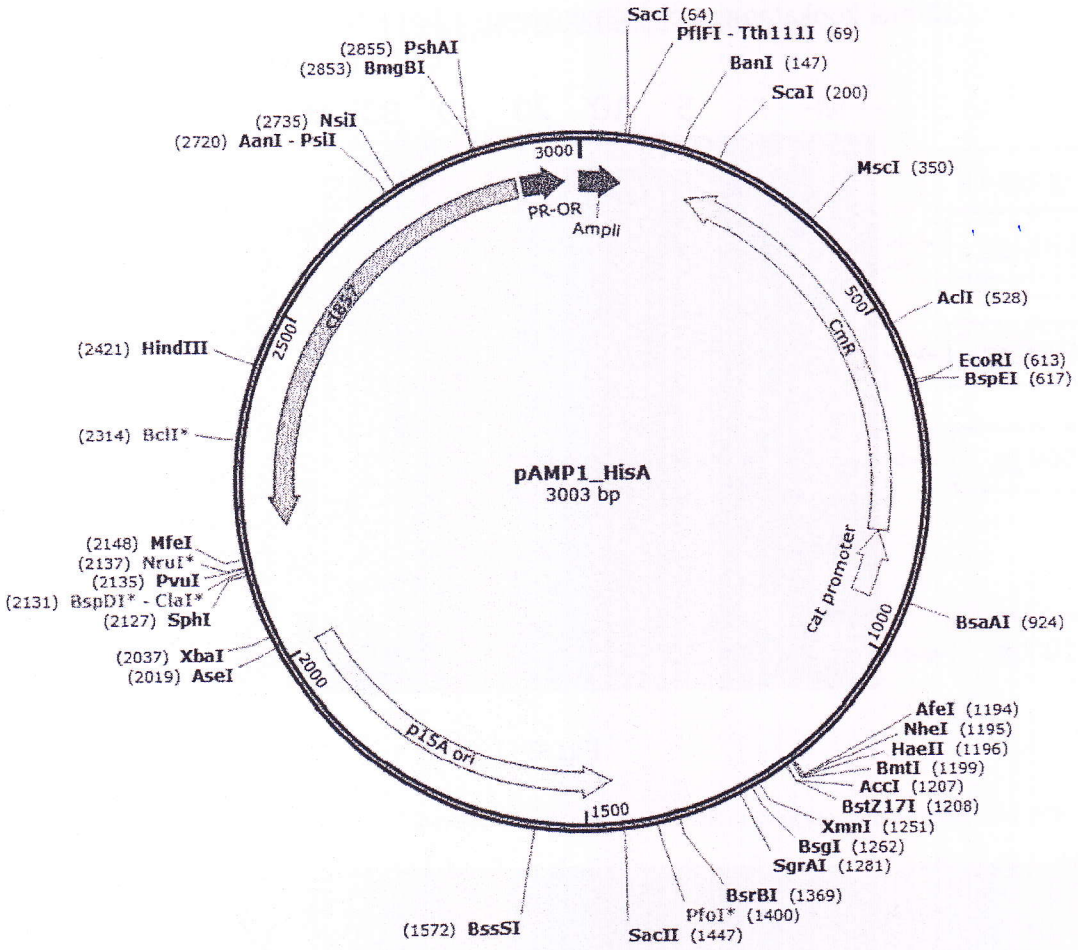
SacI (64)
PflFI - Tth111I (69)
BanI (147)
ScaI (200)
MscI (350)
AclI (528)
EcoRI (613)
BspEI (617)
BsaAI (924)
AfeI (1194)
NheI (1195)
HaeII (1196)
BmtI (1199)
AccI (1207)
BstZ17I (1208)
XmnI (1251)
BsgI (1262)
SgrAI (1281)
BsrBI (1369)
PfoI* (1400)
SacII (1447)
(1572) BssSI
(2314) BclI*
(2421) HindIII
(2148) MfeI
(2137) NruI*
(2135) PvuI
(2131) BspDI* - ClaI*
(2127) SphI
(2037) XbaI
(2019) AseI
(2720) AanI - PsiI
(2735) NsiI
(2853) BmgBI
(2855) PshAI
3000
PR-OR
Ampli
500
CmR
1000
cat promoter
1500
p15A ori
2000
2500
cBZ1

Fig. 8

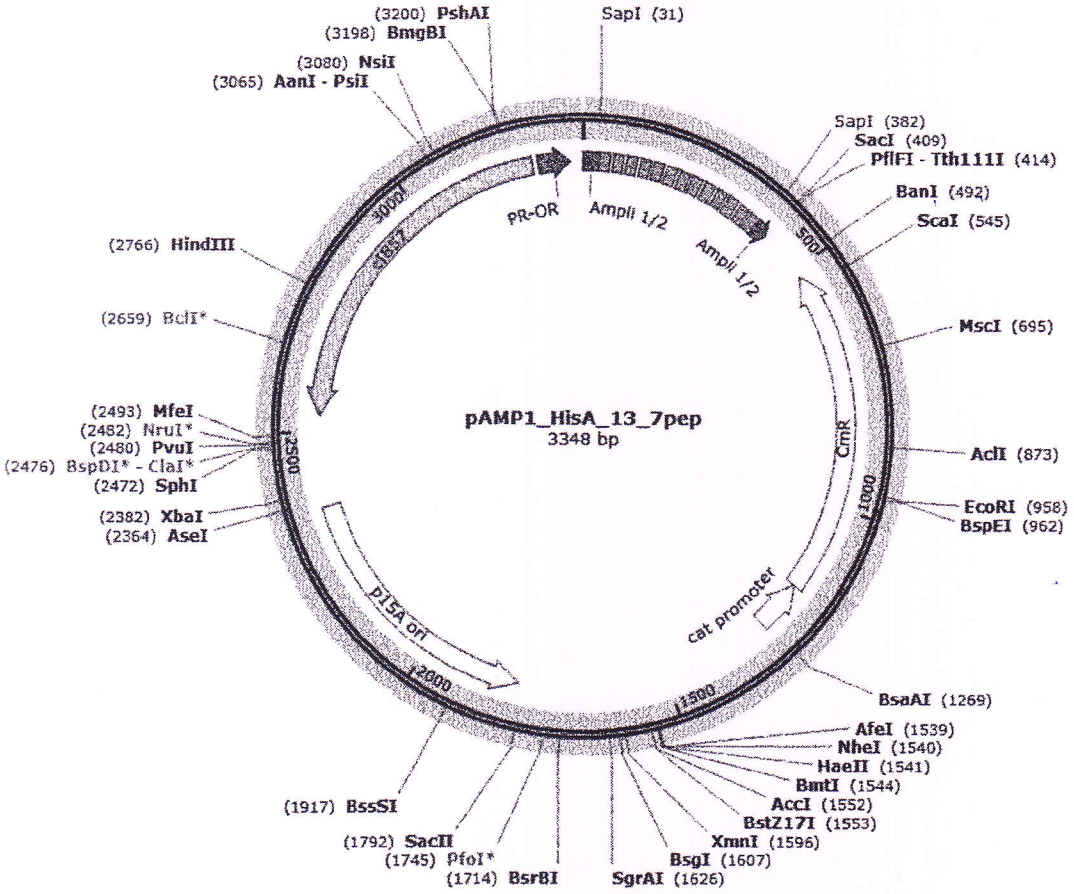
(3200) PshAI
(3198) BmgBI
(3080) NsiI
(3065) AanI - PsiI
SapI (31)
SapI (382)
SacI (409)
PflFI - Tth111I (414)
BanI (492)
ScaI (545)
MscI (695)
AclI (873)
EcoRI (958)
BspEI (962)
BsaAI (1269)
AfeI (1539)
NheI (1540)
HaeII (1541)
BmtI (1544)
AccI (1552)
BstZ17I (1553)
XmnI (1596)
BsgI (1607)
SgrAI (1626)
(1714) BsrBI
(1745) PfoI*
(1792) SacII
(1917) BssSI
(2364) AseI
(2372) XbaI
(2472) SphI
(2476) BspDI* - ClaI*
(2480) PvuI
(2482) NruI*
(2493) MfeI
(2659) BclI*
(2766) HindIII
PR-OR
Ampli 1/2
Ampli 1/2
CmR
cat promoter
p15A ori
pAMP1_HisA_13_7pep
3348 bp
500
1000
1500
2000
2500
3000

Fig. 9

Departament Wydawnictw UPRP
Cena 4,92 zł (w tym 23% VAT)