



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **177433**

(13) B

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 12 N 15/15, 15/70, 15/71, 15/81

## Styret for det industrielle rettsvern

|                     |          |                        |                       |
|---------------------|----------|------------------------|-----------------------|
| (21) Søknadsnr      | 852389   | (86) Int. inng. dag og |                       |
| (22) Inng. dag      | 13.06.85 | søknadsnummer          |                       |
| (24) Løpedag        | 13.06.85 | (85) Videreføringsdag  |                       |
| (41) Alm. tilgj.    | 16.12.85 | (30) Prioritet         | 14.06.84, CH, 2882/84 |
| (44) Utlegningsdato | 06.06.95 |                        |                       |

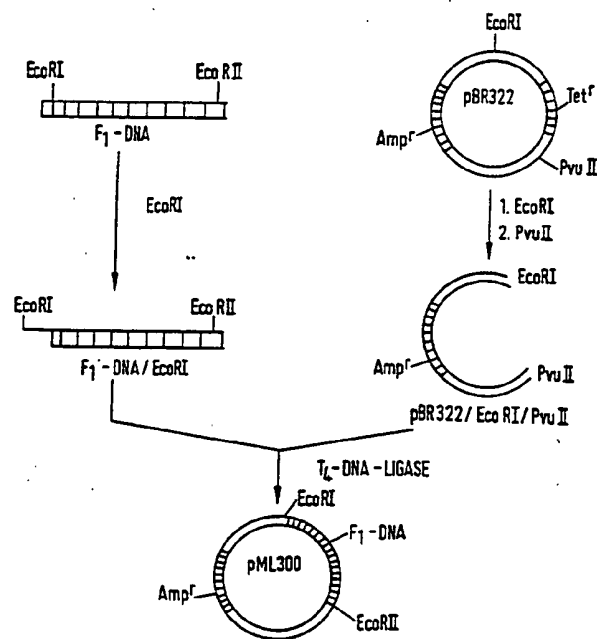
(71) Patentsøker Ciba-Geigy AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, CH  
UCP-Gen-Pharma AG, Solothurnstrasse 24, CH-3422 Kirchberg, CH  
(72) Oppfinner Manfred Liersch, Riehen, CH  
Hans Rink, Riehen, CH  
Markus Gerhard Grütter, Hochwald, CH  
Walter Märki, Möhlin, CH  
Bernd Meyhack, Magden, CH  
(74) Fullmektig Kari O. Hanssen, Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **DNA-vektor for ekspresjon av desulfatohirudin i gjær eller E.coli samt fremgangsmåte for fremstilling av desulfatohirudin og salter derav**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

DNA-sekvenser som koder for aminosyre-sekvensen av trombin-inhibitoren hirudin, hybridvektorer som inneholder slike DNA-sekvenser, vertsceller som er transformert med slike hybridvektorer, polypeptider med trombin-inhibitor-aktivitet som produseres av slike transformerte vertsceller, fremgangsmåte til fremstilling av disse DNA-sekvensene, hybridvektorer og transformerte vertsceller, og fremgangsmåter til fremstilling av disse trombin-inhibitorene ved hjelp av de transformerte vertscellene. Hirudin-forbindelsene som lar seg fremstille ifølge oppfinnelsen oppviser verdifulle farmakologiske egenskaper.



Foreliggende oppfinnelse vedrører DNA-vektor for ekspresjon av desulfatohirudin i gjær eller E.coli samt fremgangsmåte for fremstilling av desulfatohirudin og salter derav.

5 I plasma hos sunne pattedyrorganismer finnes en dynamisk likevekt mellom det fibrinolytiske systemet og koagulerings-systemet, derved opprettholdes et funksjonsdyktig nett av blodkar. Ved skader i blodkarene avleirer koagulerings-systemet en fibrin-matriks som etter at den hemostatiske  
10 tilstanden er oppnådd, igjen nedbryter av det fibrinolytiske systemet. I tilfeller hvor organismens fibrinolytiske potensial ikke er tilstrekkelig til å nedbryte dannede intravaskulære tromber, f.eks. hos pasienter som lider av tromboembolier eller postoperative komplikasjoner, har det  
15 vist seg nødvendig å understøtte organismen ved administrering av trombolytiske midler eller antikoagulanter.

I den konvensjonelle antikoaguleringsterapien har man hittil fremfor alt anvendt heparin, men også 4-hydroksykumarin- og  
20 1,3-indandion-derivater. Selv om man med disse midlene har oppnådd bemerkelsesverdige resultater oppviser de likevel noen ulemper. Heparin virker ikke direkte på blodkoaguleringsforløpet, men utøver sin koaguleringshemmende virkning indirekte ved at den akselererer hemningen av trombin og  
25 faktoren X ved antitrombin III. Heparin inngår videre i organismen i tallrike uspesifikke reaksjoner og nøytraliseres av blodplatefaktor 4, dette påvirker spesielt anvendeligheten ved forbruks-koaguleringen, henholdsvis den disseminerte intravasale koaguleringen (DIC). Det foreligger følgelig et  
30 behov for alternative og spesifikke midler til antikoagulasjonsterapi.

Et antikoagulasjonsmiddel, hirudin, som forekommer naturlig i blodigle (*hirudo medicinalis*) har lenge vært kjent. Hirudin  
35 er et polypeptid som består av 65 aminosyrer og har fullstendig oppklart primærstruktur (1) og oppviser som strukturelt kjennetegn en opphopning av hydrofobe aminosyrer ved

N-terminalen og polare aminosyrer ved C-terminalen, en som sulfatmonoester foreliggende tyrosin-rest (Tyr<sup>63</sup>) og tre disulfidbroer, hvis eksakte plassering riktignok ikke er kjent.

5

Hirudin er med en  $K_i$ -verdi (kompleks-dissosiasjonskonstant) på  $6 \cdot 10^{-11}$  M den sterkeste av alle kjente trombin-inhibitorer og karakteriseres ved en spesifikk affinitet for trombin; andre enzymer i blodkoaguleringskaskaden inhiberes ikke. I motsetning til heparin utøver hirudin sin inhiberende virkning på trombin direkte og ikke, som førstnevnte, over antitrombin III. Den eneste farmakologisk påviselige effekten av renset hirudin er hemningen av blodkoagulasjonen, henholdsvis profylaksen av trombose. Ved intravenøs administrering til hunder kunne man selv ved høye doser ikke påvise noen påvirkning på hjerteslagfrekvensen, åndingen, blodtrykket, trombocyt-tallet, fibrinogen og hemoglobin. Ved forsøk med rotter, svin og hund viste hirudin seg å være virksomt ved eksperimentell trombose (fremkalt enten ved stasis eller ved injeksjon av trombin), ved endotoksinsjokk samt DIC (disseminert intravasal koagulering). Ved direkte sammenligningsforsøk med heparin viste hirudin seg overlegen sammenlignet med denne i alle undersøkte tilfeller.

10

15

20

Selv om det lenge har vært kjent, har hirudin inntil idag ikke oppnådd den brede terapeutiske anvendelsen som man på grunn av de utmerkede biologiske egenskapene skulle vente. Hittil har hirudin-preparater utelukkende latt seg fremskaffe som dyre og vanskelig tilgjengelige naturmaterialer, med utgangspunkt i blodigleekstrakter som var underkastet tidkrevende og dyre isolerings- og renseprosesser (se referanse 2). Den relativt lange sekvensen av 65 aminosyrer gjorde at også den klassiske peptid-syntesen fra økonomisk synspunkt syntes å være lite lovende. For å fremstille tilstrekkelige mengder hirudin, for først å gjøre detaljerte kliniske undersøker vedrørende forbindelsens terapeutiske

25

30

35

potensial og brede terapeutiske anvendelse i koagulasjons-  
terapien mulig, må man gå nye veier.

I denne sammenheng synes spesielt den rekombinante DNA-  
teknologien å by på muligheter. Med dens hjelp er det mulig å  
fremstille de forskjelligste fysiologisk aktive polypeptider  
ved dyrking av tilsvarende genetisk modifiserte mikro-  
organismer eller cellekulturer fra pattedyr.

En viktig oppgave er følgelig ved hjelp av genteknologiske  
midler å tilveiebringe et ekspresjonssystem som tillater den  
mikrobiologiske fremstilling av polypeptider med hirudin-  
aktivitet i industriell målestokk. Denne oppgaven kan løses  
ved at det tilveiebringes hybridplasmider som inneholder en  
for aminosyresekvensen i hirudin kodende DNA-sekvens, som  
kontrollerer ekspresjonskontrollsekvensen på en slik måte at  
polypeptid med hirudin-aktivitet uttrykkes i en med denne  
hybridvektoren transformert vertscelle.

Det var å vente at ekspresjonen av slike DNA-sekvenser i  
transformerte vertsceller (med unntak av transformerte  
igleceller) i fravær av ekstra innbygde sulfatoverførende  
enzymssystemer ville føre til et produkt som hovedsakelig  
skiller seg fra naturlig hirudin ved at sulfatresten ved  
tyrosin-63 mangler. Den biologiske funksjonen av sulfatrester  
i proteiner generelt og i hirudin spesielt er ikke definitivt  
klarlagt i alle enkeltheter; likevel skal sulfatresten ifølge  
de kunnskaper man nå sitter inne med påvirke de fysiologiske  
egenskapene for proteiner i ikke-uvesentlig grad. Slik skal  
sulfatresten utøve følgende funksjoner:

- (1) Positiv påvirkning av den biologiske aktiviteten for  
proteinet;
- (2) Deltagelse i den regulatoriske celleprosessen (som kjent  
fra den reversible fosforyleringen);
- (3) Stimulering av sekresjonen, dvs. sulfateringen tjener som  
markering for gjenkjennelsen som sekretorisk protein;

alle kjente sulfaterte proteiner er sekretoriske eller transmembranproteiner.

5        Overraskende ble det nå funnet at i motsetning til de teoretiske forestillingene opprettholdes de verdifulle biologiske egenskapene for hirudin også når den karakteristiske sulfatmonoestergruppen av fenolisk hydroksyl i Tyr<sup>63</sup>-resten fjernes. De hirudinforbindelsene uten sulfatrest ("desulfatohirudin") som fremstilles ved hjelp av de  
10        transformerte mikroorganismene viser seg nemlig, sammenlignet med naturlig hirudin når det gjelder biologiske egenskaper, og spesielt antikoagulerende virkning, kvalitativt og kvantitativt i det minste jevnbyrdige.

15        Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgende DNA-vektor for ekspresjon av desulfatohirudin i gjær eller E.coli, kjennetegnet ved at den inneholder en DNA-sekvens som koder for desulfatohirudin med formelen

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

25        som kontrolleres av en gjær- hhv. E.coli-ekspresjonskontrollsekvens, slik at desulfatohirudin uttrykkes i en med denne ekspresjonsvektoren transformert gjær- hhv. E.coli-stamme.

30        Oppfinnelsen omfatter videre en fremgangsmåte for fremstilling av desulfatohirudin og salter derav, kjennetegnet ved at man transformerer gjær- eller E.coli-celler med en vektor som omtalt ovenfor for ekspresjon av desulfatohirudin, de resulterende transformerte gjær- eller E.coli-  
35        cellene dyrkes i et flytende næringsmedium som inneholder assimilerbare karbon- og nitrogenkilder og desulfatohirudin isoleres og, om ønsket, overføres et oppnådd salt til fritt

desulfatohirudin eller oppnådd fritt desulfatohirudin til et salt.

I det følgende er ved betegnelsene DNA-sekvenser eller gener som koder for aminosyre-sekvensen i hirudin, slike DNA-sekvenser eller gener å forstå som ved ekspresjon gir hirudinlignende polypeptider, som adskiller seg fra naturlig hirudin spesielt ved at sulfatestergruppen ved tyrosin-63 mangler ("desulfatohirudin").

Utvinningsen av genomisk hirudin-DNA og av hirudin-ds cDNA foregår eksempelvis ved i og for seg kjente fremgangsmåter. Slik utvinnes man genomisk hirudin-DNA eksempelvis fra en igle-genbank som inneholder hirudin-genet, ved at man kloner igle-DNA-fragmentet i en mikroorganisme og identifiserer klonet som inneholder hirudin-DNA, f.eks. ved kolonihybridisering ved anvendelse av et radioaktivt merket hirudin-DNA spesifikt oligodesoksynukleotid, som inneholder minst 15, fortrinnsvis 15-30 desoksynukleotider. De slikt fremstilte DNA-fragmentene inneholder ved siden av hirudin-genet som regel andre uønskede DNA-bestanddeler, disse kan avspaltes ved behandling med egnede ekso- eller endonukleaser.

Dobbeltkjedet hirudin-cDNA kan eksempelvis fremstilles ved at man egnede, fortrinnsvis til hirudin-dannelse induerte igleceller utvinnes mRNA, den slik fremstilte mRNA-blandingen anrikes på kjent måte med hirudin-mRNA, dette mRNA anvendes som templat for fremstillingen av enkeltkjedet cDNA, derav syntetiseres det cDNA ved hjelp av en RNA-avhengig DNA-polymerase, og denne klones inn i en egnet vektor. Kloner som inneholder hirudin-cDNA identifiseres eksempelvis, som beskrevet ovenfor, ved kolonihybridisering under anvendelse av et radioaktivt merket hirudin-DNA spesifikt oligodesoksynukleotid.

De på denne måten fremstilte genomiske hirudin-DNA eller hirudin-cDNA knyttes fortrinnsvis sammen ved 5'- og ved 3'-enden med kjemisk syntetiserte adapter-oligodesoksynukleotider som inneholder gjenkjenningssekvensen for en eller  
5 forskjellige restriksjonsendonukleaser og dermed letter innbygningen i egnede vektorer. I tillegg må adaptermolekylet inneholde translasjons-startsignalet (ATG) for 5'-enden av hirudin-DNA henholdsvis -cDNA. Translasjons-startsignalet må  
10 være anbragt på en slik måte at koden for den første aminosyren følger direkte etter hirudinet.

Siden strukturen for det naturlige hirudin-genet ikke er kjent og den kjemiske syntesen av et for aminosyre-sekvensen i hirudin kodende gen ("desulfatohirudin-gen") på grunn av de  
15 moderne syntesemulighetene byr på fordeler, spesielt tidsmessige fordeler, utgjør den sistnevnte en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse.

DNA i forbindelse med oppfinnelsen inneholder i tillegg til  
20 kodonene for desulfatohirudin translasjons-start- og stoppsignaler som muliggjør en ekspresjon i egnede vertsceller, eksempelvis E.coli, videre nukleotidsekvenser på endene som er egnet for innbygging i en vektor.

25 Det er fordelaktig at DNA ved 5'-enden innbefatter en nukleotidsekvens som kan kuttes av et restriksjonsenzym fulgt av translasjons-startsignalet, kodoner for aminosyrene i hirudin, som eventuelt muliggjør kutting på en eller flere posisjoner ved et restriksjonsenzym, et translasjons-  
30 stoppsignal og ved 3'-enden en nukleotidsekvens som lar seg kutte av et restriksjonsenzym. Restriksjonsenzymet som kan anvendes er eksempelvis EcoRI, EcoRII, BamHI, HpaII, PstI, HinfI eller HindIII.

35 Spesielt fordelaktig er et dobbeltkjedet DNA bestående av en nukleotidsekvens av formel I og den komplementære nukleotidsekvensen

|    |     |                   |                   |     |     |     |     |     |
|----|-----|-------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | 5'  | (X') <sub>n</sub> | Met<br>ATG        |     |     |     |     |     |
|    | Val | Val               | Tyr               | Thr | Asp | Cys | Thr | Glu |
|    | GTX | GTX               | TAY               | ACX | GAY | TGY | ACX | GAM |
| 5  | Ser | Gly               | Gln               | Asn | Leu | Cys | Leu | Cys |
|    | QRS | GGX               | CAM               | AAY | YTZ | TGY | YTZ | TGY |
|    | Glu | Gly               | Ser               | Asn | Val | Cys | Gly | Gln |
|    | GAM | GGX               | QRS               | AAY | GTX | TGY | GGX | CAM |
|    | Gly | Asn               | Lys               | Cys | Ile | Leu | Gly | Ser |
|    | GGX | AAY               | AAM               | TGY | ATN | YTZ | GGX | QRS |
| 10 | Asp | Gly               | Glu               | Lys | Asn | Gln | Cys | Val |
|    | GAY | GGX               | GAM               | AAM | AAY | CAM | TGY | GTX |
|    | Thr | Gly               | Glu               | Gly | Thr | Pro | Lys | Pro |
|    | ACX | GGX               | GAM               | GGX | ACX | CCX | AAM | CCX |
| 15 | Gln | Ser               | His               | Asn | Asp | Gly | Asp | Phe |
|    | CAM | QRS               | CAY               | AAY | GAY | GGX | GAY | TTY |
|    | Glu | Glu               | Ile               | Pro | Glu | Glu | Tyr | Leu |
|    | GAM | GAM               | ATN               | CCX | GAM | GAM | TAY | YTZ |
|    | Gln | NON               |                   |     |     |     |     |     |
|    | CAM | TMK               | (X') <sub>m</sub> | 3'  |     |     |     |     |
| 20 |     |                   |                   |     |     |     |     |     |

(I)

hvor nukleotidsekvensen er angitt med begynnelse ved 5'-  
enden og for en bedre forståelse av aminosyrene som hver  
25 triplett koder for, har man følgende betydninger

- A desoksyadenosyl,  
T tymidyl,  
G desoksyguanosyl,  
C desoksycytidyl,  
30 X A, T, C eller G,  
Y T eller C,  
Z A, T, C eller G, når Y = C,  
eller Z = A eller G, når Y = T,  
Q T eller A,  
35 R C og S = A, T, C eller G, når Q = T,  
eller R = G og S = T eller C, når Q = A,  
M A eller G,

L      A eller C,  
 N      T, C eller A,  
 K      A eller G, når M = A,  
 eller K = A, når M = G,

5

og  $(X')_n$  og  $(X')_m$  betyr nukleotidsekvenser med n og m større enn 3 og mindre enn 100, spesielt større enn 5 og mindre enn 15, som kan gjenkjennes og kuttes av et restriksjonsenzym.

10 Fordelaktig er først og fremst et dobbeltkjedet DNA som inneholder en av E.coli foretrukket og for aminosyrene i hirudin kodende triplett. Slike tripletter er spesielt

for glycin (Gly)                      GGT

cystein (Cys)                      TGC

15 valin (Val)                      GTT

leucin (Leu)                      CTG

serin (Ser)                      TCT

treonin (Thr)                      ACC

fenylalanin (Phe)                      TTC

20 tyrosin (Tyr)                      TAC

metionin (Met)                      ATG

asparaginsyre (Asp)                      GAC

glutaminsyre (Glu)                      GAA

lysin (Lys)                      AAA

25 isoleucin (Ile)                      ATC

histidin (His)                      CAC

prolin (Pro)                      CCG

glutamin (Gln)                      CAG

asparagin (Asn)                      AAC

30

Foretrukket stoppsignal (NON) er kodonet TAG.

En fordelaktig utførelsesform av et for aminosyresekvensen i hirudin kodende gen ved den ovenfor angitte fremgangsmåten er

35 DNA av formel II,

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly  
 CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT  
 GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA  
 (EcoRI)

5 SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysVal  
 TCTAACGTTTGC GGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTCTGACGGTGAAAAAACAGTGCGTT  
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCACGCAA  
 (EcoRII)

ThrGlyGluGlyThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGlu  
 ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAA  
 TGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTT

10 TyrLeuGlnNON  
 TACCTGCAGTAGGATCCTG  
 ATGGACGTCATCCTAGGAC  
 (BamHI)

(II)

15 hvor A, T, G, C har de under formel I angitte betydninger  
 og for å lette forståelsen er de aminosyrene som hver  
 triplett koder for, og kutteposisjonene for restriksjons-  
 enzymer angitt.

20 Anvendes kan også enkeltkjedede DNA-fragmenter av desulfato-  
 hirudin-genet, spesielt slike som ved kjemiske og/eller  
 enzymatiske fremgangsmåter lar seg sammenføye til desulfato-  
 hirudin-genet. Først og fremst vedrører oppfinnelsen  
 enkeltkjedede DNA-fragmenter med mer enn 20 nukleotider,  
 25 spesielt med 20-70 nukleotider.

Fremgangsmåter til syntese av DNA er sammenfattende angitt  
 av S.A. Narang (3). De kjente synteseteknikkene tillater  
 fremstilling av polynukleotider med en lengde på opp mot  
 30 20 baser i godt utbytte, høy renhet og på forholdsvis kort  
 tid. Egnede beskyttede nukleotider knyttes sammen med  
 hverandre ved fosfordiestermetoden (4), den mer effektive  
 fosfortriestermetoden (5) eller fosfitt-triestermetoden  
 (6). En forenkling av syntesen av oligo- og polynukleotider  
 35 muliggjøres ved fastfase-fremgangsmåten, hvor nukleotid-  
 kjedene bindes til en egnet polymer. Itakura et al. (7)  
 anvender ved faststoff-syntesen istedenfor enkelte nukleotider

trinukleotider som er sammenknyttet ved fosfotriester-  
fremgangsmåten, som på kort tid og med godt utbytte eksempel-  
vis kan kondenseres til et polynukleotid med 31 baser.  
Det egentlige dobbeltkjededde DNA kan oppbygges enzymatisk  
5 av kjemisk fremstilte korte segmenter. Khorana et al. (8)  
anvender for dette formål overlappende polynukleotid-  
sekvenser fra begge DNA-kjedene, som ved basepardannelse  
holdes sammen i riktig anordning og deretter kan knyttes  
sammen kjemisk ved hjelp av enzymet DNA-ligase. En ytterligere  
10 mulighet består i å inkubere en polynukleotid-sekvens fra  
begge DNA-kjedene med et kort overlappende segment i nærvær  
av de fire påkrevde desoksynukleosid-trifosfat med en DNA-  
polymerase, f.eks. DNA-polymerase I, Klenow-fragmentet  
av polymerase I, T<sub>4</sub> DNA-polymerase, eller med AMV (avian  
15 myeloblastosis virus) revers transskriptase. Derved holdes  
ved basepardannelse begge polynukleotid-sekvensene sammen  
i riktig anordning og fullstendigkjøres ved enzymet med  
de påkrevde nukleotidene til et fullstendig, dobbeltkjedet  
DNA (9). Itakura et al. (10) beskriver hvordan man med  
20 utgangspunkt i dette prinsippet i nærvær av DNA-polymerase  
I (Klenow-fragment) kan oppbygge et 132 basepar langt  
segment av det humane leukocyt-interferon  $\alpha_2$ -genet fra  
fire kjemisk syntetiserte fragmenter med en lengde på 39-  
42 baser, derved oppnår man en innsparing på 40% i kjemisk  
25 syntese sammenlignet med den ovenfor omtalte fremgangsmåten  
hvor bare ligase anvendes.

En mulig fremgangsmåte til fremstilling av DNA, som inne-  
holder et strukturen for desulfatohirudin og er egnet for  
30 ekspresjon i vertsceller, og hvis ender muliggjør innbygging  
i vektorer, og fragmenter derav, omfatter at

- a) et egnet beskyttet desoksynukleosid bindes til en fast  
bærer,
- b) egnet beskyttet di-, tri- eller tetranukleotid fremstilles  
35 ved fosfotriester- eller fosfitt-fremgangsmåten,
- c) et til bæreren bundet desoksynukleosid eller oligodesoksy-  
nukleotid knyttet sammen med egnede beskyttede mono- eller

(ifølge b) fremstilte di-, tri- eller tetranukleotider ved fosfotriester- eller fosfitt-fremgangsmåten,

d) ved c) oppnådde, til bæreren bundne oligodesoksynukleotider med en lengde mellom 20 og 70 baser avspaltes fra bæreren, renses eventuelt, befris for beskyttelsesgruppene og de frie 5'-terminale hydroksygruppene fosforyleres,

e1) 2 oligodesoksynukleotider hver av en lengde på 20 til 70 baser fra den kodende og komplementære kjeden med minst 3, fortrinnsvis 8-15, overlappende basepar rekombineres og fullstendigkjøres med en DNA-polymerase i nærvær av fire desoksynukleosid-trifosfater til dobbeltkjededede DNA-seg-  
menter (fragmenter og desulfatohirudin-genet),  
og eventuelt knyttes 2 dobbeltkjededede DNA-seg-  
menter med egnede ifølge d) fosforylerte ender sammen med en ligase  
til desulfatohirudin-strukturgenet,

eller to fremstilte dobbeltkjededede DNA-seg-  
menter subklones i egnede vektorer, fosforyleres deretter ifølge d) og knyttes sammen med en ligase til desulfatohirudin-  
strukturgenet, eller

e2) alternativt rekombineres 2 oligodesoksynukleotider fra den kodende og den komplementære kjeden med en lengde på f.eks. 20-70 baser og med minst 3, fortrinnsvis 8-15, overlappende basepar, oppfylt med en DNA-polymerase i nærvær av fire desoksynukleosid-trifosfater og knyttes sammen med ligase til desulfatohirudin-strukturgenet.

I trinn a) kan et stort antall faste bærermaterialer benyttes, som polystyren med forskjellig fuktbarhet og svelleevne, polyakrylamid, polyakrylamid-kopolymerer, polyamid eller funksjonalisert silan belagt på uorganisk materiale som kiselgur, kiselgel eller aloks. Fordelaktig anvendes kryssbundne polystyren som bærermaterialer, disse kan knyttes sammen ved hjelp av "spacere" som alkylengrupper med 2-12 C-atomer avbrutt av 1-5 polare toverdige funksjonelle grupper, som imino, okso, tio, oksykarbonat eller amido-karbonyl, på i og for seg kjent måte med 5'-OH-gruppen i egnede beskyttede desoksynukleosider. Spesielt foretrukket er

reaksjonen av i 5'-posisjon og eventuelt i basedelen beskyttede nukleosider av formel V, hvor  $R^1$  betyr en ved syre avspaltbar beskyttelsesgruppe, som en triarylmetylbeskyttelsesgruppe, eksempelvis en 4-metoksytrityl- eller en 4,4'-  
5 dimetoksytritylgruppe, eller en trilaverealkylsilylbeskyttelsesgruppe, eksempelvis en tert-butyldimetylsilylgruppe, og hvor B står for en eventuelt beskyttet base valgt fra tymyl, cytosyl, adenyl eller guanyl, med ravsyreanhydrid, eventuelt i nærvær av baser, som pyridin, trietylamin eller  
10 dimetylaminopyridin, etterfulgt av reaksjon med aminometylert polystyren, som er kryssbundet ved 0,5 til 2% divinylbenzen, ved hjelp av reagenser som aktiverer karboksylsyreresten, fortrinnsvis N-hydroksysuccinimid, eller p-nitrofenol og vanntrekkende midler, som karbodiimider, eksempelvis  
15 dicykloheksylkarbodiimid (reaksjonsskjema 1).

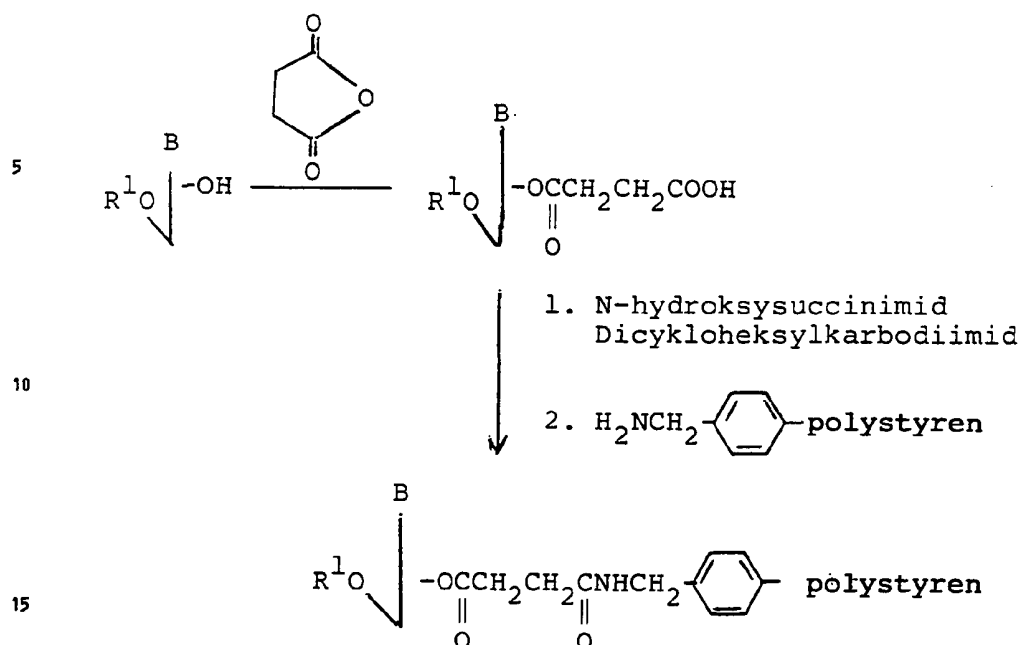
Omsetningen foregår i et inert, ikke-protisk oppløsningsmiddel, som f.eks. pyridin, tetrahydrofuran, dioksan, eddiksyreetyler, kloroform, metylenklorid, dimetylformamid  
20 eller dietylacetamid eller i blandinger derav, ved romtemperatur eller svakt forhøyet eller redusert temperatur, f.eks. i temperaturområdet fra  $-10^{\circ}\text{C}$  til  $50^{\circ}\text{C}$ , fortrinnsvis ved romtemperatur, omsetningen i nærvær av det vanntrekkende midlet også ved lavere temperatur, f.eks. ved ca.  $0^{\circ}\text{C}$ .

25

30

35

## Reaksjonsskjema 1

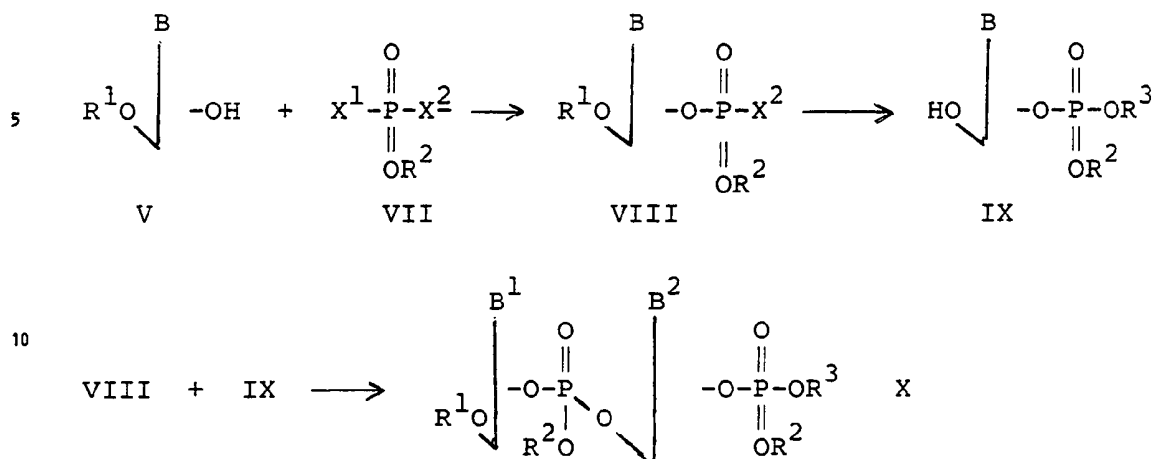


Ved fremstillingen av di-, tri- eller tetranukleotider ifølge trinn b) (reaksjonsskjema 2) omsettes i 5'-stilling og eventuelt i basedelen beskyttede nukleosider av formel V, hvor R<sup>1</sup> og B har de ovenfor angitte betydninger, med aktiverte fosforestere av formel VII, hvor X<sup>1</sup> og X<sup>2</sup> uavhengig av hverandre står for hydroksy eller derav avledede salter, halogen, imidazolyl, 1,2,4-triazol-1-yl, tetrazolyl eller 1-benztriazolyloksy og X<sup>2</sup> i tillegg også står for 2-cyano-etyloksy, 2-trihalogenetyloksy, 2-aryltioetyloksy eller 2-(4-nitrofenyl)-etyloksy og R<sup>2</sup> står for en ved en base eller et nukleofil, som ammoniumhydroksyd, tiofenolat eller et arylaldoksymat, avspaltbar beskyttelsesgruppe, som eventuelt ved halogen, nitro og/eller laverealkyl substituert fenyl, metyl eller eventuelt ved nitro substituert benzyl, eller en ved metallioner avspaltbar beskyttelsesgruppe, som 8-kinolyl eller 5-kloro-8-kinolyl, eventuelt i nærvær av vanntrekkende midler eller i nærvær av baser.

Deretter omsettes en slik fremstilt forbindelse av formel VIII, hvor  $R^1$ ,  $X^2$  og  $R^2$  har de ovenfor angitte betydninger, først eventuelt med en 2-substituert etanol som omvandler resten  $X^2$  til en gruppe  $OR^3$ , hvor  $R^3$  betyr cyanoetyl, 2-trihalogenetyl, 2-arylsulfonyletyl, 2-laverealkyltioetyl, 2-aryltioetyl eller 2-(4-nitrofenyl)-etyl, og deretter avspaltes beskyttelsesgruppen  $R^1$ , og den slik fremstilte forbindelsen av formel IX omsettes med en annen forbindelse av formel VIII, eventuelt i nærvær av vanntrekkende midler eller i nærvær av baser, til et dinukleotid X (reaksjons-skjema 2). Eventuelt omvandles en forbindelse av formel VIII ved reaksjon med baser og vann til en annen forbindelse av formel VIII, hvor  $X^2$  betyr hydroksy eller derav avledede salter.

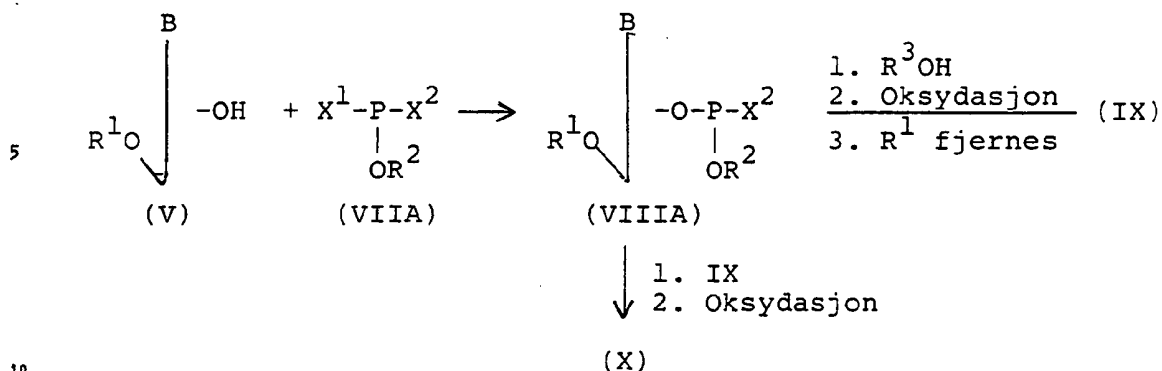
Omsetningen foregår i et av de ovenfor omtalte inerte oppløsningsmidler ved romtemperatur eller svakt forhøyet eller redusert temperatur, f.eks. ved romtemperatur.

Avspaltningen av beskyttelsesgruppen  $R^1$  gjennomføres f.eks. ved hjelp av syrer, som mineralsyrer, f.eks. saltsyre eller svovelsyre, karboksylsyrer, f.eks. eddiksyre, trikloreddiksyre eller maursyre, sulfonsyre, f.eks. metan- eller p-toluensulfonsyre, eller spesielt Lewis-syrer, f.eks. sinkklorid, sinkbromid, aluminiumklorid, dialkylaluminiumhalogenid, f.eks. dibutyl- eller dietylaluminiumklorid, eller bortrifluorid, ved 10°C til 50°C, spesielt ved romtemperatur. Ved anvendelse av et dialkylaluminiumhalogenid foregår avspaltningen i et lipofilt oppløsningsmiddel, spesielt i toluen, og ved anvendelse av en annen av de nevnte Lewis-syrene i en oppløsningsmiddelblanding som består av et halogen-hydrokarbon, f.eks. metylenklorid, og en lavalkanol, f.eks. etanol eller isopropanol.

Reaksjonsskjema 2

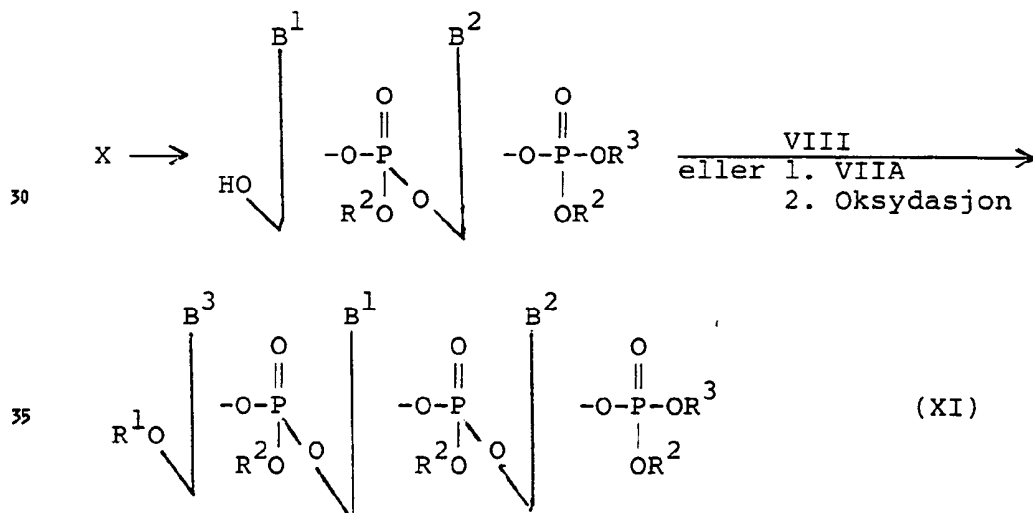
Fremstillingen av dinukleotider av formel X omfatter også reaksjonen mellom nukleosider av formel V, hvor  $\text{R}^1$  og B har de ovenfor angitte betydninger, med fosfitter av formel VIIA, hvor  $\text{X}^1$  står for halogen, spesielt klor,  $\text{X}^2$  halogen, spesielt klor, eller dilaverealkylamino, spesielt dimetyl- amino eller diisopropylamino, eller morfolino, piperidino eller pyrrolidino, og  $\text{R}^2$  har den for VII ovenfor angitte betydning, spesielt metyl, eventuelt i nærvær av en egnet base (reaksjonsskjema 3). Forbindelsene av formel VIIIA omsettes på den ene siden med 2-substituert etanol som omvandler resten  $\text{X}^2$  til en gruppe  $\text{OR}^3$ , hvor  $\text{R}^3$  har de ovenfor angitte betydninger, deretter oksyderes den til fosfat med et oksydasjonsmiddel, f.eks. jod i nærvær av en base og beskyttelsesgruppen  $\text{R}^1$  avspaltes, hvorved en forbindelse av formel IX oppstår, på den annen side omsettes med en forbindelse av formel IX, deretter oksyderes med et oksydasjonsmiddel, f.eks. jod i nærvær av en base, til en forbindelse av formel X.

## Reaksjonsskjema 3



Til fremstilling av trinukleotider avspaltes beskyttelsesgruppen  $\text{R}^1$  i dinukleotider av formel X, hvor  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  og  $\text{R}^3$  har de ovenfor angitte betydninger og hvor  $\text{B}^1$  og  $\text{B}^2$  uavhengig av hverandre står for tymol, cytosyl, adenyl eller guanyl, og den fremstilte forbindelsen omsettes med en forbindelse av formel VIII, eventuelt i nærvær av vanntrekkende midler eller i nærvær av baser, eller med en forbindelse av formel VIIIA og etterfølgende oksydasjon, hvorved en forbindelse av formel XI oppstår (reaksjonsskjema 4). Avspaltningen av beskyttelsesgruppen  $\text{R}^1$  og kondensasjonen til trinukleotider av formel XI foregår på samme måte som beskrevet ved fremstillingen av dinukleotider av formel XI.

## Reaksjonsskjema 4



Til fremstillingen av tetranukleotider bringes trinukleotider av formel XI til reaksjon på samme måte som beskrevet ovenfor for dinukleotider av formel X.

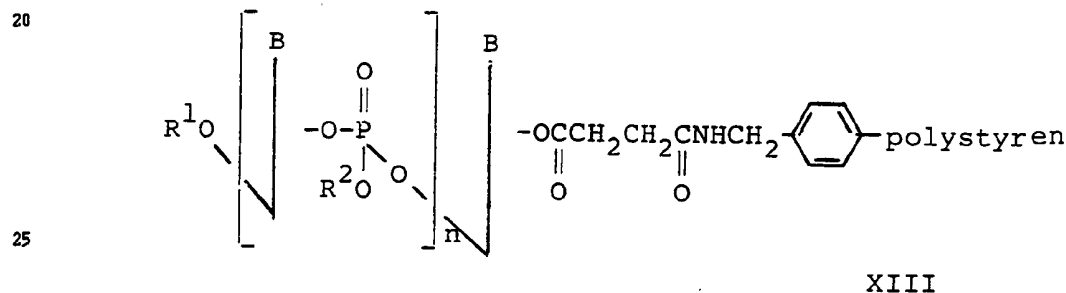
5 Det er fordelaktig at det som beskyttelsesgruppe  $R^1$  anvendes 4-metoksytritylgruppe, som beskyttelsesgruppe  $R^2$  en ved klor substituert fenylgruppe, spesielt 2-klorfenyl, og som beskyttelsesgruppe  $R^3$  2-cyanoetylgruppen. Foretrukket som rest  $X^1$  og  $X^2$  i forbindelsen av formel VII er 1-benz-  
10 triazolyloksy-resten.

Trinukleotider av formel XI fremstilles fortrinnsvis ved at beskyttelsesgruppen  $R^1$  avspaltes i dinukleotidene av formel X og forbindelsen som da oppstår omsettes med forbindelser av  
15 formel VIII, hvor  $X^2$  betyr hydroksyl eller derav avledede salter, i nærvær av et vanntrekkende middel (reaksjonsskjema 4). Vanntrekkende midler er eksempelvis 2,4,6-trimetyl- eller triisopropylbenzensulfonyl-klorid, -imidazol, -tetrazol eller 1,2,4-triazol, eventuelt substituert ved nitro. Foretrukket  
20 vanntrekkende middel er 1-(2,4,6-trimetylbenzensulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (XII).

Fordelaktig anvendes nukleosider hvis frie aminogruppe er beskyttet i basedelen. Fordelaktige beskyttelsesgrupper er  
25 benzoyl for adenin, benzoyl eller 4-metoksybenzoyl for cytosin, isobutyryl eller difenylacetyl for guanin. Tymin anvendes fortrinnsvis uten beskyttelsesgruppe.

Ved fremstillingen av oligonukleotider ifølge trinn c)  
30 anvendes en i og for seg kjent apparatur med halvautomatisk eller helautomatisk, mikroprosessorstyrt tilførselssystem for oppløsningsmiddel og reagenser. I en forbindelse a formel VI fremstilt ifølge trinn a) avspaltes beskyttelsesgruppen  $R^1$  som beskrevet ovenfor, og deretter omsettes enten med en  
35 forbindelse av formel VIII, eller med en forbindelse av formel VIIIA eller med en forbindelse av formel X eller XI, hvor beskyttelsesgruppen  $R^3$  på forhånd er avspaltet med baser

(en gruppe 2-cyanoetyl eksempelvis med et trilaverealkylamin, f.eks. trietylamin i et av de ovenfor nevnte inerte oppløsningsmidlene eller oppløsningsmiddelblandingene ved 10°C til 40°C, spesielt ved romtemperatur) eventuelt i nærvær av et  
 5 vanntrekkende middel eller i nærvær av en base. Også den reaksjonen er mulig hvor man i stedet for et dinukleotid av formel C eller et trinukleotid av formel XI anvender et tetranukleotid fremstilt ifølge trinn b). Der som et fosfitt av formel VIIIA anvendes, etterbehandler man deretter med et  
 10 oksydationsmiddel, f.eks. jod i nærvær av en base. Den på denne måten fremstilte forbindelsen av formel XIII, hvor R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> og B har de ovenfor angitte betydninger og n er et helt tall fra 1 til 4, underkastes de reaksjonstrinnene som er beskrevet for forbindelsen av formel VI (avspaltning av R<sup>1</sup>,  
 15 reaksjon med VIII, VIIIA, X, XI eller et tilsvarende tetranukleotid, eventuelt med oksyderende etterbehandling), inntil en forbindelse av formel XIII oppstår hvor n er et hvilket som helst helt tall mellom 19 og 69.



Fordelaktig anvendes som beskyttelsesgruppe R<sup>1</sup> 4-metoksytrityl, og avspaltningen gjennomføres med sinkbromid i nærvær  
 30 av en CH- eller NH-sur forbindelse, spesielt 1,2,4-triazol eller tetrazol. Anvendelsen av f.eks. 1,2,4-triazol ved avspaltningen av 4-metoksytrietyl-beskyttelsesgruppen er ny og fører overraskende til at avspaltningen foregår raskt, med høyt utbytte og uten bireaksjoner. Spesielt foretrukket er  
 35 anvendelsen av sinkbromid og 1,2,4-triazol i et molart forhold mellom 20:1 og 100:1 i en oppløsningsmiddelblanding

bestående av et aprotisk oppløsningsmiddel og en alkohol, eksempelvis metylenklorid og 2-propanol.

Fordelaktig omsettes en forbindelse av formel VI eller av formel XIII, hvor beskyttelsesgruppen  $R^1$  er avspaltet, med et trinukleotid av formel XI, hvor beskyttelsesgruppen  $R^3$  er avspaltet, i nærvær av et vanntrekkende middel som f.eks. 2,4,6-trimetyl- eller triisopropylbenzensulfonylklor, -imidazol, -tetrazol eller -1,2,4-triazol eventuelt substituert ved nitro. Spesielt foretrukket er 1-(2,4,6-trimetylbenzensulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (XII).

Den spesielt fordelaktige kombinasjonen som består i at man som beskyttelsesgruppe  $R^1$  anvender 4-metoksytritylgruppen, til avspaltning av  $R^1$  anvender sinkbromid i nærvær av 1,2,4-triazol og som vanntrekkende middel for reaksjonen mellom oligonukleotid-polystyren-harpiks av formel XIII hvor beskyttelsesgruppen er avspaltet med et trinukleotid av formel XI hvor beskyttelsesgruppen er avspaltet anvender triazol av formel XII, dette muliggjør at også lange nukleotidkjeder med 40 til 70 baser overraskende kan fremstilles på kort tid, i høyt utbytte og med høy renhet.

Til avspaltning av oligodesoksynukleotider fra bæreren og til fjernelse av beskyttelsesgruppen ifølge trinn d) anvendes i og for seg kjente fremgangsmåter. En spesielt foretrukket reagens til avspaltning fra bæreren og til fjernelse av den foretrukne 2-klorfenyl-beskyttelsesgruppen er et aryl-aldoksimat, f.eks. 1,1,3,3-tetrametylguanidinium-2-nitrobenzaldoksymat. Reaksjonen foregår i et av de ovenfor nevnte inerte oppløsningsmidlene som er tilsatt noe vann, f.eks. i 95% pyridin, ved romtemperatur. Deretter omsettes med vandig ammoniakk ved romtemperatur eller forhøyet temperatur, f.eks. ved 20°C til 70°C, spesielt ved 50°C.

Til ligering av oligodesoksynukleotidene innføres en fosfatrest ved den 5'-terminale hydroksygruppen. Innføringen

av fosfatresten (fosforyleringen) foregår på i og for seg kjent måte ved hjelp av  $T_4$  polynukleotid-kinase i nærvær av ATP.

5 Oligodesoksynukleotider fremstilt fra den kodende og den komplementære DNA-kjeden inneholder overlappende sekvenser bestående av minst 3, fordelaktig 8 til 15 overlappende basepar. Slike oligodesoksynukleotidpar holdes ved blanding sammen ved hjelp av hydrogenbrodannelse. De overhengende  
10 enkjedede endene tjener ifølge trinn e1) og e2) som matriks (templat) for oppbyggingen av den andre (komplementære) kjeden ved en DNA-polymerase, f.eks. DNA-polymerase I, Klenow-fragment av DNA-polymerase I eller  $T_4$  DNA-polymerase, eller med AMV reversert transkriptase, i nærvær av de fire  
15 desoksynukleosid-trifosfatene (dATP, cCTP, dGTP og TTP). De ved komplementeringen oppstående dupleks-DNA, hvor det spesielt dreier seg om fragmenter av desulfatohirudin-genet (fremgangsmåte e1) eller om det komplette desulfatohirudin-genet (fremgangsmåte e2), har flate ender.

20 De ifølge fremgangsmåtetrinn e1) fremstilte fragmentene av desulfatohirudin-genet inneholder ved endene nukleotid-sekvenser som gjenkjennes av restriksjonsendonukleaser og kan spaltes. Avhengig av valget av nukleotidsekvenser og dertil  
25 hørende restriksjonsendonukleaser oppstår ved spaltingen fullstendige baseparede (flate) ender ("blunt ends") eller ender med en overhengende DNA-kjede ("staggered ends"). Restriksjons-gjenkjenningssekvensene velges slik at ligeringen av DNA-fragmentet, som er behandlet med en flat  
30 ende dannet restriksjonsendonuklease, henholdsvis baseparingen ved de kohesive endene og den etterfølgende ligeringen av DNA-fragmentene med overhengende DNA-kjeder gir det fullstendige desulfatohirudin-strukturgenet. Ligeringen av to dobbeltkjedede DNA-fragmenter krever en 5'-terminal  
35 fosfatgruppe som ved donorfragmentet og en fri 3'-terminal hydroksygruppe ved akseptorfragmentet. De i trinn e1) oppstående DNA-fragmentene er allerede 5'-terminalt fosfo-

rylert og knyttes på kjente måte sammen ved hjelp av en ligase, spesielt T<sub>4</sub> DNA-ligase.

Det er mulig på beskrevet måte å fremstille to fragmenter av desulfatohirudin-genet, spesielt fragmentene F<sub>1</sub> og F<sub>2</sub> ifølge formlene henholdsvis III og IV. Fragmentene, som dersom det er påkrevet kan subklones i en egnet vektor, inneholder fordelaktig gjenkjenningssekvensen for en restriksjonsendonuklease ved sammenkopplingsendene, spesielt EcoRII, følgelig oppstår ved spaltning med det nevnte restriksjonsenzymet og ligering av begge fragmentene den korrektkodende desulfatohirudin-DNA-sekvensen. I tillegg inneholder delstykke 1 foran translasjons-startsignalet (ATG) og delstykket 2 etter translasjons-stoppsignalet (f.eks. TAG) i tillegg "terminale" restriksjonsposisjoner som tillater innbygging av desulfatohirudin-genet, henholdsvis desulfatohirudin-genfragmentet i en egnet vektor.

I en fordelaktig variant (fremgangsmåte e2) rekombineres to oligodesoksynukleotider som alternativt stammer fra den kodende og den komplementære kjeden, ved hjelp av minst 3, fortrinnsvis 8 til 15 komplementære baser, oppfylles med en DNA-polymerase, f.eks. en av de ovenfor angitte, og liggeres med T<sub>4</sub> DNA-ligase til desulfatohirudin-strukturgen.

Som nevnt innledningsvis vedrører oppfinnelsen ekspresjonsvektorer som inneholder en for desulfatohirudin kodende DNA-sekvens som reguleres av ekspresjonskontrollsekvens på en slik måte at polypeptid med hirudinaktivitet kan uttrykkes i en med denne ekspresjonsvektoren transformert vertscelle.

I prinsippet er alle vektorer egnet som replikerer og uttrykker de heterologe, for aminosyre-sekvensen i hirudin kodende DNA-sekvensene ifølge oppfinnelsen i den valgte verten.

Eksempler på vektorer som er egnet for ekspresjon av desulfatohirudin-genet i en E.coli-stamme er bakteriofager, f.eks. derivater av bakteriofagen  $\lambda$ , eller plasmider, som spesielt plasmidet colE1 og dets derivater, f.eks. mMB9, pSF2124, pBR317 eller pBR322. De foretrukne vektorene ved foreliggende oppfinnelse avledes fra plasmid pBR322. Egnede vektorer inneholder en fullstendig replikasjon og et markeringsgen, som muliggjør seleksjon og identifisering av den med ekspresjonsplasmidene transformerte mikroorganisme på grunn av dens fenotypiske kjennetegn. Egnede markeringsgener gir mikroorganismen resistens f.eks. overfor tungmetaller, antibiotika og lignende. Videre inneholder de foretrukne vektorene ifølge foreliggende oppfinnelse ved siden av replikasjons- og markeringsgenområder, gjenkjenningssekvenser for replikasjonsendonukleasene, slik at den for aminosyre-sekvensen i hirudin kodende DNA-sekvensen og eventuelt ekspresjons-kontrollsekvensen kan innføres ved disse posisjonene. Den foretrukne vektoren, plasmidet pBR322, inneholder en intakt replikasjon, markeringsgener ( $tet^R$  og  $amp^R$ ) som gir resistens mot tetracyklin og ampicillin og en rekke gjenkjenningssekvenser for restriksjonsendonuklease som bare forekommer en gang, f.eks PstI (kutter i  $amp^R$ -genet,  $tet^R$ -genet forblir intakt), BamHI, HindIII, Sali (kutter alle i  $tet^R$ -genet,  $amp^R$ -genet forblir intakt), NruI og EcoRI.

Flere ekspresjonskontrollsekvenser kan anvendes til regulering av desulfatohirudin-ekspresjonen. Spesielt anvendes ekspresjonskontrollsekvenser av sterkt uttrykkede gener fra vertscellen som skal transformeres. I tilfelle med pBR322 som hybridvektor og E. coli som vertsmikroorganisme er ekspresjonskontrollsekvensene (som blant annet inneholder promotoren og den ribosomale bindingsposisjonen) eksempelvis fra laktoseoperonet, tryptofanoperonet, arabinoseoperonet og lignende, fra  $\beta$ -laktamasegenet, den tilsvarende sekvensen fra fag  $\lambda$ N-genet eller fra fag fd-sjiktproteingenet og andre egnet. Mens promotoren fra  $\beta$ -laktamasegenet ( $\beta$ -lac-gen) allerede inneholdes i plasmidet pBR322, må de øvrige ekspresjonskontrollsekvensene innføres i plasmidet. Foretrukket som ekspresjonskontrollsekvens ved foreliggende

ekspressjonskontrollsekvensene innføres i plasmidet. Foretrukket som ekspressjonskontrollsekvens ved foreliggende oppfinnelse er den fra tryptofanoperonet (trp po).

5 Vektorer som egner seg for replikasjon og ekspresjon i gjær inneholder en gjær-replikasjonsstart og en selektiv genetisk markering for gjær. Hybridvektorer som inneholder en gjær-replikasjonsstart, f.eks. det kromosomale autonome repliserende segmentet (ars), forblir etter transformasjonen  
10 ekstrakromosomalt inneholdt i gjærcellen og repliseres autonomt ved mytosen. Videre kan man anvende hybridvektorer som inneholder den gjær-2 $\mu$ -plasmid-DNA homologe sekvensen. Slike hybridvektorer assimileres ved rekombinasjon inne i cellen med allerede tilstedeværende 2 $\mu$ -plasmider eller  
15 repliserer autonomt. 2 $\mu$ -sekvenser er spesielt egnet for plasmider med stor transformasjonshyppighet og tillater et høyt kopiantall. Egnede markeringsgener for gjær er fremfor alt slike som gir verten antibiotisk resistens eller, i tilfelle med auksotrope gjærmutanter, gener som  
20 komplementerer vertsdefektene. Tilsvarende gener gir f.eks. resistens mot antibiotikumet cykloheksimid eller sørger for prototropi i en auksotrop gjærmutant, f.eks. URA3-, LEU2-, HIS3- eller fremfor alt TRP1-genet. Fortrinnsvis inneholder gjær-hybridvektoren videre en replikasjons-start  
25 og et markeringsgen for en bakteriell vert, spesielt E. coli, for at konstruksjonen og kloningen av hybridvektorene og deres forstadier i en bakteriell vert kan finne sted. Ekspresjonskontrollsekvenser som egner seg for ekspresjon i gjær er eksempelvis de fra TRP1-, ADHI-, ADHII-, PHO3- eller PHO5-genene, videre promotorer som er involvert i  
30 glykolytisk nedbrytning, f.eks. fra PGK- og fra GAPDH-promotoren.

Spesielt vedrører oppfinnelsen ekspresjonsvektorene som  
35 er i stand til replikasjon og fenotypisk seleksjon, som inneholder en ekspresjonskontrollsekvens og en for aminosyre-

sekvensen i hirudin kodende DNA-sekvens, hvor den nevnte DNA-sekvensen sammen med transkripsjons-startsignalet og -termineringssignalet samt translasjons-startsignalet og -stoppsignalet i det nevnte ekspresjonsplasmidet under  
5 reguleringen er anordnet slik i den nevnte ekspresjonskontrollsekvensen at desulfatohirudin uttrykkes i en med det nevnte ekspresjonsplasmidet transformert vertscelle.

For å oppnå en effektiv ekspresjon, må desulfatohirudin-genet  
10 være anbragt riktig (i "fase") med ekspresjonskontrollsekvensen. Det er fordelaktig å knytte ekspresjonskontrollsekvensen i området mellom hoved-mRNA-starten og ATG for genkodese­kvensen, som naturlig er knyttet sammen med ekspresjonskontrollsekvensen (f.eks.  $\beta$ -lac-kodese­kvensen ved  
15 anvendelse av  $\beta$ -lac-promotoren), med desulfatohirudin-genet, som fortrinnsvis medbringer sitt eget translasjons-startsignal (ATG) for translasjons-stoppsignal (f.eks. TAG). Derved sikres en effektiv transkripsjon og translasjon.

20 Eksempelvis kuttet en vektor, spesielt pBR322, med en restriksjonsendonuklease og, eventuelt etter modifikasjon av den slik dannede lineariserte vektoren, innføres i en med tilsvarende restriksjonsender utstyrt ekspresjonskontrollsekvens. Ekspresjonskontrollsekvensen inneholder ved 3'-enden  
25 (i translasjonsretning) gjenkjenningssekvensen for en restriksjonsendonuklease, slik at den fordøyer vektoren som inneholder ekspresjonskontrollsekvensen ved det nevnte restriksjonsenzymet og det med passende ender utstyrte desulfatohirudin-genet kan settes inn. Derved oppstår en  
30 blanding av to hybridplasmider som inneholder genet i riktig, henholdsvis i gal orientering. Fordelaktig er det å spalte vektoren som allerede inneholder ekspresjonskontrollsekvensen også med en andre restriksjonsendonuklease innenfor vektor-DNA og i det vektorfragmentet som derved oppstår innføre det  
35 med riktige ender utstyrte desulfatohirudin-genet. Alle operasjonene på vektoren foregår fortrinnsvis på en måte som

ikke påvirker funksjonen av replikasjonen og minst et markeringsgen.

I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse blir en fra pBR322 avledet vektor, som inneholder en ekspresjonskontrollsekvens, spesielt den fra tryptofan-operonet (trp po) som ved 3'-enden (mellom hoved-mRNA-starten og den første ATG) bærer gjenkjenningssekvensen for en restriksjonsendonuklease som fortrinnsvis danner kohesive ender, f.eks. EcoRI, fordøyet med den nevnte restriksjonsendonukleasen og i vektor-DNA-delen med en andre restriksjonsendonuklease som danner flate eller fortrinnsvis kohesive ender, f.eks. BamHI, hvorefter den slik lineariserte vektoren knyttes sammen med de tilsvarende endene som oppviser desulfatohirudin-genet (f.eks. med en EcoRI-ende foran ATG-starten og en BamHI-ende etter translasjonsstoppkodonet). Sammenknytningen foregår på kjent måte ved paring av de komplementære (kohesive) endene og ligering f.eks. med T<sub>4</sub>-DNA-ligase.

Desulfatohirudin-genet som er fremstilt ved mRNA-fremgangsmåten, fra genomisk DNA eller syntetisk utvunnet og utstyrt med tilsvarende kohesive (spesielt EcoRI- og BamHI-) ender kan før innføring i et ekspresjonsplasmid også klones i en vektor, f.eks. pBR322, for å utvinne større mengder desulfatohirudin-gen, f.eks. sekvensanalyse. Isoleringen av klonet som inneholder hybridplasmidet gjennomføres eksempelvis med en desulfatohirudin-gen-spesifikk, radioaktivt merket oligodesoksynukleotid-probe (se ovenfor). Karakteriseringen av desulfatohirudin-genet foregår eksempelvis ved fremgangsmåten angitt av Maxam og Gilbert (11).

Det er også mulig å benytte transformerte vertsceller til fremstilling av forbindelser med hirudin-aktivitet. Fremgangsmåten til fremstilling av disse forbindelsene omfatter at de transformerte vertscellene dyrkes og produkter fra vertscellene settes fri og isoleres.

Dyrkingen av vertscellene foregår på i og for seg kjent måte. Slik kan man for dyrking anvende forskjellige karbonkilder. Eksempler på foretrukne karbonkilder er assimilerbare karbohydrater, som glukose, maltose, mannit og laktose, eller et acetat, som enten kan anvendes alene eller i en egnet blanding. Egnede nitrogenkilder er eksempelvis aminosyrer, som kasaminosyrer, peptider og proteiner og deres nedbrytningsprodukter, som trypton, pepton eller kjøtt-ekstrakter; videre gjærekstrakter, maltekstrakter, som også ammoniumsalter, f.eks. ammoniumklorid, -sulfat eller -nitrat, som enten kan anvendes alene eller i egnede blandinger. Uorganiske salter som også kan anvendes er f.eks. sulfater, klorider, fosfater og karbonater av natrium, kalium, magnesium og kalsium.

Videre inneholder mediet f.eks. vekstfremmende stoffer, som sporelementer, f.eks. jern, sink, mangan og lignende, og fortrinnsvis stoffer som utøver et seleksjonstrykk og forhindrer veksten av cellene som har mistet ekspresjonsplasmidet. Slik tilsettes mediet eksempelvis ampicillin når ekspresjonsplasmidet inneholder et amp<sup>R</sup>-gen. En slik tilsats av antibiotisk virksomme stoff bevirker også at forurensende, antibiotika-ømfintlige mikroorganismer drepes.

Dyrkingen foregår etter i og for seg kjente fremgangsmåter. Dyrkingsbetingelsene, som temperatur, pH-verdi for mediet og fermenteringstiden velges slik at den maksimale hirudinititeren oppnås. Dyrkingen av en E.coli- eller en gjær-stamme foregår fortrinnsvis under aerobe betingelser i neddykket kultur under risting eller omrøring ved en temperatur på 20-40°C, fortrinnsvis ca. 30°C, og en pH-verdi på 4-9, fortrinnsvis ved pH 7, i løpet av 4-20 timer, fortrinnsvis 8-12 timer. Derved ansamles ekspresjonsproduktet intracellulært.

Når celletettheten har nådd en tilstrekkelig verdi avbrytes dyrkingen og produktet settes fri fra cellene av mikroorganismen. For dette formål ødelegges cellene, f.eks. ved

behandling med et rensemiddel, som SDS eller triton, eller de lyseres med lysozym eller et like sterkt virkende enzym. Alternativt eller i tillegg kan man anvende mekaniske krefter, som skjærkrefter (f.eks. "X-presse", "French-  
5 presse", "Dyno-mill") eller risting med glassperler eller aluminiumoksyd, eller avvekslende nedfrysning, f.eks. i flytende nitrogen, og opptining, f.eks. til 30°C til 40°C, samt ultralyd til nedbrytning av cellene. Den resulterende blandingen som inneholder proteiner, nukleinsyrer og andre  
10 cellebestanddeler anrikes etter sentrifugeringen på i og for seg kjent måte med protein. Slik fraskilles f.eks. den største delen av ikke-proteinbestanddelene ved polyetylenimin-behandling og proteinene innbefattet hirudin-forbindelsene utfelles f.eks. ved metning av oppløsningen med  
15 ammoniumsulfat eller med andre salter. Bakterielle proteiner kan også utfelles ved hjelp av surgjøring med eddiksyre (f.eks. 0,2%, pH 4-5). En ytterligere anrikning på hirudin-forbindelse kan oppnås ved ekstraksjon av den eddiksure overvasken med n-butanol. Andre rensetrinn omfatter f.eks.  
20 kromatografiske fremgangsmåter, som ionebytterkromatografi, gelpermeeringskromatografi, partisjonskromatografi, HPLC, omvendt fase-HPLC og lignende. Adskillelsen av blandebestanddelene foregår ved dialyse, etter lasting ved gel- eller bærerfri elektroforese, ved molekylstørrelser ved hjelp av en  
25 egnet "Sephadex"-søyle, ved affinitetskromatografi, f.eks. med antistoffer, spesielt monoklonale antistoffer, eller med trombin koplet til en egnet bærer for affinitetskromatografi, eller ved andre fremgangsmåter som spesielt er kjent fra litteraturen.

30 Eksempelvis omfatter isoleringen av de uttrykkede hirudin-forbindelsene følgende trinn:

Adskillelse av cellen fra kulturopløsningen ved hjelp av sentrifugering;

35 Fremstilling av et råekstrakt ved nedbrytning av cellene, f.eks. ved behandling med et lyserende enzym og/eller avvekslende nedfrysning og gjenopptining;

Frasentrifugering av de uoppløselige bestanddelene;  
Utfelling av DNA ved tilsats av polyetylenimin;  
Utfelling av proteinene ved hjelp av ammoniumsulfat;  
Affinitetskromatografi av det oppløste bunnfallet ved en  
5 monoklonal anti-desulfato-hirudin-antistoff-søyle eller en  
trombin-søyle;  
Avsalting av den slik fremstilte oppløsningen ved hjelp av  
dialyse eller kromatografi på "Sephadex G25" eller "Sephadex  
G10".

10

Alternativt kan de bakterielle proteinene utfelles ved hjelp  
av 1% eddiksyre etter fraskillelse av DNA, fra den sure  
overvæsken kan hirudin-forbindelsen ekstraheres med n-butanol  
eller den sure overvæsken kan direkte underkastes ionebytter-  
15 kromatografi (f.eks. diethylaminoethylcellulose DEAE 53).  
Videre rensetrinn innbefatter gelfiltrering på "Sephadex G50"  
(eller G75) og omvendt fase-HPLC. Avsaltingen foregår igjen  
på "Sephadex G25".

20

Til påvisning av hirudin-aktivitet kan man anvende testen med  
anti-hirudin- eller anti-desulfatohirudin-antistoffer (f.eks.  
fra monoklonale antistoffer som er tilgjengelige fra kanin  
eller fra hybridomceller), trombin-teten (15) eller blod-  
koagulerings testen (16).

25

Tidligere undersøkelser har vist at bestandigheten av  
disulfidbroene er av betydning for den strømningshemmende  
aktiviteten av naturlig hirudin (se litt. 2). Avhengig av  
valget av vertsceller kan man ikke utelukke at sammenknyt-  
30 ningen av de seks cystein-restene i det primære translasjons-  
produktet under dannelsen av de tre disulfidbroene forløper på  
en måte som adskiller seg fra det naturlige forløpet i  
igleceller. Det er mulig at "falske" tertiærstrukturer som  
innstiller seg på produktet fører til en reduksjon eller tap  
35 av verdifulle farmakologiske egenskaper, spesielt den  
blodkoaguleringshemmende aktiviteten, dette lar seg fastslå

ved hjelp av den ovenfor omtalte hirudin-analysen (f.eks. trombin-testen). I et slikt tilfelle er det hensiktsmessig å spalte disulfid-bindingen ved hjelp av et egnet reduksjonsmiddel og bringe det reduserte polypeptidet til ny sammenknytning av disulfid-bindingen ved hjelp av et egnet oksydasjonsmiddel. Ved hjelp av hirudin-aktiviteten for det dannede produktet (f.eks. ved trombin-testen) lar det seg fastslå om de valgte betingelsene (reduksjons- og/eller oksydasjonsmiddel) har ført til det ønskede biologisk aktive hirudinet, eller om betingelsene må modifiseres på kjent måte.

Reduksjonsmidler som egner seg til oppspalting av disulfid-bindingen er f.eks. tiolforbindelser, som tiofenol, 4-nitrotiofenol, 1,4-butanditiol og spesielt 1,4-ditiotreitol. Reduksjonen gjennomføres fortrinnsvis i et vandig-alkalisk medium, f.eks. i den fortynnede vandige oppløsningen av et alkali-metallhydroksyd, f.eks. natriumhydroksyd, alkalimetallkarbonat, f.eks. natriumkarbonat, eller en organisk base, spesielt et trilaverealkylamin, f.eks. trietylamin, ved romtemperatur.

Oksydasjonsmidler som egner seg til ny sammenkopling av disulfid-bindingene i de reduserte polypeptidene er f.eks. luftoksyd, som ledes gjennom en vandig oppløsning av polypeptidet som eventuelt er tilsatt en katalytisk mengde av et overgangsmetallsalt, f.eks. jern-(III)-sulfat, jern-(III)-klorid eller kopper-(II)-sulfat; Jod, også i form av kaliumjodid-addisjonsproduktet  $KJ_3$ , som fortrinnsvis anvendes i alkoholisk, f.eks. metanolisk eller vandig-alkanolisk, f.eks. vandig-metanolisk oppløsning; kaliumheksacyanoferrat-(III) i vandig oppløsning; 1,2-dijodetan eller azodikarboksylyredimetyler eller -dietyler, som bringes til reaksjon i vann eller i en blanding bestående av vann og et med vann blandbart alkohol, f.eks. metanol. Oksydasjonen gjennomføres spesielt ved romtemperatur.

Fraskillelsen av reagensene, spesielt saltene og oksydasjons-  
henholdsvis reduksjonsmidlet og deres følgeprodukter, fra  
den ønskede hirudin-forbindelsen foregår etter i og for seg  
kjente fremgangsmåter, eksempelvis ved molekylvekts-  
5 filtrering, f.eks. på "Sephadex" eller "Biogel".

Forbindelsene som lar seg fremstille ifølge oppfinnelsen, kan  
ikke bare foreligge i fri form, men også i form av salter,  
spesielt farmasøytisk akseptable salter. Siden de inneholder  
10 flere aminosyre-rester med frie aminogrupeer, kan forbin-  
delsene som oppnås f.eks. foreligge i form av syreaddisjons-  
salter. Som syreaddisjonssalter kommer speislet fysiologisk  
tålbare salter med vanlige terapeutisk anvendelige syrer i  
betraktning; som uorganiske syrer kan nevnes halogenhydrogen-  
15 syrer, som hydrogenklorid, men også svovelsyre og fosfor-  
henholdsvis pyrofosforsyre; som organiske syrer er i første  
rekke sulfonsyrer, som benzen- eller p-toluen-sulfonsyre  
eller laverealkansulfonsyrer, som metansulfonsyre, samt  
karboksylsyre, som eddiksyre, melkesyre, palmitin- og  
20 stearinsyre; eplesyre, vinsyre, askorbinsyre og sitronsyre  
egnet. Siden hirudin-forbindelsene også inneholder aminosyre-  
rester med frie karboksylgrupper, kan de også foreligge som  
metallsalt, spesielt som alkalimetall- eller jordalkali-  
metallsalt, f.eks. natrium-, kalium-, kalsium- eller  
25 magnesiumsalt, eller også som ammoniumsalt, avledet fra  
ammoniakk eller en fysiologisk tålbare, organisk nitrogen-  
holdig base. Siden de imidlertid samtidig inneholder frie  
karboksylgrupper og frie aminogrupeer, kan de også foreligge  
som indre salt.

30

Alt etter arbeidsmetoden får man forbindelsene i fri form, i  
form av syreaddisjonssalter eller salter med baser. Fra  
syreaddisjonssaltene og saltene med baser kan den frie  
forbindelsen utvinnes på i og for seg kjent måte, f.eks. ved  
35 innstilling av pH-verdien til det isoelektriske punktet. Fra  
det sistnevnte lar igjen terapeutisk akseptable syreaddi-  
sjonssalter henholdsvis salter med baser seg utvinne ved

omsetning med syrer henholdsvis baser, f.eks. med slike som danner de ovenfor nevnte saltene, og inndamping eller lyofilisering.

5 Den egenskapen hos antistoffer at de binder spesifikke antigener, finner utenfor kroppen praktisk anvendelse ved kvalitativ og kvantitativ bestemmelse (immuno-analyse) og ved rensing av antigenene (immunoaffinitetskromatografi). Serumimmuniserte dyr inneholder normalt en lang rekke  
10 forskjellige antistoffer som reagerer med det samme antigenet på forskjellige bindingsposisjoner med forskjellig affinitet, med dertil også antistoffer mot andre antigener som gjen-speiler individets tidligere erfaringer. Vellykket anvendelse av antistoffer til bestemmelse og rensing av antigener krever  
15 imidlertid høy spesifisitet og reproduserbarhet.

Homogene antistoffer som oppfyller disse kravene er blitt tilgjengelige ved den av Köhler og Milstein (17) beskrevne hybridom-teknikken. Prinsipielt består teknikken i at  
20 antistoff-utskillende B-lymfocytter, f.eks. fra milten hos immuniserte dyr smeltes sammen med ("fusjoneres") med tumorceller. De dannede hybridom-cellene kombinerer evne til ubegrenset formering ved deling, med evnen til å danne og å utskille en enhetlig type antistoffer. Ved dyrking i et  
25 selektivt medium, hvor ikke-fusjonerte tumorceller dør, men hybridomceller formerer seg, og ved egnet manipulasjon, kan man oppnå å kultivere kloner, dvs. cellepopulasjoner som er avledet fra en eneste hybridomcelle og som er genetisk identiske, og de ved cellene produserte monoklonale anti-  
30 stoffene kan isoleres.

De ifølge foreliggende oppfinnelse oppnåelige hirudiner oppviser verdifulle farmakologiske egenskaper og kan, som hirudin ekstrahert fra blodigler, anvendes profylaktisk eller  
35 spesielt terapeutisk.

Desulfatohirudin-forbindelsene som lar seg fremstille ifølge foreliggende oppfinnelse oppviser en biologisk aktivitet som minst er ekvivalent med aktiviteten for naturlig hirudin. Slik oppviser eksempelvis desulfatohirudin en  $K_i$ -verdi på ca.  $10^{-11}$  M. Desulfatohirudin er fullstendig spesifikk for trombin og oppviser ingen vekselvirkning med andre proteinaser i blodkoaguleringsystemet. Den aktive toksisiteten er ytterst lav; hos rotter kan man ved doser på f.eks. 1 g/kg ikke fastslå noen tegn på toksisitet. Tilsvarende observeres ingen typer sensitivitets- og allergireaksjoner.

De nye desulfatohirudin-forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan følgelig analogt naturlig hirudin anvendes til terapi og profylakse av tromboser og tromboembolier, og også til profylakse av postoperative tromboser, til akutt sjokkterapi (f.eks. ved septisk eller polytraumatisk sjokk), til terapi ved feilfunksjoner i koaguleringsystemet, ved hemodialyser, hemoseparasjoner og i det ekstrakorporale kretsløpet.

Disse preparatene kan spesielt finne anvendelse ved de ovenfor angitte indikasjonene, hvor de f.eks. kan administreres parenteralt, som intravenøst, intrakutant, subkutant eller intramuskulært, eller topisk.

Doseringen avhenger først og fremst av den spesifikke doseringsformen og formålet med terapien eller profylaksen. Størrelsen av enkeltdosene samt administreringsformen kan best bestemmes ved en individuell vurdering av det enkelte sykdomstilfellet; de fremgangsmåtene som ved denne vurderingen benyttes til bestemmelse av relevante blodfaktorer er kjent for fagmannen. I normalt tilfellet ligger den terapeutisk virksomme mengden av forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen ved en injeksjon i doseområdet fra 0,005 til 0,1 mg/kg legemsvekt. Foretrukket er området fra 0,01 til 0,05 mg/kg legemsvekt. Administreringen foregår ved intravenøs,

intramuskulær eller subkutan injeksjon. Tilsvarende inneholder farmasøytiske preparater til parenteral administrering i enkeltdoseform avhengig av anvendelsesarten pr. dose 0,4 til 7,5 mg av forbindelsen fremstilt ifølge oppfinnelsen. Ved siden av det virksomme stoffet inneholder disse farmasøytiske preparatene normalt også en buffer, f.eks. en fosfatbuffer som skal holde pH-verdien mellom 3,5 og 7, og videre natriumklorid, mannit eller sorbit for å innstille isotonien. De kan foreligge i frysetørket eller oppløst form, hvor oppløsninger med fordel kan inneholde et antibakterielt virksomt konserveringsmiddel, f.eks. 0,2 til 0,3% 4-hydroksybenzosyremetylester eller -etylester.

Et preparat for den topiske anvendelsen kan foreligge som vandig oppløsning, lotion eller gel, oljeformig oppløsning eller suspensjon, eller fettholdig eller spesielt emulsjons-salve. Et preparat i form av en vandig oppløsning oppnår man f.eks. ved at det virksomme stoffet fremstilt ifølge oppfinnelsen eller et terapeutisk akseptabelt salt derav oppløses i vandig bufferoppløsning med pH 4 til 6,7, og om ønsket tilsettes et annet virksomt stoff, f.eks. et anti-inflammasjonsmiddel og/eller et polymert klebemiddel, f.eks. polyvinylpyrrolidon og/eller et konserveringsmiddel. Konsentrasjonen av det virksomme stoffet utgjør 0,1 til 1,5 mg, fortrinnsvis 0,25 til 1,0 mg i 10 ml av en oppløsning eller 10 g av en gel.

En oljeformet påføringsform for topisk administrering får man f.eks. ved suspensjon av det virksomme stoffet fremstilt ifølge oppfinnelsen eller et terapeutisk akseptabelt salt derav i en olje, eventuelt under tilsats av svellemidler, som aluminiumstearat, og/eller grenseflateaktive midler (ten-sider), hvis HLB-verdi ("hydrophilic-lipophilic-balance") ligger under 10, som fettsyremonoestere av flerverdige alkoholer, f.eks. glycerinmonostearat, sorbitanmonolaurat, sorbitanmonostearat eller sorbitanmonooleat. En fettholdig salve oppnår man f.eks. ved suspensjon av det virksomme

stoffet fremstilt ifølge oppfinnelsen eller et salt derav i et smørbart fettgrunnlag, eventuelt ved tilsats av et tensid med en HLB-verdi under 10. En emulsjonssalve oppnår man ved pulverisering av en vandig oppløsning av det virksomme stoffet eller et salt derav i et mykt, smørbart fettunderlag under tilsats av et tensid hvis HLB-verdi ligger under 10. Alle disse topiske påføringsformene kan også inneholde konserveringsmidler. Konsentrasjonen av det virksomme stoffet utgjør 0,1 til 1,5 mg, fortrinnsvis 0,25 til 1,0 mg, i ca. 10 g av grunnmassen.

Ved siden av de ovenfor omtalte og analoge farmasøytiske preparater, som anvendes for en direkte medisinsk innsats i det menneskelige legemet eller i et pattedyr, kan tilsvarende farmasøytiske preparater også anvendes utenfor det levende menneskelegemet eller pattedyret. Slike preparater anvendes først og fremst som koaguleringshemmende tilsatser til blod som utenfor legemet underkastes sirkulasjon eller behandling (f.eks. ekstrakorporalt kretsløp eller dialyse i kunstige nyrer), konservering eller modifisering (f.eks. hemoseparasjon). Sammensetningen av slike preparater, som forrådsoppløsninger eller også som preparater i enkeltdoseform, ligner mye på de ovenfor omtalte injeksjonspreparatene; det er imidlertid hensiktsmessig at mengden eller konsentrasjonen av det virksomme stoffet innstilles etter volumet av blodet som skal behandles eller, mer nøyaktig, blodets trombininnhold. Det bør bemerkes at det virksomme stoffet (i fri form) deaktiverer en fem ganger så stor vektmengde trombin, er fysiologisk harmløs også i større mengder, og meget raskt utskilles fra det sirkulerende blodet også i høye konsentrasjoner slik at det ikke består noen fare for overdosering, heller ikke f.eks. ved blodoverføringer. Alt etter det spesifikke formålet utgjør den egnede doser 0,01 til 1,0 mg virksomt stoff/l blod, selv om den øvre grensen kan overskrides uten fare.

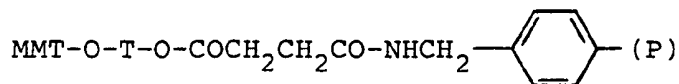
Viktige i forbindelse med oppfinnelsen er de DNA-sekvensene som er beskrevet i eksemplene og som koder for aminosyre-sekvensen i hirudin, ekspresjonsplasmider som inneholder slike DNA-sekvenser, mikroorganismer som er transformert ved slike ekspresjonsplasmider, monoklonale antistoffer mot hirudin, hybridomceller som produserer slike antistoffer, og forsøksinnretninger for immunoanalyser som inneholder slike antistoffer, de fremgangsmåtene som er beskrevet i eksemplene til deres fremstilling og de i eksemplene omtalte fremgangsmåtene til fremstilling av polypeptider med hirudin-aktivitet ved hjelp av de transformerte mikroorganismene, samt de i eksemplene beskrevne nye desulfatohirudin-forbindelsene.

De følgende eksemplene og tegningene tjener til illustrasjon av oppfinnelsen.

De forkortelsene som anvendes i eksemplene har følgende betydning:

|          |                                                                           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|
| TNE      | Oppløsning som inneholder 100 mM NaCl, 50 mM tris·HCl pH 7,5 og 5 mM EDTA |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat                                                      |
| EDTA     | Etylendiamintetraeddiksyre                                                |
| DTT      | 1,4-ditiotreitol (1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)                           |
| BSA      | Okse-serumalbumin                                                         |
| EtBr     | Tris-(hydroksymetyl)-aminometan                                           |
| Tris·HCl | Monohydrogenklorid av tris                                                |

**Eksempel 1: Fremstilling av den beskyttede nukleosid-polystyren-harpiksen**



2,57 g (5 mMol) 5'-(4-metoksytrityl)-tymidin (MMT-O-T-OH) i 20 ml absolutt pyridin blandes med 750 mg ravsyreanhydrid

og 910 mg 4-dimetylaminopyridin og får stå i 16 timer ved romtemperatur. Etter inndamping av pyridinoppløsningen tas blandingen opp i 200 ml eddiksyreetyler, utristes to ganger, hver gang med 200 ml 0,1 M fosfatbuffer under tilsats av 10 ml mettet koksaltoppløsning, vaskes nok en gang med mettet koksaltoppløsning, tørkes, inndampes og heksan tilsettes dråpevis. Det utfelte produktet skilles fra og tritureres to ganger med eter, oppløses så i 300 ml eddiksyreetyler og utristes ved 0°C med 180 ml 0,1 M kaliumhydrogensulfat med pH 2,5. Etter to gangers vasking med vann, tørkes eddikesteroppløsningen med natriumsulfat, filtreres, blandes med 0,5 ml pyridin, inndampes og fortynnes dråpevis med heksan. Det utfelte ravsyrederivatet filtreres fra.

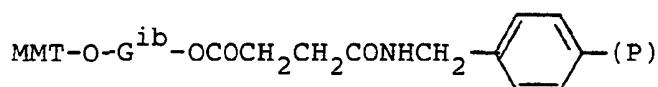
1,0 g av denne forbindelsen oppløses sammen med 190 mg N-hydroksysuccinimid i 4 ml eddiksyreetyler og 2 ml dimetylformamid og blandes ved 0°C med 370 mg N,N'-dicykloheksylkarbodiimid. Etter henstand over natten i kjøleskap frafiltreres det utfelte N,N'-dicykloheksylurinstoffet, filtratet fortynnes med eddiksyreetyler, ekstraheres med kald 0,1 M natriumhydrogenkarbonat og vann, tørkes og inndampes i vakuum til tørrhet. Residuet kromatograferes med eddiksyreetyler på kiselgel. DC:  $R_f$  0,45 i diklor-metan-metanol (9:1).

100 mg av denne N-succinimidoyl-ravsyreesteren blandes med 1 g aminometyl-polystyren (amininnhold 110  $\mu\text{mol/g}$ ) i 2 ml diklormetan og 4 ml dimetylformamid i 20 timer. Polymerharpiksen filtreres fra og utvaskes med dimetylformamid, metanol, diklormetan og metanol. Etter tørking acetyleres de ikke omsatte aminogruppene, ved at harpiksen røres i 6 ml pyridin med 1 ml eddiksyreanhydrid og 100 mg 4-dimetylaminopyridin i 30 minutter. Polymerharpiksen utvaskes med diklormetan, dimetylformamid, metanol og diklormetan og tørkes inntil konstant vekt oppnås. Den

- spektroskopiske metoksytrityl (MMT)-bestemmelsen viser et innhold på 57  $\mu\text{Mol/g}$ .

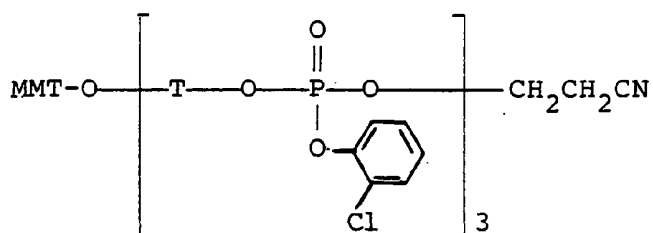
Eksempel 2:

- 5 Analogt eksempel 1 fremstilles følgende beskyttede nukleosid-polystyren-harpiks:



fra 5'-(4-metoksytrityl)-N-isobutyryl-deoksyguanosin, innhold 32  $\mu\text{Mol/g}$ .

- 15 Eksempel 3: Syntese av trinukleotidet



a) Syntese avdinukleotidet:

- 7,73 g (15 mMol) 5'-(4-metoksytrityl)-tymidin (MMT-O-T-OH)  
 25 inndampes to ganger med absolutt pyridin. Residuet renses i 20 ml absolutt tetrahydrofuran og tilsettes dråpevis til 80 ml av en 0,2 M oppløsning av 2-klorfenyl-di-(1-benzotriazolyl)-fosfat i tetrahydrofuran under omrøring og under utelukkelse av fuktighet og reaksjonsblandingen  
 30 omrøres en time ved romtemperatur. Den fremstilte oppløsningen av 2-klorfenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-3'-fosfatet deles i tre deler.

- 35 a) Hydrolyse til trietylammonium-2-klorfenyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-3'-fosfat:

Til en tredjedel av den ovenfor omtalte oppløsningen av 2-klorfenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-metoksytrietyl)-tymidin-

3'-fosfat tilsettes under avkjøling 100 ml 0,5 M trietyl-ammoniumbikarbonat. Etter 15 minutter ekstraheres det med diklormetan. Diklormetanoppløsningen vaskes med vann, inndampes og blandes dråpevis med petroleumseter. Den utfellingen som oppnås filtreres, vaskes med eter-petroleumseter 1:1 og tørkes i vakuum. DC:  $R_f$  0,35 i diklormetan-metanol-vann (75:22:3).

8) Forestring til 2-cyanoetyl-2-klorfenyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-3'-fosfat og avspaltning av 4-metoksytrityl-beskyttelsesgruppen:

Til en tredjedel av oppløsningen av 2-klorfenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-fosfat tilsettes 1,3 ml 2-cyanoetanol og 2 ml pyridin. Blandingen får stå over natten ved romtemperatur. Oppløsningsmidlet avdestilleres i vakuum og residuet løses i eddiksyreester og utristes flere med 0,1 M fosfatbuffer, pH 7. Den organiske fasen tørkes, inndampes og tilsettes dråpevis til heksan. Bunnfallet filtreres fra, oppløses i 50 ml diklormetan-metanol 7:3 og blandes ved 0°C med en oppløsning av 3,8 g p-toluensulfonsyremonohydrat i 75 ml diklormetan-metanol 7:3. Etter 2 timer fortynnes reaksjonsoppløsningen med diklormetan og utristes med en kald natriumhydrogenkarbonat-oppløsning. Den organiske fasen inndampes og blandes med heksan. Det utfelte 2-cyanoetyl-2-klorfenyl-tymidin-3'-fosfat kromatograferes på kiselgel med diklormetan-metanol (96:4).

DC:  $R_f$  på 0,45 i diklormetan-metanol (9:1).

γ) Kondensasjon til 5'-(4-metoksytrityl)-3'-cyanoetyl)-bis-tymidin-dinukleotid:

I 2,2 g 2-cyanoetyl-2-klorfenyl-tymidin-3'-fosfat fjernes vannet to ganger ved inndamping med absolutt pyridin, forbindelsen løses i 20 ml absolutt tetrahydrofuran og tilsettes til den siste tredjedelen av oppløsningen av 2-klorfenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-3'-fosfat.

Etter 18 timer ved romtemperatur tilsettes det til reaksjons-  
oppløsningen under isavkjøling 10 ml vann og 200 ml eddik-  
syreetyler. Den organiske fasen vaskes flere ganger  
med natriumhydrogenkarbonat og vann, tørkes over natrium-  
sulfat og inndampes til et lite volum. Det beskyttede  
dinukleotidet i fosfatdelen og ved 5'- henholdsvis 3'-enden  
utfelles ved dråpevis tilsats til eter-heksan 1:1.  
DC:  $R_f$  0,48 i diklormetan-metanol (9:1).

b) Syntese av trinukleotidet:

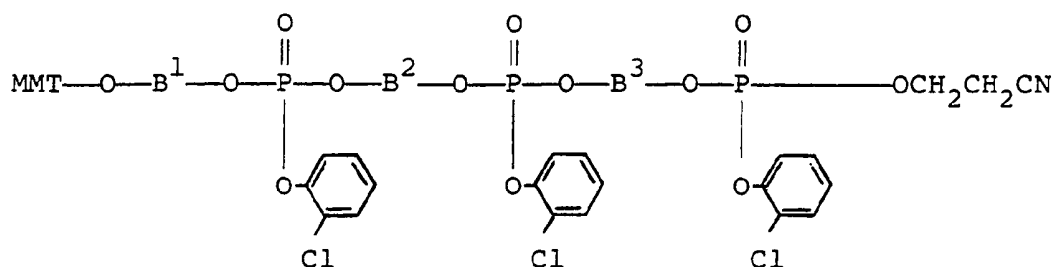
1,17 g (1 mMol) av det ovenfor omtalte fullstendig beskyt-  
tede dinukleotidet oppløses i 30 ml diklormetan-metanol  
7:3 og blandes under isavkjøling med en oppløsning av 1,9  
g p-toluensulfonsyremonohydrat i 20 ml diklormetan-metanol  
7:3. Etter 2 timer tilsettes iskald natriumhydrogenkarbo-  
nat-oppløsning og det ekstraheres med diklormetan. Den  
organiske fasen tørkes, inndampes og tilsettes dråpevis  
til heksan. Det utfelte rå dinukleotidet med fri 5'-hydroksy-  
gruppe kromatograferes på kiselgel med en gradient på 2-8%  
metanol i diklormetan.  
DC:  $R_f$  0,33 i diklormetan-metanol (9:1).

850 mg av dette 5'-hydroksy-dinukleotidet og 1,06 g trietyl-  
ammonium-2-klorfenyl-5'-(4-metoksytrityl)-tymidin-3'-fosfat  
[se avsnitt a)] inndampes to ganger med pyridin, oppløses  
deretter i 10 ml absolutt pyridin og blandes med 560 mg  
1-mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT). Etter  
2 timer tilsettes 2 ml iskaldt vann og etter nok en time  
ekstraheres med diklormetan. Den organiske fasen vaskes  
med mettett natriumhydrogenkarbonat og vann, tørkes, inndam-  
pes og blandes med eter. Det utfelte trinukleotidet renses  
ved kromatografi på kiselgel.  $R_f$  0,45 i diklormetan-metanol  
(9:1).

Eksempel 4:

Analogt eksempel 3 fremstilles følgende beskyttede trinukleotider av generell formel:

5



10

forkortet  $\text{B}^1\text{B}^2\text{B}^3$ . For nukleosidene  $\text{B}^1$ ,  $\text{B}^2$ ,  $\text{B}^3$  anvendes følgende forkortelser:

A = N-benzoyl-deoksyadenosin

C = N-benzoyl-deoksyctyidin

G = N-isobutyryl-deoksyguanosin

T = Tymidin

15

20

25

30

35

| Forbindelse | $R_f^{a)}$ | Forbindelse | $R_f^{a)}$ |
|-------------|------------|-------------|------------|
| TTT         | 0,45       | ATG         | 0,48       |
| TTC         | 0,55       | ACT         | 0,53       |
| TCT         | 0,46       | ACC         | 0,48       |
| TAC         | 0,56       | ATT         | 0,55       |
| TGC         | 0,44       | ACA         | 0,53       |
| TAG         | 0,60       | AAC         | 0,46       |
| TGT         | 0,42       | AAA         | 0,51       |
| TGA         | 0,44       | AGT         | 0,45       |
| CTT         | 0,53       | AGG         | 0,38       |
| CTG         | 0,46       | GTT         | 0,45       |
| CCT         | 0,45       | GTC         | 0,44       |
| CCC         | 0,59       | GTG         | 0,35       |
| CCG         | 0,47       | GCA         | 0,49       |
| CCA         | 0,51       | GCG         | 0,48       |
| CAT         | 0,55       | GAT         | 0,44       |
| CAC         | 0,51       | GAC         | 0,48       |
| CGC         | 0,46       | GAG         | 0,48       |
| CGA         | 0,38       | GAA         | 0,50       |
| CAG         | 0,44       | GGC         | 0,42       |
| CGG         | 0,38       | GGT         | 0,46       |
| CGT         | 0,49       | GGG         | 0,35       |
|             |            | GGA         | 0,44       |

- a) Tynnsjikt-kromatogram på kiselgel i diklormetan-metanol 9:1.

Eksempel 5: Syntese av DNA-fragmentet med en lengde på  
5                    67 baser fra base nr. 96 til base nr. 162 av  
                    DNA-kjeden (96/67)

- a) Avspaltning av 2-cyanetylbeskyttelsesgruppen i trinukleo-  
         tidet:

10 µMol av trinukletidet fra eksempel 3 eller 4 oppløses  
10 under utelukkelse av fuktighet i 60 µl pyridin-acetonitril-  
trietylamin 1:1:1. Etter en time ved romtemperatur til-  
settes dråpevis 0,7 ml peroksydfri eter og bunnfallet sen-  
trifugeres fra. Det råde trietylammmoniumsaltet oppløses i  
50 µl pyridin og utfelles nok en gang med 0,5 ml eter,  
15 frasentrifugeres og tørkes 15 timer i høyvakuum.

- b) Sammenkopling av det delbeskyttede trinukleotidet med den  
         til polystyren-harpiksen bundne oligonukleotidkjeden:

Alle operasjoner utføres under utelukkelse av fuktighet i  
20 en reaksjonsbeholder med et innhold på 220 µl og mikro-  
prosessorstyrt oppløsningsmiddel- og reagens-tilsats.  
13 mg (0,74 µMol) av tymidin-polystyren-harpiksen (eksempel 1)  
plasseres først i reaksjonsbeholderen og underkastes  
følgende operasjoner:

- 25    1. Metylenklorid, 2 ml/min., 4 min.  
      2. Metylenklorid-isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2 min.  
      3. Sinkbromid 1 M og 1,2,4-triazol 0,02 M i metylenklorid-  
         isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2-3,5 min.  
      4. Metylenklorid-isopropanol (85:15), 2 ml/min., 4 min.  
30    5. Trietylammmoniumacetat 0,5 M i DMF, 2 ml/min., 5 min.  
      6. Molekylarsikt-tørket pyridin, 2 ml/min., 3 min.  
      7. Tetrahydrofuran (peroksydfri, molekylarsikt-tørket),  
         2 ml/min., 3 min.  
      8. Nitrogenstrøm, 10 min.  
35    9. Injeksjon av 10 µMol trinukleotid GTC (trimetylammmonium-  
         salt fra avsnitt a)) og 8,9 mg (30 µMol) 1-mesitylen-

sulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) løst i 150 µl pyridin.

10. 45°C, 20 min.
  11. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
  - 5 12. Acetanhydrid 5% og 4-dimetylamminopyridin, 2,5% i pyridin, 2 ml/min., 4 min.
  13. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
  14. Pyridin-isopropanol (1:1), 2 ml/min., 3 min.
- 10 Alle 14 operasjonene gjentas 21 ganger, ved den 9. operasjonen anvendes i stedet for GCT i hvert tilfelle følgende trinukleotider i form av trietylammoniumsalter (avsnitt a)) i den angitte rekkefølgen: GCA, ACC, GAA, CCC, TAC, AGG, TGA, CGG, TAC, CGT, GTG, CCA, AAA, AAA, TGA, CGG, TGA, TTC, GGG, CCT, CAT. Det midlere koplingsutbyttet utgjør 97%. Sluttproduktet har følgende struktur:

MMT-CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAG  
TCT-polystyren

20

c) Avspaltning av DNA-fragmentet fra bærereren og avspaltning av beskyttelsesgruppene:

- 40,0 mg (ca. 0,60 µMol) DNA-synteseharpiks 96/67 holdes med 66 mg (0,40 mMol) o-nitrobenzaldoksim og 50 µl (0,40 mMol) 1,1,3,3-tetrametylguanidin i 400 µl 95% pyridin i 3 timer ved 50°C og i 12 timer ved romtemperatur. Etter avblåsing av pyridinet med nitrogen, blandes residuet med 1,6 ml vandig ammoniakk (33%) og holdes i en lukket beholder i 24 timer ved 50°C.

30

- Den fraskilte flytende fasen befris i vakuum for ammoniakk og vaskes tre ganger, hver gang med 3 ml peroksydfri dietyl-eter. Etter fraskillelse av lavmolekylære bestanddeler på en "Biogel P6"-søyle (100-200 mesh, 3x66 cm, 0,01 Molar trimetylammoniumhydrogenkarbonat pH 7,5, 1,5 ml/min.) isoleres 285 OD (260 nm) DNA.

35

Totalt 60 OD fraskilles på en HPLC-søyle ("PRP-1/Hamilton", 250 x 4,6 mm). Gradient (oppløsning A: 0,05 M trietylammonium-acetat pH 7,0; Oppløsning B: Oppløsning:acetonitril 1:1): 30% B i A → 60% B i A i 20 min. ved 50°C og 2 ml/min.

- 5 Den lipofile hovedtoppen (retensjonstid ca. 14 min.) samles, oppkonsentreres på en "DE52-Cellulose" (Whatman)-søyle, elueres og utfelles med etanol. Til avspaltning av 4-metoksytrityl-beskyttelsesgruppen oppløses bunnfallet i 50 µl eddiksyre/H<sub>2</sub>O (4:1) og holdes i 45 min. ved romtemperatur.
- 10 Reaksjonsproduktet lyofiliseres, utfelles med etanol og adskilles til rensing elektroforetisk med en 8% polyakrylamidgel (7 M urinstoff). Den mengden som tilsvarende den ventede DNA-størrelsen skjæres ut og produktet elektroelueres, oppkonsentreres på DE52-Cellulose" og DNA 96/67
- 15 av strukturen  
 5'-CATCCTGGGTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGC GTTACCGGTGAAGGTACCCCG  
 AAACCGCAGTCT-3'  
 utfelles med etanol.

#### 20 Eksempel 6:

Analogt eksempel 5 fremstilles følgende DNA-fragmenter (5'-3'):

1/58

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGT

- 25 46/64 komplementær  
 CAGAACCCAGGATGCATTTGTTACCCTGACCGCAAACGTTAGAACCTTCGCACAGGCACA  
 GGTT

- 30 154/64 komplementær  
 CAGGATCCTACTGCAGGTATTCTTCGGGATTTCTTCGAAGTCACCGTCGTTGTGAGACT  
 GCGG

#### Eksempel 7: Fosforylering av fragmentene 1/58, 46/64 komplementær, 96/67 og 154/64 komplementær

Fosforyleringen og den radioaktive merkingen på 5'-endene foregår med [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP og T<sub>4</sub> polynukleotid-kinase (Boehringer) som beskrevet i (18).

Eksempel 8: Polymerisasjon til dupleks II (delstykke F<sub>2</sub>  
av desulfatohirudin-genet)

50 pMol av kinasert fragment 96/67 og kinasert fragment  
154/64 oppløses i 24 µl vann, oppløsningen oppvarmes i  
3 minutter til 90°C og avkjøles i løpet av 5 minutter til  
12°C. Etter tilsats av 4 µl endo-R-buffer (0,1 molar  
Tris·HCl pH 7,5, 66 mM MgCl<sub>2</sub>, 66 mM β-merkaptoetanol, 0,6  
M NaCl), 10 µl deoksynukleosidtrisfosfat-blanding (dATP,  
dCTP, dGTP, TTP, i hvert tilfelle 2·10<sup>-3</sup> molar, innstilt  
til pH 7,0 med NH<sub>3</sub>) og 2 µl (10 enheter) DNA-polymerase  
I, Klenow-fragment (Boehringer) inkuberes det i 30 minutt-  
er ved 12°C. Reaksjonen stoppes ved 3 minutters oppvarming  
til 90°C og blandingen oppbevares frem til den videre  
bearbeidelsen ved -80°C.

På analog måte omsettes de kinaserte fragmentene 1/58 og  
46/64 til dupleks I (delstykke F<sub>1</sub> av desulfatohirudin-  
genet).

Dupleksene I og II har følgende strukturer:

Dupleks I

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCG  
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGC

AAGCTTCTAACGTTTGCGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTG  
TTCCAAGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGAC

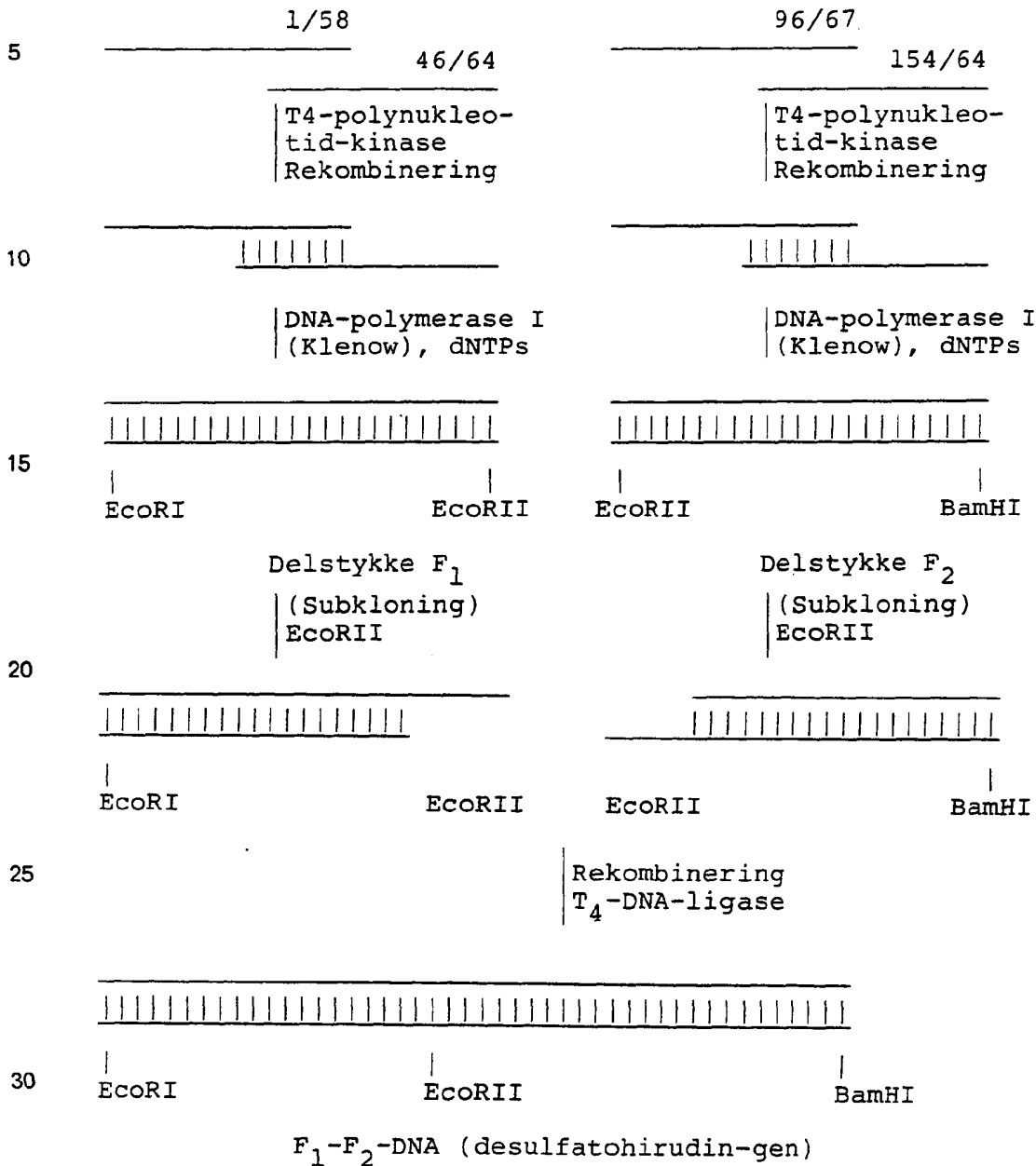
Dupleks II

CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCG  
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTTGGTCAACGAATGGCCACTTCCATGGGGCTTTGGC

CAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG  
GTCAGAGTGTTGCTGCCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC

Fremstillingen av delstykkene F<sub>1</sub> og F<sub>2</sub> av desulfatohirudin-  
genet er gjengitt i følgende skjema I:

Skjema 5: Fremstilling av delstykkene  $F_1$  og  $F_2$  av desulfato-hirudin-genet og  $F_1$ - $F_2$ -DNA



Eksempel 9: Polymerisasjon og ligering av fragmentet 1/58,  
46/64 kinasert, 96/67 kinasert og 154/64;  
Fremstilling av desulfatohirudin-genet

50 mMol av hvert av fragmentene 1/58, 46/64 kinasert, 96/67  
5 kinasert og 154/64 løses i 48 µl vann, oppløsningen oppvar-  
mes 3 minutter til 90°C og avkjøles i løpet av 5 minutter  
til 12°C. Etter tilsats av 8 µl endo-R-buffer (se eksempel  
8), 20 µl deoksynukleosidtrifosfatblanding (dATP, dCTP, dGTF,  
TTP, hver av 0,002 molar, pH justert til 7,0 med NH<sub>3</sub>) og  
10 2 µl (10 enheter) DNA-polymerase I, Klenow-fragment (Boeh-  
ringer) inkuberes det i 30 minutter ved 12°C. Reaksjonen  
stoppes ved 3 minutters oppvarming til 90°C og DNA isoleres  
etter fenol/kloroform-ekstraksjon ved etanolutfelling. Den  
fremstilte DNA-blandingen oppløses i 100 µl ligasebuffer  
15 (66 mM tris·HCl pH 7,5, 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitol,  
5 mM ATP), blandes med 50 enheter (2 µl) T4 DNA-ligase  
(Biolabs) og inkuberes i 20 timer ved 20°C. Reaksjonen  
stoppes ved 5 minutters oppvarming til 70°C og DNA isolers  
ved etanolutfelling etter fenol/kloroform-ekstraksjon.  
20 Etter oppdeling av blandingen på en 8% polyakrylamidgel  
(denaturerende) elektroelueres ligasjonsproduktet med 217  
baseparene ved elektroforese, oppkonsentreres på en "DE52-  
cellulose"-søyle og isoleres ved etanolutfelling etter  
eluering.

25 Desulfatohirudin-genet har følgende struktur:

CTGGAATTCATGGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTG  
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGAC

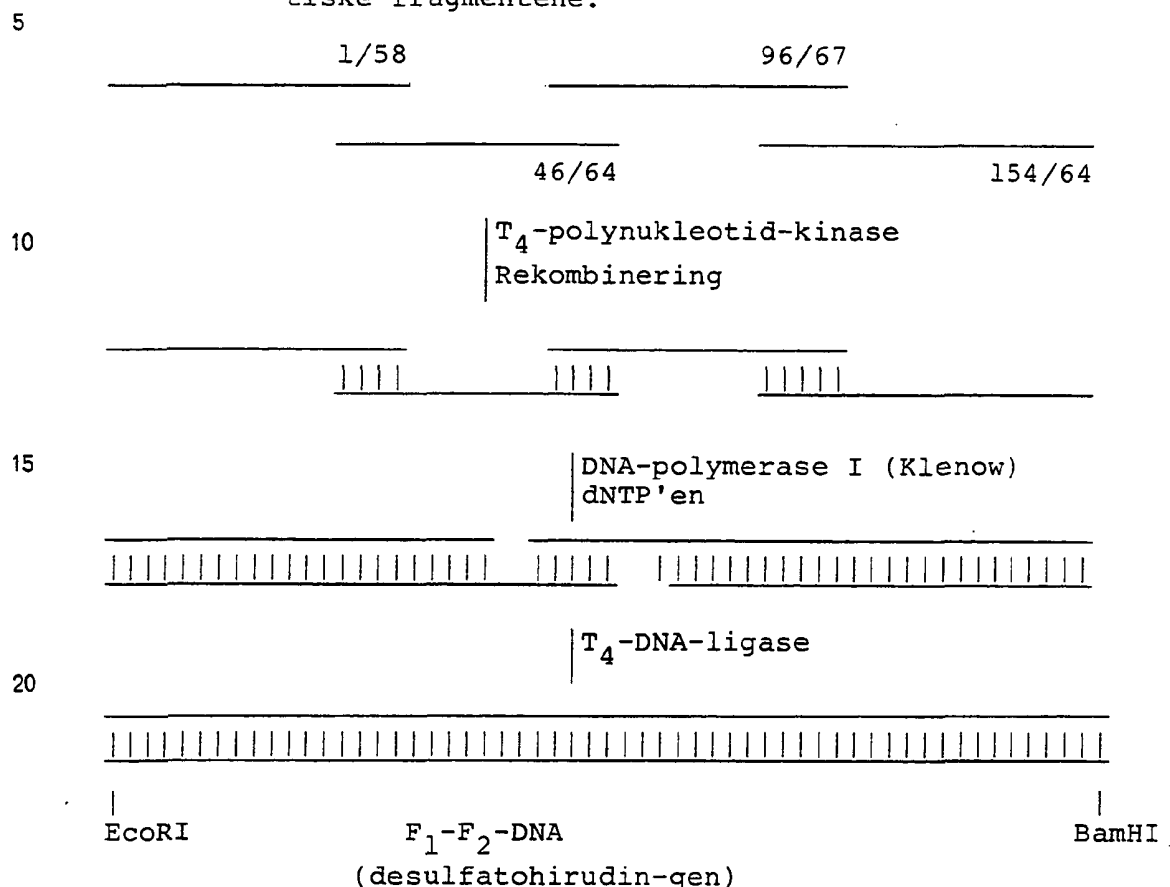
30 TGC GAAGGTTCTAACGTTTGCGGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGT  
ACGCTTCCAAGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAGACTGCCA

GAAAAAACCAGTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCGAAACCGCAGTCTCACAACGAC  
CTTTTTTTGCTCAGCAATGGCCACTTCCATGGGGCTTGGCGTCAGAGTGTGCTG

GGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGTAGGATCCTG  
35 CCACTGAAGCTTCTTTAGGGCCTTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC

Fremstillingen av desulfatohirudin-genet fra de fire fragmentene er gjengitt i følgende skjema II:

Skjema 6: Fremstilling av hirudin-genet fra de fire syntetiske fragmentene.



Eksempel 10: Fremstilling av plasmidet pML 300 som inneholder F<sub>1</sub>-DNA i desulfatohirudin-genet (fig. 1)

a) Fremstilling av den lineariserte vektoren pBR322/EcoRI/PvuII  
 5 µg pBR322 plasmid-DNA nedbrytes med 5 enheter PvuII restriksjonsendonuklease (Biolabs) i 200 ml av en oppløsning av 100 µg/ml gelatin i 1 time ved 37°C. Deretter innstilles denne oppløsningen på 100 mM tris·HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, og DNA nedbrytes med 30 enheter EcoRI-restriksjonsendonuklease (Biolabs) i 2 timer ved 37°C. Deretter innstilles opp-

løsningen på 50 mM tris·HCl pH 8 og ved en DNA-konsentrasjon på 10 µg/µl inkuberes med 2 enheter intestinal alkalisk kalve-fosfatase (Boehringer) i 30 minutter ved 37°C. Enzymet inaktiveres ved oppvarming av oppløsningen i 60 minutter til 65°C. Deretter innstilles oppløsningen på TNE, ekstraheres med 1 volumdel fenol og kloroform og det nedbrutte DNA utfelles med 2 volumdeler alkohol ved -20°C over natten.

Den fra pBR322 DNA utskårne vektoren (pBR322/EcoRI/PvuII, 2297 basepar) adskilles ved gelelektroforese på 1% lavt-smeltende agarose (Biorad) i tris-acetat-EDTA-buffer pH 8 fra små DNA-fragmenter (2067 basepar). Etter farging av DNA i agarosegel med EtBr kuttet den posisjonen av gelen som inneholder DNA-mengden av pBR322/EcoRI/PvuII-vektoren (= 2297 basepar) fra gelen og flytendegjøres ved 65°C i 10 minutter. Til denne DNA-oppløsningen tilsettes 20 volumdeler TNE, DNA renses ved "DE-52"-kromatografi ifølge Mueller et al. (19), ekstraheres med fenol/kloroform og DNA utfelles med alkohol ved -20°C over natten. DNA-bunnfallet oppløses i 50 µl 0,01 M tris·HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA og oppbevares inntil anvendelsen ved -20°C. 1,4 µg (= 3,2 pMol ender) DNA oppnås.

#### b) Fremstilling av F<sub>1</sub>-DNA/EcoRI

24 ng (=1,3 pMol ender) av den kjemisk syntetiserte F<sub>1</sub>-DNA (se eksempel 8) nedbrytes med 5 enheter EcoRI restriksjonsendonuklease (Biolabs) i 50 µl 100 mM tris·HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl og 100 µg/ml gelatin i 30 minutter ved 37°C. Deretter tilsettes oppløsningen 0,06 µg (= 0,14 pMol ender) av den lineariserte vektoren pBR322/EcoRI/PvuII (eksempel 10a). Deretter inaktiveres enzymet ved oppvarming til 65°C i 10 minutter, oppløsningen innstilles på TNE og ekstraheres med fenol/kloroform. DNA utfelles med alkohol. Det utfelte DNA oppbevares under alkohol ved -20°C inntil den videre bearbeidelsen.

c) Ligering av pBR322/EcoRI/PvuII vektor-DNA med  $F_1$ -DNA/-EcoRI og konstruksjon av plasmidet pML300.

Det i eksempel 10b) fremstilte DNA-bunnfallet, som inneholder begge de nevnte DNA-bruddstykkene, oppløses i 20  $\mu$ l av en  
5 oppløsning av 50 mM tris-HCl (pH 7,8), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100  $\mu$ g/ml gelatin og behandles med 25 enheter/ $\mu$ l  $T_4$  DNA-ligase (Biolabs) ved 15°C i 3 timer. På denne måten oppstår i oppløsningen det rekombinerte plasmidet pML300 som inneholder  $F_1$ -DNA.

d) Transformasjon av E. coli HB101 med plasmidet pML300

De E. coli HB101-cellene som er forbehandlet med kalsium og som er nødvendige for transformasjonen fremstilles som beskrevet av Mandel et al. (14).

Den under c) fremstilte oppløsningen som inneholder det rekombinerte plasmidet pML300, oppvarmes i 10 minutter til 65°C for å inaktivere  $T_4$ -DNA-ligasen og avkjøles deretter til 37°C. 10  $\mu$ l av denne reaksjonsblandingen tilsettes til  
20 150  $\mu$ l kalsium-behandlet E. coli HB101-celler i 10 mM  $MgCl_2$  og 10 mM tris-HCl (pH 7,5) i et totalvolum på 200  $\mu$ l.

Deretter avkjøles denne blandingen i 30 minutter på is, oppvarmes i 2 minutter til 42°C og får deretter stå i 50  
25 minutter i 1 ml L-medium (se eksempel 18) ved 37°C. Deretter strykes blandingen i like store deler på 0,2 ml på 5 agarplater (McConkey-agar, Difco) som inneholder 60  $\mu$ g/ml "Ampicillin" (Serva). Agarplatene holdes deretter ved 37°C i 16-18 timer. Det oppnås 484 ampicillin-resistente  
30 kolonier av den transformerte E. coli HB101.

e) Undersøkelse av koloniene som inneholder  $F_1$ -DNA.

470 transformerte kolonier (eksempel 10d) avtrekkes på nitrocellulosefilter B85 (Schleicher og Schüll). Etter  
35 Grunstein og Hogness (20) lyseres koloniene og deres denaturerte DNA festes på filteret. Deretter følger en forhybri-

disering av filteret i 20 ml (pr. filter) 4 x SET [= oppløsning av 30 mM tris·HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA], 0,1% (g/volum) "Ficoll 400" (Pharmacia), 0,5% SDS, 50 µg/ml denaturert kalvethymus-DNA i 4 timer ved 64°C. Deretter  
5 behandles nitrocellulosefilteret i 20 ml (pr. filter) 5xSET (g/volum) "Ficoll 400", 0,2% SDS og 50 µg/ml denaturert kalvethymus-DNA i 16 timer ved 64°C med den <sup>32</sup>P-radioaktivt merkede proben (ca. 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> Cerencov cpm pr. filter). Som probe benyttes oligonukleotidet 46/64 komplementær  
10 (se eksempel 6).

Deretter vaskes filteret to ganger i 2xSET, 0,2% SDS ved romtemperatur, deretter to ganger i 2xSET, 0,5% SDS ved 60°C (først 30 minutter, deretter 60 minutter). Deretter  
15 tørkes filteret mellom 3 MM papir (Whatman) og legges ved -80°C på en røntgenfilm (Fuji) med en forsterkerfolie (Intensifying screen, Ilford) i 1-2 dager.

Det oppnådde autoradiogrammet viser 71 positive kolonier  
20 (kloner) som kan anvendes til videre arbeid, en av disse inneholder betegnelsen pML300.

Eksempel 11: Fremstilling av plasmidet pML305 som inneholder F<sub>2</sub>-DNA'en av desulfatohirudin-genet (fig. 2).

25 a) Fremstilling av den lineariserte vektoren pBR322/BamHI/NruI  
5 µg pBR322 plasmid-DNA nedbrytes med 30 enheter BamHI-restriksjonsendonuklease i 30 minutter ved 37°C i en oppløsning av 100 mM NaCl, 6 mM tris·HCl (pH 7,9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>  
30 og 100 µg/ml gelatin. Deretter tilsettes oppløsningen 15 enheter PvuII-restriksjonsendonuklease og nedbrytes i 2 timer ved 37°C.

Reaksjonsblandingen oppvarmes i 10 minutter til 70°C for  
35 å inaktivere enzymene. Deretter adskilles de to DNA-fragmentene fra hverandre ved gelelektroforese på 1% lavt-

smeltende agarose i tris-acetat EDTA-buffer pH 8 (se eksempel 10a).

DNA-samlingen av pBR322 BamHI/PvuII-vektoren (= 2672 base-par) skjæres ut, flytendegjøres og renses etter Mueller et al. (19) ved "DE-52"-kromatografi. Det oppnås 0,75 µg (= 1,5 pMol ender) DNA.

b) Fremstilling av F<sub>2</sub>-DNA/BamHI

25 µg (= 1,3 pMol ender) av den kjemisk syntetiserte F<sub>2</sub>-DNA (eksempel 8) nedbrytes med 16 enheter BamHI-restriksjonsendonuklease (Biolabs) i 20 µl 150 mM NaCl, 6 mM tris·HCl (pH 7,9), 6 mM MgCl<sub>2</sub> og 100 µg/ml gelatin i 30 minutter ved 37°C. Deretter tilsettes oppløsningen 60 ng (= 96 nMol ender) av den lineariserte vektoren pBR322/BamHI/PvuII (eksempel 11a), hele oppløsningen innstilles på TNE og ekstraheres med fenol/kloroform og DNA'en utfelles med 2 volumdeler alkohol. Den utfelte DNA lagres inntil den videre bearbeidelsen under alkohol ved -20°C.

c) Ligering av pBR322/BamHI/PvuII-vektor-DNA med F<sub>2</sub>-DNA/BamHI og konstruksjon av plasmidet pML305

Det under eksempel 11b) fremstilte DNA-bunnfallet som inneholder begge de nevnte DNA-bruddstykkene, oppløses i 20 µl av en oppløsning av 50 mM tris·HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml gelatin og behandles med 15 enheter/µl T<sub>4</sub> DNA-ligase (Biolabs) ved 15°C i 3 timer. På denne måten oppstår i oppløsningen det rekombinerte plasmidet pML305 som inneholder F<sub>2</sub>-DNA.

d) Transformasjon av E. coli HB101 med plasmidet pML305.

Transformasjonen av de med kalsium behandlede E. coli HB101-cellene foregår som beskrevet i eksempel 10d). Det anvendes 10 µl av den i eksempel 12c) oppnådde reaksjonsblandingen. 313 ampicillin-resistente kolonier oppnås.

e) Undersøkelse av koloniene som inneholder  $F_2$ -DNA  
65 transformerte kolonier (eksempel 11d) undersøkes med  
hensyn på  $F_2$ -DNA som beskrevet i eksempel 10e). Som radio-  
aktiv probe anvendes oligonukleotidet 154/64 komplementær  
5 (se eksempel 6). I autoradiogrammet oppnås 2 positive  
kolonier, en av disse inneholder betegnelsen pML305.

Eksempel 12: Karakterisering av klonene pML300 og pML305

DNA i de rekombinerte plasmidene pML300 og pML305 isoleres  
10 ifølge Ish-Horowitz (21). Nukleotidsekvensene i  $F_1$ -DNA-  
og  $F_2$ -DNA-innskuddene bestemmes etter Maxam og Gilbert  
(11). For dette formålet spaltes 10 µg plasmid-DNA av  
pML300 med EcoRI-restriksjonsendonuklease og 10 µg plasmid-  
DNA av pML305 med BamHI-restriksjonsendonuklease og de  
15 lineariserte DNA'ene isoleres ved geleluering fra agarose-  
gel (se eksempel 10a). Deretter nedbrytes de isolerte  
DNA'ene med alkalisk fosfatase og kromatograferes over  
"DE-52" (se eksempel 11a). Deretter merkes DNA'ene på  
5'-enden radioaktivt med [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (spesifikk aktivitet  
20 > 5000 Ci/mmol, Amersham) og  $T_4$ -polynukleotid-kinase .  
(P-L-Biochemicals).

De radioaktivt merkede DNA'ene spaltes så med en andre  
restriksjonsnuklease (EcoRII). De oppnådde DNA-fragmentene  
25 isoleres ved geleluering fra agarose. I tilfelle med pML300  
bestemmes så fra EcoRII-EcoRI\*-fragmentet (ca. 109 basepar)  
nukleotidsekvensen for  $F_1$ -DNA, i tilfellet med pML300 be-  
stemmes  $F_2$ -DNA'en i EcoRII-BamHI\*-fragmentet (ca. 122 base-  
par).

30 (\* angir DNA-enden som er radioaktivt merket).

Nukleotidsekvensene som er bestemt for  $F_1$ -DNA og  $F_2$ -DNA  
er identiske med de som er angitt i eksempel 8.

Eksempel 13: Fremstilling av ekspresjonsplasmidet pML310

- a) Konstruksjon av den lineariserte vektoren pHR148/EcoRI/-  
BamHI, som inneholder trp-promotor-operatoren (fig. 3  
5 og fig. 4)

A. Konstruksjon av plasmidet p159

10 µg plasmid pBRH<sub>trp</sub> (22) spaltes med 50 enheter EcoRI  
(Biolabs) i løpet av 60 minutter ved 37°C, og nedbrytnings-  
10 blandingen fraksjoneres etter fenolekstraksjon ved en sakka-  
rose-tetthetsgradient (5-23%) i 50 mM tris·HCl (pH 8,0),  
1 mM EDTA i en TST41 (Kontron AG) rotor. Sentrifugeringen  
varer i 14 timer ved 40.000 opm og 15°C. 0,3 ml frak-  
sjoner samles med en ISCO-gradientkollektor ved 1 ml/min.  
15 Fraksjonene som inneholder mindre fragmenter samles, løs-  
ningen innstilles på TNE og det felles med 2 volumdeler  
etanol ved -20°C. DNA oppløses, etter sentrifugering i  
en Eppendorf-sentrifuge i 100 µl 10 mM tris·HCl pH 7,5,  
0,5 mM EDTA. 5 µg av disse DNA-fragmentene spaltes med  
20 5 enheter BgIII (Biolabs) i 60 minutter ved 37°C. Reak-  
sjonsblandingen ekstraheres med fenol og kloroform og DNA  
inkuberes med 2 volumdeler etanol ved -80°C i 10 minutter,  
DNA samles ved sentrifugering og oppløses på nytt i 50 µl  
50 mM tris·HCl (pH 8,0). 2 µl av denne oppløsningen tas  
25 ut (0,2 µg DNA) og inkuberes ved en DNA-konsentrasjon på  
10 ng/µl i 50 mM tris·HCl (pH 8,0) med 1 enhet intestinal  
alkalisk kalve-fosfatase (Boehringer) i 30 minutter ved  
37°C. Enzymet inaktiveres ved oppvarming av oppløsningen  
i 60 minutter til 65°C. 0,04 µg DNA tas ut og 5'-termi-  
30 nalen med 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham)  
og 5 enheter T<sub>4</sub> polynukleotid-kinase (P-L Biochemicals)  
inkuberes i 20 µl reaksjonsvolum i 50 mM tris·HCl (pH 9,5),  
10 mM MgCl<sub>2</sub> og 5 mM DTT i 30 minutter ved 37°C. Den  
radioaktive proben blandes med den ikke-merkede proben  
35 (se ovenfor) og DNA-fragmentene fraksjoneres ved hjelp  
av en 5-23% sakkarose-tetthetsgradient i 50 mM tris·HCl  
(pH 8,0), 1 mM EDTA i en TST60-rotor. Sentrifugeringen

foregår i 5 timer ved 60.000 opm og 15°C. Det samles fraksjoner på 0,2 ml. Radioaktiviteten av hver fraksjon bestemmes ved måling av Cerencov-strålingen og fragmentene identifiseres derved. De ønskede fraksjonene som inneholder det lille DNA-fragmentet samles, DNA utfelles med 2 volumdeler etanol og oppløses etter sentrifugering igjen i 20 µl 10 mM tris·HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA.

Det <sup>32</sup>P-merkede EcoRI-BglIII DNA-fragmentet spaltes delvis med 0,2 enheter TaqI (Biolabs) i et volum på 50 µl i 10 minutter ved 37°C. Reaksjonsblandingen innstilles på 0,2% SDS, 10% glyserin, 10 mM EDTA, 0,05% bromfenol-blått og DNA-fragmentene adskilles på en 6% polyakrylamidgel i tris-borat-EDTA (23). På autoradiogrammet identifiseres den ønskede EcoRI-TaqI-holdige mengden (det største del-fragmentet). Dette fragmentet (L, se fig. 3) ekstraheres fra gelen og renses (19) og oppløses i 10 µl 10 mM tris·HCl pH 7,5, 1 mM EDTA.

Som akseptor-plasmid anvendes pBR322 som er spaltet med ClaI og EcoRI: 2 µg pBR322 nedbrytes med 4 enheter ClaI (Biolabs) i et reaksjonsvolum på 20 µl i 60 minutter ved 37°C. Proteinene ekstraheres med fenol og DNA utfelles deretter med 2 volumdeler etanol ved -80°C i løpet av 10 minutter. DNA samles ved sentrifugering og nedbrytes deretter med 10 enheter EcoRI (Biolabs) i 30 minutter ved 37°C i et reaksjonsvolum 20 µl. Deretter blandes oppløsningen med 2 volumdeler 0,1 M tris·HCl (pH 8,7) og inkuberes med 1 enhet alkalisk kalve-fosfatase (Boehringer) i 30 minutter ved 37°C. Fosfatasen inaktiveres deretter ved inkubering ved 65°C i 60 minutter.

100 ng av akseptor-plasmidet inkuberes med 5 µl fragment 1-DNA i 15 µl reaksjonsvolum i 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM tris·HCl (pH 7,8), 10 mM DTT, 0,5 mM ATP med 30 enheter pr. µl reaksjonsvolum av T<sub>4</sub> DNA-ligase (Biolabs) i 2 timer.

5 µl av denne oppløsningen tilsettes til en blanding som inneholder 150 ml av E. coli HB101-celler (14) som er behandlet med kalsiumklorid i 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $CaCl_2$  og 10 mM tris·HCl (pH 7,5) i et totalvolum på 200 µl.

5 Blandingen avkjøles i 20 minutter på is, oppvarmes i 1 minutt til 42°C og inkuberes i 10 minutter ved 20°C. 1 ml trypton-medium [Trypton-medium inneholder 10 g bacto-trypton (Difco); 1 g gjærekstrakt (Difco); 1 g glukose; 8 g NaCl og 294 mg  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  i 1 l destillert vann] til-

10 settes og blandingen inkuberes i 30 minutter ved 37°C under risting ved 300 omdr./min. Blandingen plasseres på to agarplater (McConkey agar, Difco; 0,6 ml/plate), supplert med 50 µg/ml "Ampicillin" (Sigma). Platene inkuberes i 12 til 17 timer ved 37°C.

15

Plasmid-DNA fra 10 forskjellige kolonier isoleres på følgende måte:

Koloniene anvendes til inokulering av 10 ml trypton-medium supplert med 50 µg/ml "Ampicillin", som ovenfor, i en

20 25 ml Erlenmyerkolbe. Kulturene ristes i 15-18 timer ved 37°C og 300 omdr./min. Cellene høstes ved sentrifugering (Sorval, HS-4-rotor, 10 min. ved 4000 omdr./min., 4°C). Man oppnår ca. 0,1 g celler og disse resuspenderes i 1 ml 50 mM tris·HCl (pH 8,0). 0,25 ml lysozymoppløsning [10

25 mg/ml i 50 mM tris·HCl (pH 8,0)] tilsettes og etter 10 minutters inkubering ved 0°C tilsettes 0,15 ml 0,5 mM EDTA (pH 7,5). Etter ytterligere 10 minutter ved 0°C tilsettes 60 µl 2% "Triton X-100" (Merck). Etter 30 minutter ved 0°C sentrifugeres proben i 30 minutter ved 15.000

30 omdr./min. og 4°C i en "Sorval SA-600"-rotor. Overvasken deproteiniseres med 1 volumdel fenol (mettet i TNE). Fasene adskilles ved sentrifugering ("Sorval HB-4"-rotor) i 10 minutter ved 5000 omdr./min. og 4°C. Den øvre fasen ekstraheres to ganger med 1 volumdel kloroform.

35 Pankreatisk RNase A (Sigma; 10 mg/ml i TNE, foroppvarmet i 10 minutter ved 85°C) tilsettes til en sluttkonsentra-

- sjon på 25 µg/ml og blandingen inkuberes i 40 minutter ved 37°C. Oppløsningen innstilles så på 1 M NaCl og 10% polyetylenglykol 6000 (Fluka, behandlet i autoklav i 20 minutter ved 120°C) og inkuberes i 2 timer ved -10°C.
- 5 Bunnfallet samles i en "Sorval HB-4"-rotor (20 minutter ved 10.000 omdr./min, 0°C) og oppløses på nytt i 100 µl TNE. DNA-oppløsningen ekstraheres med 1 volum fenol og DNA utfelles med 2 volumdeler etanol i 10 minutter ved -80°C. Bunnfallet samles ved sentrifugering i en
- 10 Eppendorf-sentrifuge og DNA oppløses på nytt i 20 µl 10 mM tris·HCl (pH 7,5) og 0,5 mM EDTA. Fra en 10 ml kultur utvinnes man 8-10 µg plasmid-DNA.

- Plasmid-DNA analyseres etter nedbrytning med følgende
- 15 restriksjonsenzymer:
- 0,5 µg plasmid-DNA spaltes i hvert tilfelle med HpaI (Biolabs) samt med HpaI (Biolabs) og EcoRI (Biolabs) med ClaI (Biolabs) ifølge standardforskriftene som er angitt av enzymfabrikanten. DNA fraksjoneres på en 1% agarosegel i 40 mM tris·acetat
- 20 (pH 7,8) 1 mM EDTA og 0,5 µg/ml etidiumbromid. De ønskede plasmidene inneholder en HpaI-posisjon og gir etter tre gangers nedbrytning ved siden av det større DNA-fragmentet to mindre fragmenter som er større enn det lille EcoRI-ClaI-fragmentet av pBR322. Et av disse plasmidene betegnes
- 25 med pl59 (se fig. 3).

#### B. Konstruksjon av plasmidet pHRil45

- 2 µg pl59-DNA nedbrytes med 10 enheter EcoRI (Biolabs) i 30 minutter ved 37°C. DNA ekstraheres med fenol,
- 30 utfelles med etanol og oppløses etter sentrifugering i 10 µl 10 mM tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA. Den med EcoRI nedbrutte DNA behandles videre med 5 enheter DNA-polymrase (Klenow-fragment) (Boehringer) i 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-merkapttoetanol, 50 mM NaCl, 0,1 mM dATP (P&L Biochemicals),
- 35 0,1 mM dTTP (P&L Biochemicals) i 15 minutter ved 12°C. Polymerasen inaktiveres deretter ved inkubering ved 85°C i 5 minutter. Reaksjonsblandingen fortynnes med en faktor

10 i 20 mM tris·HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP (Sigma) og inkuberes med 30 enheter T<sub>4</sub> DNA-ligase pr. µl reaksjonsblanding i 1 time ved 15°C.

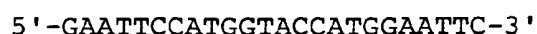
- 5 50 ng av DNA transformeres i E. coli (som beskrevet ovenfor) og plasseres på McConkey-agarplate supplert med 50 µg/ml "Ampicillin".

- 10 Plasmid-DNA fra 10 forskjellige kolonier isoleres som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA analyseres ved nedbrytning med EcoRI. De ønskede plasmidene er EcoRI-resistente. Analysen foregår som beskrevet ovenfor. Et av de ønskede plasmidene betegnes som HRil45 (fig. 3).

15 C. Konstruksjon av plasmidet pHRil48

- 2 µg pHRil45-DNA behandles med 5 enheter ClaI (Boehringer) i 60 minutter ved 37°C, deretter blir den deproteinert ved hjelp av fenol-ekstraksjon. DNA utfellesses med etanol og oppløses deretter i 20 µl 10 mM tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA. De overhengende endene utfylles som beskrevet ovenfor med DNA-polymerase I (Klenow-fragment) med den endringen at dATP og dTTP erstattes av dCTP (P&L Biochemicals) og dGTP (P&L Biochemicals). Polymerasen inaktiveres ved inkubering ved 85°C i 5 minutter. Reaksjonsblandingen blandes med 2 volumdeler 0,1 M tris·HCl (pH 8,7) og inkuberes med 0,5 enheter kalve-fosfatase (Boehringer) i 30 minutter ved 37°C. Reaksjonsblandingen deproteineres ved fenol-ekstraksjon. DNA utfellesses med etanol og oppløses i 8 µl 10 mM tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA.

- 30 En kjemisk syntetisert DNA-binder av formelen



- 35 fosforyleres ved 5'-enden, ved at 8 pMol av binderen inkuberes med 5µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5500 Ci·mmol<sup>-1</sup> Amersham) i et 8 µl reaksjonsvolum som inneholder 0,1 mM rATP (Sigma),

50 mM tris·HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT og 2 enheter T<sub>4</sub> polynukleotid-kinase (P&L Biochemicals) i 30 minutter ved 37°C. Reaksjonen stoppes ved nedfrysning til -80°C.

5

Den radioaktivt merkede binderen behandles deretter med 1 µg ClaI og fosfatase og ligeres med pHRil45-DNA (se ovenfor) i et 20 µl reaksjonsvolum som inneholder 0,5 mM rATP (Sigma), 10 mM DTT (Calbiochem), 20 mM tris·HCl (pH 7,8), 10 1 mM MgCl<sub>2</sub> og 800 enheter T<sub>4</sub> DNA-ligase (Biolabs). Inkuberingen foregår ved 15°C i 2 timer. Ligasen inaktiveres ved inkubering ved 85°C i 10 minutter. Deretter tilsettes 2 volumdeler vann, koksalt-konsentrasjonen innstilles på 10 mM og 20 enheter KpnI (Biolabs) tilsettes i løpet av 15 30 minutter ved 37°C. Etter ekstraksjonen med fenol og kloroform fraksjoneres blandingen ved en 0,9% lavtsmeltende agarosegel (Biorad) i 40 mM tris-acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA og 0,5 µg/ml etidiumbromid. Den ved UV-bestråling synlige samlingen som oppviser samme mobilitet som en 20 merker-DNA av samme størrelse, skjæres ut med en skalpell. Gelstykket smeltes i 5 minutter ved 65°C og avkjøles deretter til 37°C. Man oppnår et volum på ca. 20 µl. 5 µl av denne oppløsningen tas ut og inkuberes med 400 enheter T<sub>4</sub>-ligase (Biolabs) i 10 µl reaksjonsvolum, som er innstilt 25 på 0,5 mM ATP, 10 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM tris·HCl (pH 7,8) i 12 timer ved 15°C. 1/10 volumdel av en oppløsning med 100 mM tris·HCl (pH 7,5), 100 mM CaCl<sub>2</sub> og 100 mM MgCl<sub>2</sub> tilsettes til ligase-blandingen (størknet ved 15°C) og det inkuberes ved 65°C i 5 minutter. Oppløsningen anvendes 30 så for å transformere de med kalsium behandlede E. coli HB101-cellene, som beskrevet ovenfor. Blandingen plasseres på McConkey-agarplate supplert med 50 µg/ml "Ampicillin".

Plasmid-DNA fra 10 forskjellige kolonier isoleres som 35 beskrevet ovenfor og DNA underkastes følgende restriksjons-enzymanalyse: Porsjoner på 0,5 µg plasmid-DNA spaltes etter tur med Kpn) (Biolabs), NcoI (Biolabs) og EcoRI (Biolabs)

etter forskriftene gitt av enzymfabrikanten. Spaltnings-  
 produktene fraksjonerer på 1% agarose-geler i 40 mM  
 tris-acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml etidiumbromid.  
 Hvert plasmid viser som ønsket en av disse enzymspaltnings-  
 5 posisjonene. Et betegnes som HRil48.

Plasmidet HRil48 inneholder en tryptofan-promotor-operator  
 og en ribosomal bindingsposisjon til og med ATG. Hirudin,  
 på samme måte som andre heterologe gener, kan koples direkte  
 10 til de EcoRI, NcoI, KpnI-posisjonene som forekommer en  
 gang i plasmidet. Dessuten muliggjør denne konstruksjonen  
 direkte kopling og uttrykking av heterologe gener, uten  
 at ATG som er nødvendig for initieringen av translasjonen  
 må være tilstede på det tilsvarende genet. Dette kan lett  
 15 oppnås ved spaltning med NcoI og oppfylling av de over-  
 hengende endene med DNA-polymerase I, som beskrevet, eller  
 ved spaltning med KpnI og fjerning av de overhengende endene  
 ved nuklease S<sub>1</sub>. Plasmidet HRil48 er følgelig et svært  
 anvendelig ekspresjonsplasmid.

20

D. Fremstilling av den lineariserte vektoren pHRil48/EcoRI/-  
 BamHI

5 µg plasmid-DNA av pHRil48 nedbrytes med restriksjonsendo-  
 nukleasene EcoRI og BamHI. Den utsnittede vektoren  
 25 pHRil48/EcoRI/BamHI isoleres ved hjelp av tetthetsgradient-  
 sentrifugering.

b) Fremstilling av F<sub>1</sub>-DNA/RcoRI/EcoRII og av F<sub>2</sub>-DNA/-  
 BamHI/EcoRII

30

I. Fremstilling av F<sub>1</sub>-DNA/EcoRI/EcoRII

5 µg plasmid-DNA fra pML300 nedbrytes først med 10 enheter  
 EcoRI-restriksjonsendonuklease i 50 µl av en oppløsning  
 av 100 mM tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl og 100 µg/ml gelatin  
 35 i en time ved 37°C. En prøve (0,5 µg) av dette lineariserte  
 plasmidet DNA/EcoRI isoleres ved geleluering fra en agarose-  
 gel (se eksempel 10a)) og merkes radioaktivt med [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP

(se eksempel 12). Hovedmengden av plasmid DNA/EcoRI blandes så med denne radioaktivt merkede DNA, nedbrytes med EcoRII-restriksjonsendonuklease og EcoRII-EcoRI\* DNA-fragmentet (109 basepar) adskilles ved gelelektroforese på 8% polyakrylamid. 200 µg av F<sub>1</sub>-DNA/EcoRI\*/EcoRII isoleres ved geleluering.

II) Fremstilling av F<sub>2</sub>-DNA/BamHI/EcoRII

5 µg plasmid DNA fra pML305 spaltes med 10 enheter BamHI-restriksjonsendonuklease. En prøve (0,5 µg) av dette lineariserte plasmid DNA/BamHI isoleres ved geleluering fra en agarosegel (se eksempel 10a)) og merkes radioaktivt med [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (se eksempel 12)). Hovedmengden av plasmid DNA/BamHI blandes så med denne radioaktivt merkede DNA, nedbrytes med EcoRII-restriksjonsendonuklease og EcoRII-BamHI\* DNA-fragmentet (122 basepar) adskilles ved gelelektroforese på 8% polyakrylamid. 250 µg av F<sub>2</sub>-DNA/BamHI\*/EcoRII isoleres.

c) Legering av F<sub>1</sub>-DNA med F<sub>2</sub>-DNA og konstruksjon av ekspressjonsplasmidet pML310

10 ng (= 473 nMol ender) F<sub>1</sub>-DNA/EcoRI/EcoRII og 9 ng (= 495 nMol ender) F<sub>2</sub>-DNA/BamHI/EcoRII behandles i et volum på 20 µl med T<sub>4</sub>-DNA-ligase som beskrevet under eksempel 10c). Deretter ekstraheres blandingen med fenol/kloroform og DNA utfelles med alkohol. DNA-bunnfallet oppløses deretter som beskrevet i eksempel 10c) og nedbrytes med EcoRI- og BamHI-restriksjonsendonuklease. Oppløsningen innstilles deretter på TNE og 30 ng (= 50 nMol ender) av vektor-DNA pHR148/EcoRI/BamHI (se eksempel 13aD) tilsettes. Deretter ekstraheres oppløsningen igjen med fenol/kloroform og DNA utfelles med alkohol. Den utfelte DNA-blanding behandles, som angitt i eksempel 10c), med T<sub>4</sub>-DNA-ligase (Biolabs). På denne måten oppstår i oppløsningen et rekombinert plasmid som inneholder F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA (desulfatohirudin-genet) som innskudd.

d) Transformasjon av E. coli HB101 med plasmidet pML310

Transformasjonen av de med kalsium behandlede E. coli HB101-cellene foregår som beskrevet i eksempel 10d). Det anvendes 10 µl av den i eksempel 13c) fremstilte reaksjonsblandingen. Det oppnås 420 "Ampicillin"-resistente kolonier.

e) Undersøkelse av koloniene som inneholder F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA

18 transformerte kolonier (eksempel 13d) undersøkes vedrørende F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA-innhold som beskrevet i eksempel 10e). Som radioaktiv probe anvendes en blanding av de i eksempel 5 og 6 beskrevne oligodeoksynukleotidene. I autoradiogrammet oppnås 12 positive kolonier, fem av disse inneholder betegnelsene pML310, pML311, pML312, pML313, pML314.

Eksempel 14: Karakterisering av klonet pML310

Karakteriseringen av F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA-sekvensen i det rekombinerte plasmidet pML310 foregår ved sekvensering av F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA ifølge Maxam og Gilbert (11) som beskrevet i eksempel 12. 10 µg plasmid-DNA undersøkes. Nukleotid-sekvensen av F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-DNA er identisk med den som er beskrevet for det syntetiske desulfatohirudin-genet.

25 Eksempel 15: Fremstilling av ekspresjonsplasmidet pML315

a. Ligering av F<sub>1</sub>-DNA med F<sub>2</sub>-DNA og konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pML315

25 µg (= 1,3 pMol ender) henholdsvis 26 µg (= 1,3 pMol ender) av de kjemisk syntetiserte F<sub>1</sub>- henholdsvis F<sub>2</sub>-DNA (se eksempel 8 og skjema I) nedbrytes i et volum på 20 µl med 5 enheter EcoRII-restriksjonsendonuklease (Biolabs) i 50 mM tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml gelatin i 30 minutter ved 37°C. Deretter ekstraheres blandingen med fenol/kloroform og DNA utfelles med alkohol. DNA-bunnfallet oppløses deretter som beskrevet i eksempel 10c) og behandles med T<sub>4</sub>-DNA-ligase i tre timer

- ved 15°C. Deretter ekstraheres blandingen med fenol/kloroform og det utfelles som beskrevet i eksempel 10b). DNA-bunnfallet oppløses deretter (se eksempel 10c) og nedbrytes med EcoRI- og BamHI-restriksjonsendonuklease i 30
- 5 minutter ved 37°C. Deretter tilsettes oppløsningen 70 ng (= 0,1 pMol ender) av den lineariserte vektoren pHR148/EcoRI/BamHI (eksempel 13aD), hele oppløsningen innstilles på TNE og ekstraheres med fenol/kloroform og DNA utfelles med 2 volumdeler alkohol.
- 10 Det fremstilte DNA-bunnfallet som inneholder begge DNA-bruddstykkene ( $F_1$ - $F_2$ -DNA/EcoRI/BamHI og pHR148/EcoRI/BamHI), oppløses i 20 µl av en oppløsning av 50 mM tris-HCl (pH 7,8), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml gelatin og behandles med 15 enheter/µl  $T_4$ -DNA-ligase (Biolabs)
- 15 ved 15°C i 3 timer. På denne måten oppstår i oppløsningen det rekombinerte plasmidet pML315, som inneholder  $F_1$ - $F_2$ -DNA (= desulfatohirudin-genet).
- 20 b) Transformasjon av E. coli HB101 med plasmidet pML315  
10 µl av blandingen som inneholder plasmidet pML315 (eksempel 15a) anvendes for transformasjonen av de kalsium-behandlede E. coli HB101-cellene. Ca. 236 "Ampicillin"-resistente kolonier oppnås.
- 25 c) Undersøkelse av koloniene som inneholder  $F_1$ - $F_2$ -DNA  
Transformerte kolonier (eksempel 15b) undersøkes vedrørende tilstedeværelsen av  $F_1$ - $F_2$ -DNA som angitt i eksempel 13e).
- 30 Det oppnås fem positive kolonier som inneholder betegnelsen pML315 - pML319.
- Eksempel 16: Fremstilling av ekspresjonsplasmidet pML320
- 35 a. Ligering av den syntetiske  $F_1$ - $F_2$ -DNA med vektor-DNA  
pHR148/EcoRI/BamHI  
20 µg av det totale syntetisk fremstilte desulfatohirudin-

genet ( $F_1$ - $F_2$ -DNA, se eksempel 9) nedbrytes i 20  $\mu$ l av en oppløsning av 50  $\mu$ l 100 mM tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl og 100  $\mu$ g/ml gelatin med restriksjonsenzymet EcoRI og deretter med BamHI. Oppløsningen innstilles på TNE, hvor-  
5 etter 30  $\mu$ g (= 50 nMol ender) av vektor-DNA pHRil48/EcoRI/-BamHI (se eksempel 13aD) tilsettes. Oppløsningen ekstraheres med fenol/kloroform og DNA utfelles med alkohol. DNA-bunnfallet behandles, som angitt i eksempel 10c), med  $T_4$ -DNA-ligase (Biolabs). På denne måten oppstår i opp-  
10 løsningen et rekombinert plasmid (pML320) som inneholder  $F_1$ - $F_2$ -DNA (hirudin-gen) som innskudd.

b. Transformasjon av E. coli HB101 med plasmidet pML320  
Transformasjonen av de med kalsium behandlede E. coli  
15 HB101-cellene foregår som beskrevet i eksempel 10d). Det anvendes 10  $\mu$ l av den i eksempel 16a) fremstilte reaksjonsblandingen. 172 "Ampicillin"-resistente kolonier oppnås.

c. Undersøkelse av koloniene som inneholder  $F_1$ - $F_2$ -DNA  
20 11 transformerte kolonier (eksempel 16b) undersøkes, som beskrevet i eksempel 10e), vedrørende  $F_1$ - $F_2$ -DNA-innhold. Som radioaktiv probe anvendes en blanding av de i eksemplene 5 og 6 beskrevne oligodesoksynukleotidene. I autoradiogrammet oppnås 14 positive kolonier. Fem av disse inne-  
25 holder betegnelsene pML320, pML321, pML322, pML323 og pML324.

Eksempel 17: Karakterisering av klonene pML315 og pML320  
Karakteriseringen av  $F_1$ - $F_2$ -sekvensene i plasmidene pML315  
30 og pML320 foregår ved sekvensering av  $F_1$ - $F_2$ -DNA ifølge Maxam og Gilbert (11), som beskrevet i eksempel 12. Nukleotid-sekvensene i DNA-innskuddene for begge plasmidene er identisk med de i det syntetiske hirudin-genet.

35 Eksempel 18: Syntese av polypeptider med hirudin-aktivitet ved E. coli-celler som inneholder plasmider med rekombinerte hirudin-gener.

a. Syntese av polypeptider med hirudin-aktivitet

Hver av de 15 klonene som inneholder det rekombinerte desulfatohirudin-genet, dvs.

- 5 E.coli HB101 pML310, E.coli HB101 pML314, E.coli HB101 pML312,  
E.coli HB101 pML313, E.coli HB101 pML314, E.coli HB101 pML315,  
E.coli HB101 pML316, E.coli HB101 pML317, E.coli HB101 pML318,  
E.coli HB101 pML319, E.coli HB101 pML320, E.coli HB101 pML321,  
E.coli HB101 pML322, E.coli HB101 pML323, E.coli HB101 pML324

10

undersøkes vedrørende dannelsen av hirudin-aktivitet.

For dette formålet dyrkes de ovenfor nevnte klonene i

5 ml L-medium over natten (16 timer) ved 37°C og 250 opm.

- 15 L-medium har følgende sammensetning:

|    |                    |       |
|----|--------------------|-------|
|    | Bacto trypton      | 10 g  |
|    | Bacto gjærekstrakt | 5 g   |
|    | NaCl               | 5 g   |
|    | Glukose            | 5 g   |
| 20 | "Ampicillin"       | 0,1 g |

1 ml av denne kulturen som har stått over natten overføres  
neste dag til 25 ml M9-medium. M9-medium har følgende  
sammensetning:

|    |                                                     |          |
|----|-----------------------------------------------------|----------|
| 25 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 13,25 g  |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 3,0 g    |
|    | NaCl                                                | 0,5 g    |
|    | NH <sub>4</sub> Cl                                  | 1,0 g    |
|    | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,015 g  |
| 30 | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,25 g   |
|    | Kasaminosyrer                                       | 2,5 g    |
|    | Vitamin B <sub>1</sub>                              | 0,0099 g |
|    | Glukose                                             | 5,0 g    |
|    | "Ampicillin"                                        | 0,1 g    |

35

Det dyrkes ved 37°C og 250 opm inntil bakteriesuspen-  
sjonen har nådd en optisk tetthet (OD<sub>623</sub>) på 0,9-1,0.

Deretter høster man cellene (5 ml av den voksende kulturen) og resuspenderer bakteriene i 0,5 ml av en oppløsning av 50 mM tris-HCl (pH 8) og 30 mM NaCl. Deretter innstilles suspensjonen på 1 mg/ml lysozym (Boehringer) og stilles  
 5 på is i 30 minutter. Ved avvekslende nedfrysning av suspensjonen i flytende nitrogen og opptining ved 37°C ødelegges bakteriene. Denne prosedyren gjentas fem ganger, deretter sentrifugeres blandingen i 30 minutter ved 16000 opm ved 4°C. Overvæskene undersøkes med hensyn på desul-  
 10 fatohirudin-innhold ved at man blander med antistoffer (se eksempel 18), undersøker overvæskene ved HPLC eller måler hemningen av trombin (15).

Følgende resultater oppnås:

15

|    | <u>Bakterieekstrakt</u>        | <u>Desulfatohirudin-dannelse</u> |
|----|--------------------------------|----------------------------------|
|    | E.coli HB101 pML310            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML311            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML312            | +                                |
| 20 | E.coli HB101 pML313            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML314            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML315            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML316            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML317            | +                                |
| 25 | E.coli HB101 pML318            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML319            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML320            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML321            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML322            | +                                |
| 30 | E.coli HB101 pML323            | +                                |
|    | E.coli HB101 pML324            | +                                |
|    | E.coli HB101 pHR148 (kontroll) | -                                |
|    | E.coli HB101 pBR322 (kontroll) | -                                |
|    | E.coli HB101 (kontroll)        | -                                |

35

Eksempel 19: Påvisning av hirudin-aktivitet

Ca. 5-10 µl av en probe som inneholder polypeptid med

hirudin-aktivitet (se eksempel 18) dryppes på 1 cm<sup>2</sup> nitrocellulosepapir (NZ) (Biorad) og tørkes i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter inkuberes nitrocellulosepapiret i en time ved 37°C i en oppløsning av 3% serumalbumin i 0,01 M tris·HCl (pH 8) og 0,9% NaCl.

Deretter vaskes nitrocellulosepapiret i en oppløsning av 0,01 M tris·HCl (pH 8) og 0,9% NaCl i 30 minutter. Under dette skiftes oppløsningen 5 ganger. Deretter behandles det vaskede nitrocellulosepapiret i 2 timer ved 25°C i en oppløsning av 3% serumalbumin i 0,01 M tris·HCl (pH 8) og 0,9% NaCl som inneholder 2 µg/ml antistoffer (fremstilt fra kaniner eller monoklonale antistoffer) mot hirudin. Deretter vaskes nitrocellulosepapiret som beskrevet ovenfor.

Deretter behandles nitrocellulosepapiret i 2-3 timer ved 25°C med en oppløsning av 3% serumalbumin i 0,01 M tris·HCl (pH 8) og 0,9% NaCl som inneholder 0,2 µCi/ml <sup>125</sup>I-protein A (sp. aktivitet 89,8 µCi/mg) (NEN). Deretter vaskes nitrocellulosepapiret igjen som beskrevet ovenfor, tørkes og den bundne radioaktiviteten bestemmes i en γ-teller ("Multi gamma, 1260 gamma counter", LKB, Wallace), dette er et mål for det på nitrocellulosepapiret tilstedeværende polypeptidet med hirudin-aktivitet.

Ved en alternativ fremgangsmåte underkastes proben ovenfor en SDS-polyakrylamidgel-elektroforese (PAGE) [se (24)]. PAGE-elektroferogrammet overføres ved elektro-blotting på nitrocellulosepapiret. Deretter behandles nitrocellulosepapiret som beskrevet ovenfor og/eller autoradiografes over natten sammen med en røntgenfilm (Fuji). Posisjoner på nitrocellulosepapiret som inneholder polypeptider med hirudin-aktivitet fremstår på filmen som svarte flekker.

Eksempel 20: Isolering og rensing av desulfatohirudin  
ved hjelp av en trombin-søyle

a. Fremstilling av polypeptidoppløsning for trombin-søylen

- 5 150 ml kulturbuljong (fremstilt ifølge eksempel 18) avkjøles til 4°C og cellene fraskilles ved sentrifugering (5000 opm, 150 minutter, "Sorvall RC 3B"). Den klare overvæskan inneholder ingen hirudin-aktivitet.
- 10 Deretter suspenderes cellene i 12 ml lysesbuffer (50 mM tris-HCl, pH 8, 30 mM NaCl). Denne blandingen tilsettes 15 mg lysozym (Boehringer) og oppbevares deretter 30 minutter ved 4°C. Deretter ødelegges cellene ved fire gangers nedfrysning i flytende nitrogen og deretter opptining ved
- 15 37°C. Deretter sentrifugeres de i 30 minutter ved 16.000 opm ved 4°C. Overvæskan inneholder hirudin-aktiviteten. I overvæskan (15 ml) oppløses deretter 7,7 g fast ammoniumsulfat. Den uklare blandingen får stå ved 4°C i 30 minutter og sentrifugeres deretter (se ovenfor). Det våte sedimentet oppløses i 1 ml 0,05 mM tris-HCl pH 8 buffer og man
- 20 oppnår den ønskede polypeptidoppløsningen.

b. Rensing av hirudin på en trombin-søyle.

- Trombin-søylen (sjikt volum 4 ml) bringes til likevekt med
- 25 0,05 M tris-HCl pH 8. 5 ml porsjoner av den ovenfor fremstilte polypeptid-oppløsningen påføres søylen ved 4°C med en strømningshastighet på 7 ml/time. Det vaskes deretter med 25 ml 0,05 M tris-HCl (pH 8). De første fraksjonene inneholder de ikke-adsorberte polypeptidene, hvilke kastes.
- 30 Deretter vaskes søylen med 10 ml 5 M benzamidin (Merck) [se (25)] i 0,05 M tris-HCl (pH 8) og de oppnådde fraksjonene undersøkes vedrørende hirudin-aktivitet ved hjelp av trombin-testen (15). De fraksjonene som inneholder polypeptidene bestemmes ved måling av OD<sub>280nm</sub>. Fraksjonene
- 35 25 og 26 inneholder hirudin-aktiviteten; de oppbevares ved -20°C, eller inntil viderebearbeidelse på isbad. Hirudin-aktiviteten utgjør i fraksjon 25 20 µg/ml og i fraksjon 26 52 µg/ml. Deretter dialyseres fraksjonene eller avsaltes over "Sephadex-G25" (Pharmacia).

SDS-polyakrylamidgel-elektroforese (24) av produktet gir en molekylvekt på 7000-8000 dalton eller heltallige multiplum av dette (oligomerer).

5 c. Fremstilling av trombin-søylen

"Affi-gel 10" (Bio Rad) vaskes ifølge fabrikantens angivelser med kaldt destillert vann og koplingsbuffer pH 8,5 (0,1 M  $\text{NaOCH}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -oppløsning). En 50% suspensjon av gelen i koplingsbufferen (4 ml) overføres i et plastrør, blandes med samme mengde trombin-oppløsning (120 mg i 4 ml koplingsbuffer) (Calbiochem) og roteres ved 4°C over natten. Deretter vaskes gelen med koplingsbuffer. Til blokkering av de fremdeles frie aktive posisjonene behandles gelen med 0,1 ml 1M etanolamin-HCl (pH 8,0) pr. gel i løpet av 3 timer ved 4°C, vaskes deretter med fosfatbufret saltoppløsning som inneholder 10 mM natriumazid pr. ml gel og holdes i denne ved 4°C. Koplingsgraden bestemmes ved måling av ekstinksjonen ved 280 nm og utgjør 15-30 mg hirudin pr. ml gel.

20 4 ml av den fremstilte trombin-gelen anvendes til å fremstille affinitetssøylen.

25 Eksempel 21: Transformasjon av forskjellige E. coli-stammer med plasmidet pML310 og dyrking av de transformerte vertscellene.

På tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 10d) transformeres stammene E. coli JA221, E. coli LM1035 og E. coli W3110Δ102 med plasmidet pML310. Transformerte kolonier undersøkes vedrørende tilstedeværelse av  $F_1$ - $F_2$ -DNA, som beskrevet i eksempel 10e). Det oppnås 5, 3 henholdsvis 30 5 positive kolonier som inneholder følgende betegnelser:

- E. coli JA221/pML310/1
- E. coli JA221/pML310/2
- 35 E. coli JA221/pML310/3
- E. coli JA221/pML310/4
- E. coli JA221/pML310/5
- E. coli LM 1035/pML310/1

- E. coli LM 1035/pML310/2  
 E. coli LM 1035/pML310/3  
 E. coli W3110Δ102/pML310/1  
 E. coli W3110Δ102/pML310/2  
 5 E. coli W3110Δ102/pML310/3  
 E. coli W3110Δ102/pML310/4  
 E. coli W3110Δ102/pML310/5

De nevnte klonenedyrkes i et modifisert M9-medium

- 10 som har følgende sammensetning:

|    |                                                     |          |
|----|-----------------------------------------------------|----------|
|    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 9,0 g    |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 3,0 g    |
|    | NaCl                                                | 0,5 g    |
|    | NH <sub>4</sub> Cl                                  | 3,5 g    |
| 15 | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0,015 g  |
|    | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,25 g   |
|    | Kasaminsyrer                                        | 7,0 g    |
|    | Gjærekstrakt                                        | 5,0 g    |
|    | Vitamin B <sub>1</sub>                              | 0,0099 g |
| 20 | Jern-III-citrat                                     | 0,006 g  |
|    | MOPS (3-morfolinopropan-1-sulfonsyre)               | 34,0 g   |
|    | Glukose                                             | 20,0 g   |
|    | "Ampicillin"                                        | 0,1 g    |

25

- Det dyrkes ved 37°C og 180 opm inntil bakteriesuspensjonen har nådd en optisk tetthet (OD<sub>623</sub>) på ca. 1. Deretter høster man cellene (5 ml av den voksende kulturen) og resuspenderer bakteriene i 0,5 ml av en oppløsning av 50 mM tris·HCl (pH 8) og 30 mM NaCl. Deretter innstilles suspensjonen på 1 mg/ml lysozym (Boehringer) og stilles på is i 30 minutter. Ved vekselvis nedbrytning av suspensjonen i flytende nitrogen og opptining ved 37°C ødelegges bakteriene. Denne prosedyren gjentas fem ganger. Deretter  
 35 sentrifugeres blandingen i 30 minutter ved 16000 opm ved 4°C.

Alle klonene undersøkes vedrørende dannelsen av polypeptider med hirudin-aktivitet ved at hemningen av trombin (15) måles. I alle bakterieekstraktene fastslås hirudin-aktivitet (300-600 ng/ml kulturoppløsning). Eksempelvis bestemmes følgende hirudin-aktiviteter:

| <u>Stamme</u>                 | <u>Hirudin-aktivitet<br/>(µg/l kulturoppløsning)</u> |
|-------------------------------|------------------------------------------------------|
| E. coli LM1035/pML310/1       | 300                                                  |
| E. coli JA221/pML310/1        | 500                                                  |
| 10 E. coli W3110Δ102/pML310/1 | 600                                                  |

Eksempel 22: Fermentering av den transformerte stammen  
E. coli W3110Δ102/pML310/1 i en 5000 l  
 15 fermenteringsbeholder og opparbeiding av  
kulturbuljongen.

På tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 21 dyrkes i en 5000 l fermenteringsbeholder E.coli W3110Δ102/pML310/1-celler i 3000 l modifisert M9-medium, inntil suspensjonen har nådd  
 20 en optisk tetthet (OD<sub>623</sub>) på 10-13.

Kulturbuljongen (pH 7,4) avkjøles til 10°C, og cellene behandles med en "Alfa-Laval BRPX-207"-avslemningsinnretning. Den klare overvæsken inneholder ingen hirudin-aktivitet og  
 25 kastes. Under avslemningen blir slamrommet stadig del av slammet med lyseringsbuffer A (50 mM tris·HCl, 30 mM NaCl, innstilt med HCl på pH 8,0) og tilslutt blir innholdet av sentrifugeskålen (7 l) utstøtt under full avslemning med lyseringsbufferen A. Den oppnådde cellemassen innstilles ved  
 30 hjelp av buffer A på et volum på 375 l og har en pH-verdi på 7,6. Etter avkjøling til 5-10°C føres suspensjonen gjennom en "Dyno-mølle" (Type KD5) som er utrustet med 4,2 l glassperler med et tverrsnitt på 0,5-0,75 mm. Derved ødelegges cellene. Den slik oppnådde suspensjonen innstilles med eddiksyre på et  
 35 eddiksyreinnhold på 2% (volum/volum) og omrøres over natten ved 10°C. Suspensjonen med en pH på 3,9 avslemmes ved den ovenfor omtalte teknikken. Den klare overvæsken på 300 l

oppkonsentreres på en innretning for fordampning i tynne sjikt (timesydelse 60 l vann) til 35 l. Det lett uklare konsentratet sentrifugeres og den klare overvæsken som oppstår diafiltreres på et ultrafiltreringsanlegg "DDS = Lab 35" som er utstyrt med "GR 81 PP"-membraner (flate 2,5 m<sup>2</sup>) mot 2% eddiksyre eller 0,02 M tris-HCl pH 7,5 buffer. Sluttvolumet utgjør 31 l.

En del av 2 l av denne klare proteinoppløsningen påføres på en "Sephadex G50F"-søyle (KS 370 Pharmacia) med et sjiktvolum på 96 l, hvor søylen er bragt i likevekt med 2% eddiksyre. Hovedfraksjonen som inneholdes i 15 l eluat samles ved hjelp av ultrafiltrering og diafiltreres deretter mot vann. Den slik fremstilte klare vandige oppløsningen lyofiliseres. Opparbeidelsen kan gjennomføres som beskrevet i de følgende eksemplene.

Eksempel 23: Dyrking av stammen E.coli W3110Δ102/pML310/1

Stammen E.coli W3110Δ102/pML310/1 inkuberes ved 37°C i 24 timer i en kolbe med risting på 200 opm. Mediet oppviser følgende sammensetning (g/l):

|    |                                                     |       |
|----|-----------------------------------------------------|-------|
|    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 9,0   |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 3,0   |
| 25 | NaCl                                                | 0,5   |
|    | CaCl <sub>2</sub>                                   | 0,015 |
|    | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,25  |
|    | Jern(III)citrat                                     | 0,006 |
|    | MOPS                                                | 40    |
| 30 | NH <sub>4</sub> Cl                                  | 3,5   |
|    | Kasaminosyrer                                       | 7,0   |
|    | Gjærekstrakt                                        | 5,0   |
|    | Cerelose (glukose)                                  | 5,0   |
|    | "Ampicillin"                                        | 20    |

Mediet har en pH-verdi på 6,54. Under dyrkingen oppnås

en optisk tetthet ( $OD_{605nm}$ ) på 14,9.

- Cellene (50 ml av den voksende kulturen) festes og resuspenderes i 5 ml av en oppløsning av 50 mM tris·HCl (pH 8,0) og 30 mM NaCl. Deretter ristes suspensjonen med 5 g avkjølte glassperler (diameter 0,5 mm), eller ved tilsats av lysozym (Boehringer), sluttkonsentrasjon 1 mg/ml, i 30-45 minutter i intervaller på en "Multi-Tube Vortexer" ved høy intensitet. Til 0,5 ml av blandingen tilsettes 0,5 ml 2% eddiksyre og blandingen sentrifugeres i 20 minutter ved 4°C og 12000 opm. Den overstående oppløsningen undersøkes vedrørende hirudin-aktivitet (hemning av trombin). Testen for trombin-hemning utføres på følgende måte:
- Testen bygger på bestemmelsen av den enzymatiske avspaltningen av p-nitroanilin fra substratet kromozym TH (tosylglysyl-prolyl-arginin-4-nitroanilid-acetat). Det dannede p-nitroanilinet måles kolorimetrisk ved 405 nm. Testen gjennomføres i mikrotiterplater med flat bunn (Costar, Serocluster). Reaksjonstiden utgjør 2 timer ved 37°C i dyrkningsskap. Til testen blandes 20 µl av oppløsningen som er fortynnet med 30 µl fyllbuffer (0,2 M tris·HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 100 µg/ml okseserumalbumin) med 20 µl enzym-oppløsning [10 mg lyofilisert trombin fra humanplasma (Boehringer) oppløst i 1 ml dobbeltdestillert vann og fortynnet i forhold ca. 1:400 med den ovenfor nevnte fyllbufferen] og 150 µl substratoppløsning [20 ng kromozym TH (Boehringer) oppløst i 4 ml dobbeltdestillert vann og fortynnes i forholdet 1:15 med den ovenfor nevnte fyllbufferen]. Alle oppløsningene måles mot en blind-oppløsning bestående av 70 µl fyllbuffer (se ovenfor) og 150 µl substrat-oppløsning og mot en enzym-kontrollopløsning bestående av 50 µl fyllbuffer, 20 µl enzym-oppløsning og 150 µl substrat-oppløsning.  $OD_{405nm}$ -verdien for enzym-kontrollopløsningen etter 2 timer ved 37°C viser 100% aktivitet og skulle utgjøre ca.  $0,8 \pm 0,2$ . Trombin-hemningen (i %) for probene kan beregnes etter formelen

$$\% \text{ trombin-hemning} = 100 - \frac{100 \times \text{OD}_{405\text{nm}} \text{ for proben}}{\text{OD}_{405\text{nm}} \text{ for enzym-kontrolløppløsningen}}$$

Oppløsningen ovenfor oppviser en trombin-hemning på 49,7%/

5 20 µl.

Eksempel 24: Rensefremgangsmåte til anrikning av hirudin-  
forbindelser fra kulturbuljonger

På tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 22 dyrkes

10 stammen E. coli W3110Δ102/pML310/1 i fermenteringsbeholderen.

Deretter utelukkes cellene, frasentrifugeres og den opp-

konsentrert overvæsken ultrafiltreres eller dialyseres

etter eddiksyrebehandling. Oppløsninger som er utvunnet

på denne måten kan f.eks. renses ved hjelp av ionebytter-

15 kromatografi.

a) Anionbytterkromatografi over en "MONO Q"-søyle (Pharmacia)  
til utvinning av fraksjoner som hemmer trombin.

8,5 ml proteinoppløsning (20 mM tris.HCl pH 7,5/150 mM

20 NaCl) tilføres på en "Mono Q"-søyle ved hjelp av et kroma-

tografisystem ("Fast protein liquid chromatography" FPLC)

og elueres ved følgende betingelser.

Eksperimentelle betingelser: Søyle: "Mono Q", 4,6 mm x

25 150 mm. Buffer A: 20 mM tris.HCl pH 7,5; Buffer B: 20 mM

tris.HCl/1 mM NaCl. Lineær saltgradient: A: I løpet av

9 ml elueres med 15% buffer B, i løpet av 10,7 ml økes

til 70% buffer B. AUFS 1,0 ved 280 nm, 1 ml fraksjoner.

30 I de utskilte volumene (fraksjonene 1-10) adskilles en

stor proteintopp fra de deretter eluerte hirudin-forbindel-

sene. Fraksjonene 17-23 viser i trombin-testen en trombin-

hemning mellom 20 og 100%, hovedfraksjonen (fraksjonene

20 og 21) har 92% hemning, eluert ved en konsentrasjon

35 på ca. 500 mM NaCl.

b) Anionbytterkromatografi på en "DEAE"-cellulose-søyle til anrikning av hirudin-forbindelser.

10 ml av et dialysat underkastes anionbytterkromatografi på "DE 53" (Whatman) ved pH 7,5 (kromatografibetingelser: søyle 1 x 5 cm (10 ml). Elueringsbuffer A: 20 mM ammonium-acetat, 100 mM NaCl, pH 7,5. Elueringsbuffer B: 20 mM ammoniumacetat, 1 M NaCl, pH 4,0. Lineær saltgradient i hvert tilfelle 4 søylevolum buffer A, henholdsvis B). Hirudin-forbindelsene elueres fra 0,4 M NaCl. Påvisningen kan foretas ved trombin-hemningstesten.

c) Avsaltying på P-6 DG "Desalting Gel" (Bio-Rad)

110 ml dialysat (20 mM tris-HCl, pH 7,5, konsentrert protein-oppløsning fra 2,6 l overvæske) ble adskilt på tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 24b) på "DE 53". Hirudin-forbindelsene elueres mellom fraksjonene 46 og 52 (150 ml), adskilles fra forskjellige, raskt eluerende ikke-aktive proteintopper, og konsentreres på en rotasjonsfordamper til ca. 12 ml. Den slik fremstilte, klare proteinoppløsningen tilføres på en "Biogel P-6 DG"-søyle og elueres vandig.

Eksperimentelle betingelser: Søyle 2,5 x 9 cm, stasjonær fase 45 ml "Biogel P-6 DG Desalting Gel", gjennomstrømningshastighet 1,15 ml/min., 4,6 ml fraksjoner. Saltinnholdet kan overvåkes ved ledningsevne målinger eller ved testing med sølvnitrat (AgCl-utfelling). Hovedaktiviteten elueres mellom fraksjonene 7 til 10, påvisningen utføres ved hjelp av trombin-hemningstesten. Fraksjonene 8-10 (13,5 ml) samles, oppkonsentreres til 1 ml på en rotasjonsfordamper og den klare oppløsningen påføres på en "Sephadex G50 fine"-søyle (Pharmacia) med et sjiktvolum på 160 ml, søylen er bragt til likevekt med 1% eddiksyre.

d) Gelfiltrering på "Sephadex G50 fine"

Eksperimentelle betingelser: Søyle: "Sephadex G50 fine" (31 g), 2,5 cm x 64 cm, volum: 310 ml; Oppløsningsmiddel:

1% eddiksyre; Gjennomstrømningshastighet 43 ml/time, 3,8 ml fraksjonsstørrelse. AUFS: 0,1 ved 282 nm. Papirbevegelse 3,0 cm/time. Påvisningen av den eluerte aktiviteten foregår ved hjelp av trombin-hemningstesten. Hoved-  
5 fraksjonen som inneholdes i 50 ml eluat (fraksjonene 39-52) elueres raskere enn ikke-aktive bikomponenter, (fraksjonene 53-80). Trombin-hemningen ved de aktive fraksjonene utgjør mellom 80 og 100% hemning.

10 e) Kationbytterkromatografi på en CM-cellulose til foranrikning av aktive lysater

10 ml dialysat [20 mM tris.HCl, konsentrat (1:20) fra 200 ml overvæske, pH 2,0 innstilt med 3 ml 4N HCl] ble adskilt på en kationbytter (CM-cellulose). Hirudinfor-  
15 bindelsene elueres i de utskilte volumene mellom fraksjonene 4-8. Påvisningen foregår ved hjelp av trombin-hemningstesten. Fraksjonene 5 og 6 hemmer henholdsvis til 89% og 88% pr. 20µl eluat.

20 Eksperimentelle betingelser: Søyle: 1,5 x 8 cm, stasjonær fase: 19 ml CM-cellulose (kvalitet MZ-3146). Gjennomstrømningshastighet: 43 ml/time, 3,8 ml fraksjoner. Lineær saltgradient buffer A: 20 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 2 innstilt med 4N HCl, Buffer B: 200 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH 6,5, hver gang fem  
25 søylevolum, AUFS 1,0 ved 282 nm.

Eksempel 25: Fermentering av den transformerte stammen E. coli W3110Δ102/pML310/1 og opparbeiding av kulturbuljongen

30 På tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 22 dyrkes i en fermenteringsinnretning E. coli W3110Δ102/pML310/1-celler i 8 l medium L i 5 timer, da har suspensjonen nådd en optisk tetthet (OD<sub>623</sub>) på ca. 5.

35 De cellene som sentrifugeres fra kulturbuljongen (pH 7,2) avkjøles til 10°C, og åpnes ved lysozymbehandling og ved gjentatt (4 ganger) vekslende nedfrysning i flytende

- nitrogen og opptining til 30°C. Den slik fremstilte suspensjonen (2,5 l) fortynnes med 1,5% eddiksyre (2,4 l) og omrøres i 30 minutter ved 4°C. De utfelte bakterielle proteinene og andre cellebestanddeler frasentrifugeres i 30 minutter ved 4°C ved 9000 opm. Den klare overvæsk
- 5 på 3,2 l oppkonsentreres i en rotasjonsfordamper til 320 ml. Konsentratet dialyseres over natten mot 20 mM tris·HCl pH 7,5 ved 4°C og det lett uklare dialysatet sentrifugeres flere ganger. Sluttvolumet utgjør 300 ml. Den klare pro-
- 10 teinoppløsningen (0,02 M tris·HCl, pH 7,0) tilføres til en diethylaminoethyl-cellulose-("DE53") (20 g)-søyle med et sjiktvolum på 20 ml, hvor søylen er bragt i likevekt med buffer A (buffer A: 20 mM ammoniumacetat/100 mM NaCl, pH 7,5). Først vaskes de med et søylevolum (45 ml) ved
- 15 konstant strømming (43 ml/time) og deretter elueres det med en lineær saltgradient med i hvert tilfelle fem søylevolum av buffer A, henholdsvis buffer B (Buffer B: 20 mM ammoniumacetat/4 M NaCl, pH 5,0). Hovedfraksjonen som
- 20 inneholdes i 100 ml eluat og som er aktiv ved trombin-hemmingstesten (fraksjonene 24-26) dialyseres over natten ved 4°C mot 20 mM tris·HCl, pH 7,5 og oppkonsentreres deretter på rotasjonsfordamper ved 35°C til et sluttvolum på 5 ml.
- 25 Den slik fremstilte klare, vandige oppløsningen tilsettes på en "Sephadex G-50 fine"-søyle med et sjiktvolum på 160 ml, hvor søylen (2,5 x 64 cm, Biorad) er bragt i likevekt med 5% eddiksyre. Den i 50 ml eluat (fraksjonene 5-7, strøm 50 ml/time, 25 min./fraksjon) inneholdte hoved-
- 30 aktiviteten oppkonsentreres på rotasjonsfordamper og underkastes deretter en "Reverse Phase" HPLC-adskillelse. En porsjon (500 µl) av de enkelte fraksjonene oppkonsentreres i forholdet 1:10 på en "speed vac"-konsentrator og undersøkes ved hjelp av "Reversed Phase"-HPLC-analyse vedrørende
- 35 innholdet av desulfatohirudin-forbindelser. Oppløsningene inneholder desulfatohirudin-forbindelser. Fraksjon 6 (18 ml) inneholder prosentue

nenter og renses videre ved hjelp av semipreparativ "Reversed Phase"-HPLC.

Eksperimentelle betingelser: "Vydac 218 TP 510 RP"-HPLC-søyle, 10 x 250 mm, like store andeler av fraksjon 6 (200 µl 1:1 konsentrert) pr. adskillelse; AUFS 0,5 ved 220 nm; gjennomstrømningshastighet: 2 ml/min.; Elueringsmiddel: A: 0,1% trifluoreddiksyre, B: acetonitril/vann 8:2 + 0,07% trifluoreddiksyre, 1 min. 16% B, deretter økes i løpet av 40 minutter til 64% B. Fraksjonene fremstilt på denne måten fortynnes i forholdet 1:1 med vann og lyofiliseres. Residuet består av rene sulfatohirudin-forbindelser.

15 Eksempel 26: Analyse av produktblandingen fra fermenteringen av E. coli W31110Δ102/pML310/1

De fraksjonene, fremstilt ifølge eksempel 25, som er aktive ved trombin-hemmingstesten underkastes en HPLC-analyse under to forskjellige betingelser.

20

a) Eksperimentelle betingelser nr. 1: Nukleosil (MN) C18, 5 µm RP-HPLC-søyle, 4,6 x 120 mm; 50 µl hirudin-forbindelser pr. adskillelse, Att. 6 ved 214 nm; gjennomstrømningshastighet 1,2 ml/min.; elueringsmiddel: A: 0,1% trifluoreddiksyre, B: acetonitril/vann 8:2 med 0,07% trifluoreddiksyre, 2 min. 16% B, deretter økes i løpet av 30 min. til 64% B. Mottrykk: 107 bar.

Med intervallet på 1 minutt tas det ut fraksjoner (totalt 30), disse underkastes trombin-hemmingstesten og antistofftesten (se eksempel 19). Fraksjonene 12-15 viser seg å være aktive. Videre bestemmes aminosyresammensetningen, N-terminalen og C-terminalen for den aktive hirudinforbindelsen fra fraksjon 14. Denne fraksjonen (nr. 14) sammenlignes videre med desulfatohirudin som er fremstilt analogt eksempel 28 ved omsetning av naturlig hirudin fra blodigle med enzymet arylsulfatase. Resultatene er sammen-

fattet i den følgende tabell 1:

Tabell 1

| 5  | Fraksjon              | Retensjonstid<br>(min.) | Trombin-<br>hemning (%) | Antistoff-<br>test Δ(cpm) |
|----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
|    | FR 12                 | 11,75                   | + 35                    | +                         |
|    | FR 13                 | 12,50                   | ++                      | +                         |
|    | Fr 14                 | 12,80                   | ++ 79                   | + 13850                   |
|    | FR 15                 | 13,14                   | + 27                    | + 12440                   |
| 10 | Kontroll              | -                       | - 9                     | - 250                     |
|    | Desulfato-<br>hirudin | 12,8                    | ++ 86                   | +                         |

Fraksjonen av kontrollstammen E. coli W3110Δ102 ("kontroll")  
 15 er hverken aktiv i trombin-hemningstesten eller i antistoff-  
 testen. Slike fraksjoner fremstilles ved kultivering av  
 den ikke-transformerte stammen E. coli W3110Δ102 under  
 de betingelsene som er beskrevet i eksempel 22, og ved  
 opparbeiding av kulturbuljongen ifølge eksempel 25.

20

b) Eksperimentelle betingelser nr. 2: RP-HPLC-søyle,  
 "Vydac 218 TP 5415" 4,6 x 150 mm; 100 μl (1:10 konsentrert)  
 fraksjon 6 (se eksempel 25) pr. adskillelse; AUFS 0,1 ved  
 214 nm; gjennomstrømningshastighet 1,2 ml/min.; eluerings-  
 25 middel: A: 0,1% trifluoreddiksyre, B: acetonitril/vann  
 8:2 + 0,07% trifluoreddiksyre. Gradient: 2 min. 16% B,  
 deretter økes i løpet av 3 min. til 20% B, deretter økes  
 i løpet av 15 min. til 25% B, deretter økes i løpet av  
 27 min. til 64% B. Mottrykk 160 bar.

30

I den følgende tabell 2 er de ved trombin-hemningstesten  
 og ved antistoff-testen aktive fraksjonene oppført.  
 Tabellen inneholder videre konsentrasjonene av NaCl i mM  
 som er påkrevet for eluering av fraksjonene fra en "Mono  
 35 Q"-søyle (anionbytterkromatografi) (se eksempel 24a), samt  
 de mest langbølgede UV-absorpsjonsbåndene for enkelte frak-  
 sjoner. Alle fraksjonene viser videre en positiv reaksjon

med anti-hirudin-antistoffer (se eksempel 30).

Tabell 2

| 5  | Fraksjon nr.               | Reten-<br>sjons-<br>tid<br>(min.)<br>RP-HPLC | Trombin-<br>hemning<br>% | Anti-<br>stoff-<br>test<br>$\Delta$ /cpm | FPLC | UV( $\lambda_{maks}$ )<br>mM NaCl | Utbytte<br>$\mu$ g |
|----|----------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|------|-----------------------------------|--------------------|
|    | 1                          | 15,63                                        | 97,8 2                   | 16'196                                   | 350  | 223s,274                          | 4                  |
| 10 | 2                          | 16,83                                        | 91,9 2                   | 14'157                                   | 390  | 275                               | 1,6                |
|    | 3                          | 18,43                                        | 79,9 2                   | 9'257                                    |      |                                   | 1                  |
|    | 4                          | 19,6                                         | 81,7 5                   | 11'877                                   | 420  |                                   | 1,5                |
|    | 5                          | 20,6                                         | 50,4 5                   | 7'647                                    | 460  |                                   | 1,5                |
|    | 6                          | 21,53                                        | 66,1 5                   | 9'584                                    | 500  | 273                               | 1,5                |
| 15 | Kontroll                   | -                                            | 0                        | 508                                      |      |                                   | -                  |
|    | PBS-<br>buffer             | -                                            | -                        | 66                                       |      |                                   | -                  |
|    | Desul-<br>fato-<br>hirudin | 15,45                                        | 97,3 2                   | 15'400                                   | 350  | 274                               | ca. 4              |

20

Eksempel 27: Karakterisering av desulfatohirudin-forbindelsene  
fra fermenteringen av stammen E. coli  
W3110 $\Delta$ 102/pML310/1

I. Hirudin-forbindelsen fra fraksjon 14 (se eksempel 26  
25 under eksperimentelle betingelser nr. 1, tabell 1) eller  
fraksjon 1 (se eksempel 25, eksperimentelle betingelser  
nr. 2, tabell 2) karakteriseres på følgende måte:

a) Bestemmelse av aminosyresammensetningen

30 Ca. 2,5  $\mu$ g hirudin-forbindelse hydrolyseres med 6N HCl  
ved 110°C i 24 timer og analyseres deretter etter Chang  
et al. (DABS-Cl-metoden) (31). Hydrolysatet oppviser  
følgende sammensetning.

| Aminosyre | Hydrolysat |      | Aminosyre | Hydrolysat |      |
|-----------|------------|------|-----------|------------|------|
| Asp       | 9,8        | (9)  | Ile       | 1,8        | (2)  |
| Thr       | 4,2        | (4)  | Leu       | 3,9        | (4)  |
| Ser       | 4,4        | (4)  | Tyr       | 1,5        | (2)  |
| 5 Glu     | 12,6       | (13) | Phe       | 1          | (1)  |
| Pro       | 3,7        | (3)  | His       | 1,1        | (1)  |
| Gly       | 9,3        | (9)  | Lys       | 3,4        | (3)  |
| Val       | 3,5        | (4)  | Met       | 0          | (0)  |
| Cystin    | 2,2        | (3)  | Totalt    |            | (65) |

10

b) Partiell sekvensanalyse

5 µg (750 pMol) av hirudin-forbindelsen underkastes en klassisk sekvensanalyse ifølge Edman og de N-terminale fenylthiohydantoin (PTH)-aminosyrene bestemmes ved hjelp

15 av RP-HPLC.

Resultat:

Syklus 1 5 10  
 20 Aminosyre Val Val Tyr Thr Asp i.b. Thr Glu Ser Gly

Syklus 11 15  
 Aminosyre Gln Asn Leu i.b. Leu i.b. Glu

25 (i.b. ikke bestemt)

Den N-terminale sekvensen av den undersøkte biosyntetiske hirudin-forbindelsen er følgelig identisk med den for naturlig hirudin (1).

30

c) Bestemmelse av de C-terminale aminosyrene ved hjelp karboksypeptidase Y-nedbrytning

Den tidsavhengige nedbrytningen av de C-terminale aminosyrene med karboksypeptidase Y gir som C-terminal

35

60

65

- Ile - Pro - Glu - Glu- Tyr- Leu- Gln

Bestemmelsen av aminosyrene er utført med aminosyre-analysatoren. Det viser seg at Tyr<sup>63</sup> ikke er sulfatert (desulfato-hirudin!).

- 5 Ved hovedproduktet for fermenteringen av den transformerte stammen E. coli W3110Δ102/pML310/1 dreier det seg, som strukturdata og sammenligning med den fra naturlig hirudin fremstilte desulfatohirudin viser, om desulfatohirudin.
- 10 II. Strukturen for de øvrige fermenteringsproduktene er ennå ikke fullstendig klarlagt. Ved fraksjonene 2-6 (se tabell 2) dreier det seg om definerte forbindelser som ved hjelp av HPLC- og FPLC-data, samt ved UV-absorpsjonsmaksimumet er tilstrekkelig definert. Med sikkerhet dreier
- 15 det ved disse forbindelsene om desulfatohirudin-lignende forbindelser, som skiller seg fra desulfatohirudin ved en strukturell mikroheterogenitet (f.eks. forskjellige sammenknyttede S-S-broer) eller ved modifikasjon ved N-henholdsvis C-terminalen (f.eks. N-terminal metionylrest
- 20 eller N-terminal acylert, som formylert eller actylert).

Også ved fermenteringen av stammene E. coli LM1035/pML310/1, E. coli JA221/pML301/1 og E. coli HB101/pML310 kan desulfatohirudin identifiseres som hovedprodukt.

25

Eksempel 28: Fremstilling av desulfatohirudin fra naturlig hirudin til sammenligningsformål

- Naturlig hirudin oppløses i konsentrasjon 2 mg/ml buffer (0,1 M ammoniumacetat, pH 5,5). Til 20 µg hirudin (10 µl
- 30 oppløsning) tilsettes 100 µl av en avsaltet arylsulfatase (Boehringer)-oppløsning som inneholder 16 µg arylsulfatase. Det inkuberes ved 25°C og omsetningen følges ved hjelp av HPLC-analyse. Etter 6 timers inkubering er mer enn
- 90% av hirudinet desulfatert. Retensjonstiden for det
- 35 dannede desulfatohirudinet utgjør ved de betingelsene som er beskrevet i eksempel 26 (eksperimentelle betingelser
- a) 12,8 minutter og under de betingelsene som er beskrevet

i eksempel 26 (eksperimentelle betingelser b) 15,45 minutter.

5 Aminosyresammensetningen, sekvensanalysen ifølge Edman-nedbrytning og bestemmelsen av de C-terminale aminosyrene ved karboksypeptidase Y-nedbrytning gir de for desulfatohirudin ventede resultatene.

10 Eksempel 29: Ekspresjon av desulfatohirudin-forbindelsene i gjær (S. cerevisiae)

Ekspresjonen av fremmedproteiner i gjær krever et definert ekspresjonssystem. En sterk gjærpromotor, fortrinnsvis en induserbar gjærpromotor, og egnede transkripsjonsstoppsignaler må inneholdes på en plasmidvektor hvorved  
15 gjærcellene kan transformeres. Vektoren inneholder også DNA-sekvenser, fortrinnsvis gjær 2 $\mu$  sekvenser, som sikrer ekstrakromosomal replikasjon med høyt kopiantall. Den må også inneholde en seleksjonsmerkeforbindelse for gjær, fortrinnsvis gjær LEU2-genet, og pBR322-DNA-sekvensen med  
20 replikasjonsutgangspunkt og seleksjonsmerke, fortrinnsvis for "Ampicillin"-resistensgenet for anvendelse i E. coli. Slike vektorer er egnet som såkalte "Shuttle"-vektorer for formering i E. coli og gjær.

25 Et ekspresjonssystem som oppfyller disse kravene er det som er beskrevet i europeisk patentpubl. nr. 100.561 og som er belagt med eksempler på effektiv ekspresjon i gjær. Fremmedgener uttrykkes under kontrollen av den induserbare PHO5-promotoren for den sure fosfatasen fra gjær.  
30 PHO5-promotoren, fremmedgen og PHO5-transkripsjons-stoppsignalet er integrert i serie i gjærvektoren pJDB207 som også inneholder DNA-sekvensen for gjær 2 $\mu$ -plasmidet, gjær-LEU2-genet, "Ampicillin"-resistensgenet og E. coli replikasjonsutgangspunktet.

35 Ekspresjonsplasmidet pJDB207R/PHO5-HIR fremstilles på følgende måte:

a) Isolering av pJDB207-vektorfragmentet:

6 µg av plasmidet pJDB207R/IF(α-3) (EP 100.561) nedbrytes fullstendig med restriksjonsendonukleasen BamHI. DNA-fragmentene som oppstår (6,85 kb og 1,15 kb) utfelles  
5 med etanol og opptas i 400 µl 50 mM tris·HCl pH 8,0.  
4,5 enheter kalvetarm-fosfatase (Boehringer) tilsettes. Blandingen inkuberes en time ved 37°C, deretter inaktiveres fosfatasen ved 65°C i 1,5 timer. Oppløsningen bringes til 150 mM NaCl og tilføres deretter på en "DE52" (Whatman)  
10 anionbyttersøyle (volum 100 µl), som på forhånd er bragt til likevekt med 10 mM tris·HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, og 1 mM EDTA. Etter vasking med den samme bufferen elueres DNA med 400 µl 1,5 M NaCl, 10 mM tris·HCl pH 7,5, 1 mM EDTA og utfelles med etanol. Det store 6,85 kb BamHI-  
15 fragmentet adskilles fra det mindre fragmentet på en 1,2% agarosegel i tris-borat-EDTA-buffer, pH 8,3.

b) Isolering av 534 bp PHO5-protomorfragmentet

6 µg av plasmidet p31/R (EP 100.561) nedbrytes med restriksjonsendonukleasene EcoRI og BamHI. De tre DNA-fragmentene  
20 som oppstår adskilles på en 1,2% agarosegel i tris-borat-EDTA-buffer, pH 8,3. 534 bp BamHI-EcoRI-fragmentet isoleres. Det inneholder PHO5-promotoren innbefattet transkripsjonsstartposisjonene.

25

c) Isolering av et 206 bp DNA-fragment med den for hirudin kodende sekvensen.

9 µg av plasmidet pML310 (se eksempel 13c) nedbrytes fullstendig med restriksjonsenzymene BamHI og EcoRI. De to  
30 DNA-fragmentene som oppstår adskilles på en 1,2% agarosegel i tris-borat-EDTA-buffer, pH 8,3. 206 bp EcoRI-BamHI-fragmentet isoleres.

d) Ligering av DNA-fragmentene

35 De tre i punkt a-c (se ovenfor) nevnte DNA-fragmentene utvinnes fra agarosegelstykkene ved elektroeluering, renses over "DE52" anionbytter, utfelles med etanol og resuspen-

deres i H<sub>2</sub>O.

0,1 pMol (0,45 µg) av 6,85 kb BamHI-vektorfragmentet, 0,3 pMol (0,1 µg) av 534 bp BamHI-EcoRI PHO5-promotorfragmentet og 0,25 pMol (34 ng) av 206 bp EcoRI-BamHI-fragmentet av pML310 liggeres i 15 µl 60 mM tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP med 600 enheter T4-DNA-ligase ved 15°C i 16 timer.

24 transformerte, amp<sup>R</sup>-kolonier adskilles i LB-medium kultivert med 100 µg/ml "Ampicillin". Plasmid-DNA isoleres ved fremgangsmåten ifølge Holmes et al. (32) og analyseres ved en HindIII/EcoRI dobbeltnekbrytning. Opptredenen av et ca. 600 bp stort EcoRI-HindIII-fragment viser at ved det aktuelle klonet foreligger PHO5-promotor-hirudin-DNA-fragmentet i den riktige orienteringen til transkripsjonsstoppsignalene på vektoren. Som ventet har ca. 50% av klonene den riktige orienteringen av innskuddet. En av disse klonene betegnes som pJDB207R/PHO5-HIR.

20

e) Transformerings av *Saccharomyces cerevisiae* GRF18:

*Saccharomyces cerevisiae*-stamme GRF18 (α, his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can<sup>R</sup>) transformeres med plasmidet pJDB207R/PHO5-HIR ved fremgangsmåten angitt av Hinnen et al. (12). For transformerte gjærceller seleksjoneres på agarplater med gjær-minimalmedium uten leucin. En transformert gjærkoloni isoleres og betegnes som *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR.

30 f) Dyrking av *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR:

Celler av *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR ristes i 20 ml gjær-minimalmedium ("Difco Yeast Nitrogen Base" uten aminosyrer med tilsats av 2% glukose og 20 mg/l L-histidin) ved 30°C og dyrket til en celletetthet på 3.10<sup>7</sup> celler/ml. Cellene vaskes i 0,9% NaCl og benyttes så til okulering av 50 ml kulturer i lav P<sub>1</sub>-minimalmedium. Lav P<sub>1</sub>-minimalmedium er sammensatt tilsvarende "Difco Yeast

Nitrogen Base"-mediet (uten aminosyrer), den inneholder likevel 0,03 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l KCl, 10 g/l L-asparagin istedenfor  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% glukose og 1 g/l L-histidin. Kulturen okuleres til en celletetthet på  $4 \cdot 10^6$  celler/ml

5 og ristes ved 30°C i 24 timer ved 200 opm.

g) Analyse av produktblandingen fra fermenteringen av  
S. cerevisiae GRF18/pJDB207R/PH05-HIR

Cellene (se eksempel 29f) oppsluttes på vanlig måte (se  
10 f.eks. europeisk patentpubl. nr. 100.561). Overvasken som er behandlet med 1,5% eddiksyre sentrifugeres og porsjoner på 2 ml av den klare oppløsningen konsentreres på "Speed Vac"-konsentratoren og tørkes i høyvakuum. Prøvene oppløses enkeltvis i 100 µl vann og underkastes en HPLC-  
15 analyse (betingelser som i eksempel 26a). Trombin-hemningen for de enkelte fraksjonene undersøkes. Fraksjonen med en retensjonstid på 12,8 minutter oppviser en trombin-hemning på 89,6%. Ifølge aminosyresammensetningen dreier det seg om desulfatohirudin.

20

Eksempel 30: Forsøksanordning med monoklonale anti-hirudin-  
antistoffer til bestemmelse av hirudin, kompe-  
titiv radio-immunoanalyse.

25 a. Fremstilling av de monoklonale anti-hirudin-antistoffene  
A) Immunisering av mus

Rent hirudin (3 mg) i lyofilisert form oppløses i litt 0,1% eddiksyre og tilsettes deretter fosfatbufret koksalt-oppløsning til et volum på 3 ml. pH reguleres til 7,2.

30 Porsjoner av denne antigen-oppløsningen blandes med like store mengder komplett Freund's adjuvans eller fosfatbufret saltoppløsning.

Hunnmus Balb/c (8 uker gamle, fra dyrefarmen Sisseln, Sveits)

35 injiseres intravenøst med 100 µg hirudin-oppløsning i bufret saltoppløsning. Fire dager senere fjernes milten for å benyttes ved sammensmeltingen.

**B) Fremstilling av hybridom og antistoff-test**

Fremstillingen av hybridomcellene foregår ved sammen-smeltning av de oppnådde miltcellene med myelom-cellelinjen X63-Ag8.6.5.3 (26). Det anvendes  $10^8$  miltceller og  $10^7$  myelomceller. Sammensmeltingen gjennomføres som beskrevet i (27).

Bestemmelse av anti-hirudin-aktiviteten i hybridom-overvæskene foregår ved hjelp av en radioimmunoanalyse [RIA, (28)].

**C) Isolering og rensing av anti-hirudin-antistoffene fra bukvæskene**

Balb/c-mus forbehandles intraperitonealt med 0,4 ml "Pristan" (Carl Roth). Etter en uke injiseres 2 til  $5 \times 10^6$  klonede hybridomceller intraperitonealt. Bukvæske tas flere ganger fra hver mus og nedfryses til  $-80^\circ\text{C}$ . Den samlede væsken opptines og sentrifugeres i 30 minutter ved  $4^\circ\text{C}$  med 16.000 opm. Fettet suges av og den gjenværende overvæsken som er fri for nedbrutt materiale, blir under omrøring ved  $0^\circ\text{C}$  langsomt og dråpevis tilsatt 0,9 volumekvivalenter av en mettet ammoniumsulfatoppløsning. De oppnådde rå immunoglobulin-fraksjonene blir under anvendelse av 0,1 mM tris·HCl (pH 8,2) ført gjennom "Sephacryl G 2000" (Pharmacia) ifølge fabrikan-tens anvisninger. Aktive fraksjoner samles og konsentreres med et "Amicon XM50"-filter (Amicon).

**b. Forsøksanordning for kompetitiv radio-immunoanalyse**

En oppløsning av anti-hirudin-antistoffer fremstilt ifølge eksempel 30aC) fortynnes med fosfatbufret saltoppløsning (PBS-oppløsning) til en konsentrasjon på  $1 \mu\text{g}$  pr.  $100 \mu\text{l}$ .  $100 \mu\text{l}$  av denne oppløsningen inkuberes 2 timer ved  $37^\circ\text{C}$  i plastrør eller på plast-mikrotiterplater, hvorved anti-stoffer adsorberes uspesifikt på plastoverflaten. Til metning av de fremdeles frie aktive posisjonene på plast-overflaten etterbehandles det med en bovinserum-albumin-

oppløsning (BSA-oppløsning).

Fortynningsrekker av en prøveoppløsning eller standard-oppløsningen i BSA-oppløsning blandes enkeltvis med 50 µl  
5 av en oppløsning av hirudin som på kjent måte (29) er radioaktivt merket med  $^{125}$ Jod av aktivitet 10.000 cpm pr. 50 µl, og inkuberes deretter på plastoverflaten i 2 timer ved 37°C og deretter i 12 timer ved 4°C. Rørene eller mikrotiterplatene vaskes med fosfatbufret saltoppløsning  
10 og radioaktiviteten måles. Konsentrasjonen av hirudin i prøveoppløsningen bestemmes ved hjelp av en kalibreringskurve som er konstruert ved hjelp av standardoppløsninger.

En forsøksanordning for den omtalte radio-immunoanalysen  
15 inneholder:

2 ml oppløsning av anti-hirudin-antistoffer fra eksempel 30aC) med en konsentrasjon på 1-10 mg pr. mol,  
100 ml fosfatbufret saltoppløsning (PBS-oppløsning),  
100 ml 0,3% bovinserum-albumin og 0,1% natriumazid i PBS-  
20 oppløsning (BSA-oppløsning),  
2 ml oppløsning av radioaktivt hirudin med aktivitet 200.000 cpm/ml,  
2 ml standardoppløsning som inneholder 100 ng/ml hirudin,  
1 ml rør eller mikrotiterplater av plast.

25  
Eksempel 31: Farmasøytisk preparat som inneholder en desulfato-hirudin-forbindelse for parenteral anvendelse

En oppløsning som inneholder en desulfatohirudin-forbindelse ifølge eksempel 27, dialyseres mot en 0,9% NaCl-oppløsning.  
30 Konsentrasjonen av oppløsningen innstilles deretter ved fortynning med den samme NaCl-oppløsningen til 0,2 mg/ml eller 2 mg/ml. Disse oppløsningene steriliseres ved ultrafiltrering (membraner med 0,22 µm porer).

35 De steriliserte oppløsningene kan anvendes direkte, f.eks. for intravenøs administrering. På tilsvarende måte fremstilles oppløsninger for parenteral anvendelse som innehol-

der blandinger av desulfatohirudin-forbindelser ifølge  
eksempel 27.

5

10

15

20

25

30

35

Litteraturreferanser

1. J. Dodt et al., FEBS Letters 165, 180 (1984)
2. P. Walsmann et al., Pharmazie 36, 653 (1981)
3. S.A. Narang, Tetrahedron 39, 3 (1983)
- 5 4. K.L. Agarwal et al., Angew. Chem. 84, 489 (1972)
5. C.B. Reese, Tetrahedron 34, 3143 (1972)
6. R.L. Letsinger og W.B. Lunsford, J. Am. Chem. Soc. 98, 3655 (1976)
7. K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 103, 706 (1981)
- 10 8. H.G. Khorana et al., J. Biol. Chem. 251, 565 (1976)
9. S.A. Narang et al., Anal. Biochem. 121, 356 (1982)
10. K. Itakura et al., J. Biol. Chem. 257, 9226 (1982)
11. A.M. Maxam og W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977); se også Meth. Enzym. 65, 499 (1980)
- 15 12. A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)
13. Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. 81, 741 (1961)
14. M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970)
15. H.U. Bergmeyer (Hrsgb.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. II, 3. opplag, s. 314-316, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
- 20 16. F. Markwardt et al., Thromb. Haemostasis 47, 226 (1982)
17. Köhler og Milstein, Nature 256, 495 (1975).
18. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (utg. T. Maniatis et al.), Cold Spring Harbor Lab., 1982, s. 125
- 25 19. W. Müller et al., J. Mol. Biol. 124, 343 (1978)
20. M. Grunstein og D.S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. Ish-Horowitz, in loc. cit. 18), s. 368
- 30 22. DE-OS 3.111.405 (Genentech)
23. A.C. Peacock et al., Biochemistry 6, 1818 (1967)
24. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
25. P. Walsmann, Pharmazie 36, 860 (1981)
26. J.F. Kearney et al., J. Immunol. 123, 1548 (1979)
- 35 27. S. Alkan et al., Mol. Immunol. 20, 203 (1983)
28. T. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1978

29. A.E. Bolton og W.M. Hunter, Biochem. J. 133, 529 (1973)
30. J. Clarke og J. Carbon, J. Mol. Biol. 120, 517 (1978)
31. J.Y. Chang et al., Methods in Enzymology, 91, 41 (1983)
32. D.S. Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981)

5

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

DNA-vektor for ekspresjon av desulfatohirudin i gjær eller  
5 E.coli, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en DNA-sekvens som koder for desulfatohirudin med formelen

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

15 som kontrolleres av en gjær- hhv. E.coli-ekspresjonskontrollsekvens, slik at desulfatohirudin uttrykkes i en med denne ekspresjonsvektoren transformert gjær- hhv. E.coli-stamme.

2.

20 Ekspresjonsvektor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at ekspresjonskontrollsekvensen er den for E.coli-tryptofanoperonet.

3.

25 Ekspresjonsvektor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at ekspresjonskontrollsekvensen er den for gjær-PHO5-genet.

4.

30 Fremgangsmåte for fremstilling av desulfatohirudin og salter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at man transformerer gjær- eller E.coli-celler med en vektor ifølge krav 1 for ekspresjon av desulfatohirudin, de resulterende transformerte gjær- eller E.coli-cellene dyrkes i et flytende  
35 næringsmedium som inneholder assimilerbare karbon- og nitrogenkilder og desulfatohirudin isoleres og, om ønsket, overføres et oppnådd salt til fritt desulfatohirudin eller

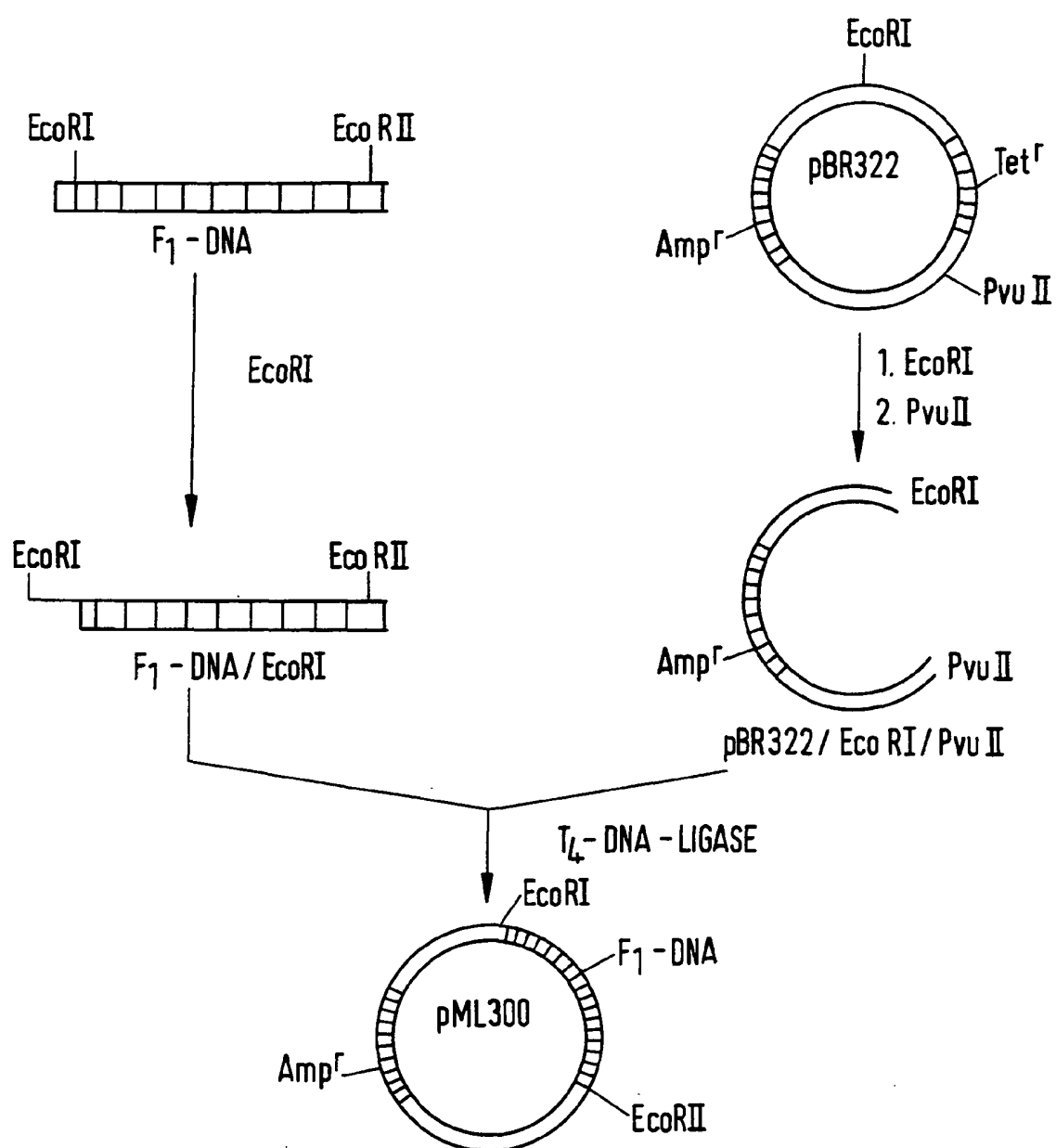
***Fig. 1***KONSTRUKSJON AV PLASMIDET pML300

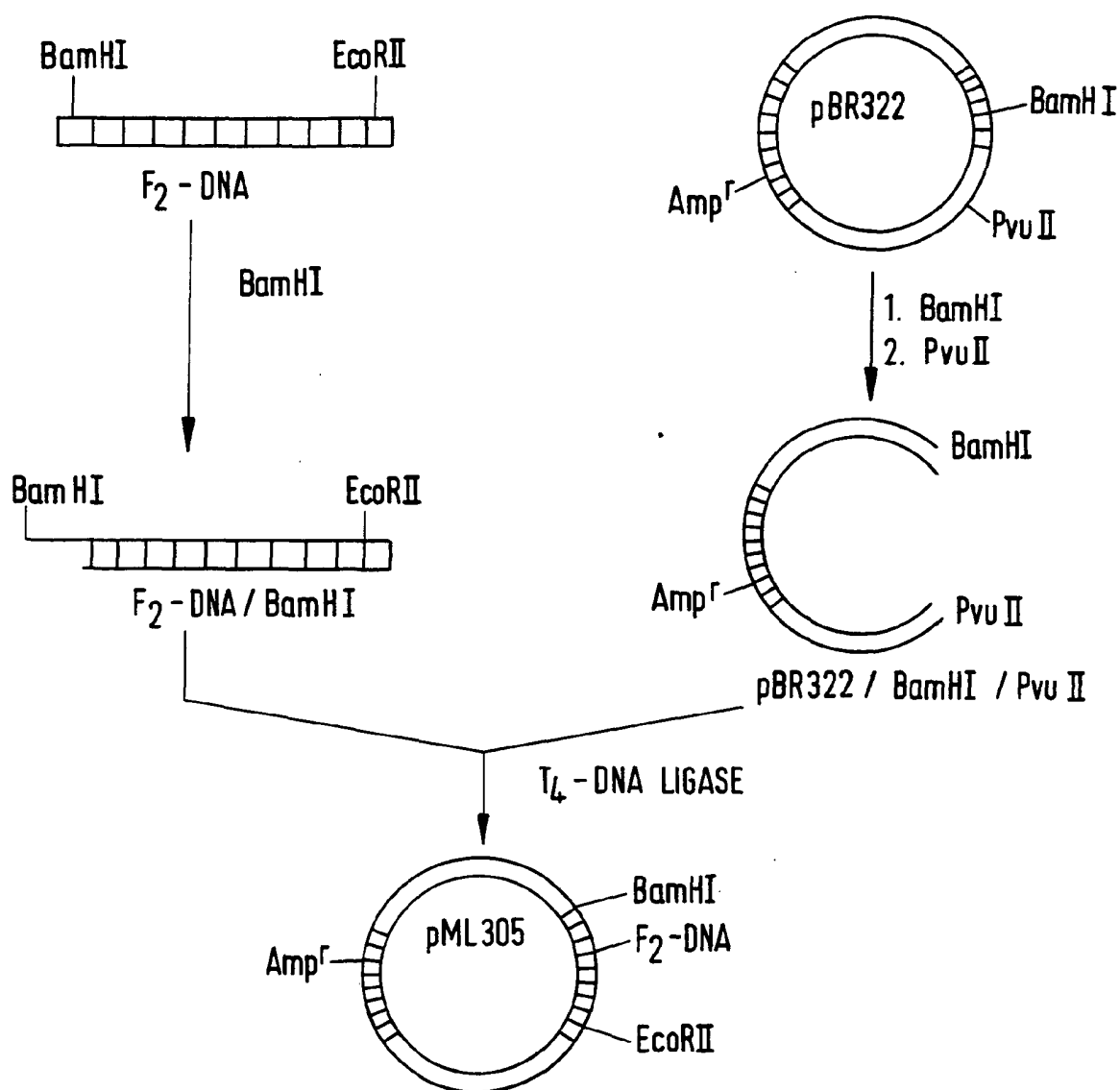
***Fig. 2***Konstruksjon av plasmidet pML305

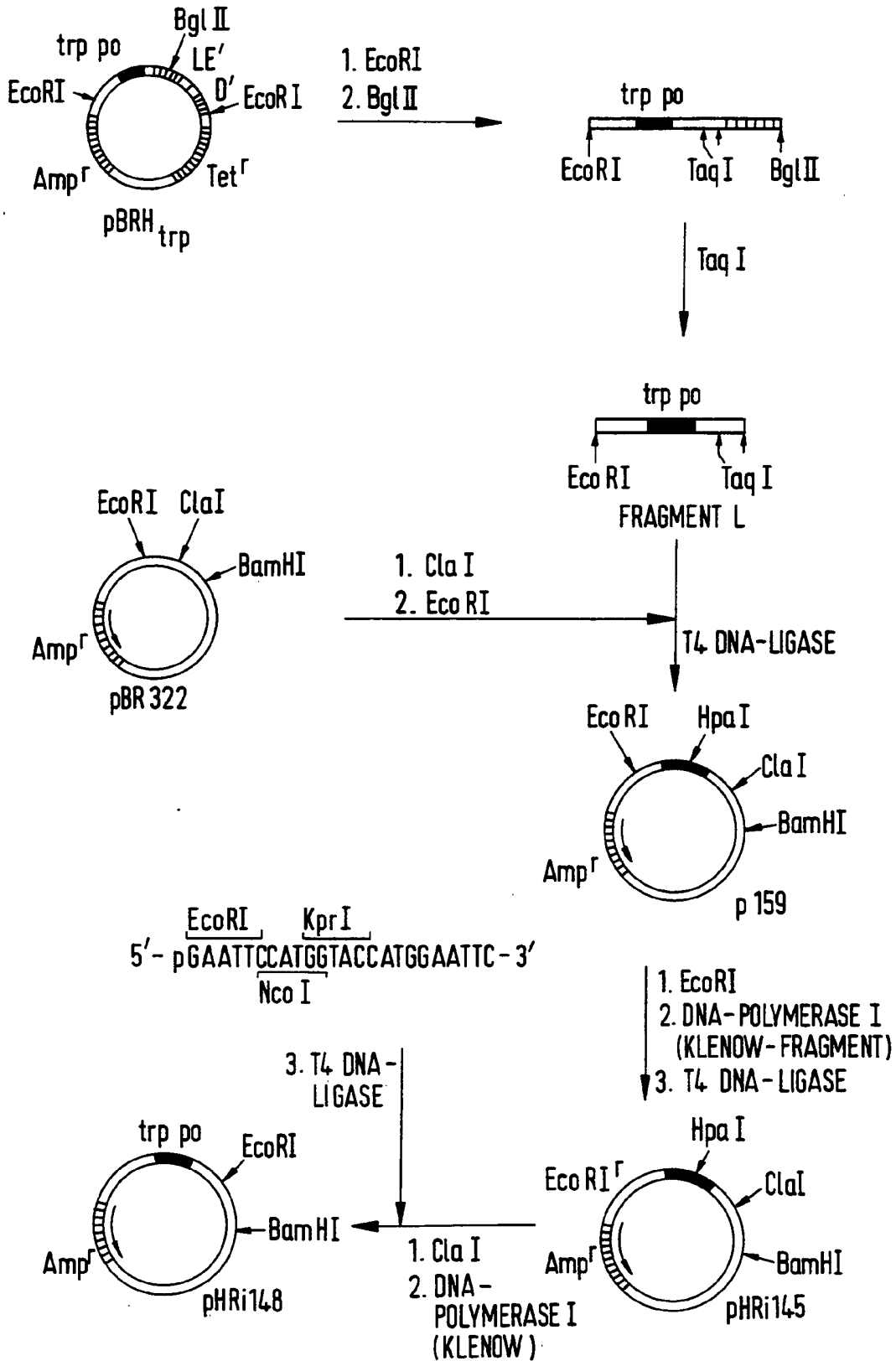
**Fig. 3**Konstruksjon av plasmidet pHRi148

**Fig. 4**

Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pML310

