



F1000103129B



SUOMI-FINLAND (FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 103129 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 30.04.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12N 1/19, 15/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 892114

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 03.05.1989

(24) Alkupaivä - Löpdag 03.05.1989

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 05.11.1989

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

04.05.1988 GB 8810524 P

27.05.1988 GB 8812627 P

29.03.1989 GB 8907110 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 Basel, Switzerland, (CH)
2. UCP Gen-Pharma AG, Solothurnstrasse 24, 3422 Kirchberg, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Treichler, Hansjörg, Ringgackerstrasse 1, 4447 Känerkinden, Switzerland, (CH)
2. Takabayashi, Kenji, Amerbachstrasse 43, 4057 Basel, Switzerland, (CH)
3. Wolf, Dieter Heinrich, Lindenstrasse 61, 7803 Gundelfingen, Germany, (DE)
4. Heim, Jutta, Zelgliring 17, 4433 Ramllinsburg, Switzerland, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4-6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Saccharomyces cerevisiae -kanta ja menetelmä S. cerevisiaelle heterologisen proteiinin tuottamiseksiSaccharomyces cerevisiae -stam och förfarande för att producera ett protein som är heterologt med avseende på S. cerevisiae(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 4413 DSM 4414 DSM
4473 DSM 4583 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 340170 (C 12N 15/00),
Febs Letters, vol. 221, 1987, p. 423-426

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uutta menetelmää heterologisten proteiinien tuottamiseksi siten, että käytetään tiettyjä transformoituneita, proteaasivajaita hiivakantoja. Lisäksi keksintö koskee mainittuja transformoituneita hiivakantoja ja menetelmiä niiden valmistamiseksi.

Uppfinningen avser ett nytt förfarande för att producera heterologa proteiner genom att använda vissa transformerade, proteaasfattiga jäststammar. Uppfinningen avser vidare de nämnda transformerade jäststammarna och förfaranden för framställning därav.

Saccharomyces cerevisiae -kanta ja menetelmä S. cerevisiaelle heterologisen proteiinin tuottamiseksi

Esillä oleva keksintö liittyy yhdistelmä-DNA-tekniikkaan ja koskee parannettua menetelmää polypeptidien valmistamiseksi geeniteknologisesti aikaansaatuja Saccharomyces cerevisiae -solujen avulla, mainittuja geeniteknologisesti aikaansaatuja S. cerevisiae-soluja ja menetelmiä näiden solujen valmistamiseksi.

Viime aikoina on saatu hiivasoluissa ilmentymään melkoinen joukko heterologisia proteiineja, kun hiivasolut on transformoitu sopivalla ilmentämisvektorilla, joka sisältää kyseistä proteiinia koodittavan DNA-sekvenssin, joita proteiineja ovat esim. α -interferoni (TFN α , Hitzeman *et al.* (1981) *Nature* 294, 717 - 722), lysotsyymi (Oberto *et al.* (1985) *Gene* 40, 57 - 65), α -amylaasi (Sato *et al.* (1986) *Gene* 50, 247 - 257), kudostyyppinen plasminogeenin aktivaattori (t-Pa, eurooppalainen patenttihakemus no. 143 081) ja desulfatohirudiini (eurooppalainen patenttihakemus no. 255 633). Usein heterologiset proteiinit eivät kuitenkaan syntetisoidu puhtaassa muodossa vaan seoksena, joka sisältää osittain hajonneita, kuten C-päästä lyhentyneitä proteiineja. Esimerkiksi ihmisen atriaalisen natriureettisen peptidin (hANP) ilmentämisessä hiivassa tapahtui kypsän hANP:n kahden muodon erittyminen, jotka C-päästään poikkesivat toisistaan (Vlasuk *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4798 - 4796). Pääosa oli sellaista, josta puuttui proteiinin kaksi viimeistä aminohappoa (Arg 150 ja Tyr 151), ja pieni osa oli täyspitkää materiaalia. Vastaavanlaisia tuloksia on saatu ilmennettäessä epidermaalista kasvutekijää (EGF) hiivassa (George-Nascimento *et al.* (1988) *Biochemistry* 27, 797 - 802), jolloin erittyneet ilmentymistuotteet olivat heterogeenisiä sikäli, että joko viimeinen aminohappo (Arg 53) tai kaksi viimeistä amino-

happoa (Leu 52 ja Arg 53) puuttuivat eikä täyspitkää EGF:ää syntynyt lainkaan.

Polyeptidi, joka aivan äskettäin on herättänyt melkoista huomiota molekyylibiologien keskuudessa, on hirudiini, joka on verijuotikkaissa (Hirudo medicinalis) luonnostaan esiintyvä antikoagulantti. Hirudiini ei ole yksi ainut polypeptidilaatu vaan joukko samalla tavoin toimivia polypeptidejä, joita on vähintään neljä, ja jotka ovat nimeltään hirudiinimuunnos 1 (HV1), hirudiinimuunnos 2 (HV2) (ks. eurooppalainen patenttihakemus no. 158 564), hirudiinimuunnos PA (ks. PCT-patenttihakemus no. 86/03493) ja "des-(Val)₂-hirudiini" (ks. eurooppalainen patenttihakemus no. 158 986). Muunnokset poikkeavat rakenteeltaan toisistaan aminohappojen suhteen (erityisesti HV1:n N-pään sekvenssi on Val-Val-Tyr, HV2:n ja PA:n N-pään sekvenssi on Ile-Thr-Tyr ja "des-(Val)₂-hirudiinin" N-pään sekvenssi on Thr-Tyr), mutta niissä on kertyneinä hydrofobisia aminohappoja N-päähän ja polaarisia aminohappoja C-päähän, tyrosiinitähde (Tyr⁶³) läsnä monoesterinä, kolme disulfidisiltaa ja antikoagulanttiaktiivisuus, mikä kaikki on yhteistä.

Äskettäin on kloonattu hirudiinimuunnoksia koodittavia cDNA-sekvenssejä ja synteettisiä geenejä ja ilmenetty niitä mikrobi-isännissä. Vaikka ilmentymistuotteista puuttui sulfaattimonoesteriryhmä Tyr⁶³:sta - mistä syystä niille annettiin nimeksi "desulfatohirudiini" - ne osoittivat biologisesti suurin piirtein samaa aktiivisuutta kuin luontaiset sulfatoituneet hirudiinit. Desulfatohirudiinimuunnos HV1 on ilmenetty Escherichia colissa (eurooppalaiset patenttihakemukset no. 158 564 ja 168 342) ja Saccharomyces cerevisiaessa (eurooppalaiset patenttihakemukset no. 168 342, 200 655, 225 633 ja 252 854). Vastaavasti on desulfatohirudiinia HV2 ilmenetty Escherichia colissa (eurooppalainen patenttihakemus no. 158 564) ja Saccharomyces cerevisiaessa (eurooppalainen patenttihakemus no. 200 655 ja PCT-patenttihakemus

mus no. 86/01224) ja des-(Val)₂-desulfatohirudiinia on ilmennetty Escherichia colissa (eurooppalainen patentti-hakemus no. 158 986).

Yleensä hirudiiniyhdisteiden ilmentymistehokkuus ja saannot ovat suurempia, kun isäntämikro-organismiksi valitaan S. cerevisiae. Kuitenkin riippumatta ilmentämisessä käytetystä kulloisestakin hiivakannasta osoitautui ilmentymistuote desulfatohirudiinilaatujen heterogeeniseksi seokseksi, jotka laadut poikkesivat toisistaan C-pään sekvenssin suhteen. Esimerkiksi ravintoalustoiden, jotka oli saatu kasvattamalla niissä hirudiinimuunnos HV1-geeniä sisältävää hiivakantaa, havaittiin sisältävän desulfatohirudiinia HV1, joka oli kontaminoitunut huomattavalla määrällä analogeja, joista puuttui C-pään aminohappo Gln⁶⁵ tai C-pään aminohapot Leu⁶⁴ ja Gln⁶⁵.

On työlästä ja aikaavievää erottaa ja puhdistaa homogeenisiksi komponenteiksi seokset, jotka sisältävät täyspitkää proteiinia, kuten desulfatohirudiinia, hANP:tä tai EGF:ää, sekä näiden C-päästä lyhentyneitä johdannaisia. Kustannussyistä tarvitaan aiempiin verrattuina parempia menetelmiä, joilla saadaan taloudellisesti kannattavalla tavalla tuotetuksi homogeenisiä proteiineja, kuten desulfatohirudiinia, hiivassa. Esillä oleva keksintö tarjoaa menetelmiä homogeenisten heterologisten proteiinien tuottamiseksi hiivassa.

Vaikka onkin ilmeistä, että C-päästään lyhentyneiden heterologisten proteiinien johdannaisten esiintymisen sellaisten transformoituneiden hiivasolujen kasvatusalustoissa, jotka sisältävät mainittua proteiinia koodittavan vastaavan DNA-sekvenssin, johtuu hiivan endogeenisten proteaasien luennanjälkeisestä vaikutuksesta primääriseen ilmentymistuotteeseen, esimerkiksi integraaliseen desulfatohirudiiniin, ei kyseistä(kyseisiä) proteaasia(proteaaseja), joka(jotka) saa(saavat) aikaan hajoamisen C-päässä, ole tähän mennessä tunnistettu. Tärkeimpiä hiivan proteaaseja, jotka yleisesti ottaen osallistuvat

proteiinien hajottamiseen, ovat endopeptidaasit yscA ja yscB ja karboksipeptidaasit yscY ja yscS. Käyttämällä hiivakantoja, joilta puuttuu proteaasien A, B, Y ja/tai S aktiivisuus, voidaan osittain vähentää vieraiden geenituotteiden, kuten desulfatohirudiinin, satunnaista hajoaamista. Tästä huolimatta on vielä havaittavissa huomattavia määriä proteiineja, joista puuttuu yksi tai kaksi aminohappoa C-päästä.

Nyt on yllättäen havaittu, että hiivamutanttikannat, joista puuttuu karboksipeptidaasi ysc κ -aktiivisuus, eivät kykene poistamaan aminohappoja heterologisten proteiinien C-päästä ja tuottavat näin ollen integraalisia (autenttisia) proteiineja. Karboksipeptidaasi ysc κ on kalvoon yhteydessä oleva proteiini ja sillä on, kuten hyvin tiedetään, tärkeä osuus tappajatekijän ja parittelutekijä κ :n kypsymisessä (ks. J.C. Wagner ja D.H. Wolf (1987) FEBS Letters 221, 423). Se on KEX1-geenin ilmentymistuote. Julkaistujen tulosten perusteella (ks. P.S. Rendueles ja D.H. Wolf (1988) FEMS Microbiol. Rev. 54, 17) rajoittuu ysc κ :n vaikutus voimakkaasti C-pään emäksisiin aminohappotähteisiin (Arg, Lys). Näiden tietojen perusteella ja sen seikan perusteella, että desulfatohirudiinin C-pään aminohapot eivät ole emäksisiä (esim. Gln ja Leu desulfatohirudiinimuunnoksessa HV1), on erittäin yllättävää ja odottamatonta, että käytettäessä hiivamutanttikantoja, joista puuttuu ysc κ -aktiivisuus, on mahdollista tuottaa homegeenista desulfatohirudiinia ilman, että tarvitsee työläästi erottaa pois C-päästä lyhentyneitä desulfatohirudiinianalogeja.

Sama pitää paikkansa muille heterologisille proteiineille, kuten esimerkiksi hANP:lle, EGF:lle ja sidekudosta aktivoiva peptidi III:lle (CTAP-III, Mullenbach *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261, 719 - 722), joita voidaan tuottaa täysmittaisessa muodossa, kun sopivalla vektorilla transformoidaan hiivamutanttikanta, josta puuttuu karboksipeptidaasi ysc κ -aktiivisuus.

Näin ollen esillä oleva keksintö koskee parannettua menetelmää hiivalle, erityisesti S. cerevisiaelle heterologisen proteiinin tuottamiseksi homogeenisessä muodossa siten, että kasvatetaan hiivakantaa, josta puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus, ja joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, jossa on hiivan promoottori toimivasti liittyneenä mainittua heterologista proteiinia koodittavaan DNA-sekvenssiin, ja eristetään mainittu heterologinen proteiini.

Erityisesti esillä oleva keksintö koskee parannettua menetelmää hiivalle heterologisen proteiinin tuottamiseksi homogeenisessä muodossa siten, että kasvatetaan mainittua hiivakantaa, joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaaliptidiä, ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa mainittua heterologista proteiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptiionlopetussignaaleja, ja eristetään mainittu heterologinen proteiini.

Heterologisia proteiineja, joita voidaan tuottaa esillä olevan keksinnön mukaisella parannetulla menetelmällä, ovat proteiinit, jotka ovat taipuvaisia karboksipeptidaasi ysc α :n aiheuttamalle C-pään hajoamiselle hiivassa ilmentymisen jälkeen. Tällaisille heterologisille proteiineille on tunnusomaista kaksi C-pään aminohappoa, joka on valittu seuraavien joukosta; Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn ja Ser. Etusijalle asetettavia heterologisia proteiiniä ovat edellä mainitut, erityisesti desulfatohirudiini.

Ensi sijassa esillä oleva keksintö koskee parannettua menetelmää desulfatohirudiinin tuottamiseksi siten, että kasvatetaan S. cerevisiae-kantaa, josta puuttuu ysc α -aktiivisuus, ja joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää desulfatohirudiinin ilmentämiskasetin, jossa on hiivan promoottori toimivasti liittyneenä

ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaalipeptidiä, joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittynään toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa desulfatohirudiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaali, ja eristetään desulfatohirudiini.

Termi "desulfatohirudiini" kattaa desulfatohirudiiniyhdisteet, joita on selostettu kirjallisuudessa, tai jotka on saatavissa transformoituneesta mikrobikannasta, joka sisältää desulfatohirudiinia koodittavan DNA-sekvenssin. Tällaisia desulfatohirudiineja ovat esimerkiksi desulfatohirudiinimuunnokset HV1, HV1 (muunnetut a, b), HV2, HV2 (muunnetut a, b, c), PA, PA:n muunnokset ja des(Val₂)-desulfatohirudiini.

Etusijalle asetettavia desulfatohirudiineja ovat kaavan (I) mukaiset

X₁ Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys
 Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn X₂ Cys
 Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu X₃ Asn Gln Cys Val Thr Gly
 Glu Gly Thr Pro X₄ Pro Gln Ser X₅ Asn Asp Gly Asp Phe
 Glu Glu Ile Pro Glu X₆

(I),

jossa kaavassa

- a) X₁ on dipeptiditähde Val-Val ja kukin ryhmistä X₂, X₃ ja X₃ on Lys, X₅ on His ja X₆ on peptiditähde Glu-Tyr-Leu-Gln (HV1) tai
- b) X₂ on Ile tai Glu ja X₁ ja X₃ - X₆ ovat kohdassa a) määriteltäviä (HV1 muunnettu a), tai
- c) X₃ on Ile tai Glu ja X₁, X₂ ja X₄ - X₆ ovat kohdassa a) määriteltäviä (HV1 muunnettu a) tai
- d) X₄ on Ile tai Glu ja X₁ - X₃ ja X₅ ja X₆ ovat kohdassa a) määriteltäviä (HV1 muunnettu a) tai
- e) X₅ on Leu tai Asp ja X₁ - X₄ ja X₆ ovat kohdassa

- a) määriteltäviä (HV1 muunnettu a) tai
 f) X_6 valitaan joukosta Glu-Tyr, Glu-Tyr-Leu,
 Glu-Asp-Leu-Gln, Glu-Glu-Leu-Gln, Glu-Tyr-Lys-Arg, Glu-Asp-
 Lys-Arg, Glu-Lys-Leu-Gln, Ser-Phe-Arg-Tyr, Trp-Glu-Leu-Arg,
 Glu-Tyr-Leu-Gln-Pro ja Glu-Tyr-Leu-Gln-Arg ja $X_1 - X_5$
 ovat kohdassa a) määriteltäviä (HV1 muunnettu b) tai
 g) X_1 on Thr ja $X_2 - X_6$ ovat kohdassa a) määriteltäviä
 (des(Val₂)-desulfatohirudiini),
 tai kaavan (II) mukaiset

Y₁ Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys
 Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Lys Gly Asn Lys Cys
 Ile Leu Gly Ser Asn Gly Lys Gly Asn Gln Cys Val Thr Gly
 Glu Gly Thr Pro Y₂ Pro Glu Ser His Asn Asn Gly Asp Phe
 Glu Glu Ile Pro Glu Glu Y₃ Leu Gln

(II)

jossa kaavassa

- a) Y₁ on N-pään dipeptiditähde Ile-Thr, Y₂ on Asn ja
 Y₃ on Tyr (HV2) tai
 b) Y₂ on Lys, Arg tai His ja Y₁ ja Y₃ ovat kohdassa
 a) määriteltäviä (HV2 muunnettu a) tai
 c) Y₃ on Glu tai Asp ja Y₁ ja Y₂ ovat kohdassa a) määri-
 teltyjä (HV2 muunnettu b) tai
 d) Y₁ on N-pään dipeptiditähde Val-Val ja Y₂ ja Y₃ ovat
 kohdassa a) määriteltäviä (HV2 muunnettu c)
 tai kaavan (III) mukaiset

Ile Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys
 Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Lys Gly Asn Lys Cys
 Ile Leu Gly Ser Gln Gly Lys Asp Asn Gln Cys Val Thr Gly
 Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Gln Gly Asp Phe
 Glu Pro Ile Pro Glu Asp Ala Tyr Asp Glu

(III)

(PA) tai mainitun PA:n muunnokset, joille on tunnuso-
maista primäärisen rakenteen lyhentyneisyys 1 tai 2 amino-
hapolla N-päässä ja 18, 10, 9, 6, 4 tai 2 aminohapolla
C-päässä.

Kaikkein edullisin desulfatohirudiiniyhdiste on
kaavan I mukainen, jossa $X_1 - X_6$ ovat kohdassa a) määri-
teltyjä.

Hiivaisäntäkannat ja yhdistelmävektorien rakenne-
osat ovat jäljempänä selostettuja.

Transformoituneita hiivakantoja kasvatetaan käyttä-
mällä alalla tunnettuja menetelmiä.

Niinpä keksinnön mukaisia transformoituneita hiiva-
kantoja kasvatetaan nestemäisessä ravintoalustassa, joka
sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epä-
orgaanisia suoloja.

Erilaiset hiililähteet ovat käyttökelpoisia. Esimerk-
kejä etusijalle asetettavista hiililähteistä ovat assi-
miloituvat hiilihydraatit, kuten glukoosi, maltoosi,
mannitoli, fruktoosi tai laktoosi tai asetaatit, kuten
natriumasetaatti, joita voidaan käyttää joko yksin tai
sopivina seoksina. Sopivia typpilähteitä ovat esimer-
kiksi aminohapot, kuten kasaminohapot, peptidit ja prote-
iinit ja niiden hajoamistuotteet, kuten tryptoni, pepto-
ni tai lihauutteet, ja edelleen hiivauute, mallasuute,
maissinliuotusvesi sekä ammoniumsuolat, kuten ammonium-
kloridi, -sulfaatti tai -nitraatti, joita voidaan käyttää
joko yksin tai sopivina seoksina. Käytettäväksi sopi-
via epäorgaanisia suoloja ovat mm. natriumin, kaliumin
ja kalsiumin sulfaatti, kloridi, fosfaatti ja karbonaat-
ti. Ravintoalusta voi sisältää lisäksi kasvuaedistäviä
aineita. Kasvua edistäviä aineita ovat mm. hivenaineet,
kuten rauta, sinkki, mangaani tms., tai yksittäiset ami-
nohapot.

Koska endogeeninen 2 μ :n DNA ja yhdistelmävektorit,
joissa on sen replikoni, eivät sovi yhteen, ovat täl-
laisilla yhdistelmävektoreilla transformoituneet hiivasolut

taipuvaisia menettämään viimeksimainitun. Tällaisia hiivasoluja pitää kasvattaa valintaolosuhteissa eli olosuhteissa, jotka vaativat plasmidin koodittaman geenin ilmentymistä kasvua varten. Useimmat tällä hetkellä käytössä olevista valintamerkeistä ja jotka ovat läsnä esillä olevan keksinnön mukaisissa yhdistelmävektoreissa (infra), ovat geenejä, jotka koodittavan aminohapposynteesin tai puriinisynteesin entsyymejä. Tästä syystä on tarpeen käyttää synteettisiä minimiravintoalustoita, joista puuttuu vastaava aminohappo tai puriiniemäs. Yhtä hyvin voidaan käyttää geenejä, jotka antavat vastustuskyvyn sopivan biosidin suhteen (esim. geeni, joka koodittaa vastustuskykyä aminoglykosidille G418). Hiivasoluja, jotka ovat transformoituneet vektorilla, joka sisältää antibioottiresistenssigeenin, kasvatetaan kompleksialustoissa, jotka sisältävät vastaavaa antibioottia, jolloin saavutetaan suuremmat kasvunopeudet ja suuremmat solutiheydet.

Yhdistelmävektorit, joissa on täydellinen 2 μ :n DNA (funktionaalinen replikoitumisen aloituskohta mukaanlukien), pysyvät stabiilisti yllä sellaisissa Saccharomyces cerevisiae-kannoissa, joista puuttuu endogeeninen 2 μ -plasmidi (ns. cir⁰-kannat), joten näiden kantojen kasvatus voidaan suorittaa ei-selektiivisissä kasvuolosuhteissa eli kompleksiravintoalustassa.

Hiivasolut, joissa on konstitutiivisen promoottorin (esim. ADHI, GAPDH) sisältävä yhdistelmäplasmidi, ilmentävät mainitun promoottorin säätelyssä olevaa, heterologista proteiinia koodittavaa DNA:ta ilman induointia. Jos mainittu DNA sen sijaan on säädellyn promoottorin (esim. PGK tai PHO5) ohjauksessa, pitää kasvu-alustan koostumus sovittaa siten, että saavutetaan maksimaalinen määrä mRNA-transkriptejä, eli käytettäessä PHO5-promoottoria pitää ravintoalustan sisältää epäorgaanista fosfaattia pienenä pitoisuutena, jotta tämä promoottori kytkeytyy päälle.

Kasvatus suoritetaan käyttämällä tavanomaisia menetelmiä. Kasvatusolosuhteet, kuten lämpötila, ravintoalustan pH ja fermentaatioaika, valitaan siten, että saadaan tuotetuksi maksimimäärä heterologista proteiinia. Valittua hiivakantaa kasvatetaan mielellään aerobisissa olosuhteissa pinnanalaisviljelmänä ravistelemalla tai sekoittamalla välillä noin 25 - 35°C olevassa lämpötilassa, mielellään noin 28°C:ssa, välillä noin 4 - 7 olevassa pH-arvossa, esimerkiksi pH:ssa noin 5, vähintään 1 - 3 vuorokautta, mutta mielellään niin pitkään, kun on saavutettu tyydyttävä proteiinisaanto.

Hiivassa ilmentyneet heterologiset proteiinit voivat kertyä solujen sisään tai ne voivat erittyä ravintoalustaan. Kun on kyseessä desulfatohirudiini, erittyy suurin osa tuotetusta proteiinista ravintoalustaan riippumatta hiivakannasta, kun käytetään promoottoria ja signaali-peptidiä, ja vain pieni osa pysyy soluihin liittyneenä. Tarkka suhde (erittyneet yhdisteet/solun yhteydessä olevat yhdisteet) riippuu fermentointiolosuhteista ja käytetystä talteenottomenetelmästä. Yleensä suhde on noin 8:1 tai suurempi. Näin ollen erittynyt desulfatohirudiini on aina voimakkaasti vallitsevana.

Heterologinen proteiini voidaan eristää ravintoalustasta tavanomaisilla menetelmillä. Esimerkiksi ensimmäisessä vaiheessa erotetaan solut kasvatusalustasta sentrifugoinnin avulla. Saatu emäliuos voidaan rikastaa heterologisen proteiinin suhteen käsittelemällä polyetyleenimiinillä, jolla suurin osa ei-proteiinimateriaalista poistuu, ja saostamalla proteiinit siten, että liuos kyllästetään ammoniumsulfaatilla. Jos isännän proteiineja on läsnä, ne voidaan myös saostaa tekemällä liuos happamaksi etikkahapolla (esimerkiksi 0,1 %, pH 4 - 5). Jatkorikastaminen heterologisen proteiinin suhteen voidaan suorittaa uuttamalla etikkahappoemäliuos n-butanolilla. Muita puhdistusvaiheita ovat mm. suolanpoisto, kromatografiset prosessit, kuten ioninvaihtokro-

matografia, geelisuodatus, partitiokromatografia, HPLC, käänteisfaasi-HPLC tms. Proteiiniseoksen aineosien erottuminen saadaan tapahtumaan myös dialyysillä, varauksen perusteella geelielektroforeesissa tai kantaja-aineettomassa elektroforeesissa, molekyylikoon perusteella käyttämällä sopivaa Sephadex-pylvästä, affiniteettikromatografialla käyttämällä esimerkiksi vasta-aineita, erityisesti monoklonaalisia vasta-aineita, tai käyttämällä trombiinia liitettyinä affiniteettikromatografiaan sopivaan kantaja-aineeseen, tai muilla menetelmillä, erityisesti kirjallisuudesta tunnetuilla.

Jos heterologinen proteiini ei erity, tai jos halutaan eristää joku muu heterologinen proteiini, joka on yhteydessä soluun eli sellainen, joka on kertynyt solun sisään tai periplasmiseen tilaan, tarvitaan joitakin lisäpuhdistusvaiheita. Niinpä, jos heterologinen proteiini on kertynyt solujen sisään, on ensimmäinen vaihe proteiinin talteenotossa sen vapauttaminen solun sisältä. Useimmissa menetelmissä solunseinä poistetaan ensin suorittamalla entsyymaattinen hajotus glukosidaaseilla (*infra*). Sitten näin saadut sferoplastit käsitellään pinta-aktiivisella aineella, kuten Tritonilla. Vaihtoehtoisesti voidaan solujen rikkomiseen käyttää mekaanisia voimia, kuten leikkausvoimia (esimerkiksi X-puristin, French press) tai ravistelua lasihelmien kanssa. Jos heterologinen proteiini erittyy isäntäsolujen periplasmiseen tilaan, voidaan käyttää yksinkertaistettua menetelmää: Heterologinen proteiini otetaan talteen ilman solujen lysisointia poistamalla solunseinä entsyymaattisesti tai käsittelemällä kemiallisilla aineilla, esim. tiolireagensseilla tai EDTA:lla, jotka saavat aikaan vaurioita solunseinässä niin, että tuote vapautuu.

Kun kyseessä on desulfatohirudiini, voidaan puhdistusmenetelmän kuluessa tutkia jakeiden sisältämää hirudiiniaktiivisuutta hirudiinin tai desulfatohirudiinin vasta-ainetestillä (käyttämällä esimerkiksi hybridooma-

soluista saatuja monoklonaalisia vasta-aineita), trombiini-testillä (M.U. Bergmeyer (toim.), Methods in Enzymatic Analysis, Vol. II, s. 314 - 316, Verlag Chemie, Weinheim (Länsi-Saksa) 1983) tai verenhyytymiskoetta (F. Markwardt et al. (1982) Thromb. Haemost. 47, 226). Vastaavia kirjallisuudesta tunnettuja määrittämenetelmiä voidaan käyttää muiden heterologisten proteiinien havaitsemiseen.

Esillä olevan keksinnön mukaiset transformoituneet hiivasolut voidaan valmistaa yhdistelmä-DNA-menetelmillä, seuraavien vaiheiden kautta:

- valmistetaan yhdistelmävektori, jossa on hiivan promoottori toimivasti liittyneenä heterologista proteiinia koodittavaan DNA-sekvenssiin, ja erityisesti valmistetaan yhdistelmävektori, jossa on hiivan promoottori toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaalipeptidiä, ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaalin, ja
- tarvittaessa saadaan aikaan mutanttahiivakanta, josta puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus,
- transformoidaan näin saatu mutanttahiivakanta mainitulla yhdistelmävektorilla,
- valitaan transformoituneet hiivasolut transformoitumattomien joukosta.

Ilmentämisvektorit

Esillä olevan keksinnön mukaiset hiivan yhdistelmävektorit sisältävät hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia. Etusijalle asetettavat yhdistelmävektorit sisältävät hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaalipeptidiä, ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, kuten desulfatohirudiinia, ja DNA-sekvenssiin,

joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaaleja.

Hiivan promoottori on säädelty promoottori, kuten PHO5-, MF α 1- tai GAL1-promoottori, tai konstitutiivinen promoottori. Desulfatohirudiinin ilmentämisessä asetetaan konstitutiivinen promoottori etusijalle. Konstitutiivinen hiivan promoottori on edullista ottaa voimakkaasti ilmentyvistä hiivageenistä, kuten glykolyyttistä entsyymiä koodittavastageenistä, joista promoottoreista mainittakoon esim. enolaasigeenin, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasigeenin (GAPDH) 3-fosfoglyseraattikinaasigeenin (PGK), heksokinaasigeenin, pyruvaattidekarboksylaasigeenin, fosfofruktokinaasigeenin, glukoosi-6-fosfaatti-isomeraasigeenin, 3-fosfoglyseraattimutaasigeenin, pyruvaattikinaasigeenin, trioosifosfaatti-isomeraasigeenin, fosfogluukoosi-isomeraasigeenin ja glukokinaasigeenin promoottori ja edelleen ADHI- tai TRPI-promoottori ja lyhennetty happofosfataasi-PHO5-promoottori, josta on poistettu ylävirran aktivoitumiskohdat. Erityisen edullinen on GAPDH-promoottori ja sen funktionaaliset fragmentit, jotka alkavat välillä -550 ja -180 olevasta nukleotidista, erityisesti nukleotidista -540, -263 tai -198, ja loppuvat nukleotidiin -5 GAPDH-geenissä, ja lyhennetyt konstitutiiviset PHO5-promoottorit, jotka alkavat välillä -200 ja -150 olevasta nukleotidista, erityisesti nukleotidista -173, ja päättyvät nukleotidiin -9 PHO5-geenissä.

Signaaliipeptidiä koodittava DNA-sekvenssi ("signaaliipeptidi") on mielellään sellainen, joka on saatu sellaisesta hiivageenistä, joka koodittaa normaalitapauksessa erittyvää polypeptidiä. Hirudiinin signaaliisekvenssiä, joka on saatavissa verijuotikkaan perimän-DNA:sta, tai muita heterologisten proteiinien signaaliisekvenssejä voidaan myös käyttää. Hiivan signaaliisekvenssejä ovat esimerkiksi hiivan invertaasin, α -tekijän, feromoniipeptidaasin (KEX1), "tappajatoksiinin" ja pois päältä kytkettävän happofosfataasin (PHO5) geenin signaali- ja preprosekvenssit ja Aspergillus awamorin gluko-

amylaasin signaalisekvenssi. Vaihtoehtoisesti voidaan rakentaa fuusioituja signaalisekvenssejä liittämällä käytettyyn promoottoriin (esim. PHO5) luontaisesti liittyvän geenin signaalisekvenssin (jos sellainen on) osa hirudiinin tai jonkun toisen heterologisen proteiinin signaalisekvenssin osaan. Etusijalle asetetaan sellaiset yhdistelmät, jotka mahdollistavat tarkan katkaisun signaalisekvenssin ja esim. desulfatohirudiinin aminohapposekvenssin välistä. Lisäsekvenssejä, kuten pro- tai välikesekvenssejä, jotka saattavat sisältää spesifisiä prosessointisignaaleja, tai jotka eivät sisällä spesifisiä prosessointisignaaleja, voidaan myös sisällyttää rakenteisiin, jotta saadaan aikaan prekursorimolekyylien tarkka prosessoituminen. Vaihtoehtoisesti voidaan tuottaa fuusioproteiineja, joissa on sisäisiä prosessointisignaaleja, jotka sallivat oikean kypsymisen in vivo tai in vitro. Prosessointisignaalit sisältävät esimerkiksi Lys-Arg-tähteen, jonka Golgi-kalvoissa sijaitseva hiivan endopeptidaasi tunnistaa. Esillä olevan keksinnön mukaiset etusijalle asetettavat signaalisekvenssit ovat hiivan PHO5-geenistä ja koodittavan seuraavan kaavan mukaista signaalipeptidiä

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala
Ser Leu Ala Asn Ala

ja hiivan invertaasigeenistä ja koodittavat seuraavan kaavan mukaista signaalipeptidiä

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe
Ala Ala Lys Ile Ser Ala.

Heterologista proteiinia koodittavat perimän DNA-sekvenssit voidaan eristää luonnonlähteistä tai vastaavasta komplementaarisesta mRNA:sta voidaan valmistaa kopio-DNA (cDNA) tai haluttu DNA voidaan tuottaa kemiallisesti tai entsymaattisesti sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Esimerkiksi desulfatohirudiinia koodittava DNA-sekvenssi tunnetaan tai se voidaan eristää verijuotikkaan

perimä-DNA:sta tai voidaan tuottaa komplementaarinen kaksisäikeinen desulfatohirudiini-DNA (desulfatohirudiinin kaksisäikeinen cDNA) desulfatohirudiini-mRNA:sta tai desulfatohirudiinin aminohapposekvenssiä koodittava geeni voidaan valmistaa kemiallisella tai entsymaattisella menetelmällä.

Hiivan transkriptionlopetussignaalit sisältävä DNA-sekvenssi on mielellään sellaisen hiivageenin 3'-reunasekvenssi, joka sisältää oikeat signaalit transkription lopettamiselle ja polyadenyloitumiselle. Sopivia 3'-reunasekvenssejä ovat esimerkiksi sellaiset, jotka ovat luontaisesti liittyneinä käytettyyn hiivageenin promoottoriin. Etusijalle asetetaan hiivan PHO5-geenin reunasekvenssi.

Hiivan promoottori, mahdollinen signaaliptidiä koodittava DNA-sekvenssi, heterologista proteiinia koodittava DNA-sekvenssi ja DNA-sekvenssi, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaalit, liitetään yhteen toimivasti eli ne liitetään toisiinsa siten, että niiden normaalit toiminnot säilyvät. Ryhmitys on sellainen, että promoottori saa aikaan heterologisen geenin (jota mahdollisesti edeltää signaalisekvenssi) oikean ilmentymisen, ja että transkriptionlopetussignaalit saavat aikaan transkription oikean loppumisen ja polyadenyloitumisen, ja mahdollinen signaalisekvenssi on liittyneenä heterologiseen geeniin oikeassa lukuvaiheistuksessa siten, että signaalisekvenssin viimeinen kodoni on suoraan liittyneenä heterologista proteiinia koodittavan geenin ensimmäiseen kodoniin ja tapahtuu erittyminen. Jos promoottori ja signaalisekvenssi on johdettu eri geenistä, on promoottori edullista liittää signaalisekvenssiin kohdassa, joka on sen geenin mRNA:n alun ja ATG:n välissä, joka luontaisesti liittyy promoottoriin. Signaalisekvenssillä pitäisi olla oma ATG:nsä luennan aloitusta varten. Näiden sekvenssien yhteenliittyminen voidaan saada aikaan synteettisillä oligodeoksinukleotidikytkijöillä, joissa

on endonukleaaasin tunnistussekvenssi.

Ilmentämiskasetin lisäksi sisältävät esillä olevan keksinnön mukaiset yhdistelmävektorit hiivan replikoitumisen aloituskohdan. Näin ollen sisältävät yhdistelmävektorit 2 μ -DNA:sta peräisin olevan DNA-segmentin, jossa on replikoitumisenaloituskohta, tai kokonaisen 2 μ -DNA:n, jos käytetään 2 μ -DNA:sta vapaata hiivakantaa. Viimeksimainitun tyyppiset vektorit asetetaan etusijalle. Esillä olevan keksinnön mukaiset etusijalle asetettavat yhdistelmävektorit sisältävät 2 μ -DNA:n keskeytymättömässä muodossa eli 2 μ -DNA katkaistaan kerran restriktioendonukleaa-silla ja näin saatuun linearisoituun DNA:han liitetään muut vektorin komponentit, ennenkuin rengas suljetaan uudestaan. Katkaisukohta valitaan siten, että REP1-, REP2- ja FLP-geenin ja ORI-, STB-, IR1- ja IR2-kohdan normaalit toiminnot säilyvät 2 μ -DNA:ssa. Etusijalle asetettavia katkaisukohtia ovat D-geenin sisällä sijaitseva ainut PstI-kohta ja ainoat HpaI- ja SnaBI-kohdat, jotka sijaitsevat kaikkien mainittujen geenien ja kohtien ulkopuolella.

Mielellään keksinnönmukaiset yhdistelmävektorit sisältävät yhden tai useampia, erityisesti yhden tai kaksi geneettistä valintamerkkiä hiivalle ja merkin ja replikoitumisen aloituskohdan bakteeri-isäntää, erityisesti Escherichia colia, varten.

Mitä tulee hiivan geneettisiin merkkeihin, voidaan käyttää mitä tahansa sellaista merkkigeeniä, joka mahdollistaa transformanttien valinnan merkkigeenin fenotyyppisen ilmentymisen perusteella. Sopivia merkkejä hiivalle ovat esimerkiksi sellaiset, jotka ilmentävät antibioot-tiresistenssiä, ja auktotrofisten hiivamutanttien ollessa kyseessä sellaiset geenit, jotka täydentävät isännän vajavuuksia. Vastaavat geenit antavat esimerkiksi G418-antibioottiresistenssin, hygromysiiniresistenssin tai bleomysiiniresistenssin tai prototrofian auktotrofiselle hiivamutantille, esimerkiksi URA3, LEU2, LYS2- tai TRP1-

geenin.

Yhdistelmävektorien monistus on edullista tehdä E. colissa, mistä syystä mukaan on edullista liittää E. colin geneettinen merkki ja E. colin replikoitumisen aloituskohta. Nämä voidaan saada E. colin plasmideista, kuten pBR322-plasmidista tai pUC-plasmidista, joista mainittakoon esimerkiksi pUC18 ja pUC19, jotka sisältävät E. colin replikoitumisen aloituskohdan ja E. colin geneettisen merkin, joka antaa vastustuskyvyn antibiootin suhteen, kuten ampisilliinin suhteen.

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdistelmävektorit valmistetaan alalla tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi liittämällä määrättyssä järjestyksessä yhteen ilmentämiskasetti, joka sisältää hiivan promootorin toimivasti liittyneenä DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, ja DNA-fragmentit, jotka sisältävät geneettiset valintamerkit hiivaisäntää varten ja bakteeri-isäntää varten ja replikoitumisen aloituskohdat hiivaisäntää varten ja bakteeri-isäntää varten.

Hiivakannat, joilta puuttuu ysc α -aktiivisuus

Keksinnön mukaisista S. cerevisiae-kannoista puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus. Kannat ovat mielellään kaksois-, kolmois- tai nelinkertaismutantteja eli niistä puuttuu myös muita hiivan peptidaasiaktiivisuuksia.

Saccharomyces cerevisiae-hiivasta on tunnistettu monia erilaisia proteinaaseja, kuten edellä mainitut (ks. T. Achstetter ja D.H. Wolf (1985) Yeast 1, 139 -

157). Mutantteja, joista puuttuu useimpien näiden proteaasien aktiivisuus, on eristetty ja niitä on tutkittu biokemiallisesti. Tiettyjen proteaasien puuttumisen seuraukset on selvitetty ja eräät ominaisuudet ovat osoittautuneet hyödyllisiksi proteaasivajaiden mutanttien de novo -eristämiseksi. Koska spontaanien mutaatioiden frekvenssit ovat pieniä, hiivoja tavallisesti käsitellään mutageeneilla, kuten röntgensäteillä tai UV-säteillä, tai kemiallisilla mutageeneilla, jotka ovat erittäin tehokkaita ja voivat saada aikaan mutaatioita suhteessa $1 \times 10^{-4} - 10^{-3}$ per geeni ilman, että ne tappavat suuressa määrin. Proteaasit, jotka puuttuvat keksinnön mukaisista hiivakannoista, eivät suorita välttämättömiä toimintoja solun metaboliassa, joten sellaiset mutaatiot, jotka tuhoavat näiden proteiinien aktiivisuuden täysin, eivät ole letaalisia. Kutakin mainittua proteaasia edustava mutanttityyppi (ysc α , yscB, yscA, yscY ja yscS) voidaan eristää erikseen mutatoinnin jälkeen. Eristäminen ja valinta perustuvat pesäkkeidenseulontamäärityksiin, jotka ovat alalla hyvin ennestään tunnettuja.

Toinen ja tehokkaampi menetelmä, jolla saadaan aikaan haluttuja yhden tai useampien proteaasien puuttumisia hiivan perimään, on paikkaan kohdennettu mutageneesi tai geeninrikkominen tai geeninkorvaus (ks. H. Rudolph et al., Gene 36 (1985) 87 - 95). Kun geenin sekvenssi tunnetaan, kuten esimerkiksi proteaasin yscB, karboksipeptidaasin yscY ja karboksipeptidaasin ysc α sekvenssit, voidaan perimän proteaasigeeni vioittaa insertiolla, substituutiolla tai deleetiolla tai käyttämällä ennestään tunnettua

paikkaan kohdennettua mutageneesimenetelmää (ks. esimerkiksi M.J. Zoller ja M. Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468), jossa pitää valmistaa tarvittavalla tavalla mutageeninen oligonukleotidialuke. Vaihtoehtoisesti voidaan perimän proteaasigeeni korvata vieraalla DNA:lla tai mainittu vieras DNA voidaan sijoittaa sopivaan katkaisukohtaan proteaasigeenissä. Esimerkiksi, jotta saadaa valmistetuksi hiivamutantti, jolta puuttuu peptidaasi ysc α -aktiivisuus (kex⁻-mutantti), sijoitetaan vieras DNA sopivaan restriktiokohtaan, joka sijaitsee perimän KEX1-geenissä. Jos käytetyssä hiivakannassa on vika aminohappo- tai puriinibiosynteesin entsyymiä koodittavassa kromosomaalisessa geenissä, voidaan vastaava geeni sijoittaa kromosomaaliseen KEX1-geeniin, jolloin aukso- trofinen hiivakanta tulee prototrofiseksi ja samalla genotyyppi muuttuu KEX1:stä kex1:ksi. Geeninkorvausmenetelmät ja kohdennetut mutageneesimenetelmät ovat alalla yleisesti käytössä ja täysin toistettavissa.

Yleisessä menetelmässä, jolla saadaan aikaan monen proteaasin suhteen vaillinaisia kantoja, kuten kantoja, joista puuttuu ysc α -aktiivisuus ja yscB-aktiivisuus, koostuu meioottisesta risteytyksestä ja senjälkeisestä tetradianalyysistä. Tetradiit, jotka ovat peräisin diploidisista soluista, leikellään palasiksi geneettisillä standardimenetelmillä. Satunnainen lajittelu tetradin neljän itiön kesken mahdollistaa kaksois- ja multippelimutanttien rakentamisen seuraavissa risteytyksissä. Satunnaista itiöanalyysiä voidaan myös käyttää vaihtoehtoisena systeeminä.

Koska hiivojen geneettisistä varastokeskuksista on saatavissa mutantteja, jolta puuttuu yksittäinen proteaasi ja jopa kaksoismutantteja, voidaan kolmois ja nelinkertaismutantteja toistettavasti yhdistää käyttämällä ennestään tunnettuja peräkkäisiä meioottisia risteytysmenetelmiä.

Sopivia Saccharomyces cerevisiae-lähtökantoja ovat esim. kex1-kanta 96, joka on saatavissa Yeast Genetic Stock Centeristä (Berkeley), hiivan A-peptidaasin suhteen (yscA) negatiiviset kannat AB103 (ATCC20673) ja AB110 (ATCC20796), hiivan B-peptidaasin (yscB) suhteen negatiiviset kannat HT246, H426 ja H449 (viimeksimainittu on lisäksi cir^o), jotka on talletettu Deutsche Sammlung von Mikroorganismen-kokoelmiin (Braunschweig, Länsi-Saksa) kokoelma-numeroilla 4084, 4231 ja 4413 vastaavasti, hiivan peptidaasien B, Y ja S (yscB, yscY ja yscS) suhteen negatiivinen kanta BYS232-31-42 ja hiivan peptidaasien A, B, Y ja S (yscA, yscB, yscY ja yscS) suhteen negatiivinen kanta ABYS.

Kuten edellä on mainittu, puuttuu esillä olevan keksinnön mukaisista edullisista hiivakannoista endogeeninen 2 μ -DNA. 2 μ -plasmidi on suuren kopiomäärän tuottava, itsereplikoituva ekstrakromosomaalinen DNA-elementti, jonka useimmat Saccharomyces cerevisiae-kannat sisältävät. 2 μ -plasmidin silmiinpistävimmät rakenteelliset piirteet ovat kaksi käänteistä toistetta (IR1 ja IR2), joiden kummankin pituus on 559 ep, ja jotka jakavat plasmidin kahteen eripituiseen DNA-alueeseen. Homologinen rekombinaatio näiden kahden identtisen IR-sekvenssin välillä johtaa kahden molekulaarisen isomeerin muodostumiseen (muoto A ja muoto B). 2 μ -plasmidin stabiilisuus aiheutuu kolmesta plasmidin koodittamasta toiminnosta. REP1- ja REP2-geenituote ovat trans-vaikuttavia proteiineja, jotka ovat tarpeen 2 μ -plasmidin stabiilissa jakautumisessa. Näistä kahdesta on REP1 mahdollisesti tärkeämpi, sillä jakautumisen tehokkuus riippuu REP1-geenituotteen geeninannoksesta eli lukumäärästä, jona geeni on läsnä (A. Cashmore et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 203, 154). Nämä kaksi proteiinia toimivat STB-kohdan (REP3) läpi ja siihen kohdistuen, joka kohta on tärkeä cis-toimiva elementti plasmidissa (M. Jayaram et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 2466 - 2475; B. Viet et al., (1985) Mol. Cell. Biol.

5, 2190 - 2196).

Tällaiset Saccharomyces cerevisiae cir^{O} -kannat ovat ennestään tunnettuja tai ne voidaan valmistaa alalla tunnetuilla menetelmillä (ks. esimerkiksi C.P. Hollenberg (1982) Curr. Top. Microbiol. Immun. 96, 119). Seuraava vaihtoehtoinen menetelmä cir^{O} -kantojen valmistamiseksi perustuu oletukseen, että puhdistukseen 2μ -plasmidista toista plasmidia käyttämällä tarvitaan STB-kohdan annoksen kasvu, jotta saadaan titratuiksi pois REP1- ja REP2-proteiini. Tämä REP1- ja REP2-proteiinin suhteellisen väheneminen johtaisi siis endogeenisen 2μ -plasmidin epästabiili-suuteen.

Käytetyssä toisessa plasmidissa on mielellään vika REP1-geenissä tai siitä puuttuu tämä geeni. Esimerkki tällaisesta plasmidista on pDP38, josta REP1-geenin lisäksi puuttuu käänteinen toiste (IR2). Tämä tekee sen suuren kopiomäärän ilmentymisen riippuvaiseksi REP1-proteiinin täydentymisestä endogeenisen 2μ -plasmidin toimesta. Se sisältää kaksi hiivan valintamerkkiä, jotka ovat URA3, jota käytetään sekä suuren kopiomäärän että pienen kopiomäärän tilanteissa, ja dLEU2, jota voidaan käyttää vain suuren kopiomäärän tilanteissa (E. Erhart et al. (1986) J. Bacteriol. 625).

Hiivakanta, joka on Ura^- ja Leu^- , transformoidaan plasmidilla pDP38 ja valitaan Ura^+ -pesäkkeet. Valinta urasiilivapaissa maljoissa (Ura-valinta) antaa paljon paremman transformoitumisfrekvenssin kuin valinta leusii-nittomissa maljoissa (Leu-valinta), koska URA3-geeni ilmentyy paljon paremmin kuin viallinen dLEU2-geeni. Valitaan yksi pesäke ja se viirutetaan Leu-valintamal-jalle, joka antaa eri kokoja ja muotoja olevia pesäkkeitä. Jotkut pienimmistä pesäkkeistä viirutetaan uudes-taan Ura-valintamaljoille ja toisintomaljataan Leu-valinta-maljoille. Valitaan ne pesäkkeet, jotka kykenevät kasva-maan Ura-valinnassa, mutta joiden kasvu on vain hidasta Leu-valinnassa. Kasvu Ura-valintamaljoissa osoittaa,

että plasmidi pDP38 on edelleen läsnä, ja että vain hidas kasvu Leu-valinnassa ei johdu tämän plasmidin menettämisestä, ja kasvun puuttuminen Leu-valinnassa merkitsee, että pDP38 ei kykene täydentämään tätä merkkiä. Viimeksimainittu seikka voidaan selittää kahdella tavalla: A. LUE2-geeni pDP38:ssa on mutatoitunut. B. Tai plasmidi ei kykene täydentämään leu2:ta, koska se ei kykene kohottamaan sen kopiomäärää, mikä merkitsee, että 2 μ -plasmidi ei ole käytettävissä (eli se on menetetty) täydentämään REP1-geenituotetta.

Nämä kaksi mahdollisuutta voidaan erottaa toisistaan hyvin helposti. Ensinnäkin, mainituissa pesäkkeissä havaittu minimaalinen kasvu (verrattuna täydelliseen nollakasvuun soluilla, joissa ei ole plasmidia pDP38) osoittaa, että jonkin verran LEU2-ilmentymistä on läsnä. Toinen seikka voidaan suoraan testata, koska 2 μ -plasmidin puuttuessa kykenee pDP38 toimimaan vain ARS-tyypin plasmidina eli se on hyvin pysymätön niin, että suurin osa pesäkkeistä menettää sen muutaman sukupolven aikana. Näin ollen, kun yksi ainut pesäke viirutetaan YPD-maljaan ja ainoat pesäkkeet otetaan ja toisintomaljataan urasiilitomissa maljoissa, vain muutama kasvaa Ura-valinnassa. Kasvamattomat pesäkkeet tarkistetaan hybridisoimalla pUC- ja 2 μ -sekvenssien suhteen. Pesäkkeet, jotka eivät osoita mitään hybridisoitumissignaalia, ovat vapaita plasmidista pDP38 ja endogeenisistä 2 μ -plasmideista (cir^o-kannat). Saadut cir^o-kannat voidaan käsitellä edellä kuvatulla tavalla, jolloin saadaan hiivan mutanttikantoja, joista puuttuu peptidaasiaktiivisuus, erityisesti ysc χ -aktiivisuus, ja joista lisäksi puuttuu 2 μ -DNA.

ysc χ -aktiivisuuden puuttumisen lisäksi puuttuu esillä olevan keksinnön mukaisista edullisista hiivakannoista myös muita peptidaaseja, jotka edustavat seuraavia: yscA, yscB, yscY ja yscS, ja joista puuttuu 2 μ -DNA. Kaikkein edullisimmista hiivakannoista puuttuvat ysc χ - ja yscY-aktiivisuus ja haluttaessa niistä puuttuvat myös

yscB- ja yscS-aktiivisuus tai yscA- ja yscB-aktiivisuus ja niistä puuttuu 2 μ -DNA.

Keksinnönmukaisia hiivakantoja voidaan edullisesti käyttää heterologisten proteiinien tuottamiseen. Yllättäen havaittiin, että keksinnönmukaiset kex1-kannat, joissa on yhdistelmävektori, jossa on hiivalle heterologista proteiinia koodittava geeni, tuottavat mainittua proteiinia homogeenisessa muodossa eli sellaisena, että kaikki C-päästä lyhentyneet sivutuotteet puuttuvat.

Transformoituneet hiivakannat

Esillä oleva keksintö koskee lisäksi hiivakantaa, josta puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus, ja joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, jossa on hiivan promoottori toimivasti liittyneenä heterologista proteiinia koodittavaan DNA-sekvenssiin, ja keksintö koskee myös menetelmää tällaisen hiivakannan valmistamiseksi.

Sopivia isäntähiivakantoja ovat mm. Saccharomyces cerevisiae-kannat, joista puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus ja mahdollisesti joku muu peptidaasi-aktiivisuus, ja jotka mahdollisesti on puhdistettu endogeenisistä 2 μ -plasmideista (ks. edellä).

Menetelmässä mainitun transformoituneen hiivakannan valmistamiseksi transformoidaan hiivakanta, jolta puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus, mainitulla yhdistelmävektorilla.

Hiivan transformointi keksinnönmukaisilla yhdistelmävektoreilla voidaan suorittaa julkaisussa Hinnen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1978 (1978)) kuvatulla menetelmällä. Tämä menetelmä voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen:

(1) Hiivan solunseinä tai osia siitä poistetaan käyttämällä erilaisia glukosidaasivalmisteita, kuten etanan suolinesteitä (esim. Glusulase^R tai Helicase^R) tai mikro-organismeista saatuja entsyymiseoksia (esim. Zymolase^R)

osmoottisesti stabiloiduissa liuksissa (esim. 1 M sorbitoli).

(2) "Paljaat" hiivasolut (sferoplastit) käsitellään DNA-vektorilla PEG:n (polyetyleeniglykoli) ja Ca^{2+} -ionien läsnäollessa.

(3) Solunseinän regenerointi ja transformoituneiden solujen valinta kiinteässä agarkerroksessa. Regenerointi on edullista suorittaa peittämällä sferoplastit agariin. Esimerkiksi sferoplastit sekoitetaan sulaan agariin (noin 50°C). Kun liuos jäähdytetään hiivan kasvulämpötilaan (noin 30°C), saadaan kiinteä kerros. Tämän agarkerroksen tarkoitus on estää välttämättömien makromolekyylien nopea diffuusio ja menetys sferoplasteista ja näin edesauttaa solunseinän regeneroitumista. Solunseinien regeneroituminen voidaan kuitenkin saada aikaan (vaikkakin pienemmällä teholla) maljaamalla sferoplasteja ennaltavalmistettujen agarkerrosten pinnalla.

Regenerointiagar on edullista valmistaa siten, että transformoitujen solujen regenerointi ja valinta voidaan suorittaa samalla kerralla. Koska valintamerkeinä käytetään yleensä hiivageenejä, jotka koodittavat aminohapon tai nukleotidin biosynteesin reitin entsyymejä (supra), on regenerointi edullista suorittaa hiivan minimiravintoalustassa. Jos tarvitaan hyvin korkeita regeneroitumistehokkuuksia, on seuraava kaksivaiheinen menetelmä edullinen: (1) solunseinä regeneroidaan rikkaassa kompleksialustassa ja (2) transformoituneet solut valitaan maljaamalla solukerroksen toisinto selektiivisissä agarmaljoissa.

Edelleen esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan valmistaa kaavan (IV) mukaista desulfatohirudiinia

X₁ Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys
 Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn X₃ Cys
 Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu X₃ Asn Gln Cys Val Thr Gly
 Glu Gly Thr Pro X₄ Pro Gln Ser X₅ Asn Asp Gly Asp Phe
 Glu Glu Ile Pro Glu X₆

(IV),

jossa kaavassa X₁ on dipeptiditähde Val-Val, kukin ryhmistä X₂, X₃ ja X₄ on Lys, X₅ on His ja X₆ on jokin seuraavista: Glu-Tyr-Lys-Arg, Ser-Phe-Arg-Tyr ja Trp-Glu-Leu-Arg.

Keksinnönmukaisella menetelmällä saatavissa olevia proteiineja voidaan käyttää sinänsä tunnetulla tavalla, esim. ihmisten ja eläinten sairauksien hoitoon ja ennaltaehkäisyyn. Esimerkiksi ihmisen atriaalisella natriureettisella peptidillä (ANP) on natriureettisia, diureettisia ja vasorelaksioivia vaikutuksia ja sitä voidaan käyttää sydän-verisuonihomeostaasin säätelyyn.

Desulfatohirudiiniyhdisteitä voidaan samoin kuin luonnonhirudiinia käyttää haluttaessa hoitaa ja ennaltaehkäistä verisuonitukoksia, akuutin shokin hoidossa, kulutusverenhiyytymien hoidossa tms., kuten eurooppalaisessa patenttihakemuksessa no. 168 342 on selostettu.

Esillä oleva keksintö koskee erityisesti transformoituneita hiivakantoja, menetelmiä niiden aikaansaamiseksi ja menetelmää heterologisten proteiinien tuottamiseksi, kuten esimerkeissä selostetaan.

Seuraavassa kokeellisessa osassa selostetaan esillä olevan keksinnön eri toteutusmuotoja viittaamalla samalla liitteessä oleviin kuviin.

Kuva 1 esittää kromatogrammeja, jotka on saatu desulfatohirudiineille, jotka on otettu talteen transformoituneista S. cerevisiae KEX1- ja kex1-kannoista.

Kuva 2 on kaavioesitys hirudiini HV1-geenin in vitro-synteesistä, joka geeni sisältää PHO5-signaali-sekvenssin, ja jossa käytetään edullisia hiivan kodoneja.

Käytetyt 21 oligodeoksinukleotidia on merkitty numeroituilla viivoilla ja katkoviivoilla vastaavasti.

Kuva 3 on kaavioesitys plasmidin pDP33 rakentamisesta.

Kuva 4 on kaavioesitys plasmidien pDP34 ja pDP38 rakentamisesta.

Kuva 5 on kaavioesitys ilmentämisplasmidin pDP34/GAPFL-YHIR rakentamisesta.

Kuva 6 on kaavioesitys ilmentämisplasmidin pDP34/PHO5(-173)-YHIR rakentamisesta.

Kuva 7 on kaavioesitys plasmidin pDP92 rakentamisesta.

Kuva 8 esittää villityyppisen hirudiinin ja hirudiinimutanttien HV1-KR, HV1-WQLR ja HV1-SFRY kromatogrammeja, jotka hirudiinit on saatu S. cerevisiae BYSkex1- ja BYSkex1-viljelmistä.

Esimerkki 1: S. cerevisiae kex1-mutanttikannan 96 risteytys S. cerevisiae-kannan BYS kanssa ja itiöiden analysointi α -tekijänerityskyvyn ja karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuuden (KEX1-geeni) suhteen

S. cerevisiae kex1-mutanttikanta 96 (a, kex1, ade2, thr1), joka saadaan hiivojen Genetic Stock Centeristä (Berkeley, USA), risteytetään S. cerevisiae-kantaan BYS232-31-42 (α , prb1-1, prc1-1, cps-3, lys2, leu2, his7) (Achstetter, T. ja Wolf, D.H. (1985) EMBO J. 4, 173 - 177; Wolf, D.H. ja Ehmann, C. (1981) J. Bacteriol. 147, 418 - 426), jossa on villityyppinen KEX1-alleeli. Tästä risteytyksestä eristetään kex1/KEX1-genotyyppiä edustavat diploidiset heterotsygoottiset solut. Diploidisista soluista johtuvat tetradit leikellään geneettisillä standardimenetelmillä (Hawthorne, D.C. ja Mortimer, R.K. (1960) Genetics 45, 1085 - 1110; Methods in Yeast Genetics 1986 (Sherman, F. et al. toim.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.).

Kunkin tetradin neljästä itiöstä testataan kyky

erittää α -tekijää. Jotta saadaan selville villityyppiset KEX1-pesäkkeet ja kex1-mutanttipesäkkeet, käytetään feromonisuperherkkää testauskantaa S. cerevisiae RC629 (a, sst-2, ade2-1, ural, his6, met1, can1, cyh2, rme) (Chan, R.K. ja Otte, C.K. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 11 - 20; Chan, R.K. ja Otte, C.K. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 21 - 29). Kuten piirteille, joita yksi tuman geeni koodittaa, on odotettavissa, on kaikkien analysoitujen tetradien kohdalla tilanne se, että kunkin tetradin kaksi itiötä erittää a-tekijää ja kaksi muuta itiötä erittää α -tekijää. α -parittelutyyppejä olevat villityyppiset KEX1-pesäkkeet estävät testauskannan kasvua suuremäärin ja saavat näin ollen aikaan suuren haloalueen ympärilleen, koska ne kykenevät prosessoimaan α -tekijän prekursorin täydellisesti ja tuottamaan neljä aktiivista α -tekijämolekyyliä yhdestä prekursorimolekyylistä. Sen sijaan kex1-mutanttipesäkkeet estävät testauskannan kasvua vähäisemmässä määrin ja näin ollen aikaansaavat pienen haloalueen ympärilleen, koska ne kykenevät tuottamaan vain yhden kypsän α -tekijämolekyylin yhdestä prekursorimolekyylistä.

Useiden täydellisten tetradien, jotka on tunnistettu kex1-geenin suhteen puutteellisiksi edellä kuvatun feromonimäärityksen avulla, karboksipeptidaasi ysc α -ominaisaktiivisuus testataan lopuksi. Solut kasvatetaan, niistä valmistetaan kalvot ja testataan karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus käyttämällä substraattina Cbz-Tyr-Lys-Arg:a kuten julkaisussa Wagner, J.C. ja Wolf, D.H. (1987) FEBS Lett. 221, 2, 423 - 426 on selostettu. Se seikka, että karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus puuttuu kex1-mutanttisoluista, osoittaa, että KEX1 on tämän entsyymin rakennegeeni. Tämä merkitsee, että karboksipeptidaasi ysc α todella osallistuu α -tekijän karboksiterminaaliseen prosessointiin.

Esimerkki 2: Varmistettujen kex1-mutanttien luokittelu sen perusteella, puuttuuko niistä lisäksi proteaaseja yscB, yscY ja yscS

S. cerevisiae kex1-mutantit luokitellaan sen suhteen, miten niistä puuttuu muita proteaaseja (proteinaasi yscB, karboksipeptidaasi yscY ja karboksipeptidaasi yscS), sekä muiden kasvutekijävaatimusten mukaan.

kex1-mutanttien solumateriaali, joka on valmistettu YPD-ravintoalustassa (Difco) kasvavassa stationäärifaa-sista, suspendoidaan 200 µl:aan 20 mM Tris-HCl-puskuria, pH 7,2, Eppendorf-mikrofugissa ja lisätään lasihelmiä ($\varnothing = 0,4$ mm) 2/3:aan asti tilavuudesta. Suspensiota ravistellaan voimakkaasti kolme kertaa 1 minuutin ajan pyörresekoittimessa niin, että välillä jäähdytetään jään päällä.

Sentrifugoidaan 5 minuuttia, jolloin saadaan talteen epäpuhtaat uutteet emäliuoksina. Nämä uutteet dialysoidaan 0,1 M imidatsoli-HCl-puskuria, pH 5,2, vasten, jossa on 0,1 mM ZnCl_2 , jotta proteaasit aktivoituvat ja vapaat aminohapot poistuvat uutteista.

Proteinaasi yscB-aktiivisuudet mitataan Azocoll-testillä (R.E. Ulane et al. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3367; E. Cabib et al. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 186; T. Saheki et al. (1974) Eur. J. Biochem. 42, 621). Proteiinikonsentraatiomittausten jälkeen kustakin näytteestä täytetään erä 0,1 M fosfaattipuskurilla (NaPi), pH 7,0, tilavuuteen 100 µl, jotta proteiininimäärät saadaan samoiksi. Proteiiniliuokseen lisätään 500 µl Azocoll-suspensiota (240 mg 10 ml:ssa 0,1 M NaPi-puskuria, pH 7,0). Saatuja seoksia inkuboidaan 30°C:ssa ilman sekoitusta. Sitten lisätään 500 µl 10 %:sta trikloorietikkahappoa, joka pysäyttää reaktion, ja saadut seokset sentrifugoidaan kahdesti ja emäliuosten absorptiospektrit mitataan aallonpituudella 520 nm.

Karboksipeptidaasien yscY ja yscS aktiivisuudet mitataan käyttämällä kromogeenistä substraattia Cbz-Gln-Leu (ks. D.H. Wolf et al. (1978) FEBS Lett. 91, 59; D.H.

Wolf et al. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 553). Dialysoidut uutteen jaetaan kolmeen erään ja kahteen niistä lisätään fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF) lopulliseen pitoisuuteen 1 mM tai EDTA:ta lopulliseen pitoisuuteen 5 mM, jotta proteaasiaktiivisuudet salpautuvat selektiivisesti. Nimittäin PMSF inhiboi karboksipeptidaasiaktiivisuutta yscY ja EDTA inhiboi karboksipeptidaasiaktiivisuutta yscS. Kutakin seosta, joka sisältää inhibiittoria, inkuboidaan 1 tunti 25°C:ssa, jotta inhiboituminen tapahtuu täydellisesti. Kun proteiinikonsentraatio on määritetty, kustakin näytteestä otetaan kaksi erää, joissa on inhibiittoria, ja yksi erä ilman inhibiittoria kontrolliksi ja ne täytetään 0,1 M NaPi-puskurilla 50 µl:aan, jotta proteiininimäärät saadaan yhtä suuriksi. Näihin proteiiniliuoksiin lisätään seuraavat testiliuokset.

500 µl testiliuosta I:

L-aminohappo-oksidaasia	0,24 mg/ml
piparjuuriperoksidaasia	0,40 mg/ml
0,10 mM MnCl ₂	
0,1 M NaPi-puskurissa, pH 7,4	

50 µl testiliuosta II

o-dianisidiinia	2 mg/ml
vedessä	

500 µl testiliuosta III

20 mM Cbz-Gly-Leu
0,2 M kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,4

Seoksia inkuboidaan 1 tunti 28°C:ssa, sitten lisätään 100 µl 20 %:sta Triton X-100 reaktion pysäyttämiseksi ja absorbanssit mitataan aallonpituudella 405 nm.

Myöhempää transformointia varten pisteytetään aminohappoauksotrofinen merkki leusiinia varten käyttämällä minimiravintomaljoja täydennettynä adeniinilla, treoniinilla, lysiinillä ja histidiinillä ja mukana on leusiinia tai leusiini puuttuu.

Edellä selostettujen määritysten avulla eristetään mutantit, joille annetaan nimeksi S. cerevisiae BYSkex1, ja joilla on nelinkertainen proteaasivajavuus (α , prb-1, prc-1, cps-3, kex1) ja lisäksi leusiinintarve.

Esimerkki 3: Nelinkertaisesti proteaasivajaan Saccharomyces cerevisiaen transformointi

Plasmidi pJDB207/PHO5-HIR (eurooppalainen patenttihakemus no. 225 633) siirretään nelinkertaisesti proteaasivajaaseen mutanttiin BYSkex1 (α , prb-1, prc-1, cps-3, kex-1, leu2) ja kontrollina käytettyyn KEX1-villityyppiin kantaan BYS232-31-42 (α , prb-1, prc-1, cps-3, lys2, leu2, his7) käyttämällä Hinnen et al:n (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)) transformointimenetelmää.

Kaksi eri hiivakantaa otetaan talteen varhaisessa logaritmisessa vaiheessa 100 ml:sta YPD-ravintoalustaa ($OD_{600} = 0,2$), pestään 25 ml:lla 0,8 M sorbitolia ja uudelleensuspendoidaan 5 ml:aan samaa sorbitoliliuosta. Näihin 5 ml:n solususpensioihin lisätään 30 μ l tsymolyaasia (ZYMOLYASE-100 T, joka on peräisin Arthrobacter luteussesta, Seikagaku Kogyo Co., LTD; 10 mg/ml 0,8 M sorbitolissa). Kutakin näistä seoksista sekoitetaan varovasti 100 ml:n ravistelupulloissa ravistelijassa (100 kierr/min) noin 30 minuuttia 30°C:ssa. 5 minuutin välein otetaan pois 100 μ l:n erä, laimennetaan 10 ml:lla tislattua vettä ja laimennosten absorbanssit mitataan aallonpituudella 600 nm, jotta sferoplastinmuodostuksen etenemistä voidaan seurata. Jotta sferoplastinmuodostus olisi hyvä, pitää absorbanssieron ennen tsymolyaasikäsittelyä ja sen jälkeen olla suurempi kuin 10-kertainen. Sferoplastimuodossa olevat solut pestään kahdesti 0,8 M sorbitolilla, uudelleensuspendoidaan 25 ml:aan HE 30-ravintoalustaa (2 M sorbitolia YPD-ravintoalustassa) ja inkuboidaan 100 ml:n ravistelupulloissa sekoittaen varovaisesti (110 kierr/min) 30°C:ssa 1 tunti. Solut sentrifugoidaan (3000 min⁻¹, 5 min) ja uudelleensuspendoidaan 1 ml:aan HE 31-

liuosta (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 0,9 M sorbitolia) varovasti. Näihin 100 µl:n solususpensioihin lisätään 4 µg plasmidi-DNA:ta. Seosta inkuboidaan 15 minuuttia huoneenlämpötilassa. Lisätään 1 ml 20 %:sta polyetyleeniglykolia (PEG) 4000 kuhunkin putkeen ja inkuboidaan 30 minuuttia huoneenlämpötilassa, sentrifugoidaan (3000 min⁻¹, 3 min) ja uudelleensuspendoidaan 500 µl:aan 0,8 M sorbitolia. Sferoplastit sekä DNA sekoitetaan 10 ml:aan regenerointiagarua (1 M mannitoli, 6,8 g/l yeast nitrogen basea w/o AA (Difco), 10 g/l L-asparagiinia, 1,0 g/l L-histidiiniä, 1,0 g/l adeniinia, 1,0 g/l treoniinia, 1,0 g/l lysiiniä ja 3 % agarua) ja kaadetaan pintakerrokseksi maljoihin, joissa on koostumukseltaan samaa agarua pohjakerroksena. Maljoja inkuboidaan 96 tuntia 30°C:ssa siihen asti, että ilmestyy transformanttipesäkkeitä.

Poimitaan yksi transformoitunut hiivapesäke ja sitä kasvatetaan hiivan synteettisellä minimiravintoalustalla (8,4 g/l yeast nitrogen basea w/o AA, 10 g/l L-asparagiinia ja 1,0 g/l L-histidiinia), joka on täydennetty adeniinilla, treoniinilla, lysiinillä ja histidiinilla, mutta leusiinia ei ole läsnä. Nelinkertaisesti proteaasivajaan mutantin BYSkex1 pesäkkeelle ja kolminkertaisesti proteaasivajaan kontrollikannan BYSKEX1 pesäkkeelle annetaan vastaavasti nimet

Saccharomyces cerevisiae BYSkex1/pJDB207/PHO5-HIR ja

Saccharomyces cerevisiae BYSKEX1/pJDB207/PHO5-HIR.

Esimerkki 4: Plasmidin pJDB207/PHO5-HIR sisältävien
Saccharomyces cerevisiae-transformanttien kasvatus

Saccharomyces cerevisiae-transformanttien BYSkex1/pJDB207/PHO5-HIR ja BYSKEX1/pJDB207/PHO5-HIR-soluja sekoitetaan esiviljelmänä 10 ml:ssa hiivan täydellistä HE 41-ravintoalustaa (4,5 g/l kasaminohappoja, 4 g/l hiivauutetta, 20 g/l sakkaroosia, 20 g/l glukoosia, 3,6 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,013 g/l CaCl₂·H₂O ja 1 ml/l hivenaine-

seosta (10 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,3 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ja 1 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 28°C :ssa ja kasvatetaan noin 48 tuntia stationäärifaasin saavuttamiseen asti. Talteenotetut solut pestään 0,9 %:sessa NaCl-liuoksessa. 50 ml edellä selostettua hiivan synteettistä ravintoalustaa ympätään 5 %:lla ympä. Viljelmät ympätään solutiheyden $\text{OD}_{600} = 0,3$ ja sekoitetaan 28°C :ssa 72 tuntiin asti kierrosnopeudella 250 min^{-1} .

Hiivan täydellistä HE 41-ravintoalustaa käytetään, jotta saadaan pois tausta-absorptio HPLC-analyysissä.

Esimerkki 5: Hirudiini-65:n ja sen karboksipään hajoa-
mistuotteiden hirudiini-64 ja hirudiini-63 analyysi Saccha-
romyces cerevisiae-transformanttien BYSkex1/pJDB207/PHO5-
HIR ja BYSKEX1/pJDB207/PHO5-HIR fermentointiviljelmistä
käyttämällä käänteisfaasi-HPLC:tä

Nestemäisten hiivaviljelmien näytteet valmistetaan sentrifugoimalla niin, että saadaan kirkas liuos, joka laimennetaan suhteessa 1:10 (tilavuus/tilavuus) etikkahapolilla (1M), ja näytteille suoritetaan HPLC-analyysi seuraavissa olosuhteissa.

HIBAR-pylväs (MERCK) (4 x 125 mm) täytetään käänteisfaasiin tarkoitettulla, laajahuokosilikamateriaalilla (tyyppi 71252, 300-5-C18, MACHEREY-NAGEL), joka on pallomainen stationäärifaasi, jonka hiukkasten halkaisija on $5 \mu\text{m}$ ja huokoisuus 300 Å. Pylvään päät varustetaan ruostumatonta terästä olevilla friteillä. Liikkuva faasi A on vettä (Nanopure^R, BARNSTEAD), joka sisältää 0,1 tilavuus-% trifluorietikkahappoa. Liikkuva faasi B sisältää 20 % liikkuvaa faasia A ja 80 % (tilavuus/tilavuus) asetonitriiliä (HPLC-laatu, FLUKA) ja 0,08 % (tilavuus/tilavuus) trifluorietikkahappoa.

Kromatografiset erotukset suoritetaan virtausnopeudella 1,5 ml/min seuraavalla gradientilla ja eluentteja seurataan absorbanssin perusteella aallonpituudella 216 nm.

t(min)	% A	% B
0	90	10
1	79	21
9	79	21
17	67	33
20	0	100
22	0	100
24	90	10
32/0	90	10

Systeemin kalibrointia varten tehdään standardiliuos liuottamalla 1 mg puhdasta desulfatohirudiinia 1 ml:aan vettä. 50 µl tätä standardiliuosta injektoidaan pylvääseen ja kromatografoidaan samoin kuin systeemin kalibroinnissa on selostettu.

Kuva 1 esittää analyyttisiä käänteisfaasinestekromatografiakäyriä, jotka on saatu hirudiineille, jotka on otettu talteen S. cerevisiae BYSkex1/pJDB207/PHO5-HIR- ja S. cerevisiae BYSKEX1/pJDB207/PHO5-HIR-viljelmistä. Kromatografiaolosuhteet ovat samat kuin edellä on selostettu. On ilmeistä, että toisin kuin BYSKEX1/pJDB207/PHO5-HIR-kanta tuottaa BYSkex1/pJDB207/PHO5-HIR-kanta, joka on ysc α -negatiivinen kanta, desulfatohirudiinituotetta ("HIR-65"), joka on oleellisesti ottaen vapaa C-päästä lyhentyneistä sivutuotteista desulfatohirudiini HIR-64, josta puuttuu aminohappo Gln C-päästä, ja desulfatohirudiini HIR-63, josta puuttuu aminohapot Leu ja Gln C-päästä.

Esimerkki 6: Edulliset hiivan kodonit sisältävän hirudiini HV1:n in vitro-synteesi

Hirudiinin ilmentämiskasetin koodittava sekvenssi rakennetaan edullisista hiivan kodoneista (B. Hall (1982) J. Biol. Chem. 257, 3026), jotta voidaan taata hirudiinin mRNA:n optimaalinen luetuksi tuleminen. Koodittava sekvenssi sisältää PHO5-signaalisekvenssinliitettynä lukuvaiheistukseen desulfatohirudiinin HV1 koodittavan sekvens-

sin kanssa. Synteettisen DNA:n 5'-pää sisältää EcoRI-katkaisukohdan tarttuvan pään.

3'-päässä seuraa TAG-lopetuskodonia välittömästi BamHI-kohdan tarttuva pää. 257 ep:n EcoRI-BamHI-DNA-fragmentin sekvenssi on esitetty kuvassa 2.

Kuvasta 2 ilmenee kaksisäikeisen DNA-fragmentin in vitro-synteesin strategia. 21 oligodeoksinukleotidia syntetisoidaan käyttämällä fosforiamidiittimenetelmää (M.H. Caruthers, teoksessa Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments (H.G. Gassen ja A. Iang, toim.), Verlag Chemie, Weinheim, Länsi-Saksa (1982)) Applied Biosystems Model 380B-syntetisaattorissa. Yksittäisten oligonukleotidien sekvenssit on esitetty kuvassa 2. Pääallekkäin menevät alueet ovat ainoita lajissaan. Lyofilisoidut oligonukleotidit liuotetaan uudestaan 50 mM Tris-HCl-liuokseen, pH 8,0, pitoisuuteen 10 pmol/ μ l. Kyseiset 21 oligonukleotidia erotellaan kahteen ryhmään: (A) numerot 1 - 11 edustavat DNA-fragmentin 5'-puolikasta, (B) numerot 12 - 21 edustavat 3'-puolikasta. Näitä kahta ryhmää käsitellään erikseen. 10 pmol ryhmän kutakin oligonukleotidia sekoitetaan keskenään. Oligoja fosforyloidaan 1 tunti 37°C:ssa 20 μ l:ssa liuosta, jossa on 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 3 mM DTT, 0,4 mM ATP ja 8 yksikköä polynukleotidikinaasia (Boehringer). Kun on inkuboitu 30 minuuttia huoneenlämpötilassa, kuumennetaan kutakin seosta (A ja B) 5 minuuttia 95°C:ssa vesihauteella. Näytteiden annetaan jäähtyä hitaasti huoneenlämpötilaan vesihauteessa yön aikana. Emäspariutettuja oligonukleotidiseoksia A ja B säilytetään tämän jälkeen jään päällä.

Plasmidi pBR322 katkaistaan täysin EcoRI:llä ja BamHI:llä. Suuri 4 ke:n fragmentti eristetään preparatiivisessa 0,6 %:ssa agarosigeelissä. DNA poistetaan elektroeluutiolla, puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografialla ja etanolisaostuksella, kuten esimerkissä 7 on selostettu. DNA uudelleenliuotetaan veteen pitoi-

suuteen 0,4 pmol/ μ l.

10 μ l emäspariutettua oligonukleotidiseosta A (5 pmol kutakin oligoa 1 - 11), 9,5 μ l seosta B (5 pmol kutakin oligoa 12 - 21), 0,4 pmol plasmidin pBR322 4 ke:n EcoRI-BamHI-fragmenttia ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs) inkuboidaan 16 tuntia 15°C:ssa. 10 μ l:n erillä transformoidaan transformointikelpoiset E. coli HB101 Ca⁺⁺-solut. 12 transformoitunutta, ampisilliiniresistenttiä pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-ravintoalustassa, joka sisältää 100 μ g/ml ampisilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan Holmes et al:n menetelmällä (Anal. Biochem. 114, 193 (1981)) ja analysoidaan EcoRI- ja BamHI-restriktiokatkaisulla. Plasmidi-DNA:t, joissa on 257 ep:n EcoRI-BamHI-insertti, jatkoanalysoidaan suorittamalla kummallekin säikeelle DNA:n sekvensointi. Sekvensointialukkeina käytetään oligonukleotideja 3, 11, 12, 14 ja 20 (ks. kuva 2). Valitaan yksi kloon, jossa on oikea sekvenssi kummassakin DNA-säikeessä, ja sille annetaan nimeksi pBR322/YHIR.

Esimerkki 7: Plasmidin pJDB207/GAPFL-YHIR rakentaminen

pJDB207/GAPFL-YHIR on hiivan plasmidi, jolla ilmenne-
tään desulfatohirudiinimuunnosta HVI hiivan glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPDH) lyhyen rakenteellisen promoottorin säätelyssä. Desulfatohirudiinia koodittava sekvenssi koostuu edullisista hiivan kodoneista.

10 μ g plasmidia pBR322/YHIR katkaistaan restriktiionukleaaseilla BamHI ja EcoRI. 257 ep:n EcoRI-BamHI-fragmentti erotetaan muista DNA-fragmenteista 1,2 %:ssa preparatiivisessa agarosegeelissä. DNA-vyöhykkeet värjätään etidiumbromidilla ja visualisoidaan UV-valolla, jonka aallonpituus on 360 nm. 257 ep:n DNA-vyöhyke leikataan geelistä ja elektroeluoidaan 0,2 x TBE-puskurissa (TBE: 90 mM Tris-emäs, 90 mM boorihappo, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) 45 minuutissa 100 mA:n virralla. Kun on muutettu polaaraisuutta 45 sekunniksi, DNA-liuos otetaan talteen ja sen pitoisuudeksi säädetään 0,15 M NaCl. DNA

adsorboidaan 100 µl:n kerrokseen DE52-ioninvaihdinta (Whatman) ja eluoidaan 400 µl:lla suuren suolapitoisuuden omaavaa puskuria (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA ja 1,5 M NaCl). DNA saostetaan etanolilla ja uudelleensuspendoidaan veteen pitoisuuteen 0,1 pmol/µl.

Plasmidi pJDB207/GAPFL-HIR (eurooppalainen patenttihakemus no. 225 633) sisältää synteettisen desulfatohirudii-nigeenin (perustuu E. colin kodonien käyttöön) liitettyinä lukuvaiheistukseen hiivan happofosfataasin (PHO5) signaalisekvenssin kanssa. Geeni ilmennetään hiivan glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPFL) lyhyen rakenteellisen promoottorin säätelyssä, joka on sukkula-vektorissa pJDB207. 10 µg plasmidia pJDB207/GAPFL-HIR katkaistaan SalI:llä ja EcoRI:llä. 478 ep:n SalI-EcoRI-fragmentti sisältää Sal-Bam-pBR322-osan ja GAPFL-promoottorin. DNA-fragmentti eristetään 0,8 %:ssa preparatiivisessa agarosigeelissä, elektroeluoidaan ja puhdistetaan DE52-kromatografisesti ja saostetaan etanolilla. DNA-uudelleensuspendoidaan veteen pitoisuuteen 0,1 pmol/µl. 5 µg plasmidia pJDB207/GAPFL-HIR katkaistaan SalI:llä ja BamHI:llä. Suuri 6,7 ke:n vektorifragmentti eristetään geelistä edellä kuvatulla tavalla.

0,2 pmol 478 ep:n SalI-EcoRI-fragmenttia, 0,2 pmol 257 ep:n EcoRI-BamHI-fragmenttia, joka sisältää PHO5-signaalisekvenssin ja synteettisen hirudiinigeenin (hiivan kodonit), ja 0,1 pmol 6,7 ke:n vektorifragmenttia liitetään yhteen 6 tunnissa 15°C:ssa 10 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP ja 200 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs). 1 µl:n erällä yhteenliittämisseosta transformoidaan transformointikelpoiset E. coli HB 101-solut.

12 transformoitunutta, ampisilliiniresistenttiä pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-ravintoalustassa, joka sisältää ampisilliiniä 100 µg/ml. Plasmidi-DNA valmistetaan Holmes et al:n menetelmällä (supra) ja analysoidaan SalI/HindIII-kaksoiskatkaisuille. Yhdelle kloonille, jolla on odotettu restriktiokaavio, annetaan nimeksi

pJDB207/GAPFL-YHIR.

Vastaavalla tavalla voidaan suorittaa rakentaminen plasmidin pJDB207/GAPEL-HIR (eurooppalainen patenttihakemus no. 225 633) 543 ep:n SalI-EcoRI-fragmentilla. Näin saadulle uudelle plasmidille annetaan nimeksi pJDB207/GAPEL-YHIR.

Esimerkki 8: Plasmidin pJDB207/PHO5(-173)-HIR rakentaminen

pJDB207/PHO5(-173)-HIR on hiivan plasmidi, jolla ilmennetään desulfatohirudiinimuunnosta HV1 lyhyen PHO5-promoottorin säätelyssä. PHO5(-173)-promoottorielementti kattaa hiivan PHO5-promoottorin nukleotidisekvenssin asemasta -9 asemaan -173 (BstEII-katkaisukohta), mutta siinä ei ole mitään ylävirran säätelysekvenssiä (UAS). Näin ollen PHO5(-173)-promoottori käyttäytyy kuten rakenteellinen promoottori.

Plasmidi pJDB207/PHO5(Eco)-HIR (EP 225 633) sisältää täyspitkän, säädellyn PHO5-promoottorin, jossa on liitettyinä EcoRI-kohta asemaan -8 suhteessa PHO5-signaalsekvenssin ATG-kodoniin, ja desulfatohirudiinia koodittavan sekvenssin, jota seuraa PHO5:n transkriptionlopetusfragmentti. Tässä esimerkissä selostetaan säädellyn PHO5-promoottorin korvaamista lyhyellä PHO5(-173)-promoottorielementillä.

20 µg plasmidia pJDB207/PHO5(Eco)-HIR katkaistaan BstEII:llä. Restriktiofragmenttien porrastetut päät täytetään Klenow-DNA-polymeraasireaktiolla (1 yksikkö/µg DNA:ta) 200 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, ja 10 mM MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP ja TTP (0,1 mM kutakin), inkuboimalla 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Fenoliuuton jälkeen DNA saostetaan etanolilla.

4,16 µg BamHI-kytkijää (5'-CGGATCCG-3', Biolabs) fosforyloidaan 45 minuuttia 37°C:ssa 100 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP ja 18 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia (Boeh-

ringer). Kun reaktioseosta on pidetty 10 minuuttia 75°C:ssa, se jäädytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Emäspariutettua oligonukleotidikytkijää säilytetään -20°C:ssa.

4 pmol plasmidin pJDB207/PHO5(Eco)-HIR (BstEII)/ta-sainenpääfragmenttia inkuboidaan 16 tuntia 15°C:ssa 100-kertaisen ylimäärän kanssa fosforyloitua, emäspariutettua BamHI-kytkijää 208 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP ja 800 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs). Kun ligaasi on inaktivoitu inkuboimalla 10 minuuttia 85°C:ssa, kytkijäylimäärä poistetaan saostamalla DNA siten, että läsnä on 10 mM EDTA, 300 mM natriumasetaattia, pH 6,0, ja 0,54 tilavuutta isopropanolia. DNA katkaistaan BamHI:llä ja EcoRI:llä. DNA-fragmentit erotetaan 0,8 %:ssa preparatiivisessa agarosigeelissä. 172 ep:n BamHI-EcoRI-promoottori-fragmentti otetaan talteen geelistä elektroeluutiolla ja etanolisaostuksella. DNA uudelleensuspendoidaan pitoisuuteen 0,1 pmol/µl.

Plasmidi pJDB207/PHO5(Eco)-HIR katkaistaan EcoRI:llä ja HindIII:lla. 643 ep:n EcoRI-HindIII-fragmentti eristetään edelläkuvatulla tavalla. Tämä DNA-fragmentti sisältää PHO5-signaalisekvenssin liitettynä lukuvaiheistukseen desulfatohirudiinia koodittavan sekvenssin kanssa ja PHO5-transkriptionlopetusfragmentin kanssa. Plasmidi katkaistaan myös HindIII:lla ja BamHI:llä. 6,6 ke:n vektorifragmentti eristetään.

0,2 pmol 172 ep:n BamHI-EcoRI-fragmenttia, 0,2 pmol 643 ep:n EcoRI-HindIII-fragmenttia ja 0,1 pmol 6,6 ke:n vektorifragmenttia liitetään yhteen 6 tuntia 15°C:ssa 10 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs). 1 µl:n erä yhteenliittämisseosta lisätään 100 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikelpoisia E. coli HB101-soluja.

12 transformoitunutta, ampisilliniresistenttiä pesäkettä kasvatetaan LB-ravintoalustassa, joka sisältää 100 µg/ml ampisilliinia. Valmistetaan plasmidi-DNA ja

analysoidaan se BamHI- ja Sali/HindIII-katkaisulla. Valitaan yksi kloon, jossa on odotetut restriktiofragmentit, ja sille annetaan nimeksi pJDB207/PHO5(-173)-HIR.

Esimerkki 9: Plasmidin pDP34 rakentaminen

Hiivan kovalenttisesti suljettu, rengasmainen 2 μ -DNA eristetään Saccharomyces cerevisiae-kannasta S288C. Soluja inkuboidaan 20 minuuttia 37°C:ssa Zymolyasen kanssa (5 μ g/ml; 100 000 yksikköä/ μ g), jotta solunseinät hajoavat. Sferoplastit lysoidaan 2 %:lla SDS:ää. Sitten lisätään EDTA:ta pitoisuuteen 25 mM, etidiumbromidia pitoisuuteen 1 mg/ml ja keesiumkloridia lopulliseen tiheyteen 1,55 g/ml. Plasmidi-DNA erotetaan kromosomaalisesta DNA:sta ultrasentrifugoimalla 42 tuntia nopeudella 42 000 min⁻¹ 15°C:ssa. 2 μ -plasmidi-DNA leikataan gradientista ruiskulla. Etidiumbromidi poistetaan uuttamalla natriumkloridilla kyllästetyllä isopropanolilla ja lopuksi plasmidi-DNA saostetaan etanolilla. Puhdistettu 2 μ -plasmidi-DNA linearisoidaan tämän jälkeen PstI:llä ja kloonataan pUC19:n PstI-kohtaan (J. Norrander et al., Gene 26 (1983), 101), jolloin saadaan plasmidi pDP31.

Plasmidi pJDB207 katkaistaan restriktioentsyymeillä KpnI ja HpaI. Saatu 0,55 ke:n HpaI-KpnI-fragmentti sisältää 2 μ -sekvenssin ja dLEU2-geenin viallisen promoottorin välisen liitännäisen.

Plasmidi pUC7/LEU2 sisältää hiivan perimän LEU2-geenin 2,2 ke:n XhoI-Sali-fragmentin (A. Andreadis et al. (1982) Cell 31, 319) kloonattuna plasmidin pUC7 (J. Vieira et al. (1982) Gene 19, 259) Sali-kohtaan. Plasmidi pUC7/LEU2 katkaistaan KpnI:llä ja HpaI:llä. 4,25 ke:n KpnI-HpaI-fragmentti liitetään plasmidin pJDB207 0,55 ke:n HpaI-KpnI-fragmenttiin. Näin saadaan plasmidi pDP30, jossa alkuperäinen 2 μ /dLEU2-fuusio, kuten plasmidissa pJDB207, on sijoitettu LEU2-geenin eteen, jossa geenissä on täydellinen terminaattori. pDP30 katkaistaan HpaI:llä ja Sali:llä ja 1,85 ke:n fragmentti, joka

sisältää täydellisen LEU2-geenin, puhdistetaan ja kloonataan plasmidin pDP31 8,7 ke:n SalI-HpaI-fragmenttiin. Näin saatu plasmidi pDP33 (ks. kuva 3) linearisoidaan suorittamalla osittainen hajotus HindIII:lla etidiumbromidin (50 µg/ml) läsnäollessa (M. Oesterlund et al. (1982) Gene 20, 121) ja liitetään 1,17 ke:n HindIII-fragmenttiin, joka sisältää URA3-geenin (M. Rose et al. (1984) Gene 29, 113). URA3-geenin mukanaolo valitaan transformoimalla E. coli-kantaan pyrF (M. Rose et al., supra). Positiiviselle kloonille annetaan nimeksi pDP34 (ks. kuva 4).

pDP34 on hiiva-E. coli-sukkulavektori, jossa on ampisilliiniresistenssimerkki E. colia varten ja hiivan valintamerkit URA3 ja dLEU2. Se sisältää täydellisen 2µ-sekvenssin A-muodossa ja on REP1-, REP2- ja FLP-kykyinen.

Esimerkki 10: Hirudiininilmentämiskasettien kloonauk- plasmidiin pDP34

Plasmidi pDP34 katkaistaan BamHI:llä. Katkaisukohdan porrastetut päät täytetään Klenow-DNA-polymeraasi-reaktiolla (T. Maniatis et al., käsikirjassa "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). DNA katkaistaan vielä SalI:llä ja ja 11,8 ke:n vektorifragmentti eristetään preparatiivisessa 0,6 %:ssa agarosigeelissä. DNA otetaan talteen elektroelutiolla ja saostetaan etanolilla. Eri ilmentämiskasetteja kloonataan pDP34-vektorifragmenttiin SalI-kohdan ja (BamHI)/tasapääkohdan väliin.

Plasmidi pJDB207/GAPFL-YHIR katkaistaan HindIII:lla. Porrastetut päät muutetaan tasaisiksi Klenow-DNA-polymeraasi-reaktiolla. DNA saostetaan etanolilla ja katkaistaan vielä SalI:llä. 1,1 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmentti sisältää täydellisen ilmentämiskasetin, jossa on pBR322-sekvenssit, GAPFL-promoottori, PHO5-signaalisekvenssi liittyneenä lukuvaiheistuksessa desulfatohirudiinin koodittavaan sekvenssiin (edulliset hiivan kodonit) ja

PHO5-transkriptionlopetusfragmentin. 1,1 ke:n fragmentti eristetään preparatiivisessa 0,8 %:ssa agarosigeelissä, otetaan talteen geelistä elektroeluutiolla ja puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografiolla ja etanolisaostuksella. 0,2 pmol 1,1 ke:n fragmenttia ja 0,1 pmol 11,8 ke:n vektorifragmenttia liitetään 16 tuntia yhteen 15°C:ssa 10 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaaasia (Biolabs) 1 µl:n erällä transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut. 5 transformoitunutta, ampisilliiniresistenttiä pesäkettä analysoidaan. Plasmidi-DNA katkaistaan BamHI:llä ja SalI/BamHI:llä. Valitaan yksi kloon, jossa on oikeat restriktiofragmentit, ja sille annetaan nimeksi pDP34/GAPFL-YHIR (ks. kuva 5).

Vastaavalla tavalla kloonataan pJDB207/GAPEL-YHIR:n (ks. esimerkki 7) 1,2 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmentti vektoriin pDP34, jolloin saadaan plasmidi pDP34/GAPEL-YHIR.

Plasmidi pJDB207/PHO5(-173)-HIR katkaistaan SalI:llä ja EcoRI:llä. 448 ep:n SalI-EcoRI-fragmentti eristetään kuvatulla tavalla. DNA-fragmentti sisältää plasmidin pBR322 SalI-BamHI-osan ja lyhyen rakenteellisen PHO5(-173)-promoottorin (ks. esimerkki 8). Plasmidi pJDB207/GAPFL-YHIR katkaistaan HindIII:lla. Porrastetut päät tehdään tasaisiksi Klenow-DNA-polymeraasireaktiolla. DNA katkaistaan vielä EcoRI:llä. 642 ep:n EcoRI-(HindIII)/tasapääfragmentti eristetään. Se sisältää PHO5-signaalisekvenssin, desulfatohirudiinin koodittavan sekvenssin (sisältää edulliset hiivan kodonit) ja PHO5-transkriptionlopetusfragmentin. 0,2 pmol 448 ep:n SalI-EcoRI-fragmenttia, 0,2 pmol 642 ep:n EcoRI-tasapääfragmenttia ja 0,1 pmol 11,8 ke:n SalI-(BamHI)/tasapäävektorifragmenttia liitetään yhteen. Yhteenliittämissokeksen erällä transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut. 12 transformantin plasmidi-DNA analysoidaan BamHI- ja SalI/BamHI-katkaisulla. Valitaan yksi kloon, jossa on oikea plasmidi, ja sille annetaan nimeksi pDP34/PHO5(-173)-YHIR (ks. kuva 6).

Esimerkki 11: Muita hirudiinigeenin ilmentämisplasmideja, joissa on E. colin kodoneja

Vastaavasti kuin esimerkissä 10 on selostettu rakennetaan ilmentämisplasmideja, jotka sisältävät desulfatohirudiinimuunnoksen HV1 synteettisen geenin, joka perustuu E. colin kodonien käyttöön. Plasmidin pJDB207/GAPFL-HIR (eurooppalainen patenttihakemus no.225 633) 1,1 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmentti eristetään ja kloonataan vektoriin pDP34. Näin saatu ilmentämisplasmidi on pDP34/GAPFL-HIR, joka sisältää synteettisen desulfatohirudiinigeenin, joka perustuu edullisiin E. coli-kodoneihin, ja joka ilmentyy rakenteellisen GAPFL-promoottorin säätelyssä.

Vastaavaa rakentamista varten kloonataan plasmidin pJDB207/PHO5(-173)-HIR (ks. esimerkki 8) 1,1 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmentti plasmidiin pDP34. Näin saatu plasmidi pDP34/PHO5(-173)-HIR sisältää synteettisen desulfatohirudiinigeenin (E. coli-kodonit) lyhyen rakenteellisen PHO5(-173)-promoottorin säätelyssä.

Esimerkki 12: Plasmidiin pDP92 kloonattu hirudiininilmentämiskasetti

Vektorit, joissa on täydellinen 2 μ -sekvenssi, eivät välttämättä ilmennä kaikkia hiivan aidon 2 μ -renkaan toimintoja. Avoimet lukuvaiheistukset saattavat tuhoutua kloonauksessa. Koska tähän mennessä ei tunneta mitään toimintoa "D"-lukuvaiheistuksen geenituotteelle, käytettiin tämän geenin sisällä olevaa laatuaan ainutta PstI-kohtaa dLEU2-geenin (Beggs, J.D. (1978) Nature 275, 104 - 109) kloonamiseen tai pUC19-vektoriosan sijoittamiseen kuten plasmidissa pDP31 (Ks. esimerkki 9). Vasta äskettäin on viitattu siihen, että D-geenituote säätelee FLP-geenituotteen ilmentymistä (J.A.H. Murray et al. (1987) EMBO J. 6, 4205). Jotta 2 μ -renkaasta saataisiin täysi hyöty, rakennetaan vektori, jolla on toi-

mivina kaikki tunnetut 2 μ -toiminnot, D-geenituotemukaanlukien.

a) Plasmidin pDP92 rakentaminen (ks. kuva 7)

Plasmidi pDP31 (ks. esimerkki 9) katkaistaan PstI:llä ja HpaI:llä, jolloin syntyy kolme fragmenttia. Plasmidi pK19 (antaa kanamysiiniresistenssin; Pridmore, R.D. (1987) Gene 56, 309 - 312) linearisoidaan SmaI:llä. Kummankin katkaisun DNA-fragmentit uutetaan fenolilla ja saostetaan etanolilla. DNA-fragmentit sekoitetaan ja liitetään yhteen. Yhteenliittämiseksi transformoidaan (Hanahan, D.J. (1983) Mol. Biol. 166, 557 - 580) transformointikelpoiset E. coli JM109-solut (Yanisch-Perron, C. et al. (1985) Gene 33, 103 - 119), ilmennetään 2 tuntia 37°C:ssa LB-ravintoalustassa ja sen jälkeen maljataan LB-agarmaljoissa, joissa on täydennyksenä 50 μ g/ml kanamysiiniä, 30 μ g/ml XGal ja 7 μ g/ml IPTG:tä.

Kasvatetaan 12 valkoista, kanamysiiniresistenttiä pesäkettä. Plasmidi-DNA analysoidaan XbaI- ja BamHI/KpnI-katkaisuilla. Yhteen klooniin, joka on menettänyt plasmidin pDP31 pUC19-vektoriosan, on palautunut 2 μ -D-lukuvaiheistus PstI-kohdan uudelleenliittymisellä, ja siinä on pK19-plasmidin tasainen pää liittyneenä HpaI-kohtaan, ja plasmidille annetaan nimeksi pDP91. Tämä plasmidi sisältää suuren HpaI-PstI-fragmentin ja pienen PstI-HpaI-fragmentin 2 μ -plasmidista kloonattuina plasmidin pK19 SmaI-kohtaan. Kun PstI-kohta on liittynyt takaisin yhteen, on D-lukuvaiheistus palautunut.

URA3-geeni eristetään plasmidin pDP34 1,17 ke:n HindIII-fragmentista (ks. esimerkki 9) ja kloonataan plasmidin pUC12 ainoaan HindIII-kohtaan. Kloonille, jossa URA3-geeni on samassa suunnassa kuin ampicilliiniresistenssigeeni, annetaan nimeksi pUC12/URA3. Plasmidi pDP91 ja plasmidi pUC12/URA3 katkaistaan kumpikin SacI:llä ja BamHI:llä, jolloin kummastakin syntyy kaksi fragmenttia. DNA-fragmentit liitetään yhteen seoksena ja saadulla

seoksella transformoidaan transformointikelpoiset E. coli JM109-solut. Solut maljataan LB-agarmaljoissa, joissa on täydennyksenä 100 µg/ml ampisilliinia, 30 µg/ml XGal ja 7 µg/ml IPTG.

Kasvatetaan 12 valkoista, ampisilliiniresistenttiä pesäkettä. Plasmidi-DNA analysoidaan HindIII- ja PvuII-katkaisulla. Yhdelle kloonille annetaan nimeksi pDP92 ja se sisältää täydellisen 2µ-sekvenssin, jolla on kaikki tunnetut toiminnot kunnossa, ja URA3-geenin kloonattuna pUC-vektoriin.

b) Hirudiininilmentämiskasettien kloonausplasmidiin pDP92

Plasmidi pDP92 katkaistaan BamHI:llä samoin kuin esimerkissä 10. Porrastetut päät täytetään Klenow-DNA-polymeraasireaktiolla. Sitten DNA katkaistaan vielä SalI:llä. 10,2 ke:n vektorifragmentti eristetään. Plasmidin pJDB207/GAPFL-YHIR 1,1 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmentti eristetään ja liitetään vektorifragmenttiin.

6 transformoitunutta, ampisilliiniresistenttiä pesäkettä analysoidaan. Plasmidi-DNA katkaistaan BamHI:llä, PstI:llä ja SalI/BamHI:llä. Valitaan yksi kloni, jossa on odotetut restriktiofragmentit ja sille annetaan nimeksi pDP92/GAPFL-YHIR. Vastaavasti saadaan plasmidi pDP92/GAPFL-YHIR käyttämällä 1,2 ke:n SalI-(HindIII)/tasapääfragmenttia (ks. esimerkki 7).

Plasmidi pDP92/PHO5(-173)-YHIR rakennetaan esimerkissä 10 kuvatulla tavalla käyttämällä 10,2 ke:n SalI-(BamHI)/tasapää-pDP92-vektorifragmenttia (ks. edellä).

Esimerkki 13: 2µ-DNA:sta vapaiden Saccharomyces cerevisiae-isäntäkantojen rakentaminen

Jotta endogeeninen 2µ-plasmidi saadaan poistetuksi, aiheutetaan ensin HT246-kantaan (DSM4048; α, leu 2-3, leu 2-112, prb) deletio URA3-geeniin niin, että kannasta tulee auksotrofinen urasiilin suhteen. HT246 trans-

formoidaan 1 µg:lla plasmidia YeP13 (Broach., J.R., Strathern, J.N., Hicks, J.B. (1979) *Gene* 8, 121 - 123) käyttämällä julkaisussa Hinnen et al. selostettua transformointimenetelmää (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)). 10 µg plasmidia pUC12ura3Δ, joka sisältää deleetion URA3-geenissä (Sengstag, Ch., Hinnen, A. (1987) *Nucleic Acids Research* 15, 233 - 246) lisätään yhdessä plasmidin YEP13 kanssa. Noin 3000 leusiiniprototrofista transformanttia uudelleensuspendoidaan 5 ml:aan minimiravintoalustaa (Difco Yeast Nitrogen Base ilman aminohappoja, johon on lisätty 2 % glukoosia, 0,1 % leusiinia, 0,1 % urasiilia ja 0,25 % fluoriorottihappoa) pienessä ravistelupullossa ja inkuboidaan 60 tuntia 30°C:ssa kierrosnopeudella 180 min⁻¹. Transformantit, jotka kasvavat, ovat vastustuskykyisiä toksiselle analogille, joka on fluoriorottihappo, ja näin ollen niissä on kromosomaaliossa URA3-geenissä tapahtunut korvautuminen uraΔ3:lla. Kasvaneet solut maljataan täydellisessä ravintoalustassa, jossa on (g/l): peptonia 20, hiivauutetta 10 ja glukoosia 20, ja kun on kasvatettu 48 tuntia 30°C:ssa, suoritetaan toisintomaljaus minimiravintoalustassa (Difco), joka on yeast nitrogen base ilman aminohappoja, mutta täydennetty 2 %:lla glukoosia ja 0,1 %:lla leusiinia, jotta saadaan selville urasiiliauksotrofit. Poimitaan useita auksotrofeja, joista testataan leusiiniauksotrofian antavan plasmidin YEP13 menetys. Yksi erillinen pesäke (nimeltään Tr889), joka vaatii leusiinia ja urasiilia, poimitaan ja käytetään jatkotutkimuksissa.

Tr889 transformoidaan plasmidilla pDP38 (saatu plasmidista pDP34 katkaisemalla SphI:llä ja liittämällä näin saatu 8,4 ke:n fragmentti uudestaan yhteen; ks. kuva 4), jossa on molemmat merkkigeenit LEU2 ja URA3 (transformointimenetelmä sama kuin edellä). Transformoituneet hiivasolut valitaan ensin hiivan minimiravintoalustamaljoissa, joista puuttuu urasiili, mutta jotka on täydennetty leusiinilla, ja sen jälkeen toisintomal-

jataan minimiravintoalustassa, josta puuttuu leusiini, mutta joka on täydennetty urasiililla. Poimitaan 10 heikosti kasvavaa pesäkettä ja niitä kasvatetaan erikseen täydellisessä nestemäisessä ravintoalustassa (supra) noin sadan sukupolven yli. Näin tehtäessä solut menettävät plasmidin pDP38 ja - tietty prosentuaalinen osuus - menettää samanaikaisesti myös 2 μ -plasmidin.

Poimitaan 10 urasiilia ja leusiinia tarvitsevaa pesäkettä, valmistetaan niistä DNA ja DNA:t katkaistaan täysin PstI:llä ja niille suoritetaan koetus ³²P:llä leimatulla hiivan 2 μ -DNA:lla Southern-blottauksena. Yhdelle risteytetylle kannalle, joka ei osoita mitään hybridisointumissignaalia, annetaan nimeksi H449 (a, leu2-3, leu2-112, ura3 Δ , prb, cir⁰), joka on isogeeninen, 2 μ :stä vapaa (cir⁰) hiivakannan HT246 johdannainen.

Esimerkki 14: *S. cerevisiae* H449 kex1-muunnoksen valmistaminen rikkomalla perimän KEX1-geeni

Karboksipeptidaasi ysc κ -aktiivisuus eliminoidaan *S. cerevisiae*-kannasta H449 (prb, leu2, ura3, cir⁰) rikkomalla perimän KEX1-geeni. Tätä tarkoitusta varten hiivan perimäkirjastosta tunnistetaan KEX1-geeni ja se kloonataan sopivaan vektoriin. URA3-geeni, joka toimii valintamerkinä, sijoitetaan KEX1-rakennegeeniin niin, että sen lukuvaiheistus särkyy. Yhdistelmäplasmidi-DNA, jossa on URA3-geeni, jonka kummallakin puolella on KEX1-sekvenssejä, siirretään Ura⁻-hiivakantaan H449. KEX1-geenin sekvenssihomologia plasmidissa ja kromosomissa mahdollistaa in vivo-rekombinaation, joka transformoi hiivasolut Ura⁻:sta Ura⁺:ksi ja samalla KEX1:stä kex1:ksi. Kannat, joissa on särkynyt kex1-geeni, eivät syntetisoi toimivaa ysc κ -proteiinia.

KEX1:tä koodittava geeni kloonataan hiivan perimäkirjastosta (sentromeerisukkulavektorissa pCS19; Sengstag, C. et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 233) suorittamalla pesäkehybridisaatio KEX1-spesifisellä oligonukleotidikoet-

timella. Seuraava oligonukleotidisekvenssi

5' -GTCGAATCCGGCCCTTTTAGGGTGAATTCA- 3'

on johdettu julkaistusta KEX1-sekvenssistä (ks. Dmochowska, A., *et al.*, (1987) *Cell* 50, 573) ja valittu kokonaisesta sekvenssistä sen perusteella, että sillä on erityisen vähäinen homologia yscY-sekvenssin kanssa. Se hybridisoituu EcoRV-katkaisukohdan ylävirrassa olevan KEX1-DNA:n kanssa, jota katkaisukohtaa käytetään URA3-geenin sijoittamiseen. Tätä samaa oligonukleotidia voidaan käyttää sekvenssointialukkeena URA3-fragmentin insertoitumisen varmistamiseen. Tämä synteettinen oligonukleotidi leimataan radioaktiivisesti ja sillä seulotaan geenikirjasto.

Noin 10 000 kloonia (5 x 2000 kloonia/malja (halkaisija 140 mm)) seulotaan pesäkehybridisoinnilla (ks. Woods, D.E., *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5661 ja Whitehead, A.S. *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5387). Kahdesta toistetusta seulonnasta eristetään 5 riippumatonta positiivista kloonia. Yhdelle niistä annetaan nimeksi pKEX1. Jotta saataisiin leikatuksi irti KEX1-spesifinen HindIII-BamHI-fragmentti (1380 ep), pKEX1-plasmidi-DNA katkaistaan kyseisillä kahdella endonukleaasilla. Vastaava fragmentti siirretään Bluescript-vektoriin M13+ SK-monikytkijällä ja tämä kloni sekvensoidaan M13-vektorin universaalialukkeella, jotta saadaan varmistetuksi KEX1-fragmentti, ja kloonille annetaan nimeksi pKEX1M13.

Plasmidi pUC12/URA3 (ks. esimerkki 12a), joka sisältää URA3-geenin HindIII-fragmenttina kloonattuna, katkaistaan HindIII:lla 1170 ep:n HindIII-fragmentin eristämiseksi (ks. Rose, M. *et al.* (1984) *Gene* 29, 115). Fragmentin porrastetut päät täytetään Klenow-polymeraasilla, jotta saadaan tasaiset päät. Toisaalta plasmidi pKEX1M13 linearisoidaan katkaisemalla endonukleaasilla EcoRV (HindIII-BamHI-KEX1-fragmentti katkeaa) ja de-

fosforyloidaan emäsfosfataasilla, jotta itseyhteenliittymiseltä vältetään. Sitten nämä kaksi DNA-fragmenttia sekoitetaan keskenään, liitetään yhteen ja transfektoidaan E. coli-kantaan JM103. Transformantit analysoidaan suorittamalla kaksoiskatkaisu HindIII:lla ja BamHI:llä, jolloin kyseisen HindIII-BamHI-fragmentin koko kasvaa 1380 ep:sta 2550 ep:iin. Oikean kloonin DNA sekvensoidaan käyttämällä edelläkuvattua oligonukleotidia sekvensointialukkeena, jotta saadaan varmistetuksi URA3-fragmentin sijoittuminen KEX1-geeniin EcoRV-leikkauskohtaan. Tälle plasmidille annetaan nimeksi pKEX1M13-URA3.

Plasmidi pKEX1M13-URA3-DNA katkaistaan HindIII:lla ja BamHI:llä, jotta KEX1-URA3-yhdistelmäfragmentti saadaan irroitetuksi, ja erottamatta vektorista siirretään S. cerevisiae-kantaan H499 käyttämällä edellä kuvattua menetelmää (ks. esimerkki 3). Kun kalvofraktio on erotettu Ura3⁺-transformanteista, ysc α -aktiivisuus mitataan käyttämällä kromogeenistä substraattia (ks. esimerkki 1). Yhdelle transformantille, joka ei osoita lainkaan ysc α -proteaasiaktiivisuutta, annetaan nimeksi S. cerevisiae H449kex1.

Esimerkki 15: *Saccharomyces cerevisiae*-kannan H449kex1 transformointi

Saccharomyces cerevisiae-kanta H449kex1 transformoidaan seuraavilla plasmideilla

pDP34/PHO5(-173)-HIR

pDP34/GAPFL-HIR

pDP34/GAPFL-HIR

pDP34/PHO5(-173)-YHIR

pDP34/GAPFL-YHIR

pDP34/GAPFL-YHIR

pDP92/PHO5(-173)-YHIR

pDP92/GAPFL-YHIR

pDP92/GAPFL-YHIR

käyttämällä Hinnen et al:n (supra) selostamaa transformointimenetelmää. Transformoituneet hiivasolut valitaan hiivan minimiravintomaljoissa, joissa on täydennyksenä leusiinia, mutta urasiili puuttuu. Yksittäiset transformoituneet hiivasolut valitaan ja niille annetaan seuraavat nimet:

Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/PHO5(-173)-HIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-HIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/PHO5(-173)-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP92/PHO5(-173)-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP92/GAPFL-YHIR
Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP92/GAPFL-YHIR

Esimerkki 16: Transformoituneiden hiivakantojen fermentointi laboratoriomittakaavassa

Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/PHO5(-173)-YHIR-soluja ja Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-YHIR-soluja kasvatetaan erikseen kahtena peräkkäisenä esiviljelmänä 20 ml:ssa minimiravintoalustaa, joka sisältää (g/l):

Difco Yeast Nitrogen Basea	6,7
asparagiinia	10
leusiinia	1
glukoosia	20

Ensimmäistä esiviljelmää kasvatetaan 60 tuntia

28°C:ssa nopeudella 180 min⁻¹. Toinen esiviljelmä ympätään 2 %:lla ensimmäistä esiviljelmää ja inkuboidaan 24 tuntia 28°C:ssa nopeudella 180 min⁻¹.

Pääkasvatuksen ravintoalustan koostumus on seuraava (g/l):

hiivauutetta	49
glukoosia	5
fruktoosia	57
NH ₄ NO ₃	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
CaCO ₃	5,0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,0

Pääkasvatus ympätään noin 2 x 10⁶ solulla/ml ja inkuboidaan 72 tuntiin asti 28°C:ssa nopeudella 180 min⁻¹. Fermentoinnin lopussa saadaan noin 1 x 10⁹ solua/ml. Kasvatuksesta otetaan fermentoinnin kuluessa useaan otteeseen eriä ja niistä poistetaan solut sentrifugoimalla ja viljelmän emäliuoksesta analysoidaan desulfatohirudiini HPLC-menetelmällä (infra).

Esimerkki 17: Desulfatohirudiinimuunnoksen HV1 tuottaminen 50 litran mittakaavassa

2μ:stä vapaan Saccharomyces cerevisiae H449kex1/pDP34/GAPFL-YHIR-kannan työskentelysolupankkia käytettiin ympin lähteenä tuotettaessa desulfatohirudiinia 50 litran mittakaavassa.

Työskentelysoluampulleja säilytetään höyryfaasissa nestetyypistiassa. Yhden ampullin sisällöllä ympätään ravistelupulloviljelmä, jossa on selektiivistä ravintoalustaa, jonka koostumus on seuraava (g/l):

yeast nitrogen basea	8,4
L-asparagiinimonohydraattia	11,4
L-histidiiniä	1,0
L-leusiinia	0,1
D-glukoosimonohydraattia	20,0

500 ml:n pullo sisältää 100 ml ravintoalustaa ja sitä inkuboidaan 48 tuntia 28°C:ssa orbitaaliravistelijassa ravistelunopeudella 180 min⁻¹.

Toinen ravistelupullosesiviljelmä sisältää 600 ml samaa ravintoalustaa 2 l:n pullossa, jossa on 4 suuntauslevyä. Ensimmäisestä esiviljelmästä otetun ympin määrä on 5 % (30 ml) ja pulloja inkuboidaan 48 tuntia 28°C:ssa orbitaaliravistelijassa nopeudella 120 min⁻¹.

Kolmas esiviljelmä fermentoidaan 50 litran bioreaktorissa, joka on ruostumatonta terästä ja varustettu neljällä suuntauslevyllä ja yksilevyisellä turbiinisekoittimella, jonka halkaisija on 115 mm. Myös tässä viljelmässä käytetään edellä mainittua ravintoalustaa ja lähtötilavuus on 30 litraa. 50 litran reaktorin ympppäämiseen käytetään yksi 2 litran pullo, joka sisältää 600 ml viljelmää (2 %). Fermentointi kestää noin 42 tuntia 28°C lämpötilassa. Sekoittimen nopeus on 600 min⁻¹, ilmastusnopeus 1 vvm ja reaktoria käytetään 0,3 bar:n ylipaineessa.

Desulfatohirudiinin tuotantovaiheessa käytetään samanlaista 50 litran bioreaktoria, joka on varustettu syöttöeräprosesseja varten. Tässä vaiheessa käytetyn ravintoalustan (30 l) koostumus on seuraava (g/l):

lihapeptoni (Merck)	5,0
hiivauute	30,0
ammoniumsulfaatti	6,0
magnesiumsulfaattiheptahydraatti	1,0
natriumkloridi	0,1
kaliumdivetyfosfaatti	1,0
D-glukoosimonohydraatti	10,0

Kolmannesta esiviljelmävaiheesta otetun ympin määrä voi olla 2 %. Fermentointi kestää 48 tuntia 28°C:ssa ja sekoittimen nopeus on 750 min⁻¹. Ylipaine asetetaan aluksi arvoon 0,3 bar, mutta se voidaan fermentoinnin kuluessa nostaa 1,0 bar:iin, jotta liuenneen hapen jän-

nitys on 20 % kyllästymisen yläpuolella. Ilmastus on aluksi 0,25 vvm, mutta se nostetaan määrään 1 vvm 9 tunnin kuluttua, jotta voidaan taata riittävä happimäärä käyttöön.

pH-arvo laskee fermentoinnin alkuvaiheessa 5,0:aan, jossa se pidetään automaattisella ammoniumhydroksidisyötöllä.

Yksinkertaisessa panoskasvatuksessa riippuu saavutettu biomassan määrä ja siten myös desulfatohirudiinitiiteri hiililähteen määrästä, joka panostetaan fermentoriin alussa. Tämän puolestaan sanelee bioreaktorin hapensiirtokapasiteetti ja tarve välttää hiivan ylenmääräinen etanolintuotanto. Nämä rajoitukset voidaan voittaa käyttämällä eräsyöttötekniikkaa. Niinpä melko vähän glukoosia sisällytetään lähtöravintoalustaan, mutta glukoosia syötetään kasvatuksen aikana niin, että lopullinen biomassan konsentraatio tulee suuremmaksi ja desulfatohirudiinitiitteristä tulee noin kolminkertainen verrattuna panoskasvatuksella saavutettuun. Käytännössä syöttöä lisätään vähin erin asteittain niin, että lopullinen syöttö on 175 g glukoosia tunnissa.

Silikonipohjaista vaahdonestoainetta lisätään vähän, jotta vaahtoaminen saadaan tarvittaessa kuriin. Osa fermentorista poistuvasta kaasusta analysoidaan, jotta saadaan tietoa hapenkulutuksesta ja hiilidioksidin kehittymisnopeudesta. Liuenneen hapen jännitys mitataan on-line käyttämällä steriloitavaa elektrodia.

Näytteitä otetaan 6 tunnin välein koko prosessin ajan, jotta voidaan seurata glukoosi- ja etanolipitoisuuksia ja desulfatohirudiinitiitteriä biomäärityksellä ja HPLC:llä ja myös tarkistaa steriilisyyttä. HPLC-määritys osoittaa, että desulfatohirudiini tuotetaan oleellisesti ottaen vapaana C-päästään lyhentyneestä analogista. Fermentoinnin jälkeen voidaan desulfatohirudiini ottaa talteen viljelmän emäliuoksesta.

Esimerkki 18: Desulfatohirudiinin talteenotto 50 litran mittakaavassa kasvatetusta *S.cerevisiae*-viljelmästä

Kasvustoon (ks. esimerkki 17) sekoitetaan Amberlite XAD-7:ää ja annetaan adsorboitua noin 4 tuntia 25°C:ssa. Solut erotetaan hartsista pylväässä. Hartsi pestään 1 M NaCl-liuoksella ja eluoidaan Tris-puskurilla (50 mM, pH 7,0 - 8,5). Pääjakeen (30 l) pH säädetään arvoon 2,9 ja sen jälkeen se sijoitetaan S-Sepharose-pylvääseen (Amicon PA, tasapainotettu ammoniumformiaattipuskurilla, jonka pitoisuus on 25 mM, pH 2,9) jonka kolonnitilavuus on 2 l. Sitten pestään ammoniumformiaattipuskurilla (40 mM, pH 3,6) ja eluoidaan ammoniumformiaattipuskurilla (50 mM, pH 3,8). Pääeluaattijae (10 l) konsentroidaan Filtron Minisette-ultrasentrifugointisysteemillä, joka on varustettu 0,3k-kalvolla. 0,5 litran erä saatua kirkasta proteiiniliuosta sijoitetaan Bio-Gel P-6 fine-pylvääseen (Amicon GF, tasapainotettu 0,5%-sella etikkahapolla), jonka kolonnitilavuus on 1,5 litraa. Eluointi suoritetaan 0,5%-sella etikkahapolla. Eluaatin pääjake (1 l) konsentroidaan ultrasentrifugoinnilla ja sijoitetaan sen jälkeen Q-Sepharose fast flow-pylvääseen (Amicon PA, tasapainotettu ammoniumformiaattipuskurilla, 25 mM, pH 2,9), jonka kolonnitilavuus on 2 l. Eluointi suoritetaan ammoniumformiaattipuskurilla (50 mM, pH 4,2). Eluaatin pääjake väkevöidään ultrasentrifugoinnilla ja sen jälkeen diasuodatetaan vettä vastaan. Näin saatu kirkas vesiliuos lyofiloidaan. Kiinteä aine on puhdasta desulfatohirudiinia, joka on vapaa havaittavissa olevista määristä C-päästään lyhentyneitä analogeja.

Esimerkki 19: *S. cerevisiae* H 449:n PRA1-geenin rikkominen

S. cerevisiae-kannasta H499 (DSM 4413; prb, leu2, ura3, cir⁰) tehdään moninkertaisesti proteaasivajaa geeninrikkomisella. Geeninrikkomisella on meioottisiin

risteytyksiin verrattuna se etu, että mutaatio saadaan aikaan stabiilisti, mutta kyseisen kannan geneettinen tausta pysyy samana kuin ennen.

Ensimmäisessä vaiheessa eliminoidaan proteinaasi yscA-aktiivisuus rikkomalla PRA1-geeni (Ammerer, G. et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 2490). PRA1 eristetään hiivan kokonaisesta perimä-DNA:sta, joka on katkaistu SacI:llä ja PstI:llä. 2 ke:n fragmentit eristetään preparatiivisessa 0,6 %:ssa agarosigeelissä, elektroelutoidaan ja liitetään pUC19:n monikytkijäalueen PstI-SacI-kohtiin. *E. coli* JM109 transformoidaan vektorilla ja poimitaan 280 erillistä pesäkettä. Pesäkkeitä kasvatetaan erikseen mikrotiterlevyjen koloissa, joissa on LP +amp-ravintoalustaa. Pesäkehybridisaatio suoritetaan oleellisesti siten kuin julkaisussa Woods, D.E. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79, 5651 on selostettu käyttämällä seuraavaa ³²P-leimattua oligonukleotidikoe-tinta

5'-AAGCCTAGTGACCTAGT-3'

joka on johdettu julkaistusta PRA1-sekvenssistä (Ammerer et al., supra). Poimitaan 3 positiivista pesäkettä ja yhden - pUC19/PRA1 - DNA katkaistaan SacI:llä ja XhoI:llä ja 1,9 ke:n fragmentti, joka sisältää koko PRA1-geenin, alakloonataan Bluescript-vektorin M13+ KS-monikytkijä-alueeseen (Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA, USA). 1,2 ke:n HindIII-fragmentti, joka sisältää koko URA3-geenin (Rose, M. et al. (1982) *Gene* 29, 113), sijoitetaan PRA1-insertin koodittavalla alueella olevaan ainoaan HindIII-kohtaan. Näin saadulle plasmidille annetaan nimeksi M13+/pral::URA3. M13+/Pral::URA3 katkaistaan SacI/XhoI:llä ja 3,1 ke:n fragmentilla transformoidaan vektoria erottamatta *S. cerevisiae* H449 edellä kuvatulla tavalla (ks. esimerkki 3). Poimitaan urasiilista riippumattomat transformantit, valmistetaan DNA ja suoritetaan SacI/XhoI-katkaisu ja oikea PRA1-geenin särkymi-

nen tarkistetaan Southern-blottauksella. Yhdelle transformantille, jossa on PRA1:n kanssa hybridisoituvan SacI/XhoI-fragmentin oikea siirtyminen 1,9 ke:n fragmentista 3,1 ke:n fragmenttiin, annetaan nimeksi Tr 1186.

Seuraavassa vaiheessa Tr 1186 - jossa PRA1-geeni on rikottu pral::URA3:lla - tehdään jälleen riippuvaiseksi urasiilista tuomalla deletio pral ::URA3-geeni-inserttiin. Tr 1186 transformoidaan 1 µg:lla plasmidia YEp13 (Broach, J.R. et al. (1979) Gene 8, 121) yhdessä 10 µg:n kanssa plasmidia pUC12ura3delta, joka sisältää 200 ep:n deletion URA3-geenissä (Sengstag, C. et al. (1978) Nucleic Acids Research 15, 233). 3000 leusiiniprototrofista hiivatransformanttia uudelleensuspendoidaan 5 ml:aan minimiravintoalustaa (Difco yeast nitrogen base ilman aminohappoja, johon on lisätty 2 % glukoosia, 0,1 % leusiinia, 0,1 % urasiilia ja 0,25 % fluoriorottihappoa) pienessä ravistelupullossa ja inkuboidaan 60 tuntia 30°C:ssa nopeudella 180 min⁻¹. Kasvavat transformantit ovat resistenttejä toksiselle analogille, fluoriorottihapolle, ja niissä on näin ollen tapahtunut pral::URA3-alueella korvautuminen ura3deltalla. Kasvaneet solut maljataan täydelliselle ravintoalustalle, joka sisältää (g/l) peptonia 20, hiivauutetta 10 ja glukoosia 20, ja kun on kasvatettu 48 tuntia 30°C:ssa, suoritetaan toisintomaljaus minimiravintoalustaan (Difco yeast nitrogen base ilman aminohappoja, mutta täydennettynä 2 %:lla glukoosia ja 0,1 %:lla leusiinia), jotta saadaan selville urasiiliaukso- trofit. Poimitaan useita auktrofeja ja niistä testataan leusiiniaukso- trofian antavan YEp13:n menetys. Yksi erillinen pesäke - nimeltään Tr 1195 -, joka vaatii leusiinia ja urasiilia, poimitaan ja sitä käytetään jatkokeisseissä.

Esimerkki 20: Tr 1195:n PRC1-geenin rikkominen

Seuraavaksi eliminoidaan karboksipeptidaasi yscY-aktiivisuus Tr 1195:stä. PRC1, joka koodittaa yscY:tä

(Rothman, J.H. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3248) eristetään hiivan perimäkirjastosta sentromeerivektorissa pCS19 (Sengstag et al. (1978) Nucleic Acids Research 15, 233) suorittamalla pesäkehybridisaatio 2 synteettisen oligonukleotidin kanssa

5'-GAAAGCATTTCACCAGTTTACTATGTGG -3' ja

5'-CGAATGGATCCCAACGGGTTTCTCC -3'

jotka vastaavat PRC1:tä koodittavan sekvenssin 5'- ja 3'-päättä. Yhdelle positiiviselle kloonille annetaan nimeksi pCS19/cpy8. pCS19/cpy8-DNA katkaistaan ClaI/PvuII:lla, ladataan 0,6 %:seen agarosigeeliin ja 2,6 ke:n fragmentti eristetään ja elektroeluoidaan. Tämä ClaI/PvuII-fragmentti, joka sisältää koko PRC1-geenin, alakloonataan plasmidin pUC19 Nar/SmaI-kohtiin. Näin saatu plasmidi pUC19/PRC1 katkaistaan ainoasta StulI-kohdasta, johon liitetään 1,2 ke:n URA3-fragmentti (ks. esimerkki 19). Tätä tarkoitusta varten URA3:n porrastetut HindIII-päät täytetään Klenow-DNA-polymeraasireaktiolla, jotta ne sopivat pUC/PRC1:n tasapäiseen StulI-kohtaan.

Näin saatu plasmidi pUC19/prc::URA3 katkaistaan AatII:lla ja AatII-fragmentilla transformoidaan vektorista erottamatta S. cerevisiae Tr 1195. Yhdestä urasiilista riippumattomasta transformantista - Tr 1206 - testataan oikea PRC1-geenin särkyminen Southern-blottauksella ja sen jälkeen kanta tehdään uudestaan urasiilista riippuvaiseksi edellä kuvatulla tavalla (ks. esimerkki 19). Näin saadulle S. cerevisiae-kannalle annetaan nimeksi Tr 1210 (pra1, prb1, prc1, ura3, leu2, cir⁰).

Esimerkki 21: S. cerevisiae Tr 1210:n kex1-muunnoksen valmistus

Karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus eliminoidaan S. cerevisiae-kannasta Tr 1210 rikkomalla KEX1-geeni kuten edellä on selostettu (ks. esimerkki 14). Näin saadulle S. cerevisiae-kannalle, joka ei osoita lainkaan ysc α -

aktiivisuutta, annetaan nimeksi Tr 1302 (pra1, prb1, prc1, ura3, leu2, cir⁰, kex1).

Esimerkki 22: Hirudiinimutanttien HV1-KR, HV1-SFRY ja HV1-WQLR valmistaminen

Jotta voitaisiin edelleen arvioida erilaisia C-pään aminohappoja omaavien heterologisten proteiinien ysc α -välitteistä C-pään hajoamista, aikaansaadaan hirudiinimutanteja, joilla on erilaisia C-pään aminohappokoostumuksia. Yleismenetelmänä käytetään paikkaan kohdennettua in vitro-mutageneesia periaatteessa siten, kuin seuraavassa julkaisussa on selostettu (Bio-Rad Muta-Gene M13 kit, Bio-Rad, Richmond, Ca. USA).

Rakennetaan seuraavat mutantit:

1. HV1-KR, vastaa (Lys⁶⁴-Arg⁶⁵)hirudiinimuunnosta 1
2. HV1-SFRY, vastaa (Ser⁶²-Phe⁶³-Arg⁶⁴-Tyr⁶⁵)HV1:tä
3. HV1-WQLR, vastaa (Trp⁶²-Glu⁶³-Leu⁶⁴-Arg⁶⁵)HV1:tä

Kaikkien näiden hirudiinimuunnosten aminohapposekvenssit vastaavat hirudiinimuunnoksen 1 sekvenssiä aminohappoon 61 tai 63 asti vastaavasti.

HV1-SFRY:n C-pää on identtinen atriaalisen natriureettisen peptidin kanssa (Vlasuk et al. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4789 - 4796) ja HV1-WQLR:ssä C-pää vastaa epidermaalista kasvutekijää (George-Nascimento, C. et al. (1988) Biochemistry 27, 797 - 802), joista kummastakin tiedetään, että proteaaseja sisältävät villityyppiset hiivakannat hajottavat niitä C-päästä.

Ensimmäisessä vaiheessa plasmidi pJDB207/GAPFL-HIR (selostettu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa no. 225633) katkaistaan SalI-HindIII:lla, jolloin saadaan 1,2 ke:n fragmentti, joka sisältää täyspitkän hirudiininilmentämiskasetin. Tämä 1,2 ke:n SalI-HindIII-fragmentti alakloonataan SalI-HindIII-katkaistuun Bluescript M13+:aan, jossa on SK-monikytkijä. Näin saadulla plasmidilla M13+/HV1 transfektoidaan E. coli CJ236, jotta saadaan sisällytetyksi urasiili edellä kuvatulla tavalla (Bio-Rad Muta-

Gene M13 kit). Transfektoituneesta *E. coli* CJ 236:sta eristetään yksisäikeinen DNA käyttämällä auttajafagia (Stratagene, supra).

Jotta saataisiin rakennetuksi HV1-KR, käytetään mutageenistä aluketta

5'-CCGGAAGAATACAAGAGGTAGGATCCT-3'.

HV1-SFRY:tä varten käytetään mutageenistä aluketta 5'-GAAGAAATCCCGGAATCTTTCAGATACTAGGATCCTGGTACG-3'.

HV1-WQLR:ää varten käytetään mutageenistä aluketta 5'-GAAGAAATCCCGGAATGGGAACTGAGATAGGATCCTGGTACG-3'.

200 pmol kutakin aluketta fosforyloidaan ensin 30 µl:n kokonaistilavuudessa, joka sisältää 3 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 µl 1 M MgCl₂, 0,75 µl 0,2 M DTT ja 0,6 µl 20 mM ATP. Lisätään 4,5 yksikköä T4 polynukleotidikinaasia ja saatua seosta inkuboidaan 45 minuuttia 37°C:ssa ja 10 minuuttia 65°C:ssa.

Tämän jälkeen fosforyloidut oligonukleotidit emäspariutetaan templaatti-DNA:han seuraavissa olosuhteissa: 0,1 pmol M13+/HV1:stä johdettua urasiilipitoista DNA:ta inkuboidaan 2 pmol:n kanssa fosforyloitua aluketta siten, että kulloinkin emäspariutuspuskurin (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) kokonaistilavuus on 10 µl. Seokset kuumennetaan vesihauteella 80°C:seen ja sen jälkeen annetaan hitaasti jäähtyä ympäristön lämpötilaan.

Tämän jälkeen muodostetaan komplementaariset säikeet seuraavissa olosuhteissa: 10 µl kutakin emäspariutusseosta inkuboidaan siten, että läsnä on 4 µl 2 mM dNTP-laatuja, 0,75 µl 20 mM ATP, 0,75 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,75 µl 0,1 M MgCl₂, 2,15 µl 0,2 M DTT, 1 yksikkö T4 DNA-polymeraasia ja 2 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Ensin reaktioseoksia inkuboidaan 5 minuuttia jään päällä, sitten 5 minuuttia 25°C:ssa ja lopuksi 90 minuuttia 37°C:ssa.

Näin saadulla kaksisäikeisellä DNA:lla transformoidaan kulloinkin E. coli JM101, kanta, joka tehokkaasti poistaa urasiilipitoisen templaatin jättäen mutagenoidun komplementaarisen säikeen replikoitumaan (Bio-Rad, supra). Valmistetaan plasmidit ja niistä tarkistetaan PstI-kohdan puuttuminen, jonka kohdan pitäisi olla läsnä vain mutatoitumattoman villityyppisen HV1-DNA:n viimeisissä 2 kodonis-
sa.

Oikea mutageneesi varmistetaan lisäksi sekvensoimalla uudet hirudiinimutantit seuraavalla alukkeella

5'-GAAGGTACCCCGAAACCGCA-3', joka vastaa hirudiinia koodittavaa sekvenssiä, joka on noin 20 ep:n päässä mutageenisten alukkeiden ylävirrassa.

Lopuksi kyseiset kolme mutatoitua SalI-HindIII-fragmenttia leikataan irti ja liitetään plasmidin pJDB207 SalI-HindIII-kohtiin.

Saadut kolme uutta plasmidia nimetään seuraavasti:

1. pJDB207/GAPFL-HV1-KR
2. pJDB207/GAPFL-HV1-SFRY
3. pJDB207/GAPFL-HV1-WQLR

Vaihtoehtoisesti, jotta voidaan transformoida cir^o-kantoja, kuten Tr 1302 (supra, ks. esimerkki 21), hirudiinimutantit alakloonataan täyspitkään 2 μ -vektoriin pDP34 (ks. esimerkki 9, supra). pDP34 katkaistaan ainosta BamHI-kohdasta ja porrastetut päät täytetään Klenow-DNA-polymeraasireaktiolla jotta saadaan tasaiset päät. Bluescript M13+:n SalI-HindIII-fragmentit, jotka koodittavat mutatoituja hirudiinisekvenssejä (supra) tehdään myös tasapäisiksi ja liitetään pDP34:n tasapäiseen (BamHI) kohtaan. Näin saadut plasmidit nimetään seuraavasti:

1. pDP34/GAPFL-HV1-KR
2. pDP34/GAPFL-HV1-SFRY
3. pDP34/GAPFL-HV1-WQLR

Esimerkki 23: *S. cerevisiae*-kantojen BYSkEX1 ja BYSkex1 transformointi pJDB207/GAPFL-HIR:llä, pJDB207/GAPFL-HV1-KR:llä, pJDB207/GAPFL-HV1-SFRY:llä ja pJDB207/GAPFL-HV1-WQLR:llä ja *S. cerevisiae*-kantojen Tr1210 ja Tr1302 transformointi pDP34/GAPFL-HV1-KR:llä, pDP34/GAPFL-HV1-SFRY:llä ja pDP34/GAPFL-HV1-WQLR:llä

S. cerevisiae BYSkEX1 (=DSM 4583) ja BYSkex1 transformoidaan kulloinkin plasmidilla pJDB207/GAPFL-HV1-KR, pJDB207/GAPFL-HV1-SFRY, pJDB207/GAPFL-HV1-WQLR tai pJDB207/GAPFL-HIR käyttämällä standardimenetelmää ja leusiinivalintaa (ks. esimerkki). Samalla tavoin transformoidaan *S. cerevisiae*-kannat Tr1210 ja Tr1302 kulloinkin plasmidilla pDP34/GAPFL-HV1-KR, pDP34/GAPFL-HV1-SFRY tai pDP34/GAPFL-HV1-WQLR.

Näin saadut kannat nimetään seuraavasti:

S. cerevisiae BYSkEX1/pJDB207/GAPFL-HIR
S. cerevisiae BYSkEX1/pJDB207/GAPFL-HV1-KR
S. cerevisiae BYSkEX1/pJDB207/GAPFL-HV1-SFRY
S. cerevisiae BYSkEX1/pJDB207/GAPFL-HV1-WQLR
S. cerevisiae BYSkex1/pJDB207/GAPFL-HIR
S. cerevisiae BYSkex1/pJDB207/GAPFL-HV1-KR
S. cerevisiae BYSkex1/pJDB207/GAPFL-HV1-SFRY
S. cerevisiae BYSkex1/pJDB207/GAPFL-HV1-WQLR

S. cerevisiae Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-KR
S. cerevisiae Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-SFRY
S. cerevisiae Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-WQLR
S. cerevisiae Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-KR
S. cerevisiae Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-SFRY
S. cerevisiae Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-WQLR

S. cerevisiae-kantojen fermentoinnit suoritetaan minimiravintoalustassa (esi- ja pääviljelmä) edellä kuvatulla tavalla (ks. esimerkki 17).

Esimerkki 24: Saccharomyces cerevisiae-transformanttien BYSkex1 ja BYSKEx1 fermentointiviljelmien sisältämän hirudiinimuunnoksen HV1 ja sen mutanttien analyysit käytämällä käänteisfaasi-HPLC-menetelmää

72 tunnin fermentoinnin jälkeen valmistetaan neste-
mäisistä hiivaviljelmistä näytteet sentrifugoimalla niin,
että saadaan kirkas liuos, joka laimennetaan 1:10 (tila-
vuus/tilavuus) etikkahapolla (1 M) ja sen jälkeen suorite-
taan HPLC-analyysi seuraavissa olosuhteissa.

HIBAR-pylväs (MERCK) (4 x 125 mm) täytetään käänteis-
faasiin tarkoitettulla, pallomaisella silikamateriaalilla
(MACHEREY-NAGEL), joka on pallomainen stationäärifaasi,
jonka hiukkashalkaisija on 5 µm ja huokoisuus 100 Å.
Pylvään päät on varustettu ruostumatonta terästä olevilla
friteilla. Liikkuva faasi A on vettä (Nanopure^R, BARN-
STEAD), joka sisältää 0,1 % (tilavuus/tilavuus) trifluori-
etikkahappoa. Liikkuva faasi B sisältää 20 % liikku-
vaa faasia A ja 80 % (tilavuus/tilavuus) asetonitriiliä
(HPLC-laatu, FLUKA), ja 0,075 % (tilavuus/tilavuus) tri-
fluorietikkahappoa.

Kromatografiset erotukset suoritetaan virtausnopeu-
della 1,5 ml/min seuraavalla gradientilla ja eluentteja
seurataan mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 216
nm.

t(min)	% A	% B
0	90	10
1	79	21
9	79	21
17	64	36
20	0	100
22	0	100
24	90	10
32/0	90	10

Systeemin kalibrointia varten tehdään standardiliuos
liuottamalla 1 mg puhdasta desulfatohirudiinia 1 ml:aan
vettä. 50 µl tätä standardiliuosta injektoidaan pylvää-
seen ja kromatografoidaan kuten edellä systeemin kalibroi-

miseksi.

Kuvassa 8 on esitetty tulokset ja niistä ilmenee, että S. cerevisiae BYSkex1 tuottaa täyspitkiä hirudiineja (joko villityyppistä hirudiini HV1:tä tai mutantteja HV1-KR, HV1-SFRY tai HV1-WQLR), joilla on eri retentioaika kuin S. cerevisiae BYSKEX1:n tuottamalla hirudiinin hajoamistuotteilla. BYSKEX1-kannan tuottama villityyppinen hirudiini HV1 osoittaa täyspitkän HV1:n (retentioaika 17,05 min) tyypillisen seoksen ominaisuuksia, jossa on kahta hajoamistuotetta: "HIR-64" (retentioaika 17,8 min) ja "HIR-63" (retentioaika 15,33 min). BYSkex1 tuottaa vain "HIR-65"-tuotetta (retentioaika 17,05 min).

Mutantti HV1-KR BYSKEX1 tuottaa vain sellaista hajoamistuotetta, josta puuttuu kaksi C-pään aminohappoa (= "HIR-63", retentioaika 15,9 min), kun taas BYSkex1 tuottaa täyspitkää HV1-KR:ää (retentioaika 14,4 min).

Mutantti HV1-WQLR BYSKEX1 osoittaa hajoamistuotetta, jonka retentioaika on 18,6 minuuttia, mutta BYSkex1 tuottaa pääasiassa täyspitkää HV1-WQLR:ää (retentioaika 17,3 minuuttia) ja vain hyvin pieniä määriä hajoamistuotetta. HV1-SFRY:tä löytyy vain hyvin pieniä määriä (retentioaika 17,1 min) BYSKEX1:ssä ja BYSkex1 osoittaa vain ehjää HV1-SFRY:tä (retentioaika 17,1 minuuttia). Suuri piikki (retentioaika 15,7 minuuttia) ei ole sukua HV1-SFRY:lle.

.. Vastaavia tuloksia saadaan S. cerevisiae KEX1-kannoilla Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-KR, Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-SFRY ja Tr1210/pDP34/GAPFL-HV1-WQLR verrattuna vastaaviin kex1-kantoihin Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-KR, Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-SFRY ja Tr1302/pDP34/GAPFL-HV1-WQLR.

Talletetut mikro-organismit

Seuraavat mikro-organismikannat talletettiin Deutsche Sammlung von Mikroorganismen-kokoelmiin (DSM), Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig (seuraavina talletuspäivinä ja talletusnumeroilla):

Saccharomyces cerevisiae H449: 18. helmikuuta, 1988, DSM
4413;

Escherichia coli JM109/pDP38: 19. helmikuuta, 1988, DSM
4414;

Escherichia coli JM109/pDP34: 14. maaliskuuta, 1988,
DSM 4473.

Saccharomyces cerevisiae BYS232-31-42: 6. toukokuuta,
1988, DSM 4583.

Patenttivaatimukset:

1. *Saccharomyces cerevisiae* -kanta, **tunnettu** siitä, että siltä puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus ja lisäksi jokin seuraavista peptidaasiaktiivisuuksista: yscA, yscB, yscY ja yscS, ja se on transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaalipeptidiä ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaalit ja jossa heterologisen proteiinin C-pään kaksi aminohappoa valitaan seuraavien joukosta: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn ja Ser.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen *S. cerevisiae* -kanta, **tunnettu** siitä, että se on vapaa endogeenisestä 2 μ -DNA:sta ja transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää täydellisen 2 μ -DNA:n, mukaanlukien REP1-geenin, REP2-geenin ja FLP-geenin ehjinä sekä ORI-kohdan, STB-kohdan, IR1-kohdan ja IR2-kohdan ehjinä.
3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen transformoituneen *S. cerevisiae* -kannan aikaansaamiseksi, **tunnettu** siitä, että transformoidaan yhdistelmävektorilla, joka sisältää hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaalipeptidiä ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa heterologista proteiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaalit ja jossa heterologisen proteiinin C-pään kaksi aminohappoa valitaan seuraavien joukosta: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn ja Ser patenttivaatimuksen 1 mukainen hiivakanta.
4. Menetelmä *S. cerevisiae*lle heterologisen proteiinin

tuottamiseksi, jossa heterologisen proteiinin C-pään kaksi aminohappoa valitaan seuraavien joukosta: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn ja Ser, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan hiivakantaa, josta puuttuu karboksipeptidaasi ysc α -aktiivisuus ja lisäksi jokin seuraavista peptidaasiaktiivisuuksista: yscA, yscB, yscY ja yscS ja joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää hiivan promoottorin toimivasti liittyneenä ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa signaaliptidiä ja joka on oikeassa lukuvaiheistuksessa liittyneenä toiseen DNA-sekvenssiin, joka koodittaa mainittua heterologista proteiinia, ja DNA-sekvenssiin, joka sisältää hiivan transkriptionlopetussignaaleja, ja eristetään mainittu heterologinen proteiini.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että heterologinen proteiini on altis karboksipeptidaasi ysc α :n aiheuttamalle luennanjälkeiselle C-pään hajoamiselle.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä *S. cerevisiae*lle heterologisen proteiinin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että mainittu heterologinen proteiini on desulfatohirudiini.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan jotakin seuraavista desulfatohirudiiniyhdisteistä: desulfatohirudiinimuunnokset HV1, HV1 (muunnetut a, b), HV2, HV2 (muunnetut a, b, c), PA, PA-muunnokset ja des(val₂)-desulfatohirudiini.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että valmistetaan desulfatohirudiinivarianttia HV1.

Patentkrav:

1. *Saccharomyces cerevisiae*-stam, **kännetecknad** därav, att den saknar karboxipeptidas ysc α -aktivitet och ytterligare någon av de följande peptidasaktiviteterna: yscA, yscB, yscY och yscS, och den är transformerad med en hybridvektor, som innehåller en jästpromotor funktionellt anknuten till en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och som är i en riktig läsram anknuten till en annan DNA-sekvens, som kodar för ett heterologt protein, och till en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av jäst och i vilken de två aminosyrorna i C-änden av det heterologa proteinet väljes bland de följande: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn och Ser.
2. *S. cerevisiae*-stam enligt patentkravet 1, **kännetecknad** därav, att den är fri från endogent 2 μ -DNA och transformerad med en hybridvektor, som innehåller ett fullständigt 2 μ -DNA, medräknad REP1-genen, REP2-genen och FLP-genen i hel form samt ORI-stället, STB-stället, IR1-stället och IR2-stället i hel form.
3. Förfarande för framställning av en *S. cerevisiae*-stam enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att man transformerar en jäststam enligt patentkravet 1 med en hybridvektor, som innehåller en jästpromotor funktionellt anknuten till en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och som är i en riktig läsram anknuten till en annan DNA-sekvens, som kodar för ett heterologt protein, och till en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av jäst och i vilken de två aminosyrorna i C-änden av det heterologa proteinet väljes bland de följande: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn och Ser.
4. Förfarande för att producera ett protein som är heterologt med avseende på *S. cerevisiae*, i vilket de två

amnosyrorna i C-änden av det heterologa proteinet väljes bland de följande: Tyr, Ala, Leu, Gln, Glu, Asp, Asn och Ser, **kännetecknat** därav, att man odlar en jäststam, som saknar karboxipeptidas ysc α -aktiviteten, och ytterligare någon av de följande peptidasaktiviteterna: yscA, yscB, yscY och yscS, och som är transformerad med en hybridvektor, som innehåller en jästpromotor funktionellt anknuten till en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och som är i en riktig läsram anknuten till en annan DNA-sekvens, som kodar för ett heterologt protein, och till en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av jäst, och isolerar det nämnda heterologa proteinet.

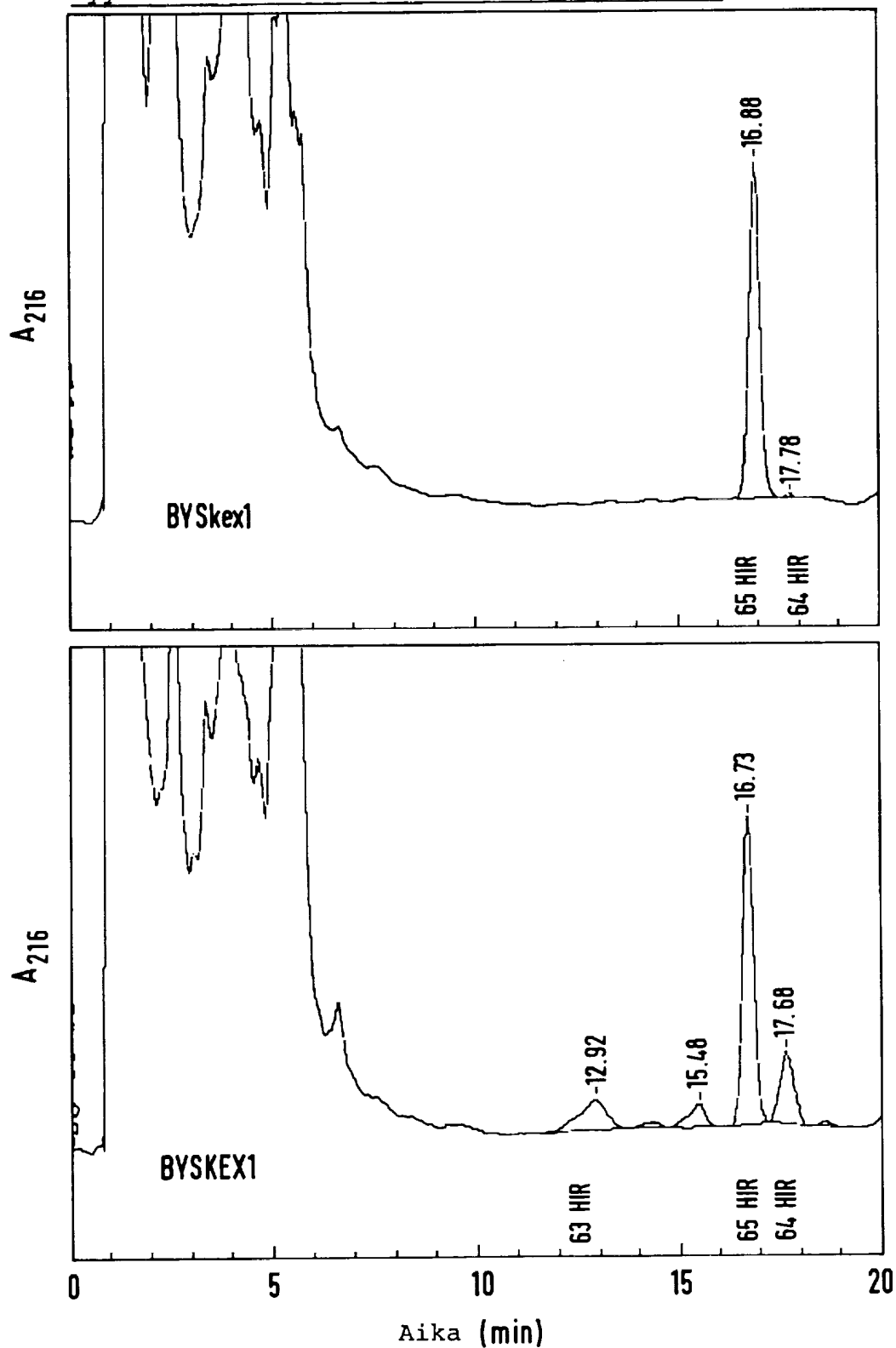
5. Förfarande enligt patentkravet 4, **kännetecknat** därav, att det heterologa proteinet är utsatt till posttranslational spjälkning av C-terminalen förorsakad av karboxipeptidas ysc α .

6. Förfarande enligt patentkravet 5 för att producera ett protein heterologt med avseende på *S. cerevisiae*, **kännetecknat** därav, att det nämnda heterologa proteinet är desulfatohirudin.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, **kännetecknat** därav, att man framställer någon av de följande desulfatohirudin-föreningarna: desulfatohirudinvarianterna HV1, HV1 (varierade a, b), HV2, HV2 (varierade a, b, c), PA, PA-varianterna och des(val₂)-desulfatohirudin.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** därav, att man framställer desulfatohirudinvarianten HV1.

Fig. 1 : BYSkex1/pJDB207/PHOS-HIR:n ja BYSkex1/pJDB207/PHO5-HIR:n viljelmistä talteenotetun hirudiinin analyttinen käänteisfaasinestekromatografia



2/11

Fig. 2: Signaalisekvenssi (PHO5)-hirudiini (HVI)-
geenin in vitro-synteesi edullisin hiiva-
kodonein

EcoRI PHO5 SS

-----1-----3-----

5' AATTCAAATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTTAGCCGCTTCTTT

3' GTTTTACAAATTTAGACAACAAATAAGTTAAAATCGGCGAAGAAA

-----2-----4-----

-----→YHIR

--5-----7-----

GGCCAATGCAGTTGTTTACACCGACTGTACCGAATCTGGTCAAACTTGT

CCGGTTACGTCAACAAATGTGGCTGACATGGCTTAGACCAGTTTTGAACA

-----6-----8-----

-9-----11-----13-

GTTTGTGTGAAGGTTCTAACGTTTGTGGTCAAGGTAACAAGTGTATCTTG

CAAACACACTTCCAAGATTGCAAACACAGTTCCATTGTTACATAGAAC

-----10-----12-----

-----15-----17

GGTTCTGACGGTGAAAAGAACCAATGTGTTACCGGTGAAGGTACCCCAA

CCAAGACTGCCACTTTTCTTGTTACACAATGGCCACTTCCATGGGGTTT

-----14-----16-----

-----19-----

GCCACAATCTCACAACGACGGTGAAGCTTTCGAAGAAATCCCAGAAGAATACT

CGGTGTTAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGTCTTCTTATGA

-----18-----20-----

-21-----

TGCAATAG 3'

ACGTTATCCTAG 5'

BamHI

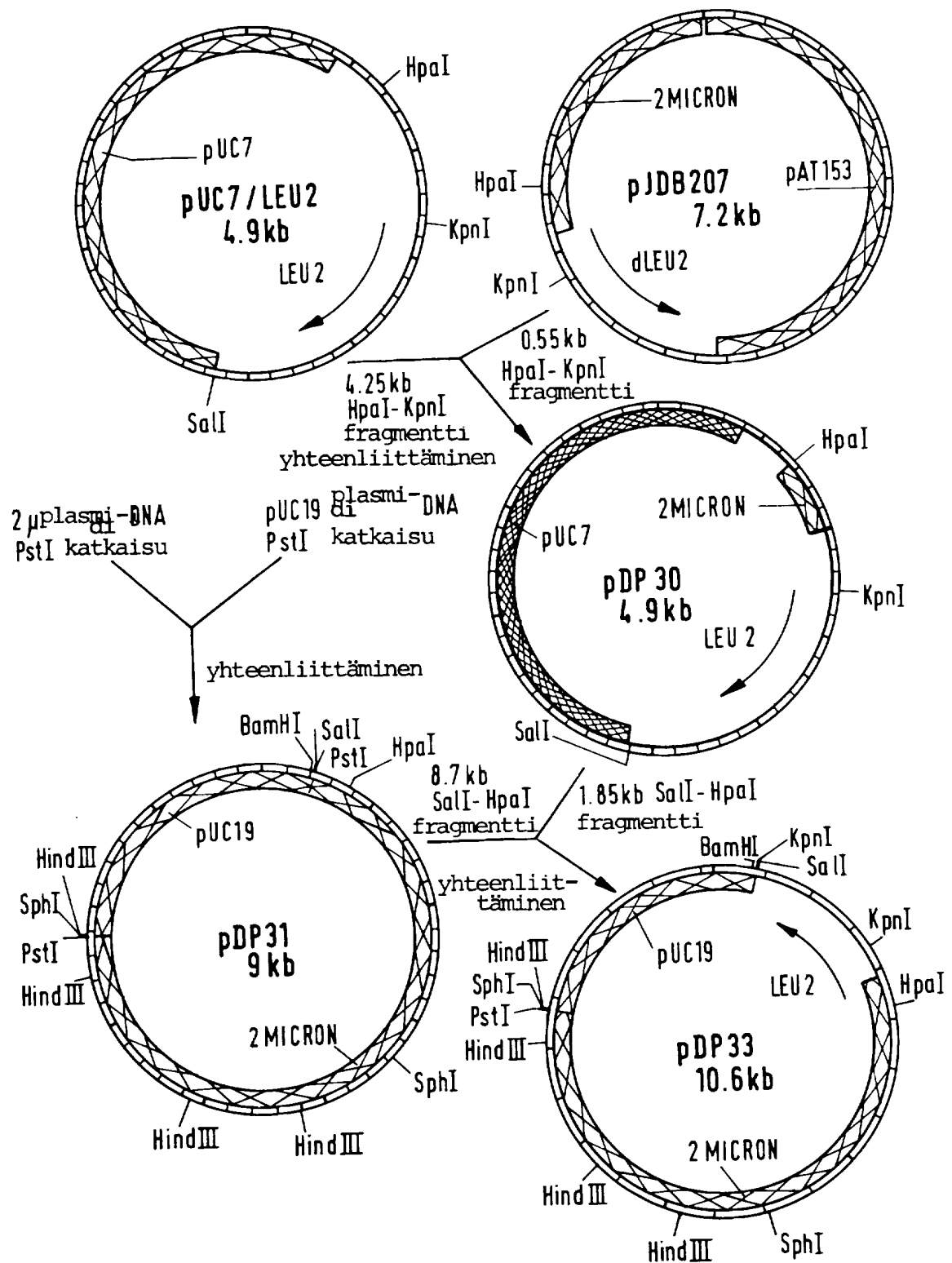
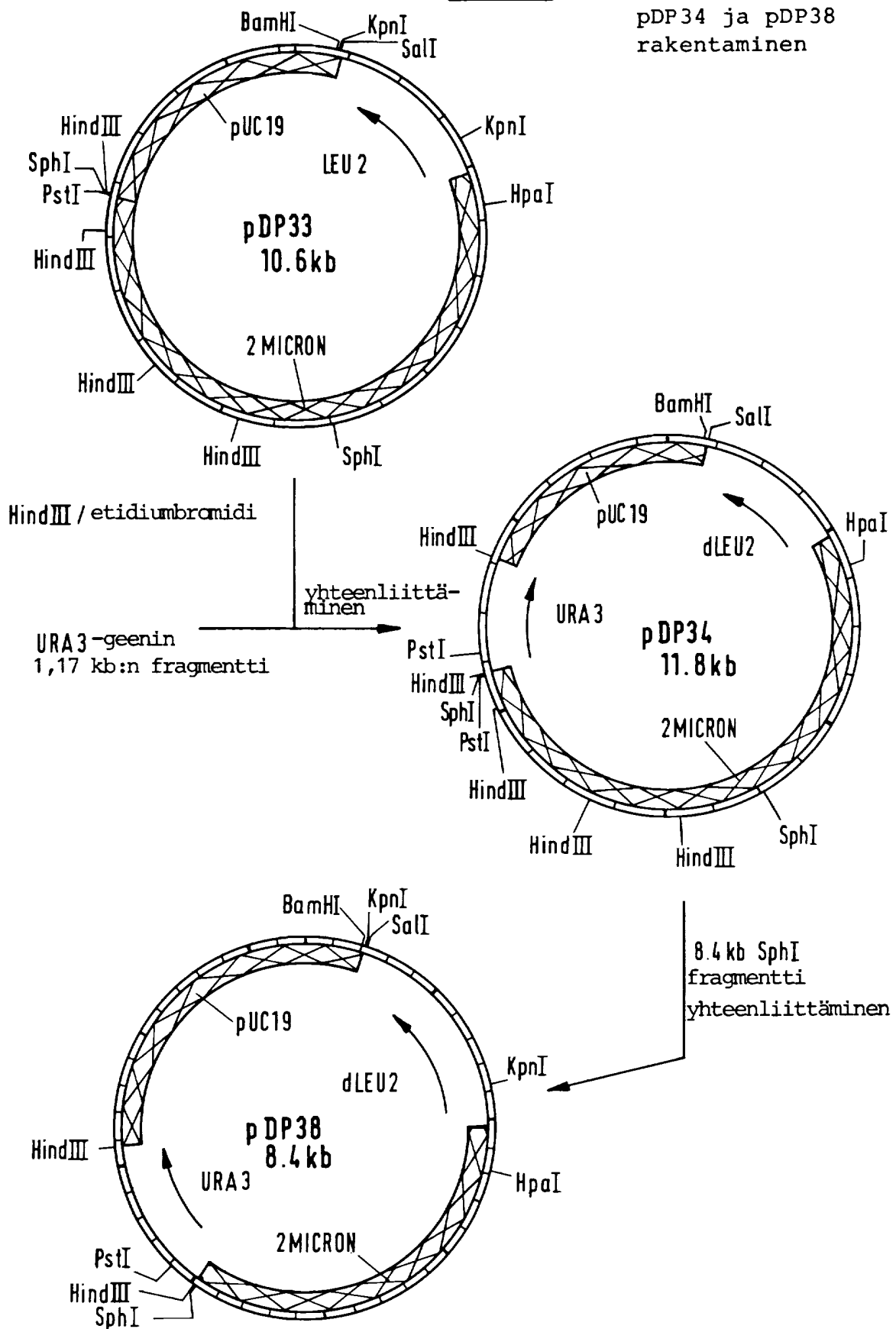
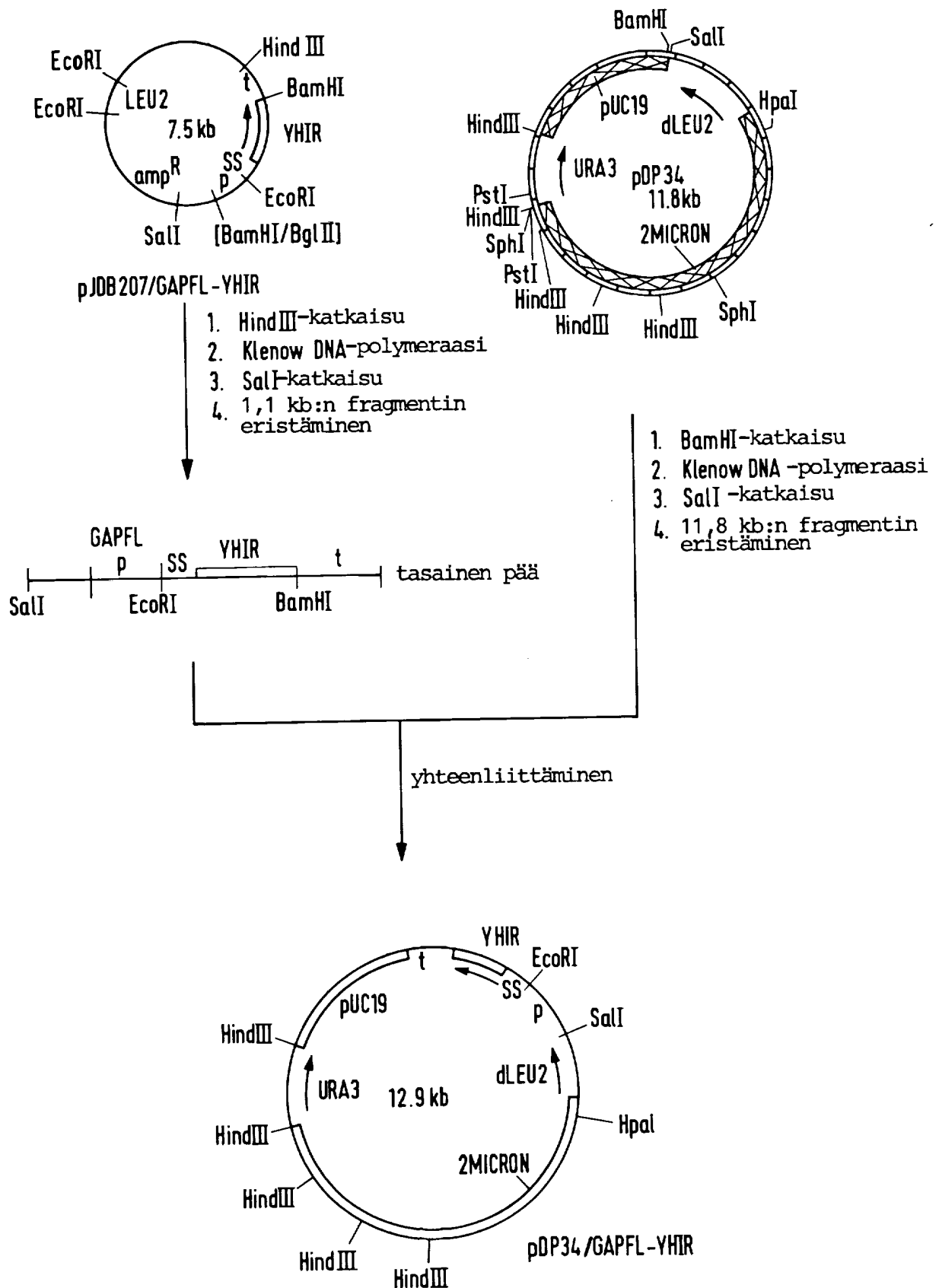
Fig. 3: Plasmidin pDP33 rakentaminen

Fig. 4: Plasmidien
pDP34 ja pDP38
rakentaminen



5/11

Fig. 5: Plasmidin pDP34/GAPFL-YHIR rakentaminen



6/11

Fig. 6: Plasmidin pDP34/PHO5(-173)-YHIR rakentaminen

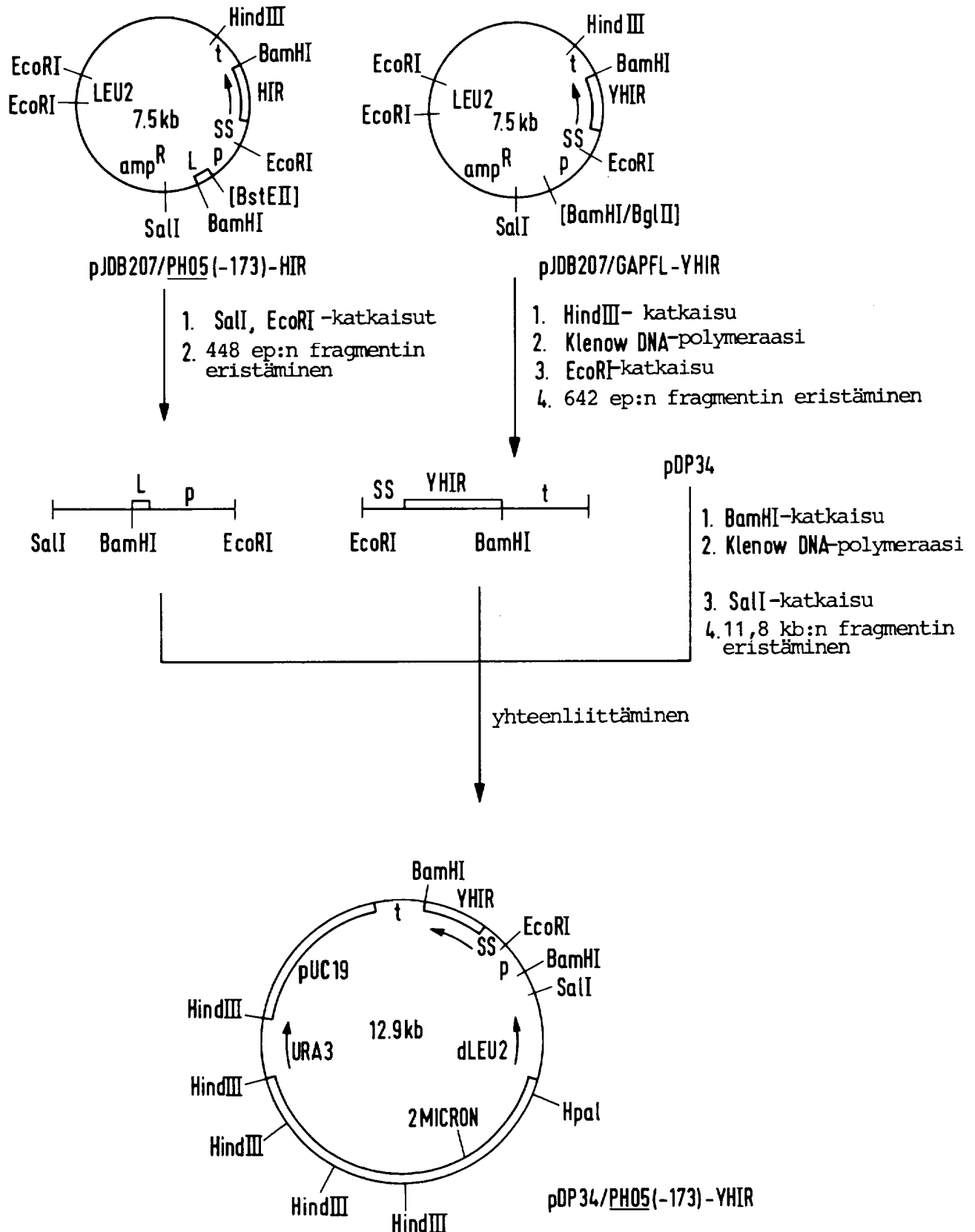


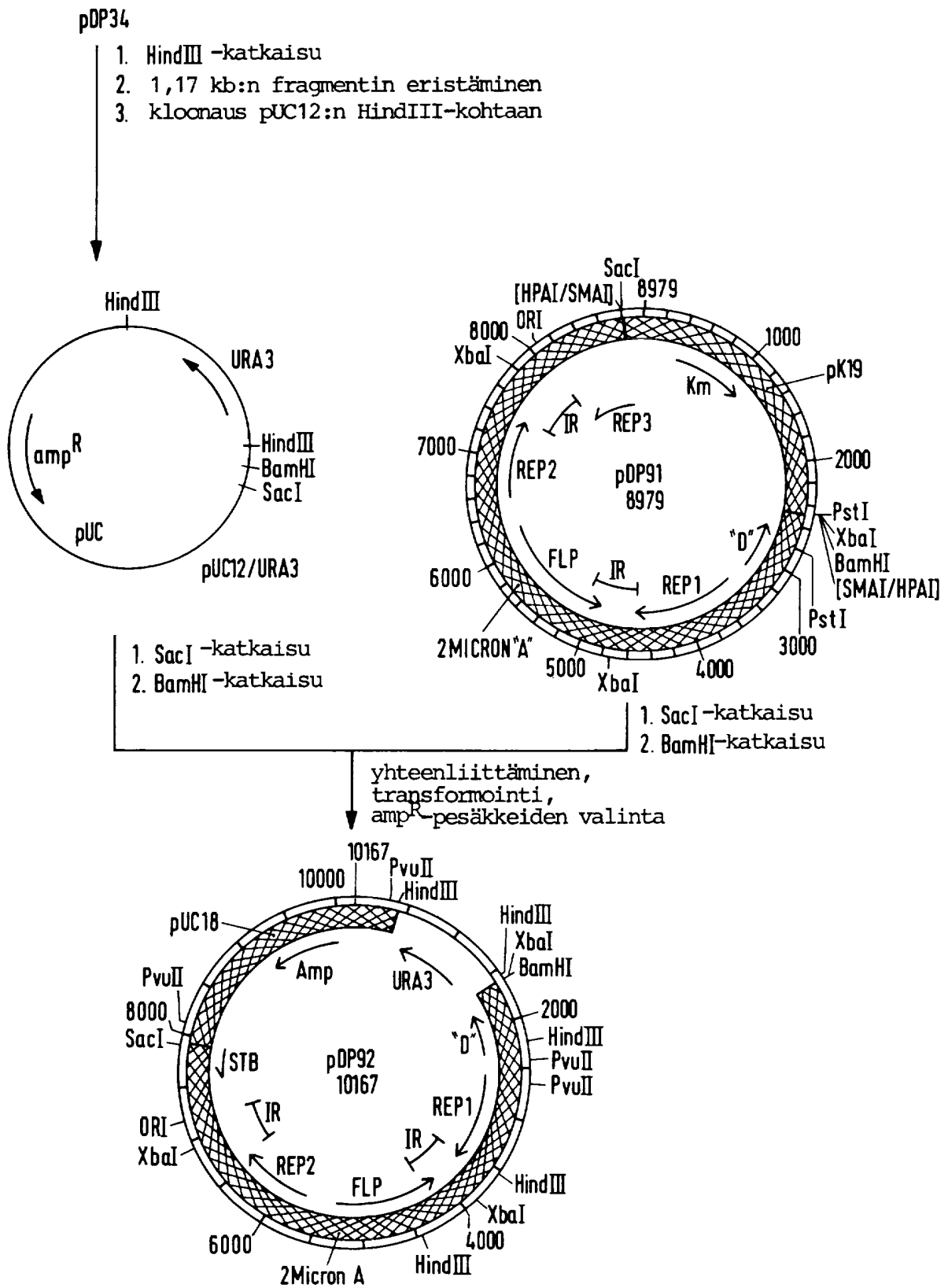
Fig. 1: Plasmidin pDP92 rakentaminen

Fig. 8: *S. cerevisiae* BYSKEX1:n ja BYSkex1:n viljelmistä saatujen villityyppisten hirudiinin ja hirudiinimutanttien HV1-KR, HV1-WQLR ja HV1.SFRY analyytin käänteisfaasinestekromatografia

Villityyppinen hirudiini HV1

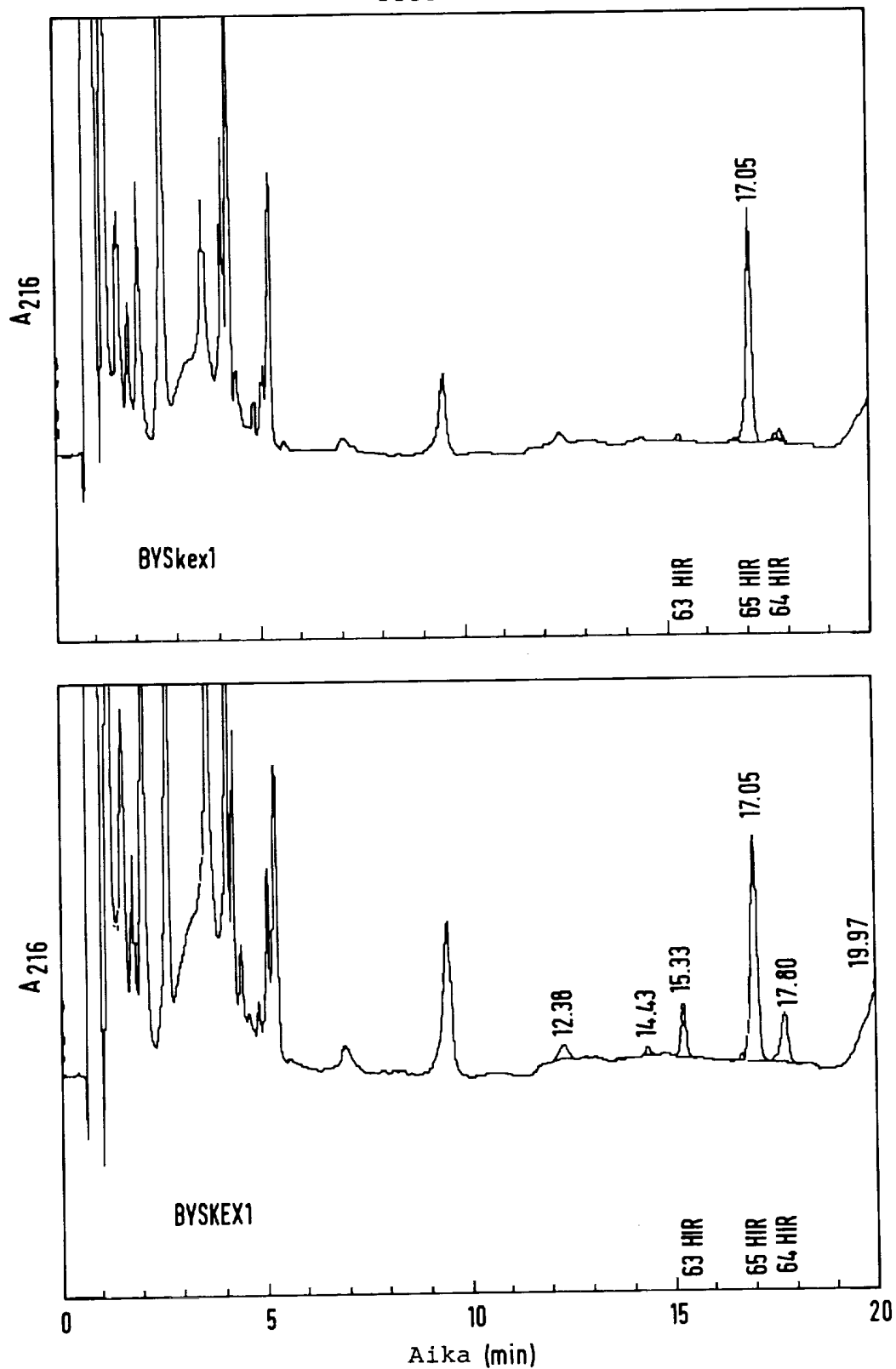


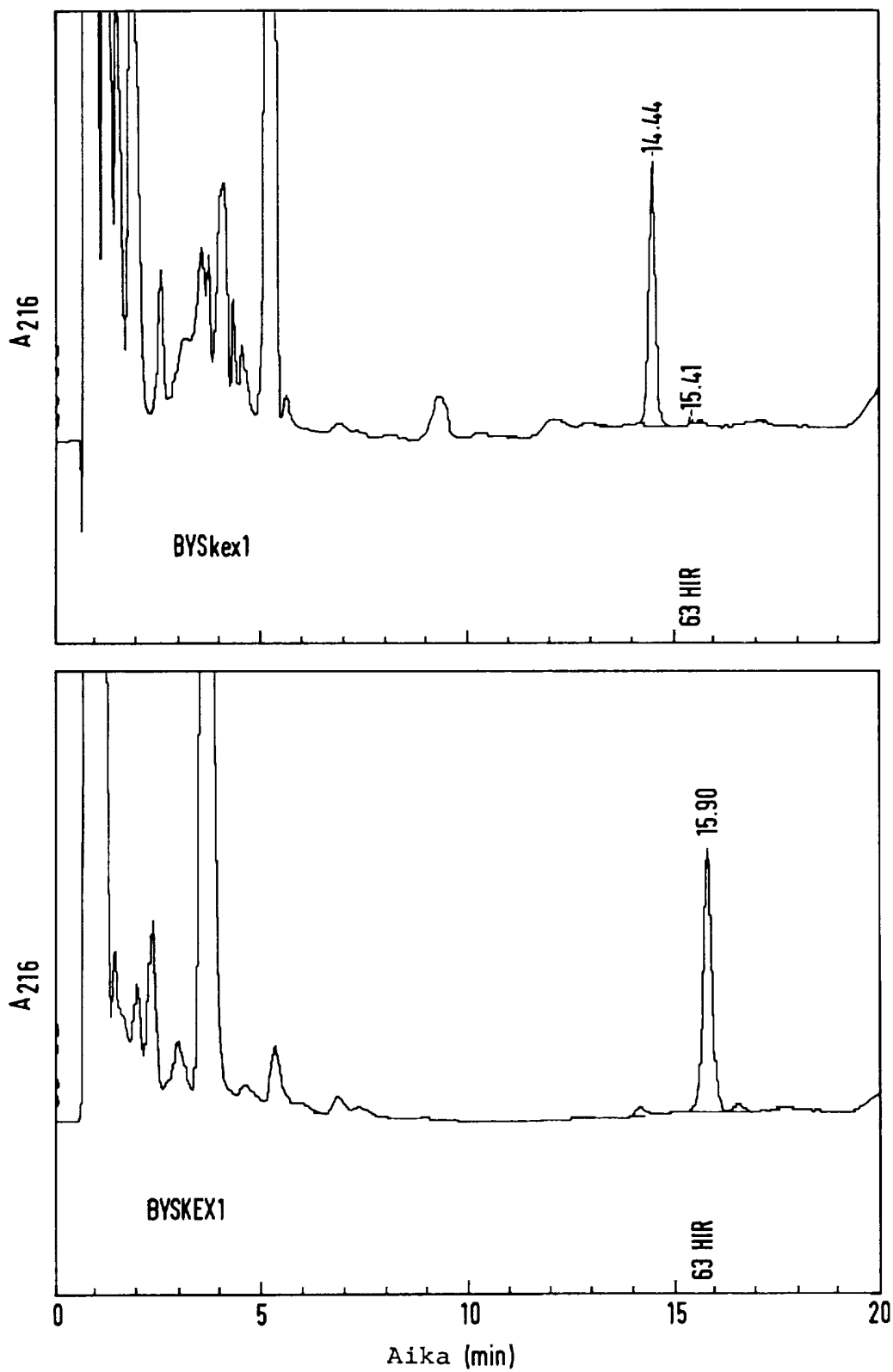
Fig. 8 (jatkoa) Hirudiinimutantti HV1-KR

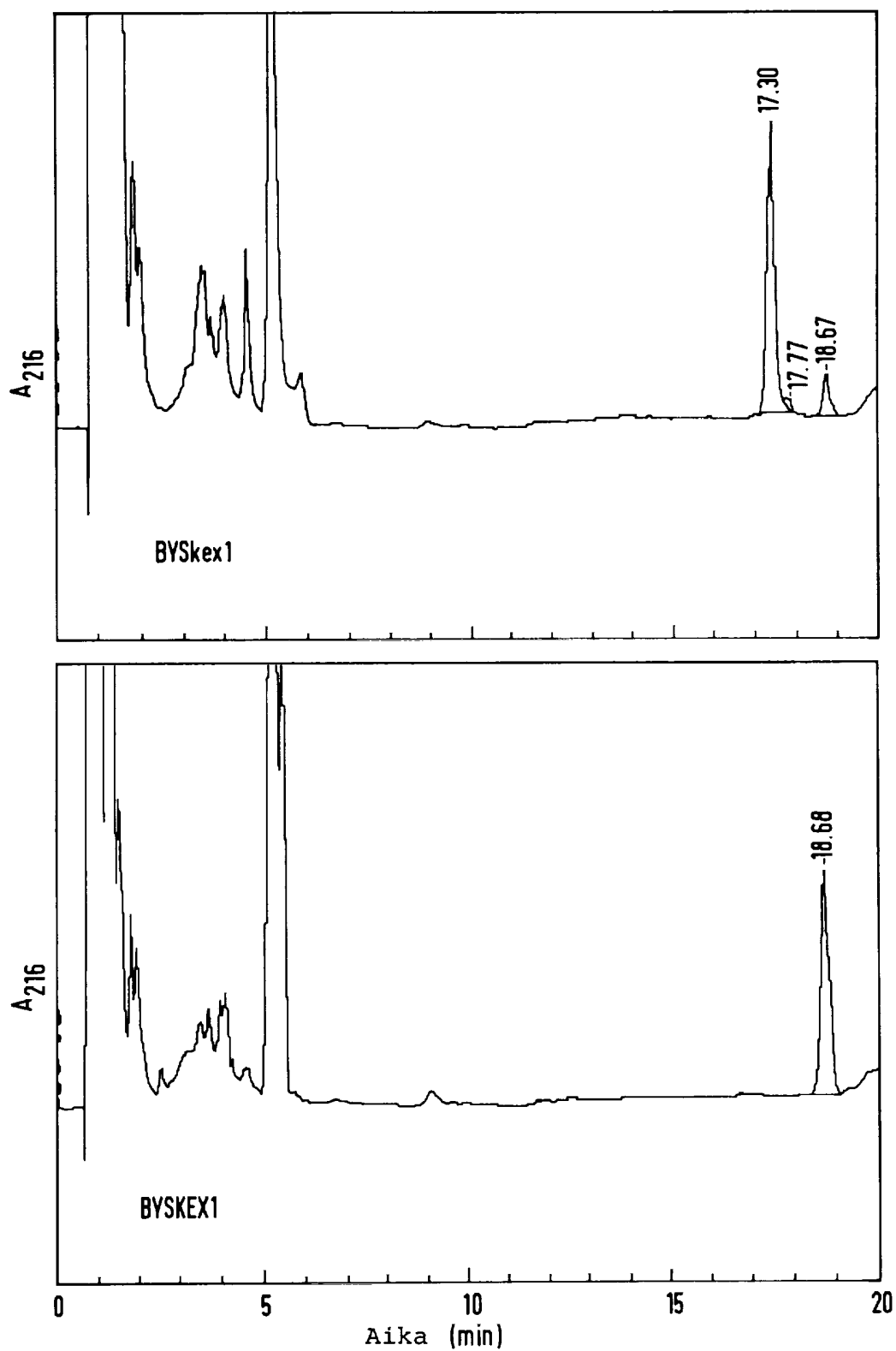
Fig. 8 (jatkoa) Hirudiinimutantti HV1-SFRY

Fig. 8 (jatkoa) Hirudiinimutantti HV1-WQLR

