



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

87799

C (45) Patentti myönnetty
Patent beviljat 25 02 1983

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/12, C 12P 21/02, C 07K 7/40

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	841524
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.04.84
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	16.04.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	26.10.84
(44) Nähtävöksiannon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.11.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
25.04.83 US 487950 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, Cal. 94608, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Barr, Philip J., 825 Lincoln Way, San Francisco, Cal. 94122, USA, (US)
2. Merryweather, James P., 1427 Walnut Street, Berkeley, Cal. 94709, USA, (US)
3. Mullenbach, Guy, 1324 Grove Street, Berkeley, Cal. 94709, USA, (US)
4. Urdea, Mickey S., 209 Irving Street, San Francisco, Cal. 94143, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Keijo Heinonen Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä ihmisen insuliinin kaltaisen kasvutekijän (IGF) tuottamiseksi
Förfarande för framställning av humaninsulinlik tillväxtfaktor (IGF)

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 2216-2220 Li et al.,
FEBS Letters 89 (1978) 283-286, Rinderknecht ja/och Humbel,
Fed. Proc. USA 42 (1983) 434, Mullenbach et al., Chem. Abstr. 102 (1985) 40931k, Hinnen et al.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmiä ja koostumuksia humaaninsuliinin kaltaisen kasvutekijän tehokkaaksi valmistamiseksi. Synteettiset IGF I ja IGF II geenit liitetään leader- ja prosessointisignaaleihin, mikä saa alkaen geenin tuotteen ekspression ja erittymisen hiivassa. Tuotteen lisääntyneitä saantoja voidaan sitten ottaa talteen elatusaineesta.

Hiivakannat *S. cerevisiae* AB103 (pYIGF-I-10/1) sekä AB103 (pYIGF-II-10/1) talletettiin American Type Culture Collectioniin huhtikuun 23 päivänä, 1983, ja ne saivat vastaavasti tulonumerot 20673 sekä 20674.

Uppfinningen avser förfaranden och sammansättningar för effektiv framställning av en humaninsulinlik tillväxtfaktor. Syntetiska IGF I- och IGF II-gener kopplas till ledar- och processsignaler, vilket åstadkommer expression och utsöndring av genens produkt i jäst. Förbättrade utbyten av produkten kan sedan tillvaratas från näringsmediet.

Jäststammarna *S. cerevisiae* AB103 (pYIGF-I-10/1) samt AB103 (pYIGF-II-10/1) deponerades hos American Type Culture Collection den 23 april 1983, och de erhöill respektive ankomst-nummer 20673 och 20674.

MENETELMÄ IHMISEN INSULIININ KALTAISEN KASVUTEKIJÄN (IGF)
TUOTTAMISEKSI

Keksinnön tausta

Pidetään mahdollisena, että somaattinen kasvu, joka seuraa kasvuhormonin antamista in vivo, välittyy mitogeenisten, insuliininkaltaisten peptidien ryhmän välityksellä, joiden seerumikonsentraatiot riippuvat kasvuhormonista. Näihin polypeptideihin sisältyvät somatomeidiini-C, somatomeidiini-A sekä insuliinin kaltaiset kasvutekijät I ja II (IGF I sekä IGF II). IGF I ja II voidaan eristää ihmisen seerumista, ja niiden aminohapposekvenssit ovat suurin piirtein homologiset insuliinin aminohapposekvenssien kanssa. Nykyisin voidaan saada ainoastaan rajoitettuja määriä näitä kasvutekijöitä ihmisen seerumista eristämällä. Täten olisi sekä kliinisesti että tieteellisesti merkittävää pystyä valmistamaan suhteellisen suuria määriä kasvutekijöitä yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla.

Ihmisen insuliinin kaltaisten kasvutekijöiden I ja II (IGF I ja II) aminohapposekvenssit määrittivät ensiksi Rinderknecht ja Humbel (1978) J. Biol. Chem. 253:2769-2776 sekä FEBS Letters 89:283-286. IGF-reseptoreiden luonnetta ovat kuvanneet Massague ja Czech (1982), julkaisussa J. Biol. Chem. 257:5038-5045. Kurjan ja Herskowitz, Cell (1982) 30:933-934, kuvaavat oletettua α -tekijän prekursoria, joka sisältää neljä peräkkäistä kypsän α -tekijän kopiota, ja he kuvaavat sekvenssiä ja oletettua valmistusmekanismia. Kurjan ja Herskowitz kuvaavat tiivistelmässä, Abstract of Papers, joka on esitetty 1981 Cold Spring Harbor Meeting on The Molecular Biology of Yeast, sivulla 242, otsikolla "A Putative Alpha-Factor Precursor Containing Four Tandem Repeats of Mature Alpha-Factor", sekvenssiä, joka koodittaa α -tekijää, sekä kahden tällaisen sekvenssin välialueita.

Keksinnön yhteenvedo

Keksintö koskee menetelmiä ja koostumuksia kypsän, ihmisen insuliinin kaltaisen kasvutekijän (IGF) tehokkaaksi valmistamiseksi. Erityisesti hiivaisännässä tapahtuva "pre"-IGF I:n ja "pre"-IGF II:n ekspressio helpottaa polypeptidin erittymistä elatusaineeseen. DNA-rakenteet saadaan aikaan liittämällä yhteen eri lähteistä peräisin olevia DNA-sekvenssejä, luonnon sekä synteettisistä lähteistä saadut DNA-sekvenssit mukaanluettuina. Syntyvät DNA-rakenteet replikoituvat hiivassa jatkuvasti sekä antavat käyttöön valmistettujen "pre"-polypeptidien, jotka saatetaan eristää suurena saantona elatusaineesta, tehokkaan, korkeatasoisen tuotannon. Keksinnölle on tunnusomaista se, mitä on esitetty patenttivaatimusten tunnusmerkkiosissa.

Keksintö koskee DNA-sekvenssejä, jotka voivat ekspressoida ihmisen insuliinin kaltaisia kasvutekijöitä (IGF I ja II). Näitä DNA-sekvenssejä voidaan sisällyttää vektoreihin, ja syntyviä plasmideja käytetään herkkiä isäntiä transformoitaessa. Sellaisilla yhdistelmäplasmideilla suoritettuna, herkän isännän transformoinnin tuloksena on insuliinin kaltaisen kasvutekijägeenin ekspressio sekä polypeptidituotteen valmistuminen.

Erityisesti keksintö koskee uusia DNA-rakenteita prekursoripolypeptidien ("pre"-IGF I sekä "pre"-IGF II) valmistamiseksi hiivaisännässä, joka pystyy valmistamaan mainittuja prekursoripolypeptidejä sekä erittämään kypsän polypeptidituotteen elatusaineeseen. DNA-rakenteisiin sisältyy replikointijärjestelmä, joka voi säilyä pysyvästi hiivaisännässä, tehokas promoottori, rakennegeeni, johon sisältyvät johdanto- ja prosessointisignaalit lukuvaiheistuksessa mainitun rakennegeenin kanssa, sekä transskription lopetussignaali rakennegeenin alapuolella.

Valinnaaisesti voidaan antaa käyttöön muita sekvenssejä transkription säätelyä, geenin monistumista, transskription eksogeenistä säätelyä yms. varten. "Pre"-IGF:llä sekä "pre"-IGF:llä tarkoitetaan, että kypsää polypeptidiä koodaava DNA-sekvenssi on liitetty lukuvaiheistukseen ja lukuraamissa johdantojakson kanssa, joka sisältää hiivaisännän tehokkaasti tunnistamat prosessointisignaalit. Täten "pre" merkitsee hiivaisäntään kytkeytyvien erityis- ja prosessointisignaalien sisältymistä eikä mitään kyseistä polypeptidiä koodittavaan geeniin liittyneitä prosessointisignaaleja.

DNA-konstruktiota valmistettaessa on välttämätöntä liittää yhteen yksityiset sekvenssit, jotka sulkevat piiriinsä replikaatiojärjestelmän, promoottorin, rakennegeenin, johon sisältyvät johdanto- ja prosessointisignaalit, sekä lopetussignaalin, edeltä määrityssä järjestyksessä, jotta varmistetaan siitä, että ne voivat toimia sopivasti syntyvässä plasmidissa. Kuten tässä yhteydessä myöhemmin kuvataan, saatetaan käyttää liittämölekyylejä varmistamaan sekvenssien sopiva suuntaus sekä järjestys.

IGF I- ja IGF II-geenit, joita käytetään, saattavat olla kromosomaalista DNA:a, cDNA:a, synteettistä DNA:a tai niiden yhdistelmä. Johdanto- ja prosessointisignaalit ovat normaalisti peräisin luonnostaan hiivassa esiintyvistä DNA-sekvensseistä, jotka ylläpitävät polypeptidin erittymistä. Sellaisiin polypeptideihin, joita hiiva luonnostaan erittää, sisältyvät α -tekijä, a-tekijä, hapan fosfataasi ym.. Jäljelle jäävät sekvenssit, jotka käsittävät rakenteen johon sisältyvät replikaatiojärjestelmä, promoottori sekä lopetussignaali, ovat hyvin tunnettuja sekä kirjallisuudessa kuvattuja.

Koska erilaiset DNA-sekvenssit, jotka liitetään yhteen kyseessä olevan keksinnön mukaisen DNA-rakenteen muodostamiseksi, ovat peräisin erilaisista lähteistä, on tarkoituksen-

mukaista liittää sekvenssit yhdistäjä- tai liittäjämolekyylien avulla. Erityisesti voidaan käyttää liittäjiä yhdistämään johdanto- ja prosessointisignaalisekvenssiä koodaavan säikeen 3'-pää IGF:a koodaavan säikeen 5'-päähen yhdessä niiden vastaavien komplementaaristen DNA-säikeiden kanssa. Johdanto- ja prosessointisignaalisekvenssi saatetaan pilkkoa restriktioentsyymien avulla sisäisesti läheltä sen 3'-päätettä niin että siitä puuttuu koodittavan alueen emäsparien ennalta määrätty lukumäärä. Liittäjä voidaan sitten konstruoida siten, että kun johdanto- ja prosessointisekvenssi yhdistetään IGF:a koodittavaan säikeeseen, puuttuvat emäsparit annetaan käyttöön ja IGF:a koodittava säie on sopivassa lukuvaiheistuksessa johdantojakson suhteen. Synteettinen IGF:a koodittava alue ja/tai liittäjä sen 3'-päässä antaa käyttöön translationaaliset pysäytyskodonit sen seikan varmistamiseksi, että polypeptidin C-pääte on sama kuin luonnossa esiintyvä C-pääte.

Liittäjillä tulee olemaan 5-40 emästä, useammin noin 8-35 emästä, koodittavassa sekvenssissä, ja niillä voi olla joko liimautuvat tai tasapäät, liimautuvien päiden ollessa edullisia. On toivottavaa, että adaptorin päätteellä tulee olemaan liimautuvat päät, jotka liittyvät erilaisiin restriktioentsyymeihin, niin että liittäjä selektiivisesti kytkee kaksi erilaista DNA-sekvenssiä, joilla on sopivat, komplementaariset, liimautuvat päät.

Kyseessä olevaa keksintöä valaistetaan synteettisten fragmenttien avulla, jotka koodittavat IGF I:a sekä IGF II:a, jotka liittyvät hiivan α -tekijän johdanto- ja prosessointisignaaleihin. Hiivan α -tekijä saatetaan katkaista HindIII:lla sekä SalII:lla. HindIII pilkkoo α -tekijän prekursorin prosessointisignaalisissa pilkkojen Glu-kodonin koodaussäikeessä 3'-kohdan toiseen emäkseen saakka, samalla kun HindIII:n tunnistussekvenssi täydentää Glu-kodonia, koodittaa alaninia sekä antaa käyttöön kypsän α -tekijän aminoterminalisen

trp-kodonin ensimmäisen 5'-emäksen. α -tekijän geenin transkription suunnan johdosta SalI-kohta on paikannettu transkriptionaalisen lopetussignaalin yläpuolelle.

IGF:a koodittavilla synteettisillä geeneillä on nukleotidisekvenssit, jotka perustuvat IGF I sekä IGF II polypeptidien tunnettuihin aminohapposekvensseihin. Synteettiset sekvenssit käyttävät mieluummin kodoneja, joita hiivaisäntä ensisijaisesti käyttää hyväksi, esim. hiivan glykolyyttisiä entsyymejä koodittavissa geeneissä esiintyvien kodonien taajuuden perusteella. Synteettinen sekvenssi sisältää sopivasti liimautuvia päitä pikemmin kuin tasapäitä kloonaavassa siirtäjässä sijaitsevaan restriktiokohtaan tapahtuvaa insertiota varten. Lisäksi, restriktiokohdat laaditaan synteettisiin sekvensseihin mykkiä mutaatioita käyttämällä, fragmenttien tuottamiseksi, joita saatetaan lämpökäsitellä sekvensseiksi, jotka voivat valmistaa IGF I/IGF II-hybridipeptidimolekyylejä.

Esimerkeissä annetaan käyttöön synteettisiä fragmentteja, joissa on EcoRI:a varten liimautuvat päät ja jotka on inser-toitu pBR328:ssa sijaitsevaan EcoRI-kohtaan. Tavallisesti synteettinen sekvenssi sisältää muita restriktiokohtia, jotka sijaitsevat proksimaalisesti polypeptidiä koodittavan alueen kunkin pään suhteen. Valitaan sellaiset sisäiset restriktiokohdat, että saadaan koodausalue tarkasti leikat-tua kloonaavasta siirtäjästä ja liittäjiin yhdistämistä varten, niin että lopullinen DNA-rakenne, joka sisältää johdanto- ja prosessointisignaalit sekä koodittavan alueen, ovat sopivassa lukuvaiheistuksessa sekä sopivassa rinnakkais-asemassa transkription lopetussignaaliin nähden. Mieluummin restriktiokohdilla tulee olla tunnistussekvenssihaara pilkkoutumiskohdasta, jossa pilkkoutuminen on suunnattu proksi-maalisesti koodausalueeseen nähden ja tunnistuskohta on hävinnyt. Tämä tekee mahdolliseksi pilkkoutumisen tarkasti koodausalueen kussakin päässä nukleotidisekvenssistä huoli-

matta. HgaI-kohdat on annettu käyttöön esimerkeissä.

Synteettistä geeniä valmistettaessa, tavanomaisin tekniikoin valmistetaan päällekkäin menevät yksisäikeiset DNA (ssDNA)-fragmentit. Sellaiset ssDNA-fragmentit tulevat tavallisesti olemaan pituudeltaan 10-40 emästä. Vaikka saatetaan käyttää huomattavasti pitempiä fragmentteja, synteetin saanto vähe-nee ja tulee vaikeammaksi varmistaa, ettei sopiva sekvenssi ole tuotamuksellisesti huonontunut tai muuttunut. Sen jälkeen kun ssDNA-fragmentit on syntetisoitu, ne yhdistetään lämpökäsittelyolosuhteissa komplementaarisen emäsparin kanssa sopivan järjestyksen varmistamiseksi. Sitten fragmenttien päät sidotaan, ja syntyvä synteettinen fragmentti kloonataan sekä suoritetaan geenin monistuminen, tavallisesti bakteeri-isännässä, kuten esim E.colissa. Kuten aiemmin on ilmaistu, synteettinen rakennegeeni saattaa olla varustettu liimautuvien päin, jotka ovat komplementaariset sopivalle restriktiokohdalle kyseessä olevassa kloonavassa siirtäjässä (vektorissa) sekä sisäisissä tunnistuskohdissa, jotka sallivat koodaavan alueen tarkan poistamisen. Synteettisten sekvenssien kloonauksen sekä monistumisen jälkeen saatetaan poistaa sekvenssien käyttökelpoisia määriä, tavallisesti IGF:a koodaavan alueen kummassakin päässä sijaitsevilla sisäisillä restriktiokohdilla.

Promoottori, jota käytetään, saattaa olla liitetty johdantojaksoon ja prosessontisekvenssiin. Tällä tavalla saatetaan antaa käyttöön 5'-siirrettävä tekijä, joka sisältää sekä promoottorin että johdantojakson sopivassa avaruussuhteessa tehokkaan transkription suhteen. Sisällyttämällä lisäksi transkriptionaalinen lopetussignaali, luodaan "kasetti", joka sisältää promoottorin/johdanto-restriktiokohdan (-kohdat)-lopetussignaalin, jossa IGF:a koodaava alue saattaa olla insertoitu liittäjien avulla. Tavallisesti sellaisia "kasetteja" saatetaan saada eristämällä DNA-fragmentti, joka sisältää hiivaisännästä peräisin olevan intaktin geenin sekä

geenin ylä- että alapuolisen transkription säätelysekvenssit, joissa geeni ekspressoi polypeptidin, jonka isäntä erittää.

Vaihtoehtoisesti voidaan korvata luonnossa esiintyvä hiiva-promoottori muilla promoottoreilla, jotka ottavat huomioon transkription säätelyn. Tämä edellyttää alueen sekvenssi- ja/tai restriktiokartoitusta säätelysekvenssin yläpuolella, erilaisen promoottorin liittämiseksi. Joissakin tapauksissa saattaa olla toivottavaa säilyttää luonnossa esiintyvä hiiva-promoottori ja antaa käyttöön toinen promoottori, joka sijaitsee peräkkäin, joko ylä- tai alapuolella luonnossa esiintyvistä hiivan promoottorista.

Monia erilaisia promoottoreita on käytettävissä tai voidaan saada hiivan geeneistä. Erityisen mielenkiintoisiin promoottoreihin sisältyvät promoottorit, jotka kytkeytyvät glykolyttisen metaboliatien entsyymeihin, kuten esimerkiksi promoottorit alkoholidehydrogenaasia, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia, pyruvaattikinaasia, trioosifosfatisomeraasia, fosfoglukoisomeraasia, fosfofruktoosikinaasia, jne. varten. Käyttämällä näitä promoottoreita säätelysekvenssien, kuten esimerkiksi lisääjien operaattoreiden jne. kanssa sekä käyttämällä isäntää, jolla on koskematon säätelysekvenssi, voidaan säädellä prosessoidun "pre"-IGF:n ekspressiota. Täten saatetaan käyttää erilaisia, pieniä, orgaanisia molekyylejä, esim. glukoosia, halutun polypeptidin valmistuksen säätelyyn.

Saatetaan käyttää myös lämpötilalle herkkiä säätelymutantteja, jotka tekevät mahdolliseksi transkription moduloinnin lämpötilaa vaihtelemalla. Täten kasvattamalla solut ei-optimisessa lämpötilassa, ne voidaan kasvattaa suureen tiheyteen, ennen kuin lämpötilaa muutetaan, jotta saadaan "pre"-polypeptidien ekspressio IGF I:a ja IGF II:a varten.

Muita mahdollisuuksia voidaan myös sisällyttää rakenteeseen. Esimekiksi jotkut geenit huolehtivat monistumisesta, jolloin stressin kohdistuessa isäntään, ei ainoastaan geeni, joka vastaa stressiin, monistu, vaan myös reunustavat alueet. Sijoittamalla sellainen geeni promoottorin koodausalueen sekä muiden säätelysignaaleiden yläpuolelle, jotka antavat käyttöön "pre"-polypeptidin transkription kontrollin, saatetaan saada plasmideja, joissa on suuri määrä toistuvia sekvenssejä, joihin sisältyy "pre"-polypeptidigeeni säätelysekvensseineen. Valaiseviin geeneihin kuuluvat metallotionieetit sekä dihydrofolaattireduktaasi.

Säätelysekvenssi-fragmentin lisäksi rakenne saattaa sisältää muuta, isännän perintöainekselle homologista DNA:a. Jos halutaan IGF-geenin integraatiota kromosomiin (kromosomeihin), voidaan integraatiota lisätä hankkimalla IGF-geenikonstruktioita reunustavia sekvenssejä, jotka ovat homologisia isännän kromosomaalisen DNA:n kanssa.

Hiivaisännän tulee tunnistaa replikaatiojärjestelmä, jota käytetään. Sen tähden on toivottavaa, että replikaatiojärjestelmä kuuluu luonnostaan hiivaisäntään. Botstein et al., ne (1979) 8:17-24, ovat tehneet selkoa monista hiivavektoreista. Erityisen mielenkiintoisia ovat YEp-plasmidit, jotka sisältävät 2 μ m-plasmidin replikaatiojärjestelmän. Näitä plasmideja säilytetään pysyvästi moninkertaisina kopioina. Vaihtoehtoisesti tai lisäksi saatetaan käyttää ARS1:n sekä CEN4:n yhdistelmää pysyvää säilyttämistä varten.

Kunkin käsittelyn jälkeen rakenne saatetaan kloonata, niin että haluttu rakenne saadaan puhtaana ja riittävässä määrin jatkokäsittelyä varten. Haluttaessa saatetaan käyttää sukku-lavektoria (se on vektoria, joka käsittää sekä hiiva- että bakteerialkuperää olevan replikation), niin että kloonaus voidaan suorittaa prokaryoteissa, erityisesti E. colilla.

Plasmidit saatetaan viedä hiivaisäntään millä tahansa tavallisella keinolla, käyttämällä isäntäsoluja tai sferoplasteja sekä käyttämällä kalsiumilla saostettua DNA:ta transformatioon tai liposomeja tai muita tavanomaisia menetelmiä. Modifioidut isännät saatetaan valita geneettisten markkereiden mukaisesti, joita tavallisesti on vektorissa, jota käytetään ekspressioplasmidin konstruktion. Saatetaan käyttää auksotrofista isäntää, jossa plasmidilla on geeni, joka täydentää isäntää ja saa aikaan prototrofian. Vaihtoehtoisesti voidaan plasmidiin sisällyttää markkerina resistenssi sopivalle biosidille, esim. antibiootille, raskasmetallille, myrkyille tms. Valinta saatetaan sitten suorittaa käyttämällä elatusainetta, joka kuormittaa kantasoluja niin, että voidaan valita solut, jotka sisältävät plasmidin. Plasmidin sisältävät solut saatetaan sitten kasvattaa sopivassa elatusaineessa, ja haluttu, eritetty polypeptidi eristetään tavanomaisin menetelmin. Polypeptidi saatetaan puhdistaa kromatografian, suodatuksen, uuttamisen jne. avulla. Koska polypeptidi tulee olemaan elatusaineessa kypsässä muodossa, elatusainetta voidaan kierrättää jatkuvasti poistamalla haluttu polypeptidi.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on valaista eikä rajoittaa keksintöä.

Kokeellinen osa

Nukleotidisekvenssit ihmisen insuliinin kaltaisia kasvutekijöitä I ja II (IGF I ja II) varten, sisältäen edullisia hii-
van kodoneita, suunniteltiin aminohapposekvenssien perusteella, joista raportoidaan Rinderknechtin ja Humbelin julkaisussa (1978), J. Biol. Chem. 253:2769-2776 sekä Rinderknechtin ja Humbelin julkaisussa (1978), FEBS Letters 89:283-286. Sekvenssit (koodittavat säikeet, jotka on esitetty 5':sta 3':iin) ovat seuraavat:

IGF I

AsnSerThrLeuMetGlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGln
 5'-AATTCGACGCTTATCGGTCCAGAAACCTTGTGTGGTGCTGAATTGGTCGATGCTTTGCAA
 GCTGCGAATACCCAGGTCTTTGGAACACACCACGACTTAACCAGCTACGAAACGTT
EcoRI HgaI

PheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSer
 TTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCAACAAGCCAACCGGTTACGGTTCTTCTTCT
 AAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGTTGTTCCGTTGGCCAATGCCAAGAAGAAGA
 ArgArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArg
 AGAAGAGCTCCACAAACCGGTATCGTTGACGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGAGA
 TCTTCTCGAGGTGTTTGGCCATAGCAACTGCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACTCT

ArgLeuGluMetTryCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAlaOP MetArgArg
 AGATTGGAAATGTACTGTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCTTGAATGCGTCG-3'
 TCTAACCTTTACATGACACGAGGTAACCTTCGGTCGATTCAGACGAACCTTACGCAGCTTAA
 Koodittava alue

IGF II

AsnSerThrLeuMetAlaTyrArgProSerGluThrLeuCysGlyGlyGluLeuValAsp
 5'-AATTCGACGCTTATCGCTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGTGGTGAATTGGTCGAC
 GCTGCGAATACCGAATGTCTGGTAGGCTTTGGAACACACCACCACTTAACCAGCTG
EcoRI HgaI

ThrLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheSerArgProAlaSerArgVal
 ACCTTGCAATTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCTCCAGACCAGCTTCCAGAGTT
 TGGAACGTTAAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGAGGTCTGGTCCAAGGTCTCAA
 SerArgArgSerArgGlyIleValGluGluCysCysPheArgSerCysAspLeuAlaLeu
 TCTAGAAGATCCAGAGGTATCGTTGAAGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGGCTTTG
 AGATCTTCTAGGTCTCCATAGCAACTTCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACCGAAAC

LeuGluThrTyrCysAlaThrProAlaLysSerGluOP MetArgArg
 TTGGAAACCTACTGTGCTACCCCAGCTAAGTCTGAATGAATGCGTCG-3'
 AACCTTTGGATGACACGATGGGGTCGATTCAGACTTACTTACGCAGCTTAA
 Koodittava alue

Sekvensseissä on EcoRI liimautuvat päät kummassakin päässä. IGF I:n koodaus alkaa koodittavan säikeen emäksestä 16 ja päättyy emäkseen 225. HgaI restriktiokohdat sijaitsevat IGF I:a koodittavan alueen kummassakin päässä. HgaI:n tunnistuskohdat (5'-GACGC-3') sijaitsevat IGF I:a koodittavan alueen ulkopuolella, so. synteettisen sekvenssin pään ja HgaI pilkkomiskohdan välissä. IGF II synteettinen sekvenssi on konstruoitu samalla tavalla siten, että koodittava säie alkaa emäksestä 16 ja päättyy emäksen 219 kohdalla.

Synteettinen DNA-fragmentti IGF I:a varten, jolla on sekvenssi, jota on juuri kuvattu IGF I:n suhteen, valmistettiin syntetisoimalla 20 limittäistä DNA-segmenttiä käyttämällä fosforamidiittimenetelmää (katso käsittelyn alaisena olevaa hakemusta, sarja no. 457,412, jätetty tammikuun 12 päivänä, -83). ssDNA-sekvenssit olivat seuraavat:

NimitysSekvenssi

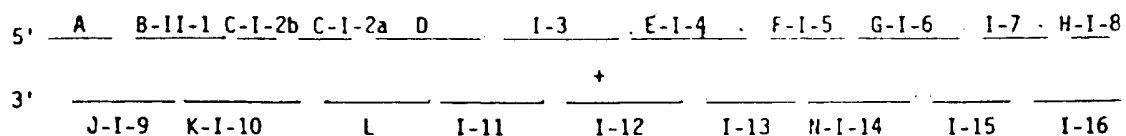
A	AATTCGACGCTTATCG
B-I-1	GTCCAGAAACCTTGTGTGGT
C-I-2b	GCTGAATTGGTC
C-I-2a	GATGCTTTGCAATTCGT
D	TTGTGCTGACAGAGGTTTCTACTTC
I-3	AACAAGCCAAACCGTTACGGTTCTTCTTC
E-I-4	TAGAAGAGCTCCACAAACCGGTATCGTT
F-I-5	GACGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTG
G-I-6	AGAAGATTGGAAATGTACTGTGCT
I-7	CCATTGAAGCCAGCTAAGTCT
H-I-8	GCTTGAATGCGTCG
J-I-9	GTTTCTGGACCCATAAGCGTCG
K-I-10	AAAGCATCGACCAATTCAGCACCACACAAG
L	CTCTGTCACCACAAACGAATTGC
M-I-11	AACCGGTTGGCTTGTTGAAGTAGAAAC
I-12	TGGAGCTCTTCTAGAAGAAGAACCGT
I-13	GAAACAACATTCGTCAACGATACCGGTTTG
N-I-14	CCAATCTTCTCAAGTCACAAGATCT
I-15	GGCTTCAATGGAGCACAGTACATTT
I-16	AATTCGACGCATTCAAGCAGACTTAGCT

ssDNA-segmentit yhdistettiin seuraavasti:

50 pikomoolia kutakin segmenttiä, paitsi A:a sekä I-16:a 5'-fosforyloitiin T4-polynukleotidikinaasilla. Sitten 50 pikomoolia kaikkia segmenttejä lämpökäsiteltiin yksinkertaisessa vaiheessa 18 µl:n yhteispanoksena jäähdyttämällä 95°C:sta 25°C:een 1,5 tunnin kuluessa. Sidonta saatiin aikaan 30µl:n reaktiutilavuudessa, joka sisälsi 1mM ATP:tä, 10mM DTT:tä, 100mM tris-HCl:ää, pH 7,8, 10mM MgCl₂:a, 1µg/ml spermiidiiniä sekä T4-ligaasia. Tarkoituksenmukainen, kaksisäikeinen fragmentti, joka syntyy kuvassa 1 esitettyjen fragmenttien ryhmityksestä ja pariutumisesta, puhdistettiin 7 % puhdasta polyakryyliamidia sisältävällä elektroforeesi-geelillä.

Kuva 1

IGF I:n lämpökäsittely ja sidontakaavio



IGF II:a varten DNA-sekvenssi syntetisoitiin samalla tavalla. Valmistettiin seuraavat ssDNA-lisäfragmentit.

Nimitys

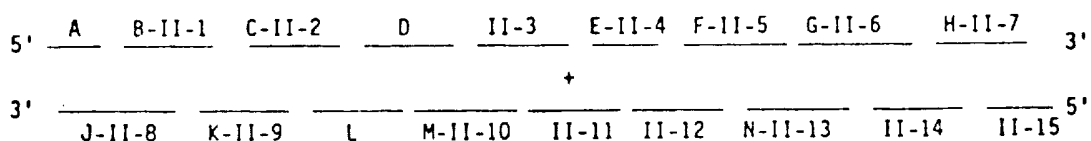
Sekvenssi

B-II-1	CTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGT
C-II-2	GGTGAATTGGTCGACACCTTGCAATTCGT
II-3	TCCAGACCAGCTTCCAGAGTTTCT
E-II-4	AGAAGATCCAGAGGTATCGTT
F-II-5	GAAGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTG
G-II-6	GCTTTGTTGGAAACCTACTGTGCT
H-II-7	ACCCCAGCTAAGTCTGAATGAATGCGTCG
J-II-8	GTTTCGGATGGTCTGTAAGCCATAAGCGTCG
K-II-9	AAGGTGTCGACCAATTCACCACCACACAAG
M-II-10	AAGCTGGTCTGGAGAAGTAGAAAC
II-11	CTGGATCTTCTAGAAACTCTGG
II-12	GAAACAACATTCTTCAACGATACCT
N-II-13	TTCCAACAAAGCCAAGTCACAAGATCT
II-14	AGACTTAGCTGGGGTAGCACAGTAGGT
II-15	AATTCGACGCATTCATTC

200 pikomoolia näitä ssDNA-fragmentteja sekä fragmentteja A, D sekä L yhdistettiin samalla tavalla kuin edellä on esitetty, jolloin A ja II-15 eivät olleet fosforyloituja ja tuloksena oli seuraava segmenttien järjestys ja pariutuminen.

Kuva 2

IGF II:n lämpökäsittely ja sidontakaavio



Synteettiset DNA-sekvenssit liitettiin pBR328:n EcoRI-kohtaan plasmidien p328IGF I:n ja p328IGF II:n valmistamiseksi. Kloonauksen jälkeen IGF:a koodittavat säikeet leikattiin käyttäen HgaI:a

Synteettiset oligonukleotidiliittäjät sidottiin HgaI-restriktiofragmentteihin. IGF I:ä varten liittäjillä oli seuraavat sekvenssit:

- a) 5'-AGCTGAAGCT-3'
3'-CTTCGACCAGG-5'
- b) 5'-CTGCTTGATAAG-3'
3'-ACTATTCAGCT-5'

Mitä tulee koodittavan säikeen suuntaukseen, ensimmäisen liittäjän a) 3'-pää on komplementaarinen 5' HgaI-pilkkoutumiskohdalle IGF I:n synteettisessä sekvenssissä, samalla kun ensimmäisen liittäjän 5'-pää saa HindIII liimautuvan pään. Toinen liittäjä b) on komplementaarinen 5'-päästään IGF I sekvenssin 3'-päässä sijaitsevalle HgaI pilkkomiskohdalle, samalla kun liittäjän 3'-pää antaa käyttöön Sall tarttuvan pään.

IGF II:lle liittäjillä on seuraavat sekvenssit.

c) 5'-AGCTGAGAAGCT-3'
3'-CTTCGACGAAT-5'

d) 5'-CTGAATGATAAG-3'
3'-ACTATTCAGCT-5'

Suuntauksen ollessa kuten edellä, ensimmäinen liittäjä c) on komplementaarinen 3'-päästään IGF II synteettisessä sekvenssissä sijaitsevalle 5'-HgaI pilkkoutumiskohdalle, kun taas 5'-pää antaa käyttöön HindIII liimautuvan pään. Toinen liittäjä d) on 5'-päästään komplementaarinen IGF II synteettisessä sekvenssissä sijaitsevalle toiselle HgaI pilkkoutumiskohdalle ja antaa 3'-päässään käyttöön SalI liimautuvan pään.

Synteettiset fragmentit ja niihin yhdistetyt liittäjät puhdistettiin preparatiivisella geelielektroforeesilla sekä sidottiin 100 ng:aan pAB113:a, joka aiemmin oli uutettu täydellisesti endonukleaaseilla HindIII sekä SalI:llä. pAB113 saatiin pAB112:sta poistamalla kolme 63 pb HindIII fragmenttia. pAB112 on plasmidi, joka sisältää 1,8 kb EcoRI-fragmentin hiivan α -tekijägeenin kanssa, joka on kloonattu pBR322:n EcoRI kohdassa, josta HindIII sekä SalI kohdat on poistettu. pAB112 johdettiin plasmidi pAB101:stä, joka sisältää hiivan α -tekijän geenin osittaisena Sau3A fragmenttina, joka on kloonattu plasmidi YEp24:n BamHI-kohdassa. pAB101 saatiin seulomalla YEp24:ssä kloonattu hiivan genomikokoelma käyttämällä entsymaattisesti P32:lla radiomerkattua, synteettistä oligonukleotidimallia, joka oli homologinen julkaistulle α -tekijää koodittavalle alueelle (Kurjan ja Herskowitz, Abstracts 1981 Cold Spring Harbor Meeting on the Molecular Biology of Yeast, sivu 242).

Syntyvät seoksia käytettiin transformoimaan E. coli HB 101 soluja, ja saatiin plasmidit pAB113-IGF-I sekä pAB113-IGF-II vastaavasti IGF I:a sekä IGF II:a varten.

Plasmidit pAB113-IGF-I sekä pAB113-IGF-II (5 µg kumpaakin), joissa oli vastaavasti rakennegeenit IGF I ja IGF II, pilkottiin täydellisesti EcoRI:llä, ja syntyvät fragmentit yhdistettiin ylimäärään EcoRI-BamHI liittäjiä ja uutettiin BamHI:n kanssa. Syntyvät 1,8 kb BamHI fragmentit eristettiin preparatiivisen geelielektroforeesin avulla, ja noin 100 ng kutakin fragmenttia sidottiin 100 ng:aan pCl/1:a, joka aiemmin oli pilkottu täydellisesti BamHI:llä sekä käsitelty alkalisella fosfataasilla.

Plasmidi pCl/1 on pJDB219:n johdannainen, Beggs, Nature (1978) 275:104, jossa pJDB219:ssä sijaitsevaa bakteeriperäistä plasmidia pMB9 vastaava alue on syrjäytetty pCl/1:ssä sijaitsevalla pBR322:lla. Kutakin sidontaseosta käytettiin transformoimaan E. coli HB 101:n soluja. Transformantit valittiin ampisilliiniresistenssin perusteella, niiden plasmidit analysoitiin restriktioendonukleasiuuton avulla. Valmistettiin DNA, joka oli peräisin kutakin rakennegeeniä IGF I tai IGF II (pYIGF-I-10/1) varten vastaavasti valitusta kloonista, ja sitä käytettiin transformoimaan hiivan AB103 soluja. Transformaatit valittiin niiden Leu⁺-fenotyyppin perusteella.

Kaksi hiivakannan AB103 (α, pep 4-3, 2-3, leu 2-112, ura 3-52, his 4-580), jotka oli transformoitu plasmidilla (pYIGF-I-10/1), viljelmää (5 ja 9 litraa) kasvatettiin 30°C:ssa, -leu-väliaineessa, kyllästykseen asti (optinen tiheys 650 nm:ssä 5) ja jätettiin ravistellen 30°C:een vielä 12 tunnin mittaiseksi ajaksi. Solusupernatantit koottiin kustakin viljelmästä sentrifugoiden, ja IGF konsentroitiin absorboimalla ioninvaihtohartsiin (Biorex-70 on saatavissa Bio-Rad Laboratories, Inc.:ltä Richmond, Kalifornia). Sen jälkeen kun oli eluoitu 80 %:seen etanoliin valmistetulla 10 mM:lla HCl:lla, IGF I-jakeet (0,4 ml ja 3 ml vastaavasti) määritettiin kokonaisproteiinikonsentraation ja IGF I konsentraation suhteen. Proteiinimääritys suoritettiin

Coomassie Blue:lla, jota on saatavissa Bio-Rad Laboratories, Inc.:ltä Richmond, Kalifornia. IGF I-määritys oli tavanomainen kompetitiivinen radioimmunologinen määritys, jossa käytettiin radiomerkattua IGF I:a. Tulokset olivat seuraavat:

<u>Tutkimus no</u>	<u>Tilavuus konsent- Kokonais-</u>			
	<u>Tilavuus</u>	<u>roinnin jälkeen</u>	<u>proteiini</u>	<u>IGF I</u>
1	5 l	0,4 ml	5,0 mg/ml	3,75 mg/ml
2	9 l	3,0 ml	2,9 mg/ml	3,00 mg/ml

IGF I:n biologinen määritys, joka perustuu peptidin synergistiseen vaikutukseen kyyhkysenkupuvasteen lisäämiseksi prolaktiinille Anderson et al. (1983), kirjassa Somatomedins/ Insulin-Like Growth Factors, Spencer, E.M., Toimittaja Walter deGruter, Berliini), ilmaisee, että näiden valmisteiden IGF I tuotteella on aktiivisuutta, joka on samanarvoista autenttisen IGF I:n kanssa, joka on eristetty ihmisen seerumista.

AB103(pYIGF-II-10/1):n viljelmät, jotka oli kasvatettu edellä kuvatulla tavalla sekä määritetty käyttämällä ihmisen istukan membraanin radioreseptorimääritystä (Spencer et al. (1979) Act. Endocrinol. 91:36-48) IGF II:n suhteen, osoittivat 3,9 yksikköä/ml, kun ihmisen normaali seerumissa on 1 yksikkö/ml.

Kyseessä oleva keksintö antaa käyttöön uusia rakenteita, jotka saatetaan liittää vektoreihin ihmisen insuliinin kaltaisen kasvutekijä I:n ekspressiota varten valmistuksen ja erittymisen aikaansaamiseksi. Täten voidaan saada polypeptidi, jolla on identtinen sekvenssi luonnossa esiintyvän, ihmisen insuliinin kaltaisen kasvutekijä I:n kanssa. Käyttöön saadun erittymisen johdosta voidaan saada lisääntyneitä saantoja solupopulaatioon perustuen, ja seuraavat preparatiiviset toiminnot ja puhdistus ovat yksinkertaistettuja.

Vaikka edellä esitettyä keksintöä on kuvattu yksityiskohtaisesti valaisemalla sitä esimerkein, jolloin tarkoituksena on ollut selventää keksintöä, on ilmeistä, että käytännössä saatetaan toteuttaa tiettyjä muutoksia liitteenä olevien patenttivaatimusten puitteissa.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä ihmisen insuliinin kaltaisen kasvutekijän (IGF) tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kasvatetaan hiivaa, joka sisältää toiminnallisen DNA-rakenteen, joka sisältää geenin, joka koodaa seuraavaa aminohapposekvenssiä:

GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGln

PheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSer

ArgArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArg

ArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAla

tai

AlaTyrArgProSerGluThrLeuCysGlyGlyGluLeuValAsp

ThrLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheSerArgProAlaSerArgVal

SerArgArgSerArgGlyIleValGluGluCysCysPheArgSerCysAspLeuAlaLeu

LeuGluThrTyrCysAlaThrProAlaLysSerGlu

liitettynä sopivaan lukuvaiheistukseen hiivan tunnistamien DNA-

:ta koodaavien erityksen ohjaaja- ja prosessointisignaalisekvenssien kanssa rakennegeenin muodostamiseksi hiivan kanssa yhteensopivassa vektorissa sijaitsevan transkription aloitusalueen alapuolelle ja transkription säätelyn alaiseksi, ja että eristetään hiivasta sen insuliinin kaltainen kasvutekijä.

2. Rekombinantti DNA, tunnettu siitä, että se koodaa insuliinin kaltaista kasvutekijää, edullisesti hiivassa, nukleotidisekvenssin ollessa:

5'-GGTCCAGAAACCTTGTGTGGTGCTGAATTGGTCGATGCTTTGCAA
CCAGGTCTTTGGAACACACCACGACTTAACCAGCTACGAAACGTT

TTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCAACAAGCCAACCGGTTACGGTTCTTCTTCT
AAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGTTGTTTCGGTTGGCCAATGCCAAGAAGAAGA

AGAAGAGCTCCACAAACCGGTATCGTTGACGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGAGA
TCTTCTCGAGGTGTTTGGCCATAGCAACTGCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACTCT

AGATTGGAAATGTA CTGTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCT-3'
TCTAACCTTTACATGACACGAGGTA ACTTCGGTCGATTCAGACGA

tai

5'-GCTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGTGGTGAATTGGTCGAC
CGAATGTCTGGTAGGCTTTGGAACACACCACCACTTAACCAGCTG

ACCTTGCAATTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCTCCAGACCAGCTTCCAGAGTT
TGGAACGTTAAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGAGGTCTGGTCGAAGGTCTCAA

TCTAGAAGATCCAGAGGTATCGTTGAAGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGGCTTTG
AGATCTTCTAGGTCTCCATAGCAACTTCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACCGAAAC

TTGGAAACCTACTGTGCTACCCAGCTAAGTCTGAA-3'
AACCTTTGGATGACACGATGGGGTCGATTCAGACTT

KRAV

1. Förfarande för framställning av humaninsulinlik tillväxtfaktor (IGF), k ä n n e t e c k n a t därav, att man odlar jäst som innehåller en funktionell DNA-struktur som kodar följande aminosyrasekvens

GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGln

PheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSer

ArgArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArg

ArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAla

eller

AlaTyrArgProSerGluThrLeuCysGlyGlyGluLeuValAsp

ThrLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheSerArgProAlaSerArgVal

SerArgArgSerArgGlyIleValGluGluCysCysPheArgSerCysAspLeuAlaLeu

LeuGluThrTyrCysAlaThrProAlaLysSerGlu

kopplad i lämpligt lässystem med av nämnda jäst igenkända DNA-kodande ledar- och processignalsekvenser för utsöndringen för att bilda en struktur gen under samt underordnad den transkrip-

tionsregulatoriska kontrollen av ett transkriptionsbegränsningsområde i en vektor kompatibel med nämnda jäst och att utsöndrad human-IGF isoleras från nämnda jäst.

2. Rekombinant DNA, k ä n n e t e c k n a d därav, att den kodar insulinlik tillväxtfaktor, fördelaktigt i jäst, med följande nukleotidsekvens

5'-GGTCCAGAAACCTTGTGTGGTGGCTGAATTGGTCGATGCTTTGCAA
CCAGGTCTTTGGAACACACCACGACTTAACCAGCTACGAAACGTT

TTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCAACAAGCCAACCGGTTACGGTTCTTCTTCT
AAGCAAACACCACTGTCTCAAAGATGAAGTTGTTTCGGTTGGCCAATGCCAAGAAGAAGA

AGAAGAGCTCCACAAACCGGTATCGTTGACGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGAGA
TCTTCTCGAGGTGTTTGGCCATAGCAACTGCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACTCT

AGATTGGAAATGTACTGTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCT-3'
TCTAACCTTTACATGACACGAGGTAACCTTCGGTCGATTGACGACGA

eller

5'-GCTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGTGGTGAATTGGTCGAC
CGAATGTCTGGTAGGCTTTGGAACACACCACCACTTAACCAGCTG

ACCTTGCAATTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCTCCAGACCAGCTTCCAGAGTT
TGGAACGTTAAGCAAACACCACTGTCTCAAAGATGAAGAGGTCTGGTCTGAAGGTCTCAA

TCTAGAAGATCCAGAGGTATCGTTGAAGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGGCTTTG
AGATCTTCTAGGTCTCCATAGCAACTTCTTACAACAAAGTCTAGAACACTGAACCGAAAC

TTGGAAACCTACTGTGCTACCCAGCTAAGTCTGAA-3'
AACCTTTGGATGACACGATGGGGTCGATTGACACTT