

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 814172 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 814172

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 28.12.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 28.12.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 03.07.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

02.01.1981 US 222044

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Goeddel, David Van Norman, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Itakura, Keiichi, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Kleid, Dennis F., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Ihmisen proinsuliini ja sen kanssa analogisia yhdisteitä sekä menetelmä niiden valmistamiseksi mikrobiselpolypeptidi-
ekspressoinnilla ja niiden muuttaminen ihmisen insuliinikinsuliiniksi.**

**Människo-proinsulin och därmed analoga föreningar och framställningsmetod genom mikrobiell
polypeptid-expressexpression och överföring därav i människo-insulin.**

Ihmisen proinsuliini ja sen kanssa analogisia yhdisteitä sekä menetelmä niiden valmistamiseksi mikrobisella polypeptidi-ekspressoinnilla ja niiden muuttaminen ihmisen insuliiniksi

5

Tämä patenttihakemus on yhteydessä eurooppalaisten patenttihakemusjulkaisujen n:o 0001930 (A.N. 78300597.8) päivätty 16.5.1979, ja 0036776 (A.N. 81301227.5), päivätty 30.9.1981, esityksiin ja niihin viitataan tässä.

10

Keksinnön kohteena on polypeptidien mikrobinen ekspressointi. Sen yhtenä kohteena on geenien valmistus ihmisen insuliinin valmistukseen käyttökelpoisten välituotteiden mikrobista ekspressointituotantoa varten. Sen toisena kohteena on ihmisen proinsuliinin tai sen kanssa analogisten yhdisteiden, jotka poikkeavat ihmisen proinsuliinista "C"-ketjuosassa, valmistus. Vielä on sen kohteena ihmisen insuliinin valmistaminen valmistetusta ihmisen proinsuliinista tai sen kanssa analogisesta yhdisteestä.

15

20

Ihmisen tila, jota luonnehtii haiman kyvyttömyys kehittää polypeptidihormonia insuliini riittävässä määrissä, hoidetaan ainakin vakavissa tapauksissa antamalla ruiskeena insuliinia, joka on peräisin teurastettujen eläinten haimoista. Erityisesti naudan ja sian insuliinia käytetään tähän tarkoitukseen.

25

Eläinperäisen insuliinin käyttö on epätydyttävää ainakin kahdelta näkökannalta. Ensinnäkin insuliinin uuttaminen teurastettujen eläinten haimoista on monimutkainen prosessi, joka vaatii suuria määriä elimiä. Toiseksi, ja tärkeämpää diabeetikon kannalta on, että eläinlähteistä peräisin oleva insuliini ei ole kemiallisesti samanlaista kuin ihmisen insuliini poiketen peptidi-yksiköiden sekvenssissä. Lisäksi se sisältää joskus ei-homologisia eläinhormoneja, kuten vastaavaa proinsuliinia, vaikkakin pienissä määrissä. Seurauksena tästä eläinperäisellä insuliinilla hoidettujen potilaiden vasta ei ole niin tyydyttävä kuin

30

35

toivotaan. Esimerkiksi immuunivasteen eläin-insuliinille uskotaan olevan kroonisten sivuhäiriöiden lähde sokeritaudin tietyissä hoidoissa.

Niinmuodoin on jo kauan ollut olemassa täyttämätön
 5 tarve löytää insuliinin, joka on kemiallisesti samanlainen kuin ihmisen insuliini ja muiden biologisesti aktiivisten epäpuhtauksien saastuttamaton, lähde, joka antaa riittäviä määriä diabeetikkojen hoitamiseksi taloudellisesti. Tämän tehtävän tekee monimutkaiseksi ihmisen insuliinin monimut-
 10 kainen kemiallinen rakenne. Rakenteellisesti sillä on kaksi polypeptidi-ketjua, joita nimitetään "A" ja "B"-ketjuiksi, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa disulfidi-sidoksin. A-ketju, joka on pituudeltaan n. 21 aminohappoyksikköä, on sitoutunut (silloittunut) B-ketjuun, jossa on 30 aminohappoa, disulfidi-
 15 sidoksin aminohapposysteiniyksiköiden välissä kummassakin ketjussa.

Ollakseen maksimaalisen tehokas ihmisissä täytyy insuliinin aminohappoyksiköiden olla täsmällisesti järjestyneinä vastaamaan in vivo tuotettua. Molekyylin monimutkai-
 20 suus on kuitenkin sellainen, että tavalliset kemialliset synteesimenetelmät eivät sovi sen valmistukseen, ainakaan kaupallisessa mittakaavassa.

Insuliinia syntyy in vivo haimassa esiproinsuliinin muodossa. Esiproinsuliini on polypeptidi, joka sisältää A-
 25 ketjun 21 yksikköä, B-ketjun 30 yksikköä, 35 yksikön silloitus- eli yhdysketjun, jota nimitetään C-ketjuksi, ja 24:n aminohapon "esisekvenssin" (Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala) liittyneenä N-pääte-fenyylialaniini-aminohappoon,
 30 joka aloittaa B-ketjun. Proinsuliini, josta esisekvenssi puuttuu, on esitetty kuvassa 1, jossa on metioniini-aminohappo esisekvenssin paikalla. Tämä esisekvenssi ottaa osaa erityykseen soluista, joissa sitä syntyy. Kun esiproinsuliinia erittyy saarekesoluista haimalla, esisekvenssi poistuu
 35 jättämään proinsuliini-ketjun. Tämä ketju taittuu raken-

teeksi, jossa muodostuu kolme disulfidi-sidosta, joista kaksi on proinsuliinin A- ja B-ketjuosien välissä. Yhdistävä C-ketju poistetaan sitten proteolyyttisesti jättämään jäännös, joka on insuliini, joka koostuu A- ja B-ketjuista disulfidid-
 5 sidosten yhteensitomina.

Tässä patenttihakemuksessa selostetaan menetelmä ihmisen insuliinin ja ihmisen proinsuliinin sekä niiden kanssa analogisten yhdisteiden, jotka poikkeavat ihmisen proinsuliinista C-ketjun muodostavassa aminohapposekvenssissä,
 10 saamiseksi. Menetelmässä käytetään vastakehitettyä rekombinantti-(yhdistelmä-) DNA-teknologiaa. Tämän teknologian elementtien seuraava selostus antaa taustan keksinnön yksityiskohtaiselle kuvaamiselle.

Rekombinantti-DNA-teknologian tulon myötä hyödyllisten
 15 polypeptidien säädetty bakteeri-tuotanto on tullut mahdolliseksi. Nyt on saatu bakteereita, jotka on modifioitu tällä teknologialla, sallimaan sellaisten polypeptidi-tuotteiden kuin somatostatiini (K. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977)), ihmisen insuliinin (komponentti) A- ja B-ketjujen
 20 (D.V. Goeddel et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979)) ja ihmisen kasvuhormonin (D.V. Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)) valmistus. Sellainen kyky tällä teknologialla on, että itse asiassa mikä tahansa polypeptidi voidaan valmistaa bakteerien avulla asettaen ulottuville hormo-
 25 nien, entsyymien, vasta-aineiden ja rokotteiden, jotka ovat hyödyllisiä suurta joukkoa tauteja vastaan, hallitun valmistuksen. Mainitut ainekset, jotka yksityiskohtaisemmin kuvaavat edustavia esimerkkejä, joihin edellä viitattiin, esitetään tässä viittein samoin kuin muut julkaisut, joihin viitataan
 30 jäljempänä keksinnön taustan valaisemiseksi.

Rekombinantti-DNA-teknologian työjuhta on plasmidi, kaksisäikeisen DNA:n ekstra-kromosomaalinen silmukka, jota esiintyy bakteereissa, usein moninkertaisina kopioina bakteerisolua kohti. Plasmidi-DNA:han koodattuun informaatioon
 35 sisältyy informaatio, joka tarvitaan jäljentämään plasmidi

tytärsoluihin (ts. "replikoniin") ja tavallisesti yhden tai useamman valintaominaisuuden, kuten resistenssin antibiooteille, mikä sallii kiinnostavan plasmidin sisältävän isäntäsolun kloonien tunnistamisen ja viljelyn etuoikeutetusti valikoivissa väliaineissa. Plasmidien, jotka voidaan ottaa talteen ja eristää isäntä-mikro-organismista, hyväksikäyttö perustuu siihen, että ne voidaan spesifisesti pilkkoa yhdellä tai useammalla restriktio-endonukleasilla eli "restriktioentsyymillä", joista jokainen tunnistaa eri kohdan plasmidi-DNA:lla. Sen jälkeen erilajisia geenejä tai geeni-osasia voidaan kytkeä plasmidiin liittämällä päittäin pölkökohtaan tai uudelleenmuodostettuihin päihin pilkontakohdan vieressä.

Käsite "heterologinen" (vieraslajinen), kuten sitä tässä käytetään, tarkoittaa geeniä, jota ei tavallisesti esiinny isäntä-mikro-⁵organismissa, tai polypeptidisekvenssiä, jota isäntä-mikro-organismi ei tavallisesti tuota, kun taas käsitteellä "homologinen" (samankaltainen) tarkoitetaan geeniä tai polypeptidiä, jota syntyy isäntä-mikro-organismissa, kuten E. coli:ssa. DNA-rekombinaatio suoritetaan mikro-organismin ulkopuolella, mutta saatu "rekombinantti"-plasmidi voidaan tuoda mikro-organismiin menetelmällä, joka tunnetaan transformointina, ja suuria määriä erilajisen geenin sisältävää rekombinantti-plasmidia voidaan saada viljelemällä transformanttia. Lisäksi, kun geeni on oikein kytketty plasmidien osien suhteen, jotka hallitsevat koodatun DNA-viestin transkriptiota ja translaatiota, ohjaa syntynyt plasmidi eli "ekspressointi-siirtäjä", kun se yhdistetään isäntä-mikro-organismiin, polypeptidisekvenssin, jota kytketty geeni koodaa, valmistumista, prosessia, jota nimitetään ekspressoinniksi.

Ekspressointi aloitetaan alueella, joka tunnetaan promoottorina, joka tunnistetaan RNA-polymeraasilla ja sidotaan sillä. Joissakin tapauksissa, kuten trp-operoinnissa, jota käsitellään jäljempänä, limittyvät promoottori-

alueet "operaattori"-alueilla muodostaen yhdistetyn promoot-
 tori-operaattorin. Operaatiot ovat DNA-sekvenssejä, jotka
 ns. repressori-proteiinit tunnistavat, joiden tehtävänä on
 säädellä transkription aloituksen taajuutta jollakin nimen-
 omaisella promoottorilla. Polymeraasi kulkee pitkin
 DNA:ta transkriboiden koodaussäikeen sisältämän informaation
 sen 5'-päästä 3'-päähän lähetti-RNA:han, joka vuorostaan trans-
 latoidaan polypeptidiin, jolla on aminohappo-sekvenssi,
 jota DNA koodaa. Jokaista aminohappoa koodaa erikoinen
 nukleotidi-kolmikko eli "kodoni", jonka sisällä olevaa voi-
 daan näitä tarkoituksia varten nimittää "rakenne-geeniksi",
 ts. se osa, joka koodaa ekspressoidun tuotteen aminohappo-
 sekvenssin. Promoottoriin sitomisen jälkeen RNA-polymeraasi
 transkriboi ensin nukleotidit, jotka koodaavat ribosomi-sito-
 miskohtan, sitten translaation aloituksen eli "aloitus"-
 signaalin (tavallisesti ATG, josta syntyneessä lähetti-RNA:ssa
 tulee AUG), sitten nukleotidikodonit itse rakennegeenissä.
 Ns. lopetus-kodonit transkriboidaan rakennegeenin päässä,
 minkä jälkeen polymeraasi muodostaa lähetti-RNA:n lisä-
 sekvenssin, joka, lopetus-signaalin läsnäolon vaikutuksesta
 jää ribosomeilta translatoimatta. Ribosomit sitoutuvat lähet-
 ti-RNA:lla aikaansaatuun sitomiskohtaan, bakteereissa ta-
 vallisesti, kun mRNA muodostuu, ja ne itse tuottavat koodatun
 polypeptidin, aloittaen translaation alotus-signaalista ja
 lopettaen edellä mainitulla lopetus-signaalilla. Haluttu tuo-
 te syntyy, jos sekvenssit, jotka koodaavat ribosomin sito-
 miskohtan, ovat sijoittuneet oikein AUG-alotuskodonin suh-
 teen ja jos kaikki jäljellä olevat kodonit seuraavat alotus-
 kodonia vaiheessa. Syntynyt tuote saadaan hajottamalla isän-
 täsolu ja ottamalla tuote talteen sopivalla puhdistamisella
 muusta mikro-organismiproteiinista.

Polypeptidit, jotka ekspressoidaan käyttämällä rekombinantti-DNA-teknologiaa, voivat olla kokonaan vieraslajisia, kuten ihmisen kasvuhormonin suoran ekspressoinnin tapauksessa, tai vaihtoehtoisesti ne käsittävät vieraslajisen

polypeptidin sekä, siihen yhdistyneenä, ainakin osan homologisen peptidin aminohappo-sekvenssistä, kuten välituotteiden valmistuksen tapauksessa somatostatiinia ja ihmisen insuliinin aineosia varten. Jälkimmäisissä tapauksissa, esimerkiksi, yhdistynyt homologinen polypeptidi käsitti osan aminohappo-sekvenssistä beta-galaktosidaasia varten. Niissä tapauksissa aiottu bioaktiivinen tuote bioinaktivoituu yhdistyneen, homologisen polypeptidin vaikutuksesta kunnes jälkimmäinen pilkkoutuu pois solun ulkopuolisessa ympäristössä. Yhdistyneet proteiinit, kuten juuri edellä mainitut, voidaan suunnitella suorittamaan erittäin spesifinen prekursoriproteiinin lohkaus aiotusta tuotteesta, kuten syaanibromidin vaikutuksella metioniiniin, tai vaihtoehtoisesti entsymaattisesti pilkkomalla. Ks. esim. brittiläinen patenttijulkaisu n:o 2 007 676 A.

Ihmisen insuliinia on tähän saakka saatu käyttäen rekombinantti-DNA-tekniikan menetelmiä. Menetelmässä käytettiin synteettistä geeniä A-ketjua varten, joka ekspresoidaan *E. coli*:ssa ja erillistä synteettistä geeniä B-ketjua varten, joka ekspresoidaan toisessa *E. coli*:ssa. D.V. Goeddel et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 76, 106 (1979). Nämä kaksi ketjua saadaan kimeerisinä polypeptideinä (proteiineina), jotka sisältävät halutun aminohappo-sekvenssin (joko A- tai B-ketju-sekvenssin) sidottuna toiseen osaan kanninpolypeptidissa, joka on tarkoitettu suojaamaan haluttua sekvenssiä proteaaseilta *E. coli*:ssa. Kimeerisillä proteiineilla on A- tai B-ketjun halutun polypeptidisekvenssin vieressä selektiivinen pilkontakohta, joka sallii halutun sekvenssin erottamisen kanninpolypeptidistä. Näiden kahden sekvenssin eristämistä seuraa disulfidi-sidosten muodostaminen in vitro.

Tätä prosessia monimutkistaa välttämättä se, että täytyy saada ja ylläpitää kaksi erillistä geneettisesti modifioitua bakteerikantaa. Lisäksi aikaisempi prosessi vaatii A- ja B-ketjun eristämisen erikseen ja näiden kahden

ketjun silloittamisen muodostamalla disulfidi-sidokset ilman suuntaamisapua, jonka antaa koskematon C-ketju.

Tässä patenttihakemuksessa kuvataan menetelmä yhden ainoan geenin rakentamiseksi ekspressoimaan yhdessä ainoassa mikro-organismissa kimeerinen proteiini, joka sisältää 5 täydellisen ihmisen proinsuliini-polypeptidin tai sen kanssa analogisen yhdisteen, joka poikkeaa ihmisen insuliinista ainoastaan C-ketjun aminohappo-sekvenssissä. Ihmisen insuliini voidaan puhtaasti poistaa näistä polypeptideistä disulfidisilloitusten in vitro-muodostamisen jälkeen A- ja B-ketjujen välille. 10

Tällä menetelmällä voidaan proinsuliinia ja sen kanssa analogisia yhdisteitä saada suoraan pääasiallisesti puhtaassa muodossa ja vapaana biologisesti aktiivisista epäpuhtauksista. Samoin voidaan proinsuliineja tehokkaasti käsitellä insuliinin saamiseksi, joka on kemiallisesti samanlaista kuin ihmisen insuliini ja samoin vapaa biologisesti aktiivisista epäpuhtauksista, mikä siten lupaa ihmisen sokeritaudin tehokkaamman hoidon kuin on mahdollista eläinperäistä insuliinia käyttäen. 15 20

Tämä keksintö antaa menetelmän ihmisen insuliinin saamiseksi kimeerisen proteiinin avulla, joka sisältää ihmisen proinsuliinin tai sen kanssa analogisen yhdisteen, joka poikkeaa ihmisen proinsuliinin polypeptidisekvenssistä aminohappojen sekvenssissä, polypeptidisekvenssin, joka sisältää C-ketjun, joka on yhdistynyt lisäproteiiniin selektiivisen pilkontakohdan vieressä, joka sallii proinsuliinin tai sen kanssa analogisen yhdisteen lohkaisemisen lisäproteiinista. Lohkaistu proinsuliini-tuote saatetaan sitten suuntautumaan muodostamalla luonteenomaisesti insuliini A- ja B-ketjun disulfidi-silloitukset ja silloitettu insuliini-prekursori poistetaan sitten "C"-ketjukantimesta. 25 30

Tämän keksinnön mukaisesti tehtyjen analogisten proinsuliinien aminohappoyksikköjen "C"-ketju (eli, tämän jälkeen, silloitusketju) voi sisältää niinkin vähän kuin 35

2 aminohappoyksikköä. Aminohappoyksikköjen identtisyys ja sekvenssi silloitusketjujen päiden välissä ihmisen pro-insuliinin kanssa analogisissa yhdisteissä eivät ole erityisen merkityksellisiä. Niiden pääteyksiköiden täytyy
 5 kuitenkin olla yksiköitä, jotka sallivat silloitusketjun helpon poistamisen ihmisen insuliinin A- ja B-ketjuista. Edullisesti poistaminen tapahtuu sen jälkeen, kun proinsuliinimolekyyli on lohkaistu kimeerisen polypeptidin lisäproteiinista, ja edullisimmin sen jälkeen kun täten loh-
 10 kaistu proinsuliinimolekyyli on taittunut ja disulfididokset A- ja B-ketjujen välissä, jotka ovat luonteenomaisia ihmisen insuliinille, ovat muodostuneet. Lisäksi silloitusketjussa on edullisesti kohtia, jotka sallivat sen poistamisen entsyymaattisesti. Edullisia tätä tarkoitusta varten ovat
 15 Arg-Arg- ja Lys-Arg-yksiköt silloitusketjulla, jotka ovat B-ketjun pääte-COOH-pään ja vastaavasti A-ketjun pääte-NH₂-pään vieressä, kuten havaitaan ihmisen proinsuliinissa itsessään. Edullisia ovat myöskin kaksi Arg-Arg-yksikköä B- ja A-ketjujen välissä.

20 Tämän keksinnön kimeeriset proteiinit saadaan ekspres-soimalla heterologinen rakennegeeni proinsuliinia tai sen kanssa analogista yhdistettä varten rekombinantti-mikrobi-kloonaussiirtäjässä, jossa on tämä geeni on koodikaavassa, jossa on DNA-sekvenssi, joka koodaa kimeerisen proteiinin
 25 lisäproteiiniosaa ja pilkontakohtaa. Keksinnön edullisissa suoritustavoissa pilkontakohta on metioniini proinsuliinin N-päänteessä, mikä tekee mahdolliseksi pilkonnan syaanibromidia käyttäen.

Lisäproteiini voi vaihdella, mutta edullinen lisä-
 30 proteiini on metioniini-aminohappo tai esiproinsuliinin esisekvenssi tai sen osa tai β -galaktosidaasin esisekvenssi tai olennainen osa siitä tai osa aminohappo-sekvenssistä, jota koodaa trp-johto-polypeptidin geenin osan, joka on yhdistynyt trp E-polypeptidigeenin tai trp D-polypeptidin osaan.
 35 Lisätty, lopuksi liiallinen kimeerisen proteiinin osa vali-

taan antamaan suojaa bakteeriproteaaseilta, jotka muutoin saattaisivat uuttaa proinsuliinin.

Ehdotettu rekombinantti-mikrobi-kloonaussiirtäjä on modifioitu, edullisesti bakteerinen plasmidi, joka sisältää
 5 rakennegeenin koodikaavassa, jossa on DNA-sekvenssi, joka koodaa kimeerisen polypeptidin lisättyä, liiallista osaa ja selektiivistä pilkontakohtaa.

Tapa, jolla nämä ja muut keksinnön tavoitteet ja edut saavutetaan, käy alaan perehtyneille selväksi edullisten
 10 suoritusmuotojen ja kuvien 1 - 6 esitysten seuraavan selostuksen tarkastelun jälkeen.

Kuva 1 esittää geenin nukleotidisekvenssiä ihmisen proinsuliinia varten, joka on valmistettu keksinnön mukaisesti.

15 Kuva 2 esittää kaaviota plasmidin saamiseksi, joka sisältää osasen kuvan 1 geenistä, joka saatiin käänteis-transkriptiota käyttäen mRNA:sta.

Kuva 3 esittää kaaviota plasmidin saamiseksi, joka sisältää kuvan 1 geenin, joka on sopiva transformoitavaksi
 20 esim. E. coli:in ihmisen proinsuliinin ekspressointia varten.

Kuva 4 kuvaa ihmisen proinsuliinin, joka on saatu ekspressoimalla esim. E. coli-transformantista, joka sisältää kuvan 3 kaaviosta saadun plasmidin, HPLC-kromatografian analyysejä.
 25

Kuva 5 kuvaa geenin segmenttejä ihmisen proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen ekspressoimiseksi, joka poikkeaa ihmisen proinsuliinista C-silloitusketjun aminohapposekvenssissä.

30 Kuva 6 esittää kaaviota plasmidin kokoamiseksi, joka sisältää geenin transformointia varten esim. E. coli:in ihmisen proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen ekspressointia varten.

A. Ihmisen proinsuliinin valmistus

35 1. Synteettisen geenin valmistus, joka koodaa proinsuliinin 32 N-pääte-aminohappoa

a. Oligonukleotidi-synteesi

Sarja, jossa oli 18 oligonukleotidiä, pituudeltaan 10 - 12 yksikön lyhyttä nukleotidiketjua, jotka on esitetty taulukossa 1, valmistettiin ensimmäisenä vaiheena geenin rakentamiseksi, joka koodaa proinsuliinin 32 ensimmäistä aminohappoa, jonka proinsuliinin aminohapposekvenssi on esitetty kuvassa 1 koko geenin, joka lopuksi rakennettiin tämän keksinnön mukaisesti, ihmisen proinsuliinin ekspres- siota varten, nukleotidi-sekvenssin osana. Yksittäiset nukleotidit geenissä tunnistetaan kirjaimista A, T, C tai G, jotka edustavat emäksiä adeniini, tymiini, sytosiini tai guaniini, jotka erottavat yhden nukleotidin toisista.

Taulukko 1

Oligonukleotidit:

15	H1	AATTCATGTT
	H2	CGTCAATCAGCA
	H3	CCTTTGTGGTTC
	H4	TCACCTCGTTGA
	H5	TTGACGAACATG
20	H6	CAAAGGTGCTGA
	H7	AGGTGAGAACCA
	H8	AGCTTCAACG
	B1	AGCTTTGTAC
	B2	CTTGTTTGCGGT
25	B3	GAACGTGGTTTC
	B4	TTCTACACTCCT
	B5'	AAGACTCGCC
	B6	AACAAGGTACAA
	B7	ACGTTACACGCA
30	B8	GTAGAAGAAACC
	B9	AGTCTTAGGAGT
	B10'	GATCCGGCG

Synteettiset nukleotidit on esitetty hakasten välissä ja alleviivattuina kuvassa 1. Nämä oligonukleotidit syntetisoitiin triesteri-menetelmällä. R. Crea et al., Proc. Nat.

Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978), K. Itakura et al., J. Biol. Chem., 250, 4592 (1975) ja K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 97, 7327 (1975). Jotkut näistä ovat nukleotidejä, joita käytettiin geenissä, joka koodaa ihmisen insuliinin B-ketjua, kuten aikaisemmin ovat selostaneet Crea et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978) ja Goeddel et al. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, 106 (1979). Kahden synteettisen nuklotidin (B5' ja B10') nukleotidisekvenssit syntetisoitiin tätä projektia varten; muut valmistettiin Crea et al.:n mukaisesti (supra). Kaksi uutta oligonukleotidia, jotka on myös valmistettu Crea et al.:n mukaisesti, sisältävät restriktioentsyymien tunnistuskohdat HpaII:lle ja pääte-BamHI:lle, joista jälkimmäistä käytetään kloonausta varten. Geenin toinen pää sisältää EcoRI-kohdan yksisäikeisen hännä kloonaustarkoituksia varten.

b. Synteettisten oligonukleotidien liittäminen

Kahdeksaa oligonukleotidia H1-H8 käytettiin etukäteen B-ketjugeenin vasemman puolikkaan rakentamiseen, jota käytettiin tässä menetelmässä ja sitä on kuvannut Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979). Se sisältää koodin B-ketjugeenin 1 - 13 aminohappoa varten ja metioniiniyksikön N-päätteellä, jota käytetään myöhemmin lohkaisemaan proinsuliini bakteerisesti ekspressoidusta kimeerisestä proteiinista käyttäen syaanibromidia (CNBr).

B-ketjugeenin oikea puolikas saatiin oligonukleotideistä B₁, B₂, B₃, B₄, B₅', B₆, B₇, B₈, B₉ ja B₁₀', liittämällä käyttäen T₄-ligaasia ja Goeddel'in et al., (Supra) kuvaamaa menetelmää. Geeni-osan antoi koodit B-ketjun 14-30 aminohappo-yksikölle ja silloitusketjun ensimmäiselle yksikölle Arg. Geenisekvenssiin on yhdistetty HpaII-restriktioentsyymi-kohta samaan koodikaavaan ja paikkaan kuin HpaII-kohta ihmisen insuliinigeenissä. Liitetyn geeni-osan puhdistamisen jälkeen polyakryyliamidi-geelielektroforeesilla, ja suurimman DNA-nauhan eluoimisen jälkeen osan kytkettiin plasmidiin pBR322, joka oli pilkottu restriktioendonukleaaseilla HindIII ja BamHI, käyttäen siten

hyväksi HindIII- ja BamHI-kohtia synteettisellä geeni-
 osasella. DNA kytkettiin E. coli 294 (ATCC No. 31446):ään
 transformoimalla. Yhdellä plasmidilla, pB3':lla, joka oli
 otettu talteen ampisilliini-resistentistä, tetrasykliinille
 5 herkästä kloonista, havaittiin olevan haluttu nukleotidi-
 sekvenssi A.M. Maxam'in et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 560 (1977) menetelmän mukaisesti.

Plasmideista pHG 1 ja pB3' otettiin talteen kaksi
 DNA-osasta, 46 emäsparin osanen EcoRI:sta HindIII:een
 10 pBHI:sta ja 58 emäsparin osanen HindIII:sta BamHI:een
 pB3:sta.

Nämä kaksi osasta liitettiin yhteen antamaan osanen,
 jossa oli EcoRI-kohta ja BamHI-restriktioendonukleasaaseilla
 käyttäen Goeddel'in et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76
 15 106 (1979) kuvaamaa menetelmää ja kloonattiin E.coli K-12-
 kantaan 294 (ATCC No. 31446) antamaan plasmidi pIB3. Kloo-
 nauksen jälkeen plasmidi pIB3 pilkottiin EcoRI- ja HpaII-
 restriktioendonukleasaaseilla synteettisen geeni-osasen (osa-
 nen 1, kuva 3) talteenottamiseksi, joka sisältää kodonit
 20 N-pääte-proinsuliini-aminohappoja varten, joita edeltää
 metioniinikodoni kuten kuvissa 1 ja 3 on esitetty. Tämä
 synteettinen geeni eristettiin polyakryyliamidi-geelielektro-
 foresilla. 2. cDNA-geenin, joka koodaa ihmisen

2. cDNA-geenin, joka koodaa ihmisen proinsuliinin
 25 50 C-pääteaminohappoa, eristäminen

Kaavio cDNA-geenin saamiseksi on esitetty kaavamai-
 sesti kuvassa 2.

Syntetisoitiin dekanukleotidi, joka sisälsi tunnis-
 tussekvenssin BamHI-endonukleasaaseja varten, johon lisättiin
 30 3'-polytymidyylihapoalue, jossa oli n. 20 tähdettä. Sen
 sekvenssi on pCCGGATCCGGTT₁₈T. Tätä oligonukleotidiä
 käytettiin panemaan alulle AMV-käänteis-transkriptaasi
 cDNA-synteesiä varten.

"primeri" valmistettiin käyttäen pääte-deoksinukleo-
 35 tidyyli-transferaasia (Enzo Biochem, 200 yksikköä), jossa

oli yksi μ mooli BamHI-dekanukleotidia 0,6 ml:n reaktio-tilavuudessa, joka sisälsi $1,5 \times 10^{-4}$ TTP. Reaktio saatettiin tapahtumaan 37°C:ssa 1 tunnin aikana puskurijärjestelmässä, jonka on selostanut A. Chang et al. Nature, 275, 617 (1978).

Ihmisen insulinoma polyA-kudosta (2,5 μ g), jota toimittaa Institute fuer Diabetesforschung, Muenchen, BRD, (Dr. Wolfgang Kemmler) ja joka sisältää mRNA:ta, joka on eristetty Ullrich'in et al., Science, 196, 1313 (1977) menetelmällä, muutettiin kaksirihmaiseksi cDNA:ksi Wickens'in et al. J. Biol. Chem., 253, 2483 (1978) menetelmällä. Siten 80 μ l, joka sisälsi 15 mM Tris/HCl (pH 8,3 42°C:ssa), 21 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 30 mM β -merkaptoetanolia, 2 mM "primeriä" dCCGGATCCGGTT₁₈T ja 1 mM dNTPs, esi-inkuboitiin 0°C:ssa. Sitten lisättiin 40 yksikköä AMV-käänteis-transkriptaasia ja seosta inkuboitiin 15 minuuttia 42°C:ssa.

Täydentäcä cDNA-rihma syntetisoitiin 150 μ l:n tilavuusmäärässä, joka sisälsi 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 35 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 15 mM β -merkaptoetanolia ja 9 yksikköä DNA-polymeraasi I:tä (Klenow-osanen). Seosta inkuboitiin 15°C:ssa 90 minuuttia, mitä seurasi 15 tuntia 4°C:ssa. Sl-nukleaasiuutto suoritettiin sitten 2 tunnin aikana 37°C:ssa käyttäen 1000 yksikköä Sl-nukleaasia (Miles Laboratories), kuten on selostanut Wickens et al. supra. Kaksi-säikeinen cDNA (0,37 μ g) saatettiin elektroforeesiin 8-%:sella polyakryyliamidi-geelillä. DNA-osaset, jotka olivat suurempia kuin 500 emäsparia, eluoitiin. Oligodeoksisytydyylihappotähtietä lisättiin osasten 3'-päihin käyttäen pääte-deoksinukleotidyli-transferraasia J.V. Maizel Jr.:n menetelmällä Meth. Virol., 5, 180 (1971). dC-hännillä varustettuja cDNA-osasia lämpökäsiteltiin pBR322:een, joka oli pilkottu restriktioendonukleaasilla PstI ja varustettu deoksiguanidylihapphännällä käyttäen pääte-deoksinukleotidyli-transferraasia. Saadut plasmidit transformoitiin E. coli K-12 kantaan 294 ja kloonattiin. Pesäkkeet, jotka olivat resistenttejä tetrasykliinille

mutta herkkiä ampisilliinille, eristettiin ja seulottiin plasmidien suhteen, joissa on kolme paikkaa, jotka olivat pilkottavissa reastriktioendonukleaasilla, PstI, mikä osoittaa geenin insuliinia varten läsnäolon. Sures et al. Science, 208, 57 (1980).

Yhden plasmidin, pH104:n, joka sisälsi 600 emäsparin insertion ja joka antoi odotetun PstI-pilkontamallin, määritettiin sisältävän kohdan, joka on pilkottavissa BamHI:lla, 3'-polyA:n ja polyGC:n, joka on tuotu cDNA:n valmistuksen aikana, välissä. Jonkin verran insertion nukleotidisekvenssistä on esitetty kuvassa 1. Tämä sekvenssi poikkeaa jonkin verran siitä, jonka aikaisemmin esittivät I. Sures et al. Science, 208, 57 (1980) ja G. Bell, et al. Nature, 282, 525 (1979), jossa oli AT-emäspari alleviivattuna mieluummin kuin CG-pari, koska käytetty mRNA oli kudoksesta, joka oli eristetty eri yksilöstä. Resistenssi antibiooteille, joka annetaan bakteerille tällä plasmidilla, on osoitettu merkittimellä Ap^S ampisilliini-herkkyydelle ja Tc^r:lla tetra-sykliini-resistenssille.

3. Geeni-ryhmä, joka koodaa ihmisen proinsuliinia
Kaavio, jota käytetään geenin kokoamiseksi, joka koodaa ihmisen proinsuliinia, on esitetty kuvassa 3.

Synteettinen geenisegmentti, joka koodaa proinsuliinin 31 ensimmäistä aminohappoa, osan 1 kuvassa 3, otettiin talteen 50 µg:stä plasmidia pIB3 käyttäen restriktioendonukleaaseja EcoRI ja HpaII, kuten edellä selostettiin. Tämä osan sisältää myös kodonin ATG metioniinia varten esiproinsuliinin "esisekvenssin" asemesta. Metioniini-yksikön tuominen tässä pisteessä sallii lopuksi ekspressoituvan polypeptidin lohkaistun tässä pisteessä syaanibromidilla (CNBr) proinsuliinin erottamiseksi polypeptidi-tähteestä, jonka tehtävänä oli suojata proinsuliini-osaa bakteeriproteaaseilta.

cDNA-geenisegmentti, joka koodaa aminohappoja 32-86 sekä myös translaation lopetuskodoneja ja mRNA:n 3'-translaatointialuetta, otettiin talteen 40 µg:sta plasmidia

pHI104 käsittelemällä ensin BamHI:lla ja sitten HpaII:lla, kuten on esitetty kuvassa 3, osasena 2.

Nämä kaksi osasta eriste-tiin polyakryyliamidi-elektroforeesilla, mitä seurasi sähköeluutio. Geeni-osaset
5 liitettiin käsittelemällä T4 DNA-ligaasilla 20 μ l:ssä ligaasi-puskuria (Goeddel et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 106 (1979) 4°C:ssa 24 tunnin ajan. Seos laimennettiin 50 μ l:llä H₂O, uutettiin fenolilla, sitten kloroformilla ja saostettiin sitten etanolilla.

10 Saatua DNA:ta käsiteltiin BamHI:lla ja EcoRI:lla näiden paikkojen uudistamiseksi ja geenipolymeerien poistamiseksi. Koottu proinsuliinigeeni eristettiin polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla ja liitettiin käyttäen T4 ligaasia plas-
midiin pBR322, jota oli sitä ennen käsitelty EcoRI:lla ja
15 BamHI:lla. Saatu DNA transformoitiin E. coli K-12 kantaan 294 ja kloonattiin. Pesäkkeet seulottiin käyttäen plasmidia, jolle oli annettu antibioottiresistenssi-merkittimet. Halu-
tut kloonit olivat tetrasykliini-herkkiä (Tc^S) ja ampisilliini-resistenttejä (Ap^r). Plasmidi pHI3 eristettiin yhdestä
20 tällaisesta pesäkkeestä ja proinsuliinia luonnehdittiin nukleotidisekvenssianalyysillä ja sen havaittiin sisältävän kuvassa 1 esitetty sekvenssi.

4. Plasmidin, joka on tarkoitettu ekspressoimaan kimeerisen proteiinin, joka sisältää ihmisen proinsuliini-peptidin, rakentaminen
25

Plasmidi pBRH1, (r. I. Rodriguez, et al., Nucleic Acids Research 6, 3267-3287 (1979) ekspressoi ampisilliini-resistenssin ja sisältää geenin tetrasykliini-resistenssiä varten, mutta koska yhdistynyttä promoottoria ei ole, se ei
30 ekspressoi tätä resistenssiä. Plasmidi on niinmuodoin tetrasykliini-herkkä. Tuomalla promoottori-operaattori-systeemi EcoRI-kohtaan voidaan plasmidi tehdä tetrasykliini-resistentiksi.

Plasmidissa pGM1 on E. coli-tryptofaani-operoni,
35 joka sisältää deletion LE1413 (G. F. Miozzari, et al.,

(1978) J. Bacteriology 1457-1466)) ja ekspressoiti siten yhdistetyn proteiinin, joka sisältää trp-johtajan 6 ensimmäistä aminohappoa ja likimääräisesti trp E-polypeptidin (jota tämän jälkeen tässä yhteydessä nimitetään LE':ksi)

5 kolme viimeistä aminohappoa, sekä myös trp D-polypeptidin kokonaisuudessaan, kaikki promoottori-operaattori-systeemin säätelyn alaisena. Plasmidia, 20 μ g, uutettiin restriktioentsyymillä PvuII, joka pilkkoo plasmidin viidessä kohdassa. Geeniosaset 2 yhdistettiin seuraavaksi EcoRI-liittäjillä

10 (joka käsittää itsetäydentyvän oligomeeriplasmidin 3, jolla on sekvenssi: pCATGAATTCATG), mikä antaa EcoRI-pilkontakohdan myöhempää kloonausta varten plasmidiin, joka sisältää EcoRI-kohdan. 20 μ g DNA-osasia 2, jotka oli saatu pGMI:stä, käsiteltiin 10 yksiköllä T_4 DNA-ligaasia 200 pikomoolin 5'-fosforyloitua synteettistä oligonukleotidia pCATGAATTCATG läsnäollessa ja 20 μ l:ssa T_4 DNA-ligaasi-puskuria (20 mM tris, pH 7,6, 0,5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiotreitolia) 4°C:ssa yli yön. Liuosta kuumennettiin sitten 10 minuuttia 70°C:ssa

15 liitännän pysäyttämiseksi. Liittäjät pilkottiin EcoRI-uutolla ja osaset, joissa oli nyt EcoRI-pää, erotettiin käyttäen 5-%:sta polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesia (tämän jälkeen "PAGE") ja kolme suurinta osasta eristettiin geelistä värjäämällä ensin etidiumbromidilla, paikallistamalla osaset ultraviolettivalolla ja leikkaamalla geelistä kiinnostavat

20 osat. Jokainen geeli-osanen, 300 mikrolitran kanssa 0,1 x TBE, pantiin dialyysi-pussiin ja saatettiin elektroforeesiin 100 V:lla 1 tunniksi 0,1 x TBE-puskurissa (TBE-puskuri sisältää: 10,8 g tris-emästä, 5,5 g boorihappoa, 0,09 g Na_2EDTA 1 litrassa H_2O). Vesipitoinen liuos kerättiin dialyysipussista, uutettiin fenolilla, uutettiin kloroformilla ja pestiin 0,2 M:ksi NaCl:n suhteen ja DNA poistettiin H_2O :ssa EtOH-saostuksen jälkeen.

25

30

pBRH1:tä uutettiin EcoRI:lla ja entsyymi poistettiin fenoli-uutolla, mitä seurasi kloroformi-uutto ja talteenotto vedessä etanoli-saostuksen jälkeen. Saatu DNA-molekyyli

35

yhdistettiin, erillisessä reaktioseoksessa, jokaisen kanssa kolmesta DNA-osasesta, jotka saatiin edellä, ja liitettiin T_4 DNA-ligaasilla kuten edellä selostettiin. Reaktioseoksessa läsnäoleva DNA käytettiin transformoimaan kelvoinen

5 E. coli K-12 kanta 294, K. Backman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4198 (1976) (ATCC no. 31446) standardimenetelmin (V. Hershfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3455-3459 (1974)) ja bakteerit levitettiin LB-levyille, jotka sisälsivät 20 μ g/ml ampisilliinia ja 5 μ g/ml tetra-

10 sykliiniä. Valittiin useita tetrasykliini-resistenttejä pesäkkeitä, plasmidi-DNA eristettiin ja halutun osasen läsnäolo vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä. Saatu plasmidi nimettiin pBRHtrp:ksi.

pBRH trp:tä uutettiin EcoRI restriktioentsyymillä ja

15 saatu osanen eristettiin PAGE:lla ja sähköeluutiolla. EcoRI-uutettu plasmidi pSOM Δ 11 (K. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977); brittiläinen patenttijulkaisu no. 2 007 676 A) yhdistettiin tämän osasen kanssa. Seos liitettiin T_4 DNA-ligaasilla kuten edellä selostettiin ja syntynyt DNA transformoitiin E. coli K-12 kantaan 294 kuten edellä selostettiin.

20 Transformantti-bakteerit valittiin ampisilliinia sisältävillä levyillä. Saadut ampisilliini-resistentit pesäkkeet seulottiin pesäke-hybridisoinnilla (M. Gruenstein et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 72, 3951-3965 (1975)) käyttäen koettimen

25 trp promoottori-operaattoria sisältävää osasta, joka oli eristetty pBRHtrp:sta, joka oli merkattu radioaktiivisesti P^{32} :lla. Valittiin useita pesäkkeitä, jotka osoitettiin positiivisiksi pesäke-hybridisoinnilla, plasmidi-DNA eristettiin ja kytkettyjen osasten suuntautuminen määritettiin re-

30 striktioanalyysillä käyttäen restriktioentsyymejä BglII ja BamHI kaksoisuutossa. E. coli 294, joka sisälsi plasmidin, joka nimettiin pSOM7 Δ 2:ksi.

Plasmidi pBR322 uutettiin HindIII:lla ja ulostyöntyvät HindIII-pääutettiin vuorostaan S1-nukleaasilla. S1-nukle-

35 aasiuutto käsitti 10 μ g:n HindIII-pilkottua pBR322 käsittelyn

30 μ l:ssä S1-puskuria (0,3 M NaCl, 1 mM ZnCl₂, 25 mM
natriumasetaattia, pH 4,5) 300 yksiköllä S1-nukleaasia 30
minuutin ajan 15°C:ssa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä
1 μ l 30 X S1-nukleaasi-lopetusliuosta (0,8 M tris-emästä,
5 50 mM EDTA). Seosta uutettiin fenolilla, uutettiin kloroformilla ja saostettiin etanolilla, EcoRI-uutettiin sitten kuten
edellä kuvattiin ja suuri osanen 1' saatiin PAGE-menetelmällä,
mitä seurasi sähköeluutio. Saadulla osasella on ensimmäinen
EcoRI-yksirihmainen pää ja toinen tylppä pää, jonka koodaus-
10 säie alkaa nukleotidilla tymidiini.

16 μ g plasmidia pSOM7 Δ 2 laimennettiin 200 μ l:aan
puskuria, joka sisälsi 20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,02 %
NP40-detergenttiä ja 100 mM NaCl, ja käsiteltiin 0,5 yksi-
köllä EcoRI. 15 minuutin kuluttua 37°C:ssa reaktioseos
15 uutettiin fenolilla, uutettiin kloroformilla ja saostettiin
etanolilla ja uutettiin sen jälkeen Bgl II:lla. Saatu suurempi
osanen 3' eristettiin PAGE-menetelmällä, mitä seurasi sähkö-
eluutio. Tämä osanen sisältää kodonit "LE'(p)" LE'-polypepti-
din läheisintä päätä varten, ts. ylävirtaan Bgl II-kohdasta
20 olevat. Osanen 3' liitettiin seuraavaksi osaseen 4'. Osanen
4' valmistetaan pTrp24:n peräkkäisellä uutolla (valmistettu
pTh α 1:n EcoRI-uuton jälkeen (Biochemistry 80, 6096 (1980)),
mitä seuraa Klenow-polymeraasi I-reaktio EcoRI-tähteiden
tylpäksi tekemiseksi, Bgl II-uutto antaa suoran osasen, joka
25 muodostettiin uudelleen renkaaksi reaktiolla LE':n kanssa, jo-
ka sisälsi Bgl II-yksisäikeiset ja tylpät päät) Bgl II:n ja
EcoRI:n kanssa, mitä seurasi PAGE ja sähköeluutio. Liitäntä
tehtiin T₄ DNA-ligaasin läsnäollessa plasmidin pSOM7 Δ 2 Δ 4
muodostamiseksi, joka transformoitiin E. coli kantaan 294,
30 kuten edellä selostettiin.

Plasmidia pSOM7 Δ 2 uutettiin Bgl II:lla ja saadut
Bgl II-yksisäikeiset päät tehtiin kaksisäikeisiksi Klenow-
polymeraasi I-menetelmällä käyttäen kaikkia neljää deoksinuk-
leotidi-trifosfaattia. Syntyneen tuotteen pilkonta EcoRI:lla,
35 mitä seurasi pienen osasen 2' PAGE ja sähköeluutio, antoi

suoran pätkän DNA:ta, joka sisälsi tryptofaani-promoottori-operaattorin ja LE' "likimääräisen" sekvenssin kodonit ylävirtaan Bgl II-kohdasta ("LE'(p)"). Tuotteella oli EcoRI-pää ja tylppä pää seurauksena täyttämisestä Bgl II-kohdassa.

5 Bgl II-kohta muodostetaan kuitenkin uudelleen liittämällä osasen 2' tylppä pää osasen 1' tylppään päähän. Siten nämä kaksi osasta liitettiin T₄ DNA-ligaasin läsnäollessa muodostamaan uudelleen renkaaksi tehty plasmidi pHKY 10, joka saatettiin lisääntymään transformoimalla kelvollisiin

10 E. coli kannan 294 soluihin. Tetrasykliini-resistenttejä soluja, jotka sisälsivät rekombinantti-plasmidin pHKY 10, viljeltiin, plasmidi-DNA uutettiin ja digeroitiin vuorostaan Bgl II:lla ja Pst:lla, mitä seurasi suuren osasen, DNA:n suoran pätkän, jossa oli Pst- ja Bgl II-yksisäikeiset päät,

15 eristäminen PAGE-menetelmällä ja sähköeluutiolla antamaan DNA-osanen 7'.

Plasmidia pSOM7 Δ 2 Δ 4 voitiin manipuloida antamaan toinen komponentti systeemiä varten, joka pystyy ottamaan vastaan suuren valikoiman vieraslajisia rakennegeenejä.

20 Plasmidi saatettiin osittaiseen EcoRI-uuttoon, jota seurasi Pst-uutto ja osaset, jotka sisälsivät trp promoottori-operaattorin, eristettiin PAGE-menetelmällä, mitä seurasi sähköeluutio. Osittainen EcoRI-uutto oli tarpeen osasen saamiseksi, joka pilkottiin somatostatiini-geenin 5'-pään vieressä mutta ei pilkottu EcoRI-kohdassa, joka sijaitsee ampisilliini-resistenssigeenin ja trp promoottori/operaattorin välissä. Ampisilliini-resistenssi, joka menetettiin Pst I-leikkauksella ap^r-geenissä, voitiin palauttaa liitännän jälkeen osasen 5' kanssa.

25-

30 Ensimmäisessä havaintoesityksessä saatiin kolmas komponentti, rakenne-geeni somatostatiinia (6') varten ja puhdistettiin PAGE:lla ja sähköeluutiolla.

Nämä kolme geeni-osasta 7', 5' ja 6' voitiin nyt liittää yhteen sopivasti suunnattuina muodostamaan plasmidi

35 SOM7 Δ 1 Δ 4.

Täydellinen ihmisen proinsuliini-geeni, joka sisälsi N-päätekodonit, jotka koodaavat metioniinia, otettiin talteen plasmidista pHI3 käsittelemällä EcoRI:lla ja BamHI:lla ja puhdistettiin geeli-elektroforeesilla. Tämä geeni, osanen 3 kuvassa 3, liitettiin kahteen muuhun DNA-osaseen T4 ligaasilla; nämä tunnistetaan osasiksi 4 ja 5 kuvassa 3.

Osanen 4' sisältää promoottorin ja kanninproteiini-geenin, joka on saatu plasmidista pSOM7 Δ 1 Δ 4 osittain uuttamalla EcoRI:lla ja täydellisesti uuttamalla PstI:llä. Tämä osanen sisältää E. coli-tryptofaani (trp)-promoottori/operaattorin, 9 kodonia trp johtopeptidistä, 190 kodonia trp E-geenistä ja EcoRI-pilkontakohdan, joka on tuotu trp E-päätekodonin paikalle. (Tätä geeni-rakennetta nimitetään seuraavassa trp LE':ksi.) Tryptofaani-vaimenninalue, joka sisältää ainakin 5 kodonia trp johto-peptidisekvenssistä ja ensimmäiset kaksi kolmannelta trp E-geenistä, on jätetty pois tästä rakenteesta.

trp E-geeni (trp LE'), joka sisältyy osaseen 4', modifioidaan sisältämään EcoRI-kohta trp E-geenin päätekodonin paikalla, minkä on osoitettu antavan oikean koodikaavan kytketyn geenin kanssa, osanen 3.

Tämä osanen sidotaan vastakkaisesta päästä PstI-kohdalla, joka on peräisin pBR322:sta ja yhdistää ensimmäisen puolikkaan β -laktamaasigeenistä. Osanen otettiin talteen 20 μ g:stä plasmidia pSOM7 Δ 1 Δ 4 osittaisuutolla EcoRI:lla, mitä seurasi käsittely PstI:lla. Promoottorin sisältävä osanen eristettiin polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla.

Osanen 5' saatiin plasmidista pHKY10. Tämä plasmidi on pBR322:n johdannainen ja sisältää tryptofaani-promoottori-operaattorin tetrasykliinipromoottorin asemesta. pBR322:n HindIII-kohta on muutettu BglII-kohdaksi. Plasmidia, 20 μ g, käsiteltiin PstI:lla ja BglII:lla ja suuri osanen, joka on merkitty 5:ksi kuvassa 3, puhdistettiin polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla.

Nämä kaksi osasta 4 ja 5 kokoavat uudelleen, kun ne

liitetään yhteen, geenin β -laktamaasia varten PstI-kohdan kautta ja antavat ampisilliini-resistenssin (Ap^r). Päätt edustavat sitten EcoRI-kohtaa ja BglII-kohtaa geenin insertiota varten. Näitä kahta kohtaa ei voida liittää yhteen, 5 mikä johtuu 3'-ulostyöntyvien päiden hybridisoimattomuudesta ja ne voidaan liittää ainostaan yhdistämällä DNA-osan, jossa on 3'-päätt, jotka ovat täydentäviä EcoRI- ja BglII-päille. Proinsuliini-geeni, osanen 3, joka sisältää EcoRI- ja BamHI-päätt, on tällainen molekyyli. Siten nämä 10 kolme osasta, 5 μ g 4, 1 μ g 3 ja 1 μ g 5 yhdistettiin ja käsiteltiin T4 DNA-ligaasilla 4°C:ssa 24 tunnin ajan ligaasi-puskurissa. Renkaan uudelleenmuodostamisen jälkeen plasmidin sulkemiseksi tryptofaani-promoottori/operaattori säätelee yhdistelmä(kimeerisen) proteiinin, josta proinsuliini muodos- 15 taa sen osan, ekspressointia. Samalla annetaan myös tetrasykliini-resistenssi (Tc^r).

DNA-seos liitännästä transformoitiin E. coli K-12 kantaan 294 Goeddel'in et al., Nature, 281, 541 (1979) menetelmällä. Valittiin pesäkkeet, jotka kasvaisivat sekä 20 ampisilliinilla että tetrasykliinillä. Kolmesta testatusta pesäkkeestä havaittiin kahden SDS-polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla (J.F. Maizel, Jr., Meth. Virol., 5, 180, (1971)) ekspressoivan odotetun molekyylipainon omaavan proteiinin trp LE'-proinsuliini-yhdistelmästä. Yksi plasmidi, 25 pHI7 luonnehdittiin täydelliseksi lisätyn geenin DNA sekvenssiksi vektorin pBR322 restriktioanalyysillä.

5. Proinsuliinin eristäminen

Plasmidi pHI7 transformoitiin E. coli K-12 kantaan RV308 (ATCC No. 31608) ja viljeltiin 500 ml:ssa LB-väliainetta (J.H. Miller, Experiments In Molecular Genetics, 433, Cold Spring Harbor 1972), joka sisältää 10 μ g/ml ampisilliiniä solutiheyteen 5 OD (optinen tiheys). Tämä laimennettiin 10 l:n käymisastiaan (New Brunswick) ja viljeltiin M9-väliaineissa (Miller, supra, s. 431) solutiheyteen 14 OD. Solut 35 koottiin linkoamalla ja pakastettiin.

Solut (164 g) sulatettiin 5 tilavuusosaan sakkaroosi-hajotuspuskuria (10 % sakkaroosia, 0,1 M tris HCl, pH 7,9, 50 mM EDTA, 0,2 M NaCl), joka sisälsi 0,1 mM fenyyylimetyyli-sulfonyylifluoridia ja 1,0 mM dimerkaptopropanolia, hajoi-
 5 tettiin äänikäsittelyllä. Hajotuspelletti koottiin lin-koamalla ja suspendoitiin sekoittaen yli yön 4°C:ssa 4 tila-vuusosan kanssa 7,0 M guanidiini-HCl, 1 mM dimerkaptoetanolia, 1 mM EDTA. Linkoamisen jälkeen sakan päällä oleva neste laimennettiin 20-kertaiseksi kylmällä vedellä ja annettiin
 10 seistä 2 tuntia 4°C:ssa. Sakka (9,6 g kuivana) koottiin lin-koamalla ja saatettiin reagoimaan yli yön huoneen lämpötilas-sa 220 ml:ssa 88-%:sta muurahaihappoa 5 g:n kanssa CNBr pro-insuliinin lohkaisemiseksi trp LE'-yhdistelmästä. Pyörö-haihduksen jälkeen jäännös suspendoitiin 200 ml:aan 7,5 M
 15 ureaa, 1 mM EDTA, 20 mM ammoniumkarbonaattia, ja pH ase-tettiin 9,0:aan etanoliamiinilla (5,5 ml). 10 g natriumsul-fiittia ja 5 g natriumtetrationsaattia lisättiin systeiinien ja systiinien muuttamiseksi S-sulfonaatti-ryhmiksi ja reak-tiota sekoitettiin huoneen lämpötilassa 6 tuntia.

20 Reaktioseoksesta poistettiin suolat pylväässä, jossa oli G-25 Medium'ia 7,5 M ureassa 10 mM Tris'issä pH 8,5, 10 mM EDTA:ssa. Proteiini, josta suolat oli poistettu, pan-tiin DEAE-sephadex (A-25)-pylvääseen ja eluoitiin 2-litran suoraviivaisella gradientilla 0:sta 0,5 M:een NaCl samassa
 25 Tris-urea-puskurissa. Proinsuliinin kaltainen aine, joka tunnistettiin RIA:lla tai HPLC:lla (ks. seuraavaa), väke-väitiin Amicon YM5-membraanilla ja hajotettiin Tris-urea-puskuriin G-50 Medium-pylväässä. G-50-jakeet, jotka tunnis-tettiin HPLC:lla, yhdistettiin (104 ml) ja puskurit syötet-tiin G-25 Fine-pylvääseen, joka oli tasapainoitettu 30 mM
 30 ammoniumkarbonaatilla, pH 8,8. Lyofiloitu proteiini painoi 216 mg. Talteenotot kussakin vaiheessa on esitetty taulu-kossa 2.

6. Proinsuliinin analyysi

35 Saatu S-sulfonoitu proinsuliini analysoitiin amino-

happo-analyysillä. Tämän analyysin suoritti Eli Lilly and Co. ja se on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

	<u>Aminohapot</u> <u>laskettu</u>	<u>Aminohapot</u> <u>ennustettu</u>		<u>Aminohapot</u> <u>laskettu</u>	<u>Aminohapot</u> <u>ennustettu</u>
Asp	4,40	4	Ile	1,34	2
Thr	2,90	3	Leu	12,21	12
Ser	4,50	5	Tyr	3,93	4
Glu	15,64	15	Phe	2,61	3
Pro	3,42	3	His	2,02	2
Gly	11,08	11	Lys	1,96	2
Ala	4,46	4	Arg	3,92	4
Cys	2,85	6	Val	5,58	6

TAULUKKO 2

PUHDISTUS

VAIHE	Aineen määräpaine	Aineen kuivapaine	Proteiini (Lowry)	Proinsuliini	Puhdistus
Solut	164	--	(21,2 g)	360 mg (RIA)	--
Päällä oleva neste ääni- käsiteltynä	--	--	8,1 g	--	--
Pelletti äänikäsitteystä	78	--	13,1 g	--	1,6
Päällä oleva neste guanidiini HCL:stä	--	--	11,5 g	--	--
Pelletti guanidiini HCL:stä	--	--	0,3 g	--	--
20 x laimennettu pelletti CNBr, sulfitolyysi	--	9,6	--	--	--
G-25 yhteispanos suolan- poistosta	--	--	7,0 g	394 mg (HPLC)	2,0
DEAE-yhteispanos	--	--	776 mg	259 mg (HPLC)	6,0
Amicon-väkevöite (YM5)	--	--	369 mg	279 mg (HPLC)	2,2
G-50-yhteispanos	--	--	390 mg	240 mg (HPLC)	0,8
G-25-yhteispanos	--	--	209 mg	233 mg (HPLC)	1,6

Proinsuliinin läsnäolo vahvistettiin myös radioimmunoanalyysillä. Radioimmunoaktiivisuuden määrittämiseksi käytettiin Corning ^{125}I -insuliini-sarjaa. Vasta-aineen havaittiin olevan n. 4-%:sesti poikki-reaktiivinen proinsuliinin kanssa ja n. 0,2-%:sesti poikki-reaktiivinen pelkistetyin proinsuliinin kanssa. Tuntemattomia kuumennettiin 2 minuuttia 90°C :ssa 7,5 M ureassa, 2 mM β -merkapttoetanolissa, H 8 - 10 (etanoliamiini) ja tasaosia laimennettiin fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (0,1 gelatiini) ja analysoitiin välittömästi. Nämä tulokset määritettiin vertailuista pelkistetyin proinsuliinin standardikäyrälle, joka oli kehitetty samalla tavalla joko naudan proinsuliinista tai ihmisen proinsuliini-S-sulfonaatista.

Proinsuliini-S-sulfonaatti analysoitiin myös HPLC:lla. Kuvassa 4 on esitetty profiilit S-sulfonoidulle naudan proinsuliinille, bakteerisesti johdetulle ihmisen proinsuliinille ja näiden kahden yhdistelmälle. Tässä analyysissä syötettiin naudan ja ihmisen proinsuliini-sulfonaatin ja näiden kahden seoksen näytteitä 10 m RP-189-pylvääseen ja eluoitiin käyttäen suoraviivaista gradienttia 21:stä 33:een prosenttia n-propanolia ja asetonitriiliä (2:9) 50 mM NH_4OAc (pH 7). Proteiinien nähdään kulkevan hyvin lähelle yhtenevyyttä. Suuri A_{278} -huippu kromatogrammin lopussa johtuu nopeista muutoksista liuotinkoostumuksessa ja eluoimattomasta proteiinista.

B. Proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen valmistus
Seuraavassa selitetään geenin synteesi, joka koodaa proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen ekspressiota, joka yhdiste sisältää ihmisen insuliinin A- ja B-ketjut yhdistettyinä silloitusketjulla, joka poikkeaa ihmisen proinsuliinin C-ketjusta siinä, että se sisältää ainoastaan 6 eikä 35 aminohappoyksikköä, kuten kuvassa 1 esitetty ihmisen proinsuliinin polypeptidi. Eriteltyinä nämä kuusi yksikköä ovat, lukien järjestyksessä B-ketjun viimeisestä yksiköstä A-ketjuun, Arg-Arg-Gly-Ser-Lys-Arg. Tässä sekvenssissä on

samat pääte-sekvenssit Arg-Arg ja Lys-Arg kuin ihmisen proinsuliinissa, mikä sallii silloitusketjun leikkaamisen proteolyttisesti.

6 aminohapon ketju on hyväksyttävä pituus modifioi-
 5 dulle (tai analogiselle) silloitus-"C"-ketjulle, joka sal-
 lii taivuttumisen ja sen jälkeen disulfidi-poikkisidosten
 muodostumisen A- ja B-ketjujen välille, mikä on luonteen-
 omaista hormoni-insuliinille. Alaan perehtyneille on kui-
 tenkin selvää, että silloitusketjut, jotka ovat lyhyempiä tai
 10 pitempiä kuin 6, olisivat myös käyttökelpoisia sallieissaan
 taivuttumisen ja tarpeellisten disulfidi-sidosten muodostumi-
 sen. 100 tai useampien aminohappoyksiköiden sekvenssejä voi-
 daan käyttää silloitusketjussa. Kuitenkin käytännön vaikeus
 saada geeniosasia, jotka koodaavat hyvin pitkiä sekvenssejä
 15 tekevät analogiset silloitusketjut, joissa on vähemmän kuin
 35 aminohappoyksikköä, houkuttelevammiksi käytännön näkökan-
 nalta.

Silloitusketjun päät, huolimatta siitä kuinka monta
 välissä olevaa aminohappoyksikköä on tai missä järjestyksessä
 20 ne ovat, täytyy rakentaa sallimaan silloitusketjun leikkaa-
 minen. Vaikka voidaan käyttää vaihtoehtoisia keinoja, pi-
 detään parempana käyttää sekvenssejä Arg-Arg ja Arg-Lys,
 kuten löydettiin proinsuliinissa itsessään, proteolyttisenä
 lohkaisuna trypsiiniä käyttäen ja karboksipeptidaasi B
 25 esiintyy puhtaana näissä kohdissa.

1. Synteettisen geenin valmistus, joka koodaa proinsu-
 liinin kanssa analogisen yhdisteen 57 aminohappoa

a. Oligonukleotidi-synteesi

Kemialliset synteesimenetelmät sekä myös DNA-geeni-
 30 osasten, jotka koodaavat ihmisen insuliinin A- ja B-ketjuja,
 synteesi on selostettu. K. Itakura et al., J. Biol. Chem.,
250, 4592 (1975), K. Itakura et al., J. Biol. Chem., 250,
 4592 (1975), K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc., 97, 7327
 (1975), Crea et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 75, 5765
 35 (1978) ja Goeddel et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76,

106 (1979). Viisi uutta oligonukleotidi-osasta syntetisoitiin samanlaisin menetelmin käyttäen myös triesteri-menetelmää, joka on kuvattu edellä mainituissa viitteissä. Nämä sekvenssit on esitetty seuraavassa taulukossa 4 ja kuvassa 5.

5

Taulukko 4

Oligonukleotidit

	C ₁	AAGACTCGTCGTG
	C ₂	GATCCAAGCGTGGCATC
	C ₃	GATCCACGACGAGTCTT
10	C ₄	CAACGATGCCACGCTTG
	C ₅	TCGACTATTAGTT

b. Synteettisten oligonukleotidien liittäminen

Kuva 5 esittää insuliinin aikaisemmin valmistettujen A- ja B-ketjugeenien synteettiset oligonukleotidit ja tavan, jolla uusia osasia C₁-C₅ käytettiin täydellisen geenin proinsuliinin kanssa analogista yhdistettä varten entsymaattisessa rakentelussa. Kaavio tämän geenin saamiseksi on esitetty kuvassa 6.

Plasmidia pBH1, joka sisältää B-ketjugeenin vasemman puolikkaan, käytettiin tässä menetelmässä ja sitä on selostanut Goeddel et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, 106 (1979). Se sisältää kodonit B-ketjun 1-13 aminohappoa varten ja metioniini-yksikön N-päätteellä, jota käytetään myöhemmin proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen lohkaisemiseksi bakteerisesti ekspressoidusta kimeerisestä proteiinista käyttäen syaanibromidia (CNBr).

Geeni B-ketjun oikeata puolikasta varten saatiin oligonukleotideistä B₁, B₂, B₃, B₄, C₁, B₆ ja B₇, B₈, B₉ ja C₃ (jolloin C₁ ja C₃ korvaavat B₅- ja B₁₀-sekvenssit aikaisemmin valmistetussa geeni-osasessa) liittämällä käyttäen T4 ligaasia tavanomaisissa menetelmissä. Tämä geeni-osanen koodaa B-ketjun 14-30 aminohappoyksikköä ja silloitus- (modifioidun "C"-) ketju-pBcl:n ensimmäiset kaksi yksikköä Arg-Arg.

Puhdistamisen jälkeen polyakryyliamidi-geeli-elektro-

foreesilla ja suurimman DNA-nauhan eluution jälkeen osanen kytkettiin plasmidiin pBR322, joka oli pilkottu restriktioendonukleaaseilla HindIII ja BamHI, käyttäen siten hyväksi HindIII- ja BamHI-kohtia geeni-osasella, ja kloonattiin E. coli 294 (ATCC No. 31446):ssa. Plasmidilla pBC, joka otettiin talteen ampisilliini-resistentistä, tetrasykliini-herkästä kloonista, oli haluttu nukleotidisekvenssi A.M. Maxam'in et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977) menetelmän mukaisesti.

10 A-geeni rakennettiin samalla tavalla oligonukleotideistä C₂, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, C₄, A₈, A₉, A₁₀, A₁₁ ja C₅ (jolloin C₂, C₄ ja C₅ korvaavat A₁-, A₂- ja A₁₂-sekvenssit aikaisemmin valmistetussa geeni-osasessa) käyttäen T4 ligaa-

15 sia tavanomaisissa menetelmissä. Tämä osanen koodaa A:n 21 aminohappoa ja silloitus-C-ketjun 4 yksikköä, Gly-Ser-Lys-Arg. Puhdistamisen jälkeen, myös polyakryyliamidi-elektroforeesilla, osanen kytkettiin plasmidiin pBR322, joka oli pilkottu restriktioendonukleaaseilla EcoRI ja SalI käyttäen EcoRI- ja SalI-kohtia osasella ja kloonattiin E. coli 294:ssä.

20 Ampisilliini-resistentti, tetrasykliini-herkkä kloni antoi plasmidin pCA18, jossa oli haluttu nukleotidi-sekvenssi, A. W. Maxim'in et al., supra, menetelmällä.

2. Proinsuliinin kanssa analogisen geenin ja vastaavan ekspressointi-plasmidin rakentaminen

25 Haluttu ekspressointi-plasmidi valmistettiin plasmideista pBH1, pBC1 ja pCA18, kuten kuvassa 6 on esitetty. Plasmidi pBH1 pilkottiin HindIII:lla ja liitettiin osaseen BC, joka oli leikattu plasmidista pBC1 käsittelemällä HindIII:lla ja BamHI:lla. Syntynyt plasmidi pBC135 pilkottiin EcoRI:lla ja liitettiin plac5:n EcoRI-osaseen, joka sisältää lac-kontrollialueen ja pääosan β -galaktosidaasi-rakennegeenistä (merkitty Z:lla). K. Itakura et al., Science, 198, 1056 (1977). Tämä liitanta antoi plasmidin pIB254, joka pilkottiin BamHI:llä, Sal:llä ja alkalisella fosfataasilla.

35 Tämän pilkonnan tuote liitettiin osaseen CA, joka oli lei-

- kattu plasmidista pCA18 käsittelemällä BamHI:lla ja SalI:llä, kuten kuvassa 6 on esitetty, ja transformoitiin E. coli 294:ään ja kloonattiin. Plasmidi pBCA5 otettiin talteen ampisilliini-resistenteistä, tetrasykliini-herkistä
- 5 kloonista E. coli 294:ssa, joka oli viljelty X-geeli-levyillä, jotka sisälsivät ampisilliiniä ja sisälsivät DNA-koodaus-sekvenssin proinsuliinin kanssa analogista yhdistettä varten, kuten on osoitettu A.M. Maxam'in et al., supra, menetelmällä.
- 10 3. Proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen ekspressointi
- Täysin luonnehdittu plasmidi pBCA5 kytkettiin E. coli RV308:aan ja viljeltiin 4 l:n pulloissa, jotka sisälsivät 1,5 l LB, joka sisälsi 20 mg/l ampisilliinia. Talteenotetut
- 15 solut (322 g märkinä) hajotettiin äänikäsittelyllä 2 l:aan 10-%:sta sakkarosia, 50 mM EDTA, 0,1 M tris/HCl, pH 7,9, 0,1 M fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia, 0,2 M NaCl ja 1 mM 1,3-ditio-2-propanolia. Linkoamisen jälkeen (30 min., 5000 r/min) pelletti suspendoitiin sekoittaen 400 ml:aan 7M guanidiini-hydrokloridia, 0,1 mM 1,3-ditio-2-propanolia, 1mM
- 20 EDTA. Tätä suspensiota lingottiin (30 min., 12.000 r/min.) ja päällä oleva neste laimennettiin 6-kertaiseksi kylmään veteen. Saostunut proteiini (12,4 g kuivapaino) koottiin linkoamalla (20 min., 5000 r/min.) ja käsiteltiin yli yön huoneen lämpötilassa 2,8 g:lla (26,4 mmoolia) CNBr 200 ml:ssa
- 25 88-%:sta muurahaishappoa proinsuliinin kanssa analogisen yhdisteen (tämän jälkeen "analogi-'C'" -proinsuliini) lohkaistaiseksi β -galaktosidaasi-tähteistä N-metioniini-yksiköllä. Kuiviin haihduttamisen jälkeen pyöröhaihduttimella alle 30°C:ssa lisättiin vettä ja tilavuus pienennettiin uudelleen.
- 30 Jäännös uutettiin 300 ml:aan 6 M guanidiini-hydrokloridia ja pH asetettiin 9,0:aan etanoliamiinilla. Tähän lisättiin 15,0 g natriumsulfiittia ja 7,5 g natrijmtetrationaattia systeiniinien ja systiiniinien muuttamiseksi systeiini-S-sulfo-naatti-ryhmiksi ja seoksen annettiin reagoida huoneen lämpö-
- 35 tilassa 6 tuntia. Reaktioseos dialysoitiin täydellisesti

(Spectropor 3) 1 mM EDTA:a vastaan 4°C:ssa ja saostuneet proteiini-S-sulfonaatit kerättiin linkoamalla (20 min., 5000 r/min.). Pelletti suspendoitiin 50 ml:aan 7,5 mM Tris/HCl, pH 7,5, suodatettiin ja pantiin DE-52-pylvääseen (2,5 x 87 cm) samassa puskurissa 4°C:ssa. Pylväs eluoitiin lineaarisella gradientilla 0:sta 0,5:een M NaCl samassa puskurissa. Mini-C-proinsuliini-S-sulfonaatin läsnäolo havaittiin insuliini-RIA-anlyyseyllä, joita seuraavassa selostetaan OD-huipun päässä eluoimiseksi. Yhdistetyt jatkeet pantiin G-50F Sephadex-pylvääseen (2,5 x 100 cm) ja eloitiin 7 M urealla, 50 mM tris/HCl:lla, pH 7,5, 1 mM EDTA:lla. Jakeet, jotka sisälsivät insuliini-RIA-aktiivista ainetta yhdistettiin ja dialysoitiin 20 mM ammoniumkarbonaattia vastaan, pH 8,8, ja lyofiloitiin. Valkoinen jauhe suspendoitiin uudelleen 7 ml:aan 20 mM ammoniumkarbonaattia, pH 8,8 ja varastoitiin -40°C:ssa. Osaa yhdistetystä tuotteesta puhdistettiin edelleen valmistavalla HPLC:lla ja insuliini-RIA-aktiivinen huippu analysoitiin aminohapposisällön suhteen, joka on esitetty taulukossa 3.

Analogi-"C"-proinsuliini-S-sulfonaatti puhdistettiin HPLC:lla valmistavasti kokoamalla analyttisestä C-8-pylväästä. Hajoittava gradientti oli 21 - 39-%:nen 2-propanoli 50 mM NaOAc:ssa, pH 7,0 0,6%:lla/min. ja 2 ml/min. Proteiiniliuosta hajoitettiin 1,5 mooliin asti yhdessä kokeessa kolmella peräkkäisellä ruiskutuksella 500 µl:n silmukan kautta.

Taulukko 5

Puhdistetun analogi-"C"-proinsuliinin 24-tuntisen 6N HCl-hydrolyysin (110°C) aminohappoanalyysi. Systeiniin määritettiin kvantitatiivisesti systeinihapon erillisellä määrittelyksellä permuurahaishapolla hapetetulla näytteellä ja laskettiin systeini/alaniini-suhteesta. Osat, jotka lisääntyivät korvaamaan hapon hajoamisen, olivat seriini (10 %) ja treoniini (5 %). N.D. = ei määritetty.

	<u>Ennustettu</u>	<u>aa mooli-% x 57</u>	<u>aminohapot</u>
	Ala	1,19	1
	Arg	4,06	4
	Asp	3,17	3
5	Cys/2	4,87	6
	Glu	6,95	7
	Gly	5,37	5
	His	2,03	2
	Ile	1,39	2
10	Leu	5,98	6
	Lys	2,02	2
	Met	0	0
	Phe	3,03	3
	Pro	1,96	1
15	Ser	4,21	4
	Thr	3,09	3
	Trp	N.D.	0
	Tyr	3,99	4
	Val	3,74	4
20	4. Analogi-"C"-proinsuliinin taittaminen		
	Analogi-"C"-proinsuliinin taittaminen silloitetun muodon saamiseksi suoritettiin saattamalla 4 mg proteiinia, joka sisälsi n. 30 % analogi-"C"-proinsuliinisulfonaattia, reagoimaan. Proteiini liuotettiin puskuriin, josta kaasut		
25	oli poistettu ja jossa oli 40 mM glysiiniä, pH 10,6, 3 M ureaa, 0,3 M NaCl, 0 ^o :ssa. Tähän lisättiin β -merkaptotetanolia väkevyyteen 0,4 mM ja reaktio suljettiin N ₂ -atmosfääriin. Reaktion kulkua seurattiin mittaamalla lisäys RIA-aktiivisuudessa ja se oli täydellinen n. 4 tunnissa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä etikkahappoa.		
30	Reaktioseos puhdistettiin HPLC:lla valmistavalla kokoamisella C-18 Ultrosphere-pylvästä. Hajotusgradientti oli 21 - 28-%:nen asetonitriili 0,2 M ammoniumsulfatissa, 50 mM NaOAC:ssa, pH 4,0 0,2 %:lla/min ja nopeudella 1,0 ml/min.		
35			

5. Analyysi analogi-"C"-proinsuliinia varten

Analogi-"C"-proinsuliinilla ei ole silloittumisreaktiivisuutta insuliini-radioimmunoanalyysissä S-sulfonaattina. Kuitenkin analogi-"C"-proinsuliinin muodostumisen ekspressoitit tuotteena vahvistettiin tioli-muodon silloittumisreaktiivisuudella. Tuntemattomien näytteitä käsiteltiin 2 minuuttia 90°C:ssa 1 mM β -merkaptotoetanolilla, laimennettiin RIA-puskuriin (0,1 M natriumfosfaattia, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN_3 , 0,1 % gelatiinia) ja analysoitiin välittömästi. Jäljentymiskyky riippuu tarkasta ajoituksesta, koska laimennetun, pelkistetyn testiliuoksen pidennetty inkubointi johtaa molekyylin vaihtelevaan hapettavaan taittumiseen muodoiksi, joilla on suurempi RIA-aktiivisuus.

Tioli-muoto antoi 0,9 %:n aktiivisuuden verrattuna insuliinin 100 %:iin. Vertailun vuoksi oli naudan proinsuliinin RIA-aktiivisuus 7,3 % insuliinin aktiivisuudesta ja naudan proinsuliinin tioli-muodon aktiivisuus oli 1,9 %. Sian proinsuliinin B-ketjun kolmannen muodon aktiivisuus oli 0,1 %. Inkuboinnin jälkeen pienen ylimäärän kanssa β -merkaptotoetanolia taittuneen, silloittuneen tuotteen saamiseksi, on reaktioseosten RIA-aktiivisuus 20 - 40 % insuliinin aktiivisuudesta.

C. Ihmisen insuliinin valmistus

1. A- ja B-ketjujen taittaminen ja sitominen

Ihmisen proinsuliini tai sen kanssa analogiset yhdisteet, jotka on valmistettu tämän keksinnön mukaisesti, esimerkiksi seuraten edellä esitettyjen osien A tai B menetelmää, vastaavina S-sulfonaatteinaan, saatetaan taittumaan muodostaen sopivasti sisäiset disulfidi-sidokset (systeini $_{7B:n}$ ja systeini $_{7A:n}$ välille, systeini $_{19B:n}$ ja systeini $_{20A:n}$ välille sekä systeini $_{6A:n}$ ja systeini $_{11A:n}$ välille) säädetyn sisäisen sulfohydroksyyli-vaihdon avulla, jota katalysoidaan β -merkaptotoetanolilla.

Proinsuliini-S-sulfonaatin 0,1 mg/ml liuokseen 50 mM natriumglysinaatissa, josta kaasut oli poistettu,

pH 10,6, 4°C:ssa, lisättiin β -merkapttoetanolia 0,3 mM lopulliseen väkevyyteen. 4 tunnin kuluttua reaktio on pääasi-
allisesti täydellinen mitattuna seoksen silloitusreaktio-
aktiivisuuden lisäyksellä insuliini-RIA:ssa. Proinsuliinin
5 saalis on n. 80 %. Proinsuliini puhdistetaan sitten sivu-
tuotteista geeli-läpäisyllä, ioninvaihdolla ja/tai käänteis-
faasi-suurpainenestekromatografialla antamaan tuote pääasial-
lisesti puhtaassa muodossa.

2. Silloitusketjun poistaminen

10 Ihmisen proinsuliini tai sen kanssa analogiset yh-
disteet, jotka on valmistettu tämän keksinnön mukaisesti,
esimerkiksi seuraamalla edellä esitetyn osan C.1 menettelyä,
muutetaan proteolyttisesti insuliiniksi esimerkiksi
Kemmler'in et al., J. Biol. Chem., 246, 6786 (1971) mene-
15 telmän mukaisesti. Saatu insuliini puhdistetaan sitten
pylväskromatografialla tai sinkki-kiteytyksellä antamaan pää-
asiallisesti puhtaassa muodossa tuote, joka on samanlainen
kuin luonnollinen ihmisen insuliini ja joka on vapautettu
biologisesti aktiivisista saasteista.

20 Samalla kun keksintöä edullisimmassa suoritusmuodos-
saan selostetaan E. coli:n suhteen voivat muut mikro-organis-
mit samalla tavalla toimia isäntäsoluina, esimerkiksi hiivat,
kuten *Saccharomyces cerevisiae*, basillit, kuten *Bacillus*
subtilis ja edullisesti muut suolistobakteerit, joista
25 mainittakoot esimerkkeinä *Salmonella typhimurium* ja
Serratia marcescens, käyttäen plasmideja, jotka voivat
jäljentää ja ekspressoida heterologisia geenisekvenssejä
näissä organismeissa. Siten ei keksintöä tule rajoittaa
selostettuihin edullisiin suoritusmuotoihin, vaan ainoas-
30 taan oheisten patenttivaatimusten laillisella piirillä.

Patenttivaatimukset

PL 100 136

1. Kimeerinen polypeptidi, t u n n e t t u
siitä, että se käsittää
 - 5 a) proinsuliinin polypeptidisekvenssin, joka sisältää ihmisen insuliinin A- ja B-ketjut yhdistettyinä silloitusketjulla, jossa on vähintään 2 aminohappoyksikköä, jolloin silloitusketjussa on kummassakin päässä kohdat, jotka sallivat leikkaamisen A- ja B-ketjujen välistä;
 - 10 b) lisäproteiinin; ja
 - c) pilkontakohdan lisäproteiinin vieressä ja yhden tämän proinsuliinin polypeptidisekvenssin pään.
2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen kimeerisen polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u
15 vaiheista, joissa:
 - 1) kytketään geeni, joka koodaa tätä proinsuliinia, mikrobiseen kloonaussiirtäjään, jossa geeni on koodikaavassa DNA-sekvenssin kanssa, joka koodaa lisäproteiinia ja pilkontakohtaa;
 - 20 2) transformoidaan kloonaussiirtäjä, joka sisältää kytketyn geenin, mikrobi-isäntään kimeerisen polypeptidin ekspressoimiseksi;
 - 3) ekspressoidaan kimeerinen polypeptidi; ja
 - 4) eristetään ekspressoitu kimeerinen polypeptidi.
- 25 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u lisävaiheesta, jossa kimeerinen polypeptidi pilkotaan proinsuliinin vapauttamiseksi.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u lisävaiheesta, jossa silloitusketju leikataan proinsuliinista.
- 30 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että silloitusketjun leikkausta edeltää disulfidi-sidosten muodostaminen A- ja B-ketjujen välille ja leikattu tuote on ihmisen insuliini.
6. Ihmisen proinsuliini, kun se on valmistettu
35 patenttivaatimuksen 3 menetelmällä.
7. Ihmisen insuliini, kun se on valmistettu patenttivaatimuksen 5 menetelmällä.

si se on
tämä on
tämä on

8. Kloonaussiirtäjä, joka on sovitettu mikrobi-isännän transformointia varten käytettäväksi siinä patenttivaatimuksen 1 mukaisen kimeerisen polypeptidin ekspressointiin.

5

9. Plasmidi pH17.

10. Plasmidi pBCA5.

11. Mikrobi-transformanttien, jotka sisältävät patenttivaatimuksen 8 mukaisen kloonaussiirtäjän, elinvoimainen viljely.,

10

12. Menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 1) viljellään patenttivaatimuksen 11 mukaista viljelyä, 2) erotetaan syntynyt solumassa, 3) eristetään ihmisen insuliinin prekursorit, jotka sisältävät patenttivaatimuksen 1 mukaisen kimeerisen polypeptidin, 4) lohkaistaan lisäproteiini siitä, 5) aikaansaadaan taaituminen ja A- ja B-ketjujen sitominen ja 6) leikataan silloitusketju.

15

13. Mikrobisesta ekspressoinnista saatu tuote, t u n n e t t u siitä, että se käsittää proinsuliinin polypeptidisekvenssin, joka sisältää ihmisen insuliinin A- ja B-ketjun yhdistettynä silloitusketjulla, jossa on vähintään 2 aminohappoyksikköä ja josta ihmisen insuliini on johdettavissa tämän silloitusketjun poisleikkaamisen jälkeen.

20

¹ met phe val asn gln his leu cys gly ser his ¹⁰ leu val glu ala leu tyr leu val cys gly
^{H1} AATTC ATG TTC GTC AAT CAG CAC CTT TGT GGT TCT CAC CTC CTC GAT GAA GCT TTG TAC CTT GTT TGC GGT
^{H2} G TAC AAG CAG CAG TTA GTC GTG GAA ACA CCA AGA GTC GAG CAA CTT CGA AAC ATG GAA CAA ACC CCA
^{H3} ^{H4} ^{H5} ^{H6} ^{H7} ^{H8} ^{B1} ^{B2}

³⁰ glu arg gly phe phe tyr thr pro lys thr arg arg glu ala glu asp leu gln val gly gln val glu
^{B3} ^{B4} ^{B5} ^{B6} ^{B7} ^{B8} ^{B9} ^{B10}

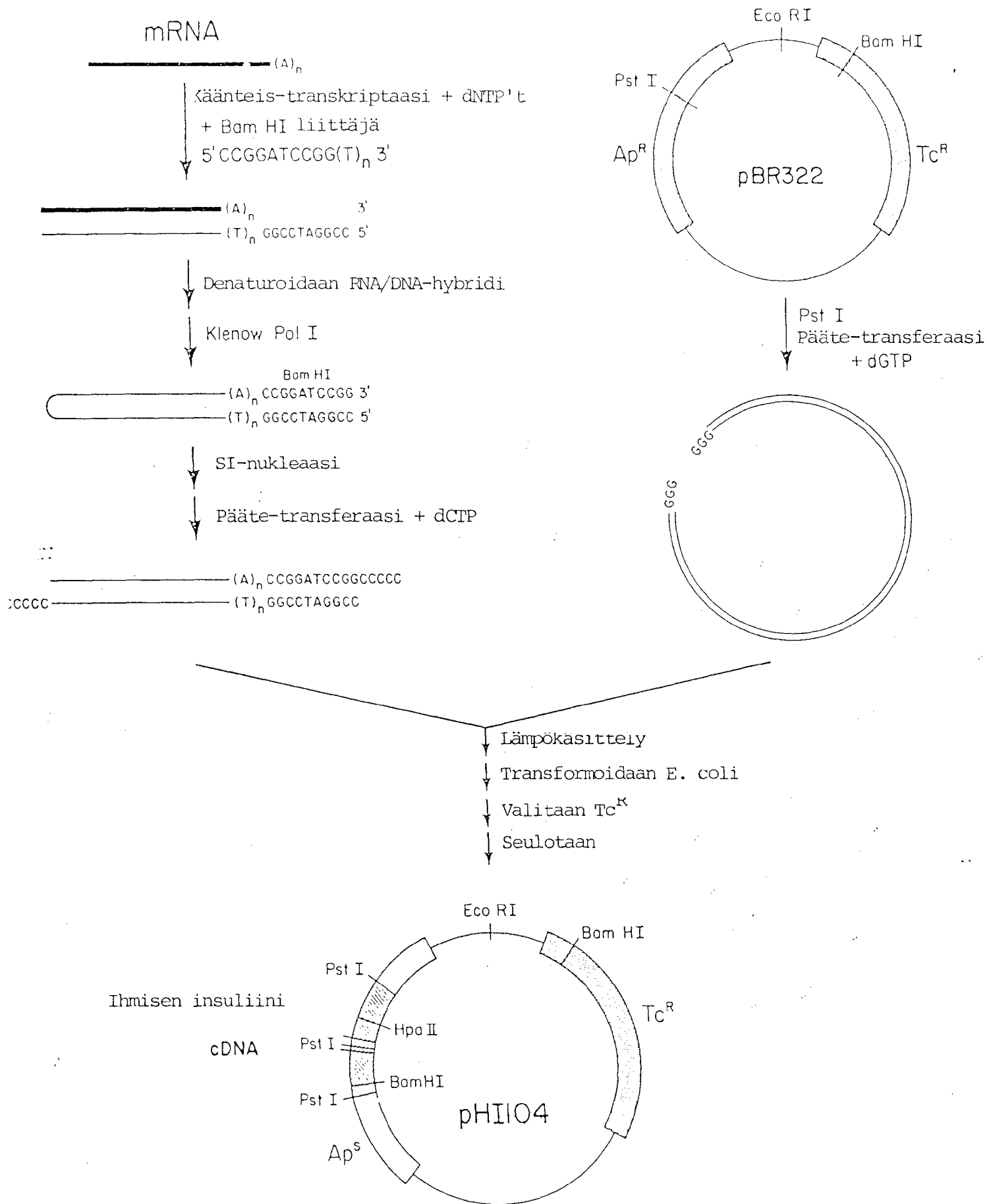
⁵⁰ leu gly gly pro gly ala gly ser leu gln pro leu ala leu glu gly ser leu gln lys arg gly
^{B11} ^{B12} ^{B13} ^{B14} ^{B15} ^{B16} ^{B17} ^{B18} ^{B19} ^{B20}

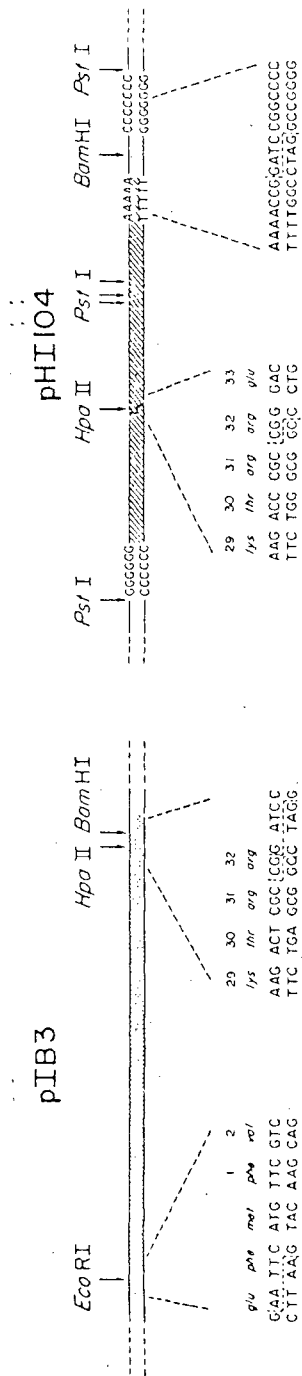
⁷⁰ ile val glu gln cys cys thr ser ile cys ser leu tyr gln leu glu asn tyr cys asn
^{B21} ^{B22} ^{B23} ^{B24} ^{B25} ^{B26} ^{B27} ^{B28} ^{B29} ^{B30}

⁸⁰ CGGCAGGCCAGCCCCACACCCCGCCCTCCCTGCCACCGAGAGATGGAATAAGCCCTTGAACCAGC-polyA-CCG
^{B31} ^{B32} ^{B33} ^{B34} ^{B35} ^{B36} ^{B37} ^{B38} ^{B39} ^{B40}

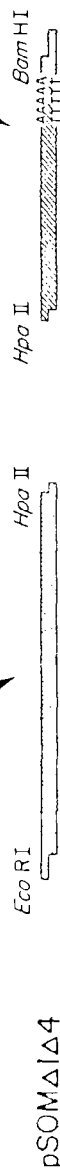
YNTTEETTINEN PROINSULIINIINIINI

Aminohapot 1-30 ovat B-ketju; 31-65 ovat C-ketju; ja 66-86 ovat A-ketju.

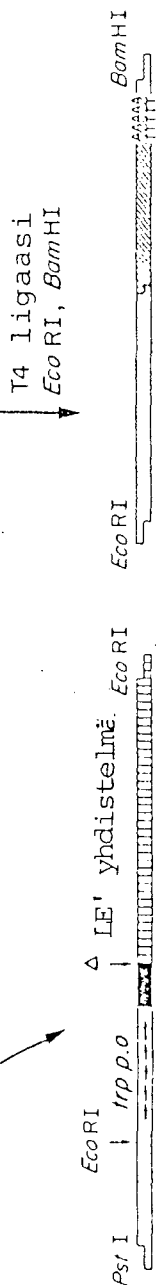




EcoRI, *HpaII* *BamHI*, *HpaII*

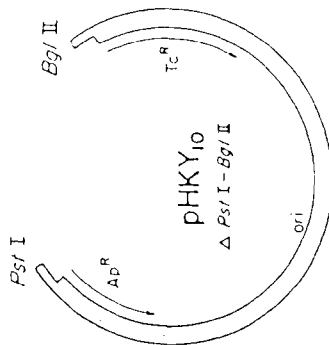
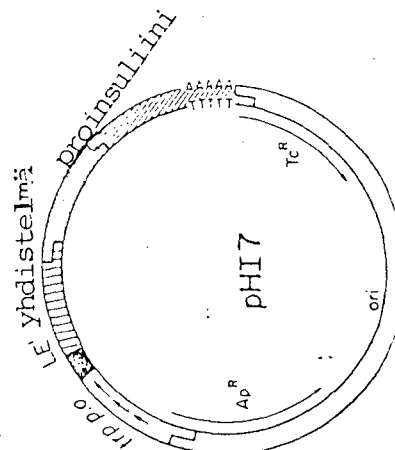


EcoRI ositt., *PstI*

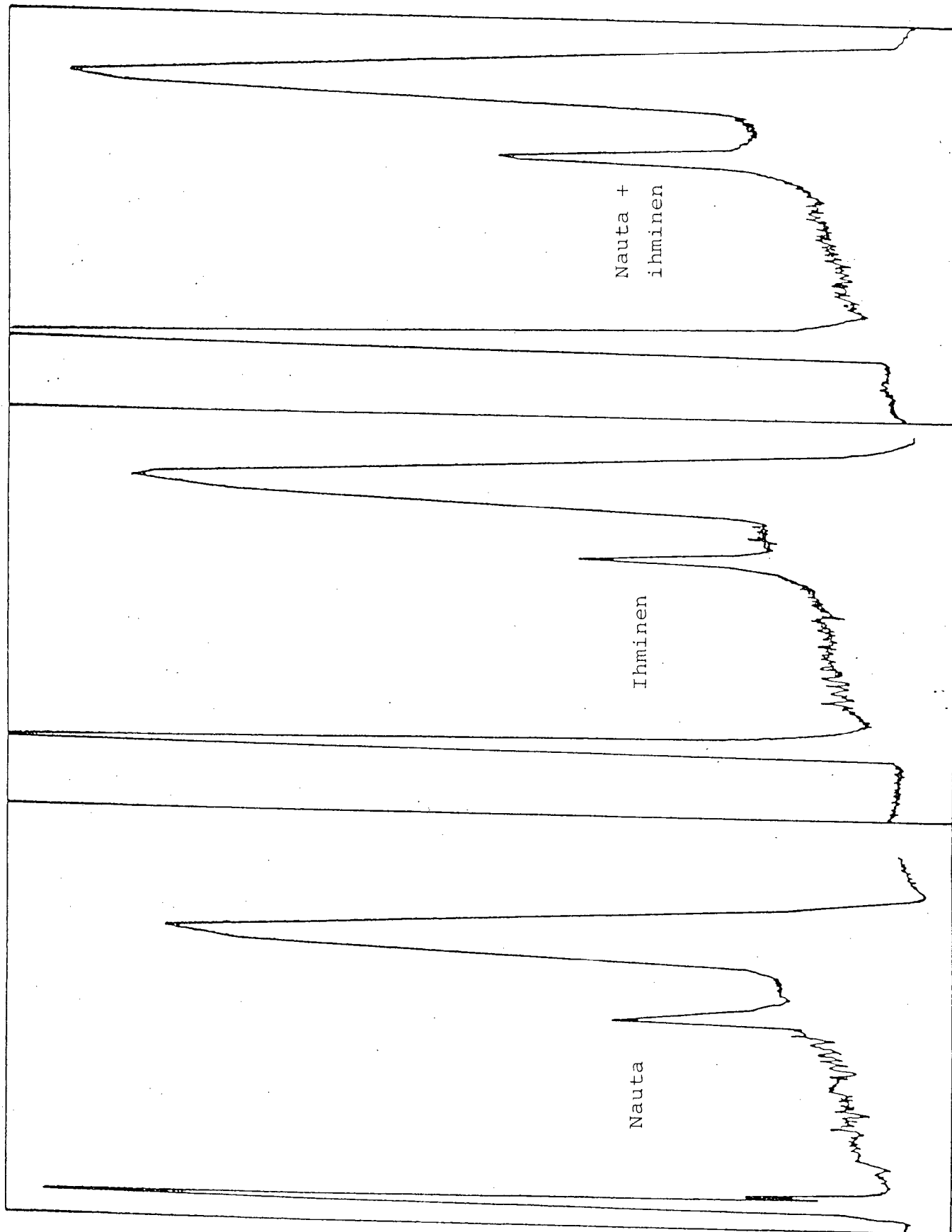


T4 ligaasi
EcoRI, *BamHI*

T4 ligaasi
Transformointi



5



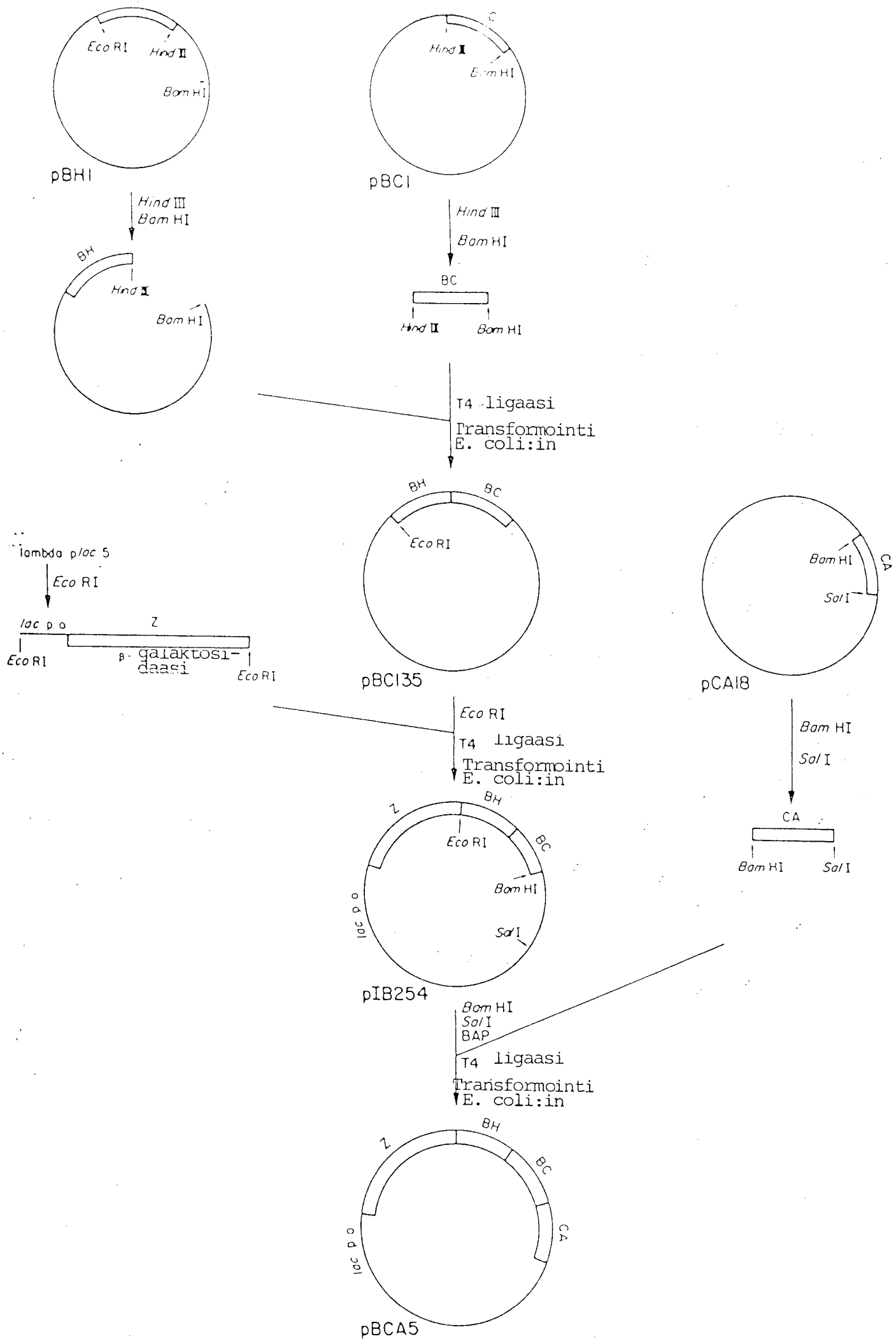
¹
 met phe val asn gln his leu cys gly ser his ¹⁰ leu val glu ala leu tyr leu val cys gly ²⁰
^{H1} AATTC ATG TTC GTC AAT CAG CAC CTT TGT GGT TCT CAC CTC GTT GAA GCT TTG TAC CTT GTT TGC GGT
^{H2} G TAC AAG CAG TTA GTC GTC GAA ACA CCA CCA AGA GTC GAG CAA CTT CGA AAC ATG GAA CAA ACG CCA
^{H3} ^{H4} ^{H5} ^{H6} ^{H7} ^{H8} ^{B1} ^{B2}

³⁰
 lu arg gly phe phe tyr thr pro lys thr arg gly ser lys arg gly ile val glu gln cys cys ⁴⁰
^{B3} AA CGT GGT TTC TTC TAC ACT CCT CCT AAG ACT CGT GGA TCC AAG CGT GGC ATC GTT GAA CAG TGT TGC
^{B4} TT GCA CCA AAG AAG ATG TGA GGA TTC TGA GCA CCT AGG TTC GCA CCG TAG CAA CTT GTC ACA ACG
^{B7} ^{B8} ^{B9} ^{C1} ^{C2} ^{C3} ^{C4} ^{A2} ^{A8}

⁵⁰
 hr ser ile cys ser leu tyr gln leu glu asn tyr cys asn
^{A3} CT TCT ATC TGC TCT CTT TAC CAG CTT GAG AAC TAC TGT AAC TAA TAG
^{A4} SA ACA TAG ACG AGA GAA ATG GTC GAA CTC TTG ATG ACA TTG ATT ATC AGCT
^{A5} ^{A6} ^{A9} ^{A10} ^{A11} ^{C5}

SYNTEETTISEN ANALOGISEN GEENIN PROINSULIINI-SILLOITUSKETJU

Aminohapot 1-30 ovat B-ketju; 31-36 ovat yhdysketju; ja 37-57 ovat A-ketju.



K U V A 6

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI - H - 792 481, -H-791841, -H-802837

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chryst Sarna

Allekirjoitus