

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 565 B

(21) A bejelentés száma: 1572/84
(22) A bejelentés napja: 1984. 04. 24.
(30) Elsőbbségi adatok:
487 950 1983. 04. 25. US
(83) Letétbe helyezés: ATCC 33694; ATCC 20673; ATCC 20674

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/19

C 12 N 15/81

C 12 P 21/02

(40) A közzététel napja: 1985. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:

Barr, Philip J., San Francisco, Kalifornia (US)
Merryweather, James P., Berkeley, Kalifornia (US)
Mullenbach, Guy, Berkeley, Kalifornia (US)
Urdea, Mickey S., San Francisco, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

Chiron Corp., Emeryville, Kalifornia (US)

(54) **Eljárás az érett inzulinszerű növekedési faktorok hibrid DNS-ének
szintézisére**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás humán inzulinszerű I vagy II növekedési faktorok (IGF) hatékony előállítására megfelelő gazdaszerzetben.

- i) A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy egy IGF I vagy IGF II polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát állítunk elő, ezt az IGF I vagy IGF II polipeptidet kódoló szekvenciát megfelelő leolvasási fázisban összekapcsoljuk egy olyan DNS-szekvenciával, amely az adott gazdaszerzet által felismert szekréción vezér és processzor szignál-szekvenciákat határoz meg, ezek 3' irányban helyezkednek el az őket transzkripción szinten szabályozó, a gazdaszerzet által felismerhető transzkripción régiótól; az így kapott DNS-molekulával a megfelelő gazdaszerzet sejtjeit transzformáljuk;
- ii) a transzformált sejtet tenyésztjük; és
- iii) a transzformált sejtek tenyészetéből izoláljuk a szekretált humán IGF I vagy IGF II polipeptideket.

A találmány tárgya eljárás érett inzulinszerű növekedési hormonokat meghatározó hibrid DNS szintézisére.

Felteszik, hogy a növekedési hormon in vivo adagolását követő szomatikus (testi) növekedés olyan mitogén, inzulinszerű peptidcsalád szabályozása révén jön létre, amelyek szérumból izolálható, növekedési hormon függő. Ezek a polipeptidek például a szomatomedin-C, szomatomedin-A és az I és II inzulinszerű növekedési faktorok (IGF I és IGF II). Az IGF I és IGF II a humán szérumból izolálható, aminosavszekvenciájuk nagymértékben homológ az inzulinéval. Jelenleg csak korlátozott mennyiségben nyerhetők a humán szérumból ezek a növekedési faktorok. Ezért nagy tudományos és klinikai érdek fűződik ahhoz, hogy rekombináns DNS-technikákkal viszonylag nagy mennyiségű növekedési faktorokat állíthassunk elő.

Az I és II humán inzulinszerű növekedési faktorok (IGF I és II) aminosavszekvenciáját elsőként Rinderknecht és Humbel határozta meg [J. Biol. Chem., 253, 2769-2776. (1978)]; továbbá Rinderknecht és Humbel, FEBS Letters, 89, 283-286. (1978). Az IGF-receptorok tulajdonságait Massague és Czech tárgyalják [J. Biol. Chem., 257, 5038-5045. (1982)]. Kurjan és Herskowitz [Cell, 30, 933-934. (1982)] egy olyan feltételezett α -faktorprekurzort írnak le, amely az érett α -faktor (az élesztő által természetes úton kiválasztott fehérje) négy tandem másolatát tartalmazza, leírják a szekvenciát is, és feltehető keletkezési mechanizmusát. Kurjan és Herskowitz (Abstracts of Papers, Cold Spring Harbor Meeting on The Molecular Biology of Yeast, 242. oldal, „A Putative Alpha-Factor Precursor Containing Four Tandem Repeats of Mature Alpha-Factor”) leírják az α -faktort meghatározó és két ilyen szakasz között elhelyezkedő nukleotid szekvenciáját.

A találmány olyan módszerekre és készítményekre vonatkozik, amelyekkel hatékonyan állíthatjuk elő az érett humán inzulinszerű növekedési faktort (IGF). Részletesebben, a pre-IGF I és a pre-IGF II kifejezés élesztőgazdasejtben a polipeptidek tápközegebe való szekretálódásával jár együtt. Az eljárás során különböző forrásból származó, természetes és szintetikus eredetű DNS-szekvenciákat összekapcsolva DNS-molekulákat hozunk létre. Az előállított DNS-molekulák élesztősejtekben stabilan replikálódnak, és hatékonyan, nagy koncentrációban termelik a prepolipeptideket, amelyek a tápközegből jó kitermeléssel izolálhatók.

A találmány olyan DNS-szekvenciák előállítására vonatkozik, amelyek humán inzulinszerű növekedési faktorok (IGF I és II) kifejezésére képesek. Ezeket a dezoxiribonukleinsav-szekvenciákat vektorokba építhetjük be, és a kapott plazmidokkal a megfelelő gazdasejteket transzformáljuk. A megfelelő gazdasejtek ilyen rekombináns plazmidokkal történő transzformációja az inzulinszerű növekedési faktor génjének kifejeződését eredményezi, és a polipeptidtermék termelését. Részletesebben, a találmány tárgya eljárás prekursor polipeptidek (pre-IGF I és pre-IGF II) termelését meghatározó új DNS-szekvenciák kifejezésére olyan élesztőgazdasejtben, amely képes szintetizálni a fenti prekursor polipeptideket, és az érett polipeptidterméket a tápkö-

zegebe szekretálja. A DNS-molekula hordoz egy replikációs rendszert, amely a DNS-t képes stabilan fenn tartani élesztőgazdasejtben, tartalmaz továbbá egy hatékony promotort, egy struktúrgént, ideértve az ezzel azonos leolvasási fázisban lévő vezér- és processzorszignálokat, tartalmaz továbbá a struktúrgéntől 3' irányban egy transzkripció terminátorszekvenciát.

Adott esetben a transzkripció szabályozására, a gén sokszorosítására, és a transzkripció exogén szabályozására más szekvenciákat is beépíthetünk.

A pre-IGF I és a pre-IGF II kifejezés azt jelenti, hogy az érett polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát leolvasási fázisban kapcsoltuk hozzá a vezérszekvenciához és a processzorszignálokhoz, amelyeket hatékonyan felismer az élesztőgazdasejt. Így a pre szócska azt jelzi, hogy az élesztősejt szekréción és processzorszignáljai jelen vannak, de nem jelenti azt, hogy a szóban forgó polipeptidet kódoló gén bármely processzorszignálja jelen van.

A DNS-készítmény előállításakor lényeges, hogy a replikációs rendszert, promotort, a vezér- és processzorszignálokat hordozó struktúrgént és a terminátort előre meghatározott sorrendben kapcsoljuk, azért, hogy a kapott plazmidban megfelelően funkcionáljanak. Ahogy azt a későbbiekben megadjuk, a szekvenciák megfelelő orientációját és sorrendjét adaptormolekulák használatával alakíthatjuk ki. A felhasznált IGF I és IGF II gének lehetnek kromoszomális DNS-ek, cDNS-molekulák, szintetikus DNS-ek vagy ezek kombinációi. A vezér- és processzorszignálokat az élesztőben levő természetes előforduló DNS-szekvenciákból izoláljuk, ezek biztosítják egy polipeptid szekretálódását. Az élesztő által természetesen szekretált polipeptidek közül megemlítjük az α -faktort, a-faktort, savas foszfátstb.

A konstrukciót felépítő további szekvenciák a replikációs rendszer, promotor és terminátor jól ismertek, az irodalomban megadottak.

Mivel a találmány szerinti DNS-molekula összeállításakor különböző DNS-szekvenciákat használunk, amelyek különböző forrásból származnak, kényelmi okokból összekötő vagy adaptermolekulákat használunk. Részletesebben szólva, az adaptermolekulákat előnyösen használhatjuk a vezér és processzor szignálszekvenciákat hordozó kódolószál 3'-végének kapcsolására az IGF-kódolószál 5'-végéhez, a kapcsolást a megfelelő kiegészítő DNS-szálakkal együtt végezzük. A vezér- és processzorszignálokat hordozó szekvenciát közel, ennek 3'-végéhez hasíthatjuk úgy, hogy kódolórégiójából előre meghatározott számú bázispár kiessen. Ezután adaptermolekula állítható elő úgy, hogy ha a vezér és processzor szignálszekvenciát az IGF-kódolószekvenciához kapcsoljuk, a hiányzó bázispárok beépülnek, és a vezérszekvenciához képest az IGF-kódolószál megfelelő leolvasási fázisban helyezkedik el. A szintetikus IGF-kódolószekvencia és/vagy az adaptermolekula 3'-végén transzlációs stopkodonokat hordoz, ily módon elérjük, hogy a polipeptid C-terminális vége azonos legyen a természetes polipeptid C-terminálisával.

Az adaptermolekula 5–40 bázisból állhat, általában 8–35 bázisból, a kódolószekvenciában helyezkedik el, és kohéziv vagy tompa végű lehet. Előnyös, ha az adaptermolekula végei tapadós (kohéziv) végűek, mivel így az adapter szelektíve kapcsolódik a különböző restrikciós enzimekkel kapott két különböző DNS-szekvenciához, amelyek a megfelelő komplementer kohéziv végekkel rendelkeznek.

A találmányt az élesztő α -faktorának vezér- és processzorsználjaihoz kapcsolt IGF I és IGF II polipeptideket kódoló szintetikus fragmenssel szemléltetjük. Az élesztő α -faktora HindIII és SalI restrikciós endonukleázokkal hasítható ki. A HindIII hasítja az α -faktor prekurzorának processzorsználját, hasítja a 3'-véget a kódolósál Glu-kodonjának második bázisáig, ugyanakkor a HindIII felismerő szekvencia teljessé teszi a Glu-kodont, kódolja az alanint, és létrehozza az első 5'-bázist az érett α -faktor aminoterminális trp-kodonjában. Az α -faktor génjének átirási irányához képest a SalI hely a transzkripció terminátortól 5' irányban helyezkedik el.

Az IGF-polipeptidet kódoló szintetikus gén nukleotidszekvenciáját az IGF I és IGF II polipeptidek ismert aminosavszekvenciája határozza meg. A szintetikus szekvenciát előnyösen úgy tervezzük, hogy abban az élesztőgazdasejt által szívesen használt kodonok legyenek, például az élesztő glikolitikus enzimjeinek kodonfelhasználási frekvenciájára alapozunk. A szintetikus szekvencia előnyösen nem tompa, hanem kohéziv végeket tartalmaz abból a célból, hogy egy klónozó vektor megfelelő restrikciós helyébe beépíthessük. Ezenkívül a szintetikus szekvenciákba restrikciós helyeket építhetünk be néma mutációkat használva, így olyan fragmensek keletkezhetnek, amelyeket beépítve hibrid IGF I vagy IGF II peptidmolekulák keletkezhetnek.

A példákban megadott eljárás során a szintetikus fragmenseket EcoRI kohéziv végekkel látjuk el, és a pBR328 plazmid EcoRI helyére építjük be. A szintetikus szekvencia általában a polipeptidet meghatározó régió mindkét végének közelében további restrikciós helyeket is tartalmaz. Ezeket a belső restrikciós helyeket úgy választjuk meg, hogy a klónozó vektorból pontosan kihasználjuk a kódolószekvenciát, és úgy köthessük be az adaptermolekulát, hogy a végső DNS-molekula tartalmazza a vezér- és processzorsználókat, és a kódolórégiót egymáshoz képest megfelelő leolvasási fázisban és megfelelő távolságra egy transzkripció terminátortól. Előnyös, ha a restrikciós hely felismerőszekvenciája távolabbra esik a hasítási helytől, ebben az esetben a hasítás a kódolórégiótól 3' irányba esik, és a felismerési hely eltűnik. Ez lehetővé teszi a kódolósál mindkét végén a pontos hasítást, a nukleotidszekvenciától függetlenül. A példákban HgaI helyeket ismertettünk.

A szintetikus gén előállítására ismert technikákkal átfedő egyszálú dezoxiribonukleinsav (ssDNS) fragmenseket állítunk elő. Ezek az ssDNS-fragmensek általában 10–40 bázis hosszúak. Bár jelentősen hosszabb fragmenseket is használhatunk, a szintézis hozama ekkor csökken, és nehéz megjósolni, hogy a megfelelő

szekvencia degradálódik-e vagy megváltozik. Miután előállítottuk az ssDNS-fragmenseket, összekapcsoljuk azokat olyan kapcsolási reakciókörülmények között, ahol a komplementer bázisok párosodása megfelelő sorrendben következik be. A fragmensek végeit ezután ligáljuk, és a kapott szintetikus DNS-fragmenst klónozzuk és sokszorosítjuk, általában *E. coli* baktériumgazdasejtben. Ahogy előzőleg jeleztük, a szintetikus struktúrgént az adott klónozó vektor megfelelő restrikciós helyével komplementer kohéziv végekkel látjuk el, és egy olyan belső felismerési hellyel, amely a kódolószakasz pontos kimetszését lehetővé teszi. A szintetikus szekvenciák klónozása és sokszorosítása után megfelelő mennyiségű terméket kihasítunk, általában az IGF-kódolórégió egyik végénél elhelyezkedő belső restrikciós helyet használva.

A használt promotor kényelmi okokból a vezér- és processzorszekvenciákhoz kötött promotor lehet. Ilyen módon előállíthatunk egy olyan 5' eredetű szekvenciát, amely tartalmazza a promotort is és a vezérszekvenciát, mégpedig egymáshoz képest olyan kapcsolatban, hogy hatékony transzkripció legyen várható. Transzkripció terminátor beépítésével ezután egy olyan „kazettát” állítunk elő, amely hordozza a promotor/vezérszekvencia restrikciós hely (helyek), terminátorszekvenciákat, és ahová adaptermolekulák segítségével beépíthetjük az IGF-polipeptidet meghatározó kódolószakaszt. Ilyen kazettákat általában úgy állíthatunk elő, hogy izolálunk egy érintetlen élesztőgént és 3', illetve 5' irányban a gén transzkripció szabályozószekvenciáit hordozó dezoxiribonukleinsav-fragmenst, ez a gén kifejezi és szekretálja az adott polipeptidet.

Eljárhatunk oly módon is, hogy a természetesen előforduló élesztőpromotort transzkripció szabályozást megengedő más promotorokkal helyettesítjük. Ebben az esetben a vezérszekvenciától 5' irányban eső régiót szekvenálnunk kell és/vagy meg kell állapítanunk restrikciós térképét. Némely esetben kívánatos lehet az, hogy megtartva a természetes élesztőpromotort, amellé 3' vagy 5' irányban egy másik promotort építsünk be.

Élesztőgénekből több különböző promotort izolálhatunk. Különösen előnyösek azok a promotorok, amelyek a glükolízis folyamatának enzimeivel kapcsolatosak, ilyen promotorok az alkohol- dehidrogenáz, a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, piruvát-kináz, trióz-foszfát-izomeráz, foszfoglükó-izomeráz, foszfofrukto-kináz stb. promotor. Ezeket a promotorokat regulációs szekvenciákkal, például erősítőkkal, operátorokkal stb. együtt használva, ép regulálórendszerrel rendelkező gazdasejttel szabályozhatjuk a pre-IGF expresszióját. Így különböző kisméretű, szerves molekulákat, például glükózt használhatunk az adott polipeptid termelésének szabályozására.

Használhatunk hőmérsékletérzékeny regulációs mutánsokat, így a hőmérséklet változtatásával befolyásolhatjuk a transzkripciót. Ha a sejteket kedvezőtlen hőmérsékleten növesztjük, igen sűrű tenyészetet kaphatunk, mielőtt megváltoztatjuk a hőmérsékletet abból a célból, hogy az IGF I és IGF II prepolipeptideket kifejezzük. A találmány szerinti molekulába más ké-

pelességeket is bevihetünk. Például egyes gének felelősek a sokszorozódásért, a gazdasejtet ért stressz hatására nem csupán a stresszre válaszoló gén sokszorozódik, de a határos régiók is. Ha a promotor, a kódoló régió és más, a prepolipeptid transzkripció szabályozásáért felelős regulációs szignálok elé egy ilyen gént helyezünk, és az élesztő gazdasejtet stresszállapotba hozzuk, úgy olyan plazmidokat kaphatunk, amelyekben több ismétlődő szekvencia van, ezek a szekvenciák pedig tartalmazzák a prepolipeptid gént a regulációs szekvenciákkal együtt. A jelen leírásban a metallo-tionein és a dihidrofolát redukáz géneket használjuk.

A találmány szerinti molekula a vezérszekvenciát hordozó fragmensen kívül a gazdasejt genomjával homológ más dezoxiribonukleinsav-fragmenseket is tartalmazhat. Szükség esetén integrálhatjuk az IGF-gént a kromoszómába, ezt úgy érhetjük el, hogy az IGF-gént a gazdasejt kromoszomális dezoxiribonukleinsavával homológ szekvenciák határolják.

A használt replikációs rendszert az élesztőgazdasejt felismeri. Így előnyös, ha a replikációs rendszer természetes az élesztőgazdasejt számára. Botstein és munkatársai [Gene, 8, 17-24. (1979)] több élesztővektort ismertettek. Különösen érdekesek az YE_p-plazmidok, amelyek tartalmazzák az élesztő két mikronos plazmidjának replikációs rendszerét. Ezek a plazmidok stabilan fennmaradnak, sejtenként több másolatban. Használhatjuk az ARS1 és CEN4 kombinációkat a stabil fenntartáshoz (ARS: autonóm replikálódó szekvencia; CEN: kromoszóma centomer szakasz). A molekulák manipulációját követően, szükség szerint, klónozzuk azt, úgy, hogy tisztán és megfelelő mennyiségben kapjuk meg a további kísérletekhez. Előnyösen használhatunk úgynevezett ingázó vektort (élesztő és bakteriális eredetű replikációs origót is tartalmaz), úgy, hogy a klónozást prokariótasejtben, különösen E. coli-ban is elvégezhessük.

A plazmidokat bármely megfelelő módszerrel bejuttathatjuk az élesztősejtbe, használhatunk élesztősejte-

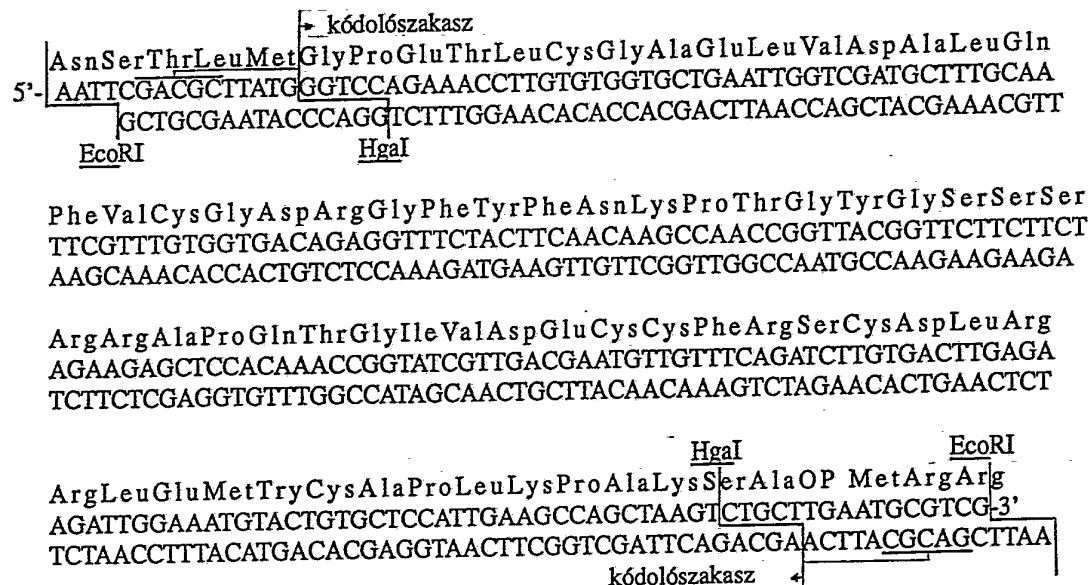
ket vagy szferoplasztokat, és kalciumionokkal kicsapott dezoxiribonukleinsavat vagy liposzómákat, vagy [lásd például Hitzemann és munkatársai: Nature 293: 717-720 (1981), Beggs: Nature 275: 104-109 (1978) és Hinen és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933 (1978)] más, ismert technikákat. A módosított gazdasejteket az expressziós plazmid előállítására használt vektorban általában jelen lévő genetikai markerek segítségével szelektáljuk. Használhatunk auxotróf gazdasejtet, ebben az esetben a plazmid egy olyan gént hordoz, amely kiegészíti a gazdasejt kromoszomális hiányát és prototrófiát okoz. Egy megfelelő biológiailag aktív anyaggal, például antibiotikummal, nehézfémekkel, toxinnal vagy más, hasonlóval szembeni rezisztenciát biztosító, és a plazmidban jelen lévő markert is használhatunk. A szelekciót ekkor úgy véghezvük, hogy a szülői sejtek növekedését meg nem engedő táptalajon tenyésztünk, így szelektáljuk a plazmidot hordozó sejteket. A plazmidot tartalmazó sejtek megfelelően kiegészített táptalajon növekednek, és az adott, szekretált polipeptid ismert technikákkal, például kromatográfiával, szűréssel, extrahálással stb. izolálható. Mivel a polipeptid a tápközegben érett alakban van jelen, az adott polipeptid folyamatos eltávolítása után a tápközeg recirkuláltatható.

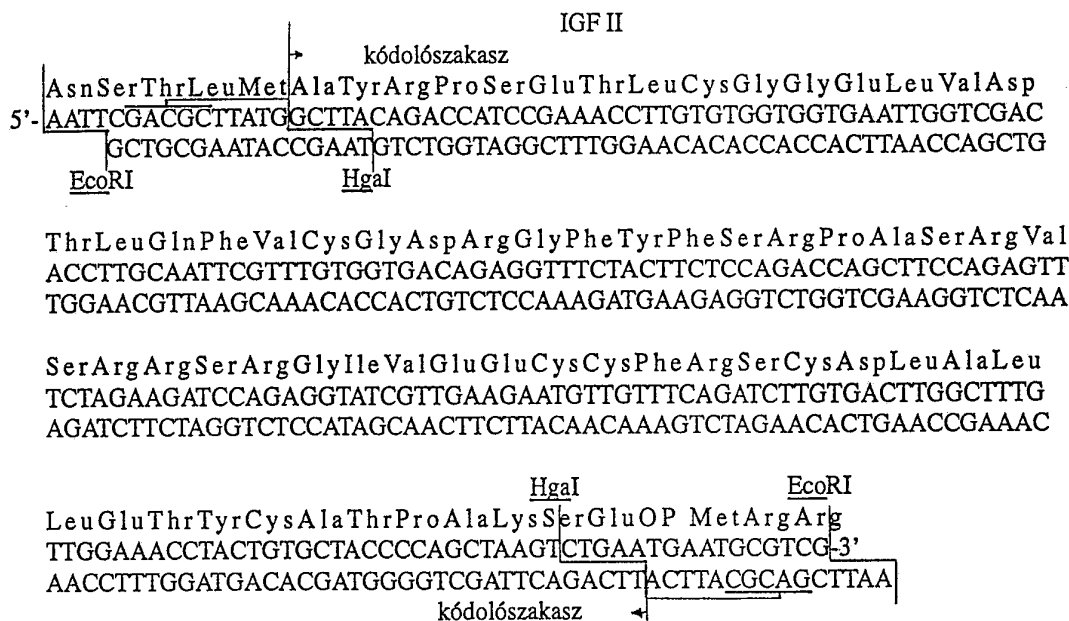
Az alábbi példákban szemléltetjük a találmányt, a példák szemléltető jellegűek, a leírás oltalmi körét nem szűkítik.

Példa

A humán inzulinszerű növekedési faktorokat (IGF I és IGF II) meghatározó nukleotidszekvenciákat Rinderknecht és Humbel [J. Biol. Chem., 253, 2769-2776. (1978)] és Rinderknecht és Humbel [FEBS Letters, 89, 283-286. (1978)] által közölt aminosav-szekvenciák alapján terveztük úgy, hogy az élesztő szempontjából előnyös kodonok legyenek jelen. Az 5'-3' irányú (a kódolósálak iránya) szekvencia a következő:

IGF I





A szekvencia mindkét végén EcoRI kohéziv végeket tartalmaz. Az IGF I kódja a kódolósál 16. nukleotidjánál kezdődik, és a 225-nél fejeződik be. Az IGF I szekvenciát kódoló régió mindkét végén HgaI restrikciós helyek vannak. A HgaI felismerőhelyek (5'-GACGC-3') az IGF I kódolórégióján kívül helyezkednek el, azaz a szintetikus szekvencia vége és a HgaI hasítási hely között. Az IGF II szintetikus szekvenciát

hasonlóképpen szerkesztettük, a kódolósál a 16. bázisnál kezdődik, és a 219-nél fejeződik be.

Az előzőekben megadott IGF I szekvenciát meghatározó szintetikus DNS-fragmenst úgy állítjuk elő, hogy a foszfor-amitid-módszerrel [lásd Urdea és mtsai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7461-7465. (1983)] hús, egymást átfedő ssDNS-szegmenst szintetizálunk. Az alábbiakban megadjuk az ssDNS-szekvenciákat:

Jelzés	Szekvencia
A	AATTCGACGCTTATGG
B-I-1	GTCCAGAAACCTTGTGTGGT
C-I-2b	GCTGAATTGGTC
C-I-2a	GATGCTTTGCAATTCGT
D	TTGTGGTGACAGAGTTTCTACTTC
I-3	AACAAGCCAACCGTTACGTTCTTCTTC
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	AACCGGTTGGCTTGTGTAAGTAGAAAC
I-12	TGGAGCTCTTCTAGAAGAAGAACCGT
I-13	GAAACAACATTCGTCAACGATACCGGTTTG
N-I-14	CCAATCTTCTCAAGTCACAAGATCT
I-15	GGCTTCAATGGAGCACAGTACATT
I-16	AATTCGACGCATTCAAGCAGACTTAGCT

Az ssDNS-szegmenseket az alábbiak szerint eljárva kapcsoljuk össze:

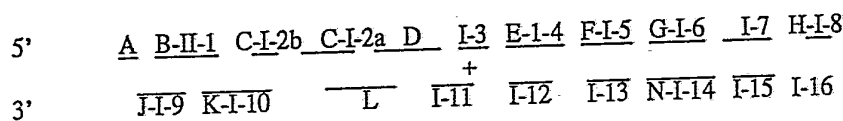
T4 polinukleotid-kinázal 5'-foszforilezünk 50 pmól-nyi mennyiségű szegmenst, mindegyiket, kivéve az A és I-16 jelűt. Ezután 18 µl reakcióelegyben 50-50 pmól-nyi szegmenseket egyetlen lépésben összekapcsolunk úgy, hogy 1,5 óra alatt 95 °C hőmérsékletre 25 °C-ra hűtjük a

reakcióelegyet. A ligálást 30 µl reakcióelegyben végézzük, amely az alábbi összetételű:

- | | |
|----|--|
| 55 | 1 mmól adenosin-trifoszfát, |
| | 10 mmól ditiotritol, |
| | 100 mmól triszhidrogén-klorid, pH=7,8, |
| | 10 mmól magnézium-diklorid, |
| | 1 µg/ml spermidin és |
| 60 | T4 ligáz. |

Az 1. ábrán mutatjuk be a megfelelő sorrendben párosított fragmensekből előállított kétszállú fragmenst, amit 7% natív poliakrilamidot tartalmazó gélen elektroforézissel tisztítunk.

I. ábra
Az IGF I összekapcsolásának és ligálásának reakciósémája

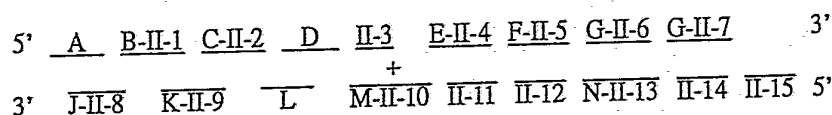


Hasonlóképpen szintetizáljuk az IGF II DNS-szekvenciáját. Ehhez az alábbi, további ssDNS-fragmenseket állítjuk elő:

Jelzés	Szekvencia
B-II-1	CTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGT
C-II-2	GGTGAATTGGTTCGACACCTTGCAATTCGT
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 pmól fenti ssDNS-fragmenseket és az A-, D- és L-fragmenseket az előzőekben megadott módon összekapcsolunk, azzal a különbséggel, hogy az A és II-15 fragmenseket T4 polinukleotid-kinázal nem foszforilezzük. Ekkor a 2. ábrán megadott sorrendű és párosítású szegmenseket kapjuk.

2. ábra
Az IGF II összekapcsolásának és ligálásának reakciósémája



A szintetikus DNS-szekvenciákat a pBR328 plazmid EcoRI restrikciós helyére építjük be, miután megkapjuk a p328IGF I és p328IGF II plazmidokat. Klónozás után az IGF-kódolószálakat HgaI endonukleázal kihalásztuk. A fenti általános módszert részletesen ismertetik Urdea és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7461-7465 (1983).

A HgaI restrikciós fragmensekhez ezután szintetikus oligonukleotid adaptermolekulákat ligálunk, ugyan- csak Urdea szerint. Az IGF I esetén az alábbi adapter-szekvenciákat használjuk:

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

szintetikus szekvencia 5'-végén elhelyezkedő HgaI hasítási helyel, míg az első adapter 5'-vége HindIII kohéziv véget eredményez.

A b) jellel jelzett második adaptermolekula 5'-végén komplementer az IGF I szekvencia 3'-végén elhelyezkedő HgaI hasítási helyel, míg az adapter 3'-vége SalI kohéziv véget eredményez.

Az IGF II klónozásakor az alábbi adapterszekvenciákat használjuk:

- c) 5'-AGCTGAAGCT-3'
3'-CTTCGACGAAT-5'
- d) 5'-CTGAATGATAAG-3'
3'-ACTATTCAGCT-5'.

Az orientációt tekintve, az első adaptermolekula c) 3'-végén komplementer az IGF II szintetikus szekvencián levő 5'-végén elhelyezkedő HgaI hasítási helyel, míg az adapter 5'-vége HindIII kohéziv véget eredmé-

nyez. A d) betűvel jelzett második adaptermolekula 5'-végén komplementer az IGF II szintetikus szekvencia második HgaI hasítási helyével, és SalI kohézív véget alakít ki annak 3'-végén.

A szintetikus fragmenseket és a hozzájuk kapcsolt adaptermolekulákat preparatív gélelektroforézissel tisztítottuk, és HindIII és SalI endonukleázokkal előzőleg teljesen emésztett 100 ng mennyiségű pAB113 plazmidhoz ligáljuk. A pAB113 a pAB112 plazmidból származik a három 63 bázispár nagyságú HindIII fragmens deléciójával. A pAB112 egy 1,8 kb nagyságú EcoRI fragmenst tartalmaz az élesztő α -faktor génjével, amit a pBR322 plazmid EcoRI helyére klónoztunk, amely pBR322-ből a HindIII és SalI helyeket kivágtuk. A pAB112 a pAB101 plazmidból származik, amely utóbbi részleges Sau3A fragmenszen hordozza az élesztő α -faktor génjét; a fragmenst az YEp24 plazmid BamHI helyére klónoztuk. A pAB101 plazmidot úgy kaptuk, hogy YEp24 plazmiddal élesztő genomális könyvtárát (génbankot) állítottunk elő, majd enzimatikusan ^{32}P radioaktívan jelzett szintetikus oligonukleotid-próbával szkríneltünk. A próba homológ a publikált α -faktor kódoló régióval [Kurjan és Herskowitz, Abstracts (1981), Cold Spring Harbor meeting on the Molecular Biology of Yeasts, 242. oldal]. A fenti műveleteket ugyancsak Urdea ismertetett módszerével végezzük.

A kapott keverékkel E.coli HB101 sejteket transzformálunk, és izoláljuk az IGF I és IGF II szekvenciát hordozó pAB113-IGF-I pAB113-IGF-II plazmidokat. Az IGF I és IGF II struktúrgéneket hordozó pAB113-IGF-I és pAB113-IGF-II plazmidokat EcoRI enzimmel teljesen emésztjük, és a kapott fragmenseket főlős mennyiségben jelen levő EcoRI-BamHI adaptermolekulákkal ligáljuk, végül BamHI restrikciós endonukleázzal emésztjük.

A reakcióelegyben 5–5 μg plazmid DNS-t használunk. A kapott 1,8 kb nagyságú BamHI fragmenseket preparatív gélelektroforézissel izoláljuk, és a közelítőleg 100 ng-nyi mennyiségű fragmenseket 100 ng pC1/1 plazmidhoz ligáljuk, amely plazmidot előzőleg BamHI endonukleázzal teljesen emésztünk, és alkalis foszfátázzal kezelünk.

A pC1/1 plazmid a pJDB219 egy származéka [Beggs, Nature, 275, 104. (1978)], a plazmidban a pMB9 (pJDB219) bakteriális plazmidnak megfelelő szakaszt a pBR322-vel helyettesítettük. Mindegyik ligációs eleggyel E.coli HB101 sejteket transzformálunk. A transzformánsokat ampicillin-rezisztenciájuk alapján szelektáljuk, és a bennük levő plazmidokat restrikciós endonukleázossal kezeléssel analizáljuk. Az IGF I vagy IGF II struktúrgént hordozó egy-egy szelektált klónból (pYIGF-I-10/1 és pYIGF-II-10/1) DNS-t izolálunk, és ezzel AB103 élesztősejteket transzformálunk. A transzformánsokat leucin pozitív fenotípus alapján szelektáljuk. A fenti transzformációs lépéseket Beggs előző cikke, valamint Maniatis: Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1982) szerint végezzük.

A pYIGF-I-10/1 plazmiddal transzformált AB103 (α , pep 4–3, leu 2–3, leu 2–112, ura 3–52, his 4–580)

élesztőtörzset 5 és 9 literes tenyészetben 30 °C hőmérsékleten növesztjük -leu-táptalajban addig, míg a tenyészet optikai sűrűsége 650 nm-en 5 lesz, majd ezután további 12 órán át tenyésztünk 30 °C hőmérsékleten.

Centrifugálással mindkét tenyészetből összegyűjtjük a sejtfelülúszót, és az IGF I polipeptidet ioncserélő oszlopon (Biorex-70, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, California) abszorbeálva koncentrálnak. A terméket 10 mmól hidrogén-kloridot tartalmazó, 80%-os etanollal eluáljuk, a 0,4 ml és 3 ml térfogatú IGF I frakciókat teljes proteintartalomra és IGF I koncentrációra vizsgáljuk. A proteintartalmat Coomassie Blue módszerrel határozzuk meg (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, California).

Az IGF I koncentrációt az ismert kompetitív radioimmúnassay-vel mérjük, radioaktívan jelzett IGF I-et használva. Az eredményeket az alábbiakban közöljük:

Vizsg. száma	Térfogat	Koncentráció utáni térfogat	Össz-protein	IGF-I
1.	5 liter	0,4 ml	5,0 mg/ml	3,75 mg/ml
2.	9 liter	3,0 ml	2,9 mg/ml	3,00 mg/ml

A mérést Zapf és munkatársai: J. Clin. Invest. 68: 1321–1330 (1981) szerint végezzük.

Az IGF I mérés azon alapszik, hogy a peptid szinergista hatású a galambbegy-prolaktinra adott válaszában erősítésében [Anderson és munkatársai, Somatomedins/Insulin-Like Growth Factors, Spencer szerkesztése, Walter de Gruyter, Berlin (1983)]. A biológiai mérés alátámasztja, hogy a készítményekben levő IGF I termék azonos hatású a humán szérumból izolált autentikus IGF I termékkel.

A fentiekhez hasonlóan tenyésztve az AB103 (pYIGF-II-10/1) törzset, és humán placental membrán radio-receptorassay-vel meghatározva az IGF II koncentrációt [Spencer és munkatársai, Act. Endocrinol., 91, 36–48. (1979)], úgy találtuk, hogy a tenyészetekben 3,9 egység/ml, míg a normál humán szérumban 1 egység/ml IGF II aktivitás van.

A találmány szerinti eljárással új DNS-molekulákat állítunk elő, ezek a humán inzulinszerű növekedési faktor (I) kifejezésére, termelésére és szekréciójára használhatók. Tehát olyan polipeptidet állíthatunk elő, amely azonos szekvenciájú a természetesen előforduló humán I inzulinszerű növekedési faktorról. A szekréció biztosításával adott sejtpopulációból nagymértékben megnövekedett hozamot biztosíthatunk, és az ezután következő izolálási és tisztítási lépések egyszerűsödnek.

Bár a találmányt annak szemléltetése során részletesen ismertettük, és példát adtunk meg a világos érthetőség kedvéért, nyilvánvaló, hogy a találmány oltalmi körének szűkítése nélkül bizonyos változtatásokat és módosításokat eszközölhetünk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán inzulinszerű I vagy II növekedési faktorok (IGF) hatékony előállítására megfelelő gazdaszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy

- i) egy IGF I vagy IGF II polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát állítunk elő, ezt az IGF I vagy IGF II polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát megfelelő leolvasási fázisban összekapcsoljuk egy olyan DNS-szekvenciával, amely az adott gazdaszervezet által felismert szekréción vezér és processzor szignálszekvenciákat határoz meg, ezek 3' irányban helyezkednek el az őket transzkripció szinten

szabályozó, a gazdaszervezet által felismerhető transzkripció régiótól; az így kapott DNS-molekulával gazdaszervezetet transzformálunk;

- ii) a transzformált sejteket tenyésztjük; és
5 iii) a transzformált gazdaszervezet tenyészetéből izoláljuk a szekretált humán IGF I vagy IGF II polipeptideket.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezet által előnyben részesített kodonokat tartalmazó szintetikus IGF-gént alkalmazunk.
10 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán IGF-génként egy alábbi nukleotidszekvenciájú szintetikus IGF I gént alkalmazunk:

GlyProGluThrLeuCysGlyAlaGluLeuValAspAlaLeuGln
5'-GGTCCAGAAACCTTGTGTGGTGCTGAATTGGTCGATGCTTTGCAA
CCAGGTCTTTGGAACACACCACGACTTAACCAGCTACGAAACGTT

PheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheAsnLysProThrGlyTyrGlySerSerSer
TTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCAACAAGCCAACCGTTACGGTTCTTCTCT
AAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGTTGTTGGTTGGCCAATGCCAAGAAGAAGA

ArgArgAlaProGlnThrGlyIleValAspGluCysCysPheArgSerCysAspLeuArg
AGAAGAGCTCCACAAACCGGTATCGTTGACGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGAGA
TCTTCTCGAGGTGTTTGGCCATAGCAACTGCTTACAACAAAGTCTAGAACTGAACCTCT

ArgLeuGluMetTyrCysAlaProLeuLysProAlaLysSerAla
AGATTGGAAATGTAAGTCTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCT-3'
TCTAACCTTTACATGACACGAGGTAAGTCTCGGTTCGATTTCAGACGA

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy humán IGF-génként egy alábbi nukleotidszekvenciájú szintetikus IGF II gént alkalmazunk:

AlaTyrArgProSerGluThrLeuCysGlyGlyGluLeuValAsp
5'-GCTTACAGACCATCCGAAACCTTGTGTGGTGGTGAATTGGTCGAC
CGAATGTCTGGTAGGCTTTGGAACACACCACCACTTAACCAGCTG

ThrLeuGlnPheValCysGlyAspArgGlyPheTyrPheSerArgProAlaSerArgVal
ACCTTGCAATTCGTTTGTGGTGACAGAGGTTTCTACTTCTCCAGACCAGCTTCCAGAGTT
TGGAACGTTAAGCAAACACCACTGTCTCCAAAGATGAAGAGGTCTGGTTCGAAGGTCTCAA

SerArgArgSerArgGlyIleValGluGluCysCysPheArgSerCysAspLeuAlaLeu
TCTAGAAGATCCAGAGGTATCGTTGAAGAATGTTGTTTCAGATCTTGTGACTTGGCTTTG
AGATCTTCTAGGTCTCCATAGCAACTTCTTACAACAAAGTCTAGAACTGAACCGAAAC

LeuGluThrTyrCysAlaThrProAlaLysSerGlu
TTGGAAACCTACTGTGCTACCCAGCTAAGTCTGAA-3'
AACCTTTGGATGACACGATGGGGTTCGATTTCAGACTT

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdaszervezetként élesztősejtet használunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdaszervezetként élesztősejtet, és hordozó DNS-ként az élesztő két mikronos plazmidjának egy származékát használjuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás a humán inzulinszerű növekedési faktor (IGF) előállítására élesztőben, *azzal jellemezve*, hogy

előállítunk egy olyan első DNS-fragmenst, amely tartalmaz egy IGF-polipeptidet meghatározó első DNS-szekvenciát, és ennek kódolószálnak 5'-vége a nevezett DNS-szekvencia első bázisa mellett, vagy attól 3' irányban helyezkedik el;

egy olyan második DNS-fragmenst állítunk elő, amely egy második, az élesztősejtek által felismerhető szekréción és processzorszignálokat kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, és kódolószálnak 3'-vége a nevezett

processzorszignál utolsó bázisa mellett, vagy ettől 5' irányban található, és a nevezett első és második fragmens legalább egyikének vége a kódolószekvencián belül helyezkedik el, aminek eredményeképpen bázispárok esnek ki;

a nevezett első és második DNS-fragmenseket a nevezett első és második DNS-fragmensek hiányzó bázispárjait kódoló adaptermolekulával összekapcsoljuk, amikor a nevezett első és második DNS-fragmens azonos leolvasási fázisba kerül;

az első fragmenstől 3' irányba és annak szomszédságába egy terminációs kodont építünk be, majd

a kapott gént élesztő expressziós vektorba klónozzuk és kifejezzük.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás IGF előállítására, *azzal jellemezve*, hogy IGF-ként IGF I-et fejezzük ki.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás IGF előállítására, *azzal jellemezve*, hogy IGF-ként IGF II-t fejezzük ki.

5 10. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a baktériumok által felismerhető replikációs rendszert tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.

10 11. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az élesztő 2 mikronos plazmidjából, vagy annak egy részéből álló élesztő replikációs rendszert tartalmazó expressziós vektort alkalmazunk.