

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 830774 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **830774**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/00
C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.03.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **08.03.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.09.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

08.03.1982 US 355,297 01.11.1982 US 438,236

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hitzeman, Ronald Arthur, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Leung, David Wai-Hung, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Heterologisen proteiinin ilmentäminen, käsittely ja erityis hiivan avulla.

Expression, behandling och sekretion av ett heterologiskt protein med jäst.

Heterologisen proteiinin ilmentäminen, käsittely ja erityys hiivan avulla

5 Tämä keksintö koskee yleisesti yhdistelmä-DNA-
tekniikkaa, jossa käytetään hyväksi hiivaisäntäsysteme-
jä ja ilmentymisväliaineita, jotka ilmentävät, käsitte-
levät ja erittävät heterologista proteiinia erillisenä
tuotteena, johon ei liity epätoivottavaa esijaksoa tai
muuta ilmentymistuotetta.

10 Löytö, johon tämä keksintö perustuu, on ensim-
mäinen kerta, jolloin proteiinia, joka on normaalisti
vieras hiivaisännälle on eristettävissä käyttökelpoisia
määriä väliaineesta, jossa hiivaviljelmä kasvaa, hiivan
ilmentämänä, käsittelmänä ja erittämänä tavalla, joka
15 jäljittelee sen tuotantoa luonnollisessa solu ympäristös-
sä. Tämä keksintö on siten tulosta ilmentämisväliainei-
den ja hiivaisännän onnistuneesta käsittelystä siten,
että saadaan syntymään proteiinia, jota hiivaisäntä
ei normaalisti tuota, ja, mikä on merkillepantavaa,
20 voidaan säädellä hiivaisäntää siten, että proteiini saa-
daan sen erityisreittien ohjaamaksi. Siten tämä keksintö
koskee keinoja ja menetelmiä käyttökelpoisten määrien
heterologista proteiinia saamiseksi hiivaviljelmän vä-
liaineesta, joka sisältää toimintakykyisiä soluja, jot-
25 ka sisältävät proteiinia koodittavaa DNA:ta. Erittäin
edullista on se, että keksinnön mukaisesti pystytään
saamaan käyttökelpoinen, erillinen proteiinituote solu-
viljelmän väliaineesta, mikä tekee mahdolliseksi jättää
pois solujen rikkomisen tuotteen eristämiseksi; tähän
30 mennessä on tuote ollut saatavissa vain solun sisällöstä,
usein ei-valmiina.

Julkaisut ja muu materiaali, johon tässä viita-
taan keksinnön taustan ja erityistapauksissa sen käy-
tännön toteuttamisen lisäyksityiskohtien valaisemiseksi,
35 on liitetty tähän hakemukseen, ja ne annetaan mukavuuden
vuoksi numeroituna ja koottuina liitteenä olevaan kirjal-

lisuusluetteloon.

Hiivaorganismit kuljettavat luonnostaan pientä lukumäärää homologisia proteiineja plasmakalvoon ja joskus sen läpi, mikä on välttämätöntä solun pinnan kasvun ja solun aineenvaihdunnan edistämiseksi. Solun silmikoidessa, mikä on esivaiheena tytärsolun muodostumisessa, tarvitaan lisäproteiineja soluseinän ja plasmakalvon muodostamiseen samoin kuin aineenvaihduntaan. Joidenkin näistä proteiineista täytyy löytää tiensä toimintakohtaansa; siten uskotaan, että erittymistie on olemassa (1). Jotkut yllä mainittuihin prosesseihin osallistuvat homologiset proteiinit muodostuvat translaation kautta plasman sisäisessä tumaverkossa. Homologisia proteiineja ovat hiivalajin normaalisti tuottamat ja sen toimintakyvyn kannalta välttämättömät proteiinit. Muodostuttuaan ne siirtyvät entsymaattisen siirron kautta Golgin laitteeseen, sitten rakkuloiden sisällä plasmakalvoihin, joihin jotkut liittyvät tai jossakin määrin tunkeutuvat plasmakalvon ja soluseinän väliseen tilaan. Jotkut harvat homologiset proteiinit näyttävät kulkeutuvan kokonaan soluseinän läpi, kuten α -tekijä ja tappajatoksiini (2,3).

Silmualue näyttää jälleen olevan rakkuloiden suuntautumiskohtana, ja sulautuessaan silmun sisäpintaan ne edistävät plasmakalvon kokonaiskasvua ja otaksuttavasti soluseinän kasvua (4, 5, 6). Tämä teoria ei tarjoa mitään näyttöä siitä, että proteiini (e)n erittymistä tai siirtymistä kalvon läpi todella tapahtuu. Samoin on vielä epävarmaa, voiko proteiinin glykolyysi edistää niin kutsuttua erittymisprosessia tai liittyä siihen. Lisäksi määritelmän mukaan "erittyneissä" proteiineissa uskotaan olevan signaaliesipeptidi, jonka otaksutaan liittyvän kuljetukseen tai kalvon pintaan kinnittymiseen. Tällaisten valmiin proteiinin muunnosten merkitys, jos sitä on, eritystapahtumalle ja eritysreitin kokonaisrooli pinnan kasvussa ovat olettamuksia,

jotka eivät perustu lujiin todisteisiin.

Odotettiin, että yhdistelmä-DNA-tekniikka tarjoaisi arvokasta apua etsittäessä vastausta hiivaorganismien erityystapahtumaa koskeviin avoimiin kysymyksiin ja, kun se osoittautui todistettavasti käyttökelpoiseksi saamaan nämä ja muut organismit tuottamaan suuria määriä heterologisia polypeptidituotteita endogeenisesti (katso 7 - 17), käsiteltäessä hiivaisäntää siten, että se saatiin ohjaamaan heterologisen proteiinin erittymistä erillisenä ja valmiina.

Tämä keksintö perustuu siihen havaintoon, että hiivaorganismi voidaan saattaa ilmentämään, tuottamaan ja erittämään proteiinia, joka on sille normaalisti heterologinen, ja jota se ei tarvitse toimintakykynsä kannalta, siten että proteiini voidaan eristää väliaineesta, jossa elävät, tuottavat hiivasolut kasvavat, erillisessä muodossa, johon ei liity epätoivottavaa polypeptidiesijaksoa tai muuta ilmentymistuotetta. Elävässä viljelmässä oleviin soveltuviin hiivasoluihin siirretään ilmentämisvektoreita, jotka sisältävät heterogista proteiinia ja heterologista signaalipolypeptidiä koodittavaa DNA:ta. Kun proteiini yhdessä heterologisen signaalipolypeptidin kanssa on ilmentynyt, muodostuu ilmentymistuote ja valmis heterologinen proteiini siirtyy soluviljelmän väliaineeseen. Tuote on suhteellisen helppo poistaa väliaineesta tarvitsematta haitallisesti häiritä eläviä hiivasoluja, ja se saadaan eristettyä muuten alkuperäisessä muodossa käyttöä varten tarvitsematta poistaa epätoivottavaa esijaksoa tai muita ilmentymistuotteita (esimerkiksi metiotiiniä, joka on kiinnittynyt muuten ensimmäiseen N-pääteaminohappoon, joka on AUG-translaation alkamissignaalikodonin ilmentymä). Väliaine voidaan siten saada muodossa, joka on suurinpiirtein vapaa elävistä tai vahingoittuneista (rikotuisista tai muuten rikkoutuneista) soluista, ja joka on sisältäessään haluttua tuotetta helpompi puhdistaa. Tuote

on puhdistuksen jälkeen valmis käyttötarkoitukseensa. Esimerkiksi ihmisen leukosyytti-interferonia voidaan käyttää ihmisessä virusten vastaisena ja/tai kasvainten vastaisena aineena (katso 7 - 17).

5 Lyhyesti ilmaistuna keksintö koskee proteiinia, joka on normaalisti heterologinen hiivaorganismille ja jota se ei tarvitse elääkseen, erillisessä muodossa, johon ei liity polypeptidiesijaksoa tai muuta ilmentymistuotetta, ja joka syntyy hiivan ilmentämis-, käsittely- ja eritystoiminnan tuotteena, samoin kuin keinoja
10 ja menetelmiä tällaisen proteiinin tuottamiseksi. Lisäksi tämä keksintö koskee hiivaviljelmiä, jotka pystyvät tuottamaan tällaista proteiinia, sekä tuloksena olevaa hiivaviljelmän väliainetta, joka sisältää tällaista
15 tuotteena olevaa proteiinia.

Ilmaus "heterologinen proteiini" tarkoittaa tässä käytettynä proteiinia, jota hiivaorganismi ei normaalisti tuota eikä tarvitse elääkseen, Tähän ilmaukseen sisältyy tällaista proteiinia koodittavan DNA:n
20 funktionaalinen sijoittaminen yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttäen ilmentämisvektoriin, jota puolestaan käytetään hiivaorganismi-isännän transformaatiossa. DNA:n funktionaalinen sijoittaminen käsittää heterologista proteiinia ja esijaksoa koodittavan DNA:n sijoittamisen ilmentämisvektoriin ilmentämistä ohjaavien promoottorisysteemien
25 valvonnassa. Esimerkkejä tällaisista heterologisista proteiineista ovat hormonit, esimerkiksi ihmisen kasvuhormoni, naudan kasvuhormoni, jne.; lymfokiinit; entsyymit, interferonit, esimerkiksi ihmisen sidekudos-, immuuni- ja leukosyytti-interferonit ja hybridileukosyytti-interferonit, jne.; virusantigeenit tai immunogeenit,
30 esimerkiksi suu- ja sorkkatauti -antigeenit, influenssa-antigeeniproteiini, hepatiitin ydin- ja pinta-antigeenit, jne.; ja monet muut polypeptidit, esimerkiksi ihmisen seerumialbumiini, ihmisen insuliini, erilaiset glykoproteiinit, jne. "Heterologinen esijakso" tai

"heterologinen signaalipolypeptidi" tarkoittaa polypeptidejä, joita hiivasysteemi ei normaalisti tuota tai käytä hyväkseen, ja ne voivat olla kyseessä olevan heterologisen proteiinin alkuperäisiä signaalipolypeptidejä tai muita heterologisia (signaali)polypeptidejä, jotka ovat funktionaalisesti sitoutuneita kyseessä olevaan heterologiseen proteiiniin.

"Erityksellä" tarkoitetaan tässä tuotteen kuljettamista hiivaorganismin plasmakalvon läpi ja ainakin soluseinämään tai sen läpi väliaineeseen, joka toimii soluviljelmän kantajana. Tässä yhteydessä on ymmärrettävä, että joissakin tapauksissa "erittynyt" tuote liittyy jollakin tavalla soluseinämään, jolloin ehkä on välttämätöntä tehdä puhdistus eri tavalla tai muuntaa hiivaisännän rakennetta ja toimintaa. "Käsittely" tarkoittaa solussa tapahtuvaa signaalipolypeptidin irrottamista valmiista proteiinista, jolloin syntyy proteiini, johon ei liity ulkopuolista peptidiä, ja joka on (niin kutsutussa erillisessä) valmiissa muodossa. Ulkopuolisiin peptideihin kuuluvat peptidi-ilmentymistuotteet, kuten metiotiini, kuten edellä mainittiin. Käsittely tekee mahdolliseksi signaalipolypeptidin seurauksia aiheuttamattoman irrottamisen kohdasta, joka ei ole inaktivoivasti lähellä signaalipolypeptidin ja valmiin proteiinin tarkkaa liittymiskohtaa.

Kuvassa 1 verrataan ihmisen IFN- α 1:n (pre D), IFN- α 2:n (pre A), IFN- α 1,2:n (pre D/A), IFN- γ :n (pre γ) ja IFN- β :n (pre β) signaaliesipeptidin aminohappojärjestystä. Alleviivatut aminohapot ovat erilaisia pre A:n ja pre D:n aminohappojaksoissa. Kohta DdeI on D- ja A-esijaksojen yhtymäkohta valmistettaessa hybridi-pre D/A -esijaksoa.

Kuva 2 on kaavakuva hiivan ilmentämisplasmidista YEpIPT, jota käytetään tässä yleisenä välineenä erilaisen geenisiirrännäisten ilmentämiseen; kuvassa näkyy muutamia plasmidin restriktiokohtia ja erilaisia mielen-

kiintoisia alueita.

Kuva 3 esittää EcoRI-jakson, joka sisältää pre-plus -IFN- α 1-geenin IFN- α 1:n ilmentämiseksi suoraan hiivassa, rakennetta.

5 Kuva 4 esittää EcoRI-jakson, joka sisältää valmiin IFN- α 2-geenin sen ilmentämiseksi suoraan hiivassa, rakennetta.

10 Kuva 5 esittää EcoRI-jakson, joka sisältää pre-plus -IFN- α 2-geenin, jossa 14 ensimmäisen aminohapon kooditusjakso on pre-IFN- α 1:n esijaksossa, IFN- α 2:n ilmentämiseksi suoraan hiivassa, rakennetta.

15 Kuva 6 esittää EcoRI-jakson, joka sisältää pre-plus -IFN- γ -geenin, jossa on 70 bp:n säätelyjakso, joka edeltää initiaatio -ATG-kodonia, IFN- γ :n ilmentämiseksi hiivassa.

Kuva 7 esittää EcoRI-jakson, joka sisältää pre-plus -IFN- γ -geenin IFN- γ :n ilmentämiseksi suoraan hiivassa, rakennetta.

20 Kuva 8 on yhteenveto kaikista rakenteista, joita käytetään keksinnön mukaisesti ilmentämään erilaisia IFN-geenejä ja käsiteltäessä ja eritettäessä ilmentämis- tuotteita hiivoissa.

25 Kuva 9 on a) YEplPT-LeIFAl/pep4-3:n ja b) YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3:n kasvukäyrä mitattuna $A_{660\text{nm}}$ -arvona. Väliaineen interferoniaktiivisuus a):n ja b):n ollessa kyseessä mitattiin biologisella menetelmällä. Aika on kasvatuksen kesto tunteina 30°C:ssa.

30 Kuva 10A on YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3:n 5l:n fermentointierän kasvukäyrä. (o) on $A_{660\text{nm}}$ -arvo ja (o) solujen sisäinen interferoniaktiivisuus (mljoonaa yksikköä/litra).

Kuva 10B on sama kasvukäyrä kuin 10A:ssa, mutta siinä esitetään väliaineen aktiivisuus.

35 Kuva 11 on pre-D/A-LeIF:n eluoitumiskäyrä monoklonaalista vasta-ainetta sisältävästä pylvästä.

Kuva 12 on monoklonaalista vasta-ainetta sisältävästä kolonnista saadun interferonipiikin A HPLC-käyrä.

5 Kuva 13 on HPLC-puhdistuksen jälkeen saadun tuotteen aminohappojärjestyksen määrittystulos.

Kuva 14 esittää erilaisia rakenteita, joita käytettiin tuottamaan ihmisen kasvuhormonia (HGH) keksinnön mukaisesti.

10 Kuva A esittää kaavamaisesti vektorin pBl 3,1 kbp:n HindIII-siirrännäisen, josta PGK-promoottori on erotettu, restriktiokaaviota. Kuvassa näkyy EcoRI-kohdan ja XbaI-kohdan sijoitus PGK-geenin 5'-sivun DNA:ssa.

15 Kuva B esittää 5'-sivujaksoa ja PGK-geenin kooditusjakson alkuosaa ennen XbaI- ja EcoRI-kohtien sijoittamista.

20 Kuva C esittää kaavamaisesti tekniikkaa, jota käytetään sijoitettaessa XbaI-kohta asemaan -8 PGK-promoottorissa ja eristettäessä 39 bp:n jakso PGK:n 5'-sivuketjusta, joka jakso sisälsi tämän XbaI-pään ja Sau3A-pään.

Kuva D esittää kaavamaisesti 300 bp:n fragmentin, joka sisältää yllä mainitun 39 bp:n fragmentin lisäksi PGK:n 5'-sivujakson (265 bp) PvuI:ta Sau3A:een (katso kuva A) ja EcoRI-kohdan XbaI:n vieressä.

25 Kuva E esittää kaavamaisesti 1500 bp:n PGK-promoottorifragmentin (HindIII/EcoRI), joka sisältää kuvan 4 mukaisen fragmentin lisäksi 1300 bp:n fragmentin HindIII:sta PvuI:een, joka kuuluu PGK:n 5'-sivujaksoon (katso kuva A).

30 Kaikki DNA:n restriktio- ja aineenvaihduntaentsyymit ostettiin yhtiöiltä New England Biolabs ja Bethesda Research Laboratories. DNA:n restriktioentsyymiä ja aineenvaihduntaentsyymejä käytettiin valmistajien suosittelemissa olosuhteissa ja puskureissa. ATP ja
35 deoksinukleotiditrifosfaatit dATP, dGTP, dCTP ja dTTP ostettiin PL Biochemicals-yhtiöltä. DNA:n liittämis-

aineet valmistettiin tavanomaisin menetelmin.

DNA:n valmistus ja transformaatio

E.colin kovalenttisesti suljettujen plasmidi DNA:iden puhdistus (18) ja E.colin transformaatio (19) tehtiin aiemmin kuvatuilla menetelmillä. E.coli-miniscreen-erotus tehtiin kirjallisuudessa (20) kuvatulla menetelmällä. Hiivan transformaatio tehtiin aiemmin kuvatulla tavalla (21) muuntaen kuitenkin menetelmää seuraavasti: Käytettiin 200 ml soluja pitoisuuden ollessa 2×10^7 solua/ml, ja ne pestiin 25 ml:lla vettä sentrifugoimalla. Nämä solut käsiteltiin 10 ml:lla liuosta, joka oli 1M sorbitolin suhteen, 25mM EDTA:n suhteen (pH=8) ja 50mM ditiotreitolin suhteen, 10 min 30°C :ssa, minkä jälkeen ne pestiin 10 ml:lla 1M sorbitolia. Pelletoidut solut suspendoitiin sitten varovasti 10 ml:aan SCE:a (1M sorbitolin 0,1 M natriumsitraatin (pH=5,8) ja 0,01M EDTA:n suhteen) ja käsiteltiin 30°C :ssa 200 μg :lla zymolyaasi 60 000:a (Kirin Brewery). Soluista tehtiin sferoplasteja 80-prosenttisesti lisäämällä 100 μl 0,9 ml:aan 10 % SDS-suspensiota ja mittaamalla $A_{800\text{nm}}$ käyttäen solulaimennosta ennen entsyymin lisäystä nollaarvona (10 % SDS-suspensiossa tapahtuva hajoaminen aiheuttaa $A_{800\text{nm}}$:n alenemisen). Solut pestiin sitten kolmesti 10 ml:lla 1M sorbitoliliuosta. Soluja voidaan säilyttää useita päiviä 0°C :ssa sorbitolissa. Sitten solut pestiin kerran 1M sorbitolilla, 10mM CaCl_2 :lla ja 10mM Tris-HCl:lla (pH 7,4) ja suspendoitiin sitten 1 ml:aan samaa liuosta. 5 - 15 μl puhdistettua plasmidi-DNA:ta tai 20 μl E.coli:sta saatua miniscreen-DNA:ta (2/5 plasmidi DNA:sta 5 ml:n E. colin stationääriviljelmässä, joka oli kasvatettu LB-alustalla) lisättiin sitten ja sekoitettiin varovasti 100 μl :aan uudelleen suspendoituja soluja 15 min:n ajan. Sitten lisättiin 1 ml liuosta, joka sisälsi 20 % (w/w) polyetyleeniglykoli 4 000:a (Baker) ja oli 10 mM CaCl_2 :n suhteen ja 10 mM Tris-HCl:n suhteen (pH=7,5), sekoittaen varovasti

15 min. Sitten solut laskeutettiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen varovasti 2 000 μ l:aan SOS-liuosta (1M sorbitolin ja 6,5 mM CaCl_2 :n suhteen, sisältää 33,5 til-% YEPB-ravintoliuosta) ja inkuboitiin 30°C:ssa 20 min. 100 μ l tätä suspensiota levitettiin sitten petrimaljalle, joka sisälsi 20 ml pohja-agaria (182 g sorbitolia, 20 g glukoosia, 6,7 g YNB ja 30 g Difcoagaria litrassa vettä), ja peitettiin 10 ml:lla 50°C pinta-agaria [sama kuin pohja-agar, mutta sisälsi 1 ml adeninia (1,2 mg/ml), 1 ml urasiilia (2,4 mg/ml) ja 1 ml -trp-drop-out -seosta 50 ml:ssa pohja-agaria (-trp-drop-out -seos sisältää seuraavia määriä aminonappoja 100 ml:ssa vettä: 0,2 g arg, 0,1 g his, 0,6 g ile, 0,6 g leu, 0,4 g lys, 0,1 g met, 0,6 g ohe ja 0,5 g thr)]. Tämä Trp^+ -valinta johtaa $10^3 - 10^4$ hiivatransformaattiin/1 μ g plasmidi-DNA.

Hiivaplasmidi saatiin hiivasta kasvattamalla 15 ml hiivaa stationääritilaan ($A_{660} = 5 - 6$) YNB+CAA:lla (katso Strains and Media infra) muodostamalla sferoplas- teja kuten edellä, pelletoimalla solut ja käyttäen E. coli -miniscreen-menetelmää (ilman lysotsyymiä), kuten viitteessä (20) on kuvattu.

Plasmidien stabiilisuus määritettiin laimentamalla solut YNB+CAA:lla tapahtuvan selektiivisen kasvun aikana ja levittämällä YEPD-maljoille (ei-selektiivisiä). Kun viljelmiä oli kasvatettu 2 vrk 30°C:ssa, maljat siirrostettiin painamalla vasten YNB+CAA -maljoja (Trp^+ -valikoima). Plasmidin prosentuaalinen stabiilisuus laskettiin vähentämällä ei-selektiivisesti kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärästä niiden pesäkkeiden, jotka eivät kasva selektiivisesti, lukumäärä, jakamalla erotus ei-selektiivisesti kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärällä ja kertomalla sadalla.

E.coli K-12 -kantaa 294 (ATCC no. 31446) (22) käytettiin kaikkien muiden bakteerien transformointiin.

Hiivakantoja pep4-3 (20B-12, d trp1 pep4-3) (23) ja GM3C-2(~~Q~~, leu2-3, leu2-112, trp 1-1, his 4-519, cyp 1-1, cyp 3-1) (24) käytettiin hiivatransformaatioihin. Hiivakannat 20B-12 ja CM3C-2 on rajoituksetta tallennettu the American Type Culture Collection:iin, ATCC-numerot 20626 ja 20625, vastaavasti, molemmat 5.3.1982. Erilaisia hiivakantoja voidaan käyttää, katso Lodder et al., The Yeasts, a Taxonomic Study, Noerth-Holland publ. Co. Amsterdam. Samoin voidaan käyttää erilaisia väliaineita, katso Difco Manual of Dehydrated Culture media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, 9. p. Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan (1953).

LB oli Millerin (25) mukainen, ja siihen oli lisätty 20 μ g/ml amplisilliinia (Sigma) väliaineen autoklaavikäsittelyn ja jäähdytyksen jälkeen. Hiiva kasvatettiin seuraavilla väliaineilla: YEPD sisälsi 1 % hiivauutetta, 2 % peptonia ja 2 % glukoosia $\pm$ 3 % Difcon agaria. YNB+CAA sisälsi 6,7 g hiivatyyppiemästä (ilman aminohappoja) YNB) (Difco), 10 mg adeniinia, 10 mg urasiilia, 5 g Difcon cas-aminohappoja (CAA), 20 g glukoosia ja $\pm$ 30 g agaria litrassa (käytettiin Trp⁺ -lajitelmaan).

Yksittäisiä hiivakantojen YEpIPT-preLeIF-A53t/ pep4-3 ja YEpIPT-LeIF-A1/pep4-3 pesäkkeitä kasvatettiin 7 h 30°C:ssa 100 ml:ssa YNB+CAA:ssa A₆₆₀-arvoon noin 1,1. 100 ml näitä viljelmiä laimennettiin 1 l:ksi YNB+CAA:lla, jolloin saatiin laimennos, jonka A₆₆₀ oli 0,1. Näitä 1 l:n viljelmiä kasvatettiin 30°C:ssa, ja 10 ml annoksia otettiin ajoittain optisen tiheyden, interferonituotannon ja erityksen mittaamiseksi. Koetta varten kutakin 10 ml:n näytettä sentrifugoitiin kierrosnopeudella 7K 15 min Sorval RC3B-sentrifugissa. Supernatantti (väliaine) tutkittiin laimentamatta. Solut suspendoitiin uudelleen 0,4 ml:aan 7M guanidiini HCL:aa, joka sisälsi yhtä suuren tilavuuden lasihelmiä, ja sekoitettiin pyö-

rittämällä 2 min kahdesti suurella nopeudella. Solujen
hajotusote laimennettiin sitten PBS/BSA-liuoksella (150
mM NaCl:n suhteen, 20 mM natriumfosfaatin suhteen (pH=
7,9) ja sisälsi 0,5 % naudan seerumialbumiinia) biolo-
5 gista tutkimusta varten.

Hiivauutteiden interferoni tutkittiin vertaamal-
la interferonistandardeihin sytopaattisen vaikutuksen
(CPE) estokokeella (26). Hiivauutteet valmistettiin seu-
raavasti: 10 ml:n viljelmiä kasvatettiin YNB+CAA:ssa,
10 kunnes A_{660} oli 1 - 2. Solut kerättiin sentrifugoimalla,
suspendoitiin sitten uudelleen 3 ml:aan liuosta, joka
oli 1,2M sorbitolin ja 10mM KH_2PO_4 :n (pH=6,8) suhteen
ja sisälsi 1 % tsymolyaasi 60 000:a, ja inkuboitiin
sitten 30°C:ssa 30 min (90 % sferoplastien muodostumi-
15 nen). Sferoplastit pelletoititiin kiihtyvyydellä 3000 x 10
min, suspendoitiin sitten uudelleen 150 μ l:aan 7M guani-
diinihydrokloridia (GHCl) + 1 mM fenyyylimetyylisulfo-
nyylifuridia (PMSF). Uutteet laimennettiin 20 - 100-
kertaisiksi PBS/BSA-puskuriin (20mM NaH_2PO_4 :n pH=7,4,
20 150 mM NaCl:n ja 0,5 % BSA:n suhteen) välittömästi ennen
koetta. Vaihtoehtoisesti, 10 ml solususpensiota, jolla
oli sama A_{660} , pelletoititiin ja suspendoitiin uudelleen
0,4 ml:aan 7M GHCl:a 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa, joka
sisälsi noin 0,4 ml lasihelmiä (0,45 - 0,5 mm, B.Braun
25 Melsurgen AG). Putkia pyöritettiin kahdesti 2 min suu-
rimmalla nopeudella ja pitäen välillä jäissä. Uutteita
sentrifugoitiin 0,5 min Eppendorf-sentrifugilla ja lai-
mennettiin PBS/BSA-puskurilla yllä mainitulla tavalla.
Biologiset kokeet tehtiin MDBK-soluille (26), kun ky-
30 seessä olivat LeIF A, LeIF D ja esimuodot, mutta HeLa-
soluille (26), kun kyseessä olevat IFN- γ ja preIFN- γ .

Väliaineessa olevan (pre D/A) LeIF A:n puhdistus

Yhtä hiivakannan YUpIPT-preLeIA-A53t/pep4-3 pe-
säkettä kasvatettiin 30°C:ssa 500 ml:ssa YNB+CAA:a, kun-
35 nes A_{660} oli 2,4. 500 ml tätä viljelmää laimennettiin
5 l:ksi YNB+CAA:lla, jolloin A_{660} :ksi tuli 0,21; tulok-

sena olevaa 5 l:n viljelmää kasvatettiin 30°C:ssa, kunnes $A_{660} = 4$. Tässä kasvun vaiheessa viljelmä kerättiin sentrifugoimalla kierrosnopeudella 7 000 rpm 10 min. Fermentoinnin aikana otettiin ajoittain 10 ml:n näytteitä optisen tiheyden, interferonituotannon ja erityksen mittaamiseksi. Ennen tutkimusta sentrifugoitiin kuttakin näytettä 5 min jäähdytyksellä varustetussa sentrifugissa solujen erottamiseksi väliaineesta. Väliaine ja solut tutkittiin edellä kuvatulla tavalla (katso kuvat 9, 10A ja 10B).

Väliaine konsentroitiin lopputilavuuteen 200 ml ja diasuodatettiin tris/cys/EDTA:aa vastaan pH:ssa 8,0 1 000 daltoninultrasuodatuskalvoa (0 - PS, Osmonics) käyttäen Amicon-ohutkanavalaitteessa (TCF 10). Retentoitunut osa (200 ml) johdettiin 1,5 ml:n immuuniaffiniteettikolonniin, joka sisälsi monoklonaalista LeIF-A:n vasta-ainetta kovalenttisesti sitoutuneena Affigel 10:een (BioRad), läpi virtausnopeudella 15 ml/h. yli 80 % alkuperäisen liuoksen interferoniaktiivisuudesta sitoutui kolonniin. Liuos laskettiin uudelleen kolonniin läpi virtausnopeudella 40 ml/h. Tämän toisen käsittelyn jälkeen oli läpivirranneessa liuoksessa jäljellä noin 7 % alkuperäisestä interferoniaktiivisuudesta. Sitten kolonni pestiin tris/cys/EDTA-liuoksella, jonka pH oli 8,0, ja joka oli 0,2M NaCl:n suhteen. Noin 1,7 % aktiivisuudesta eluoitui tämän pesun aikana.

Suurin osa interferoniaktiivisuudesta (noin 50 % alkuperäisestä aktiivisuudesta) eluoitui sitten kolonnista 51,5 ml:lla deionisoitua vettä, jonka pH oli 5,5. Kolonni huuhdottiin lopuksi 22,5 ml:lla 0,2M etikkahappoliuosta mahdollisesti jäljellä olevan proteiinin eluomiseksi; noin 8 % alkuperäisestä aktiivisuudesta eluoitui. Etikkahapolla eluoinnin jälkeen kolonni saatettiin takaisin tasapainoon tris/cys/EDTA-liuoksella, pH 8,0. Vedellä, etikkahapolla ja tris/cys/EDTA:lla eluoinnin aikana kerättiin 2,25 - 4,5 ml:n fraktioita

(kuva 11). Fraktiot 1 - 7 yhdistettiin ja kulmäkuivat-
 tiin. Jäännös liuotettiin uudelleen 200 μ l:aan 0,1 %
 trifluorietikkahappoa (TFA), jonka pH oli 2,5, ja puh-
 distettiin edelleen HPLC:lla Synchropak RP-P-kolonnissa.
 5 Kolonnia eluoitiin virtausnopeudella 1 ml/min käyttäen
 lineaarista gradienttia 0 - 100 % asetonitriiliä 0,1 %
 TFA:ssa, pH 2,5. Kerättiin 1 ml:n fraktioita, ja ne tut-
 kittiin laimennettuina PBS/BSA:lla edellä kuvatulla
 tavalla. 2,5 μ g:n puhdistetusta IFN-A-näytteestä mitat-
 10 tiin vertailukromatogrammi (kuva 12). Interferoniaktii-
 visuus eluoitui kolonnista yhtenä piikkinä, jonka kes-
 kusta oli fraktion 39 kohdalla. Tämä fraktio kylmäku-
 vattiin ja jäännöksen aminohappojärjestys tutkittiin.

Aminohappojärjestysanalyysi

15 Aminohappojärjestysanalyysi perustui Edman-hajoa-
 miseen (27). Näyte laitettiin Beckman 890B spinning cup
 -analysaattorin kuppiin. Kupissa käytettiin kantaja-ai-
 neena PolybreneTM:a (poly-N,N,N¹-tetrametyyli-N-trime-
 tyleeniheksametyleenidiammoniumdiasetaatti) (28). Ana-
 20 lysaattori varustettiin kylmäloukulla ja siihen tehtiin
 muutamia ohjelmamuutoksia taustapiikkien pienentämiseksi.
 Reagenssit olivat Beckmanin sekvenssianalyysi-puhtaus-
 astetta olevat 0,1 M Quadrol-puskuri, fenyyli-isotiosya-
 naatti ja heptafluoributaanihappo.

25 Analysaattorin ohjelman muunnoksiin kuului myös
 2-aniliini-5-tiatsolinonijohdannaisten automaattinen
 konversio niiden uuttuessa analysaattorista. 1-kloori-
 butaani kerättiin Pierce Reacti-VialTM-astioihin ja kui-
 vattiin typen alla. Sitten lisättiin 25 % trifluorietik-
 30 kahapon (TFA) vesiliuosta 2-aniliini-5-tiatsolinoniin
 ja pidettiin 20^oC:ssa 10 min sen muuttamiseksi 3-fenyyli-
 2-tiohydantoiiniksi (PTH-johdannainen) (29). PTH-amino-
 happojäännös liuotettiin sitten automaattisesti 50 %
 asetonitriilin vesiliuokseen ja ruiskutettiin käänteis-
 35 faasi-HPLC-laitteeseen. Kukin PTH-aminohappo analysoi-
 tiin sitten vertaamalla retentioaikoja PTH-aminohappo-

jen standardiseokseen, joka oli asetettu konversio-
astiaan ja käsitelty samalla tavalla kuin näytteet.
Tulokset ovat koottuina kuvaan 13 ja niistä keskustel-
laan infra.

5 Western Blotting -menettely

Proteiineille tehtiin ensin elektroforeesi poly-
akryyliamidigeelilevyllä natriumdodekyylisulfaatin läs-
nä ollessa (46,47) ennen elektroforeettista siirtoa
nitroselluloosapaperille (S + S BA 85) ja sitä seuraa-
vaa HGH:n immunologista tunnistusta. Siirtolaite
10 (Electroblot, E.C. Apparatus Corp., St. Petersburg Fla)
kytkettiin päälle sen jälkeen, kun geeli ja nitrosellu-
loosapaperi oli pesty nopeasti siirtopuskurilla, joka
oli 25 mM Tris:in ja 192 mM glysiinin suhteen, pH 8,4.
15 Siirto tehtiin virralla 400 mA 1,5 h, minkä jälkeen
paperi laitettiin liuokseen, joka oli 50 mM Trisi:in
(pH 7,4), 0,15 M NaCl:n ja 5 mM EDTA:n suhteen ja si-
sälsi 0,25 % (w/w) gelatiinia ja 0,05 % NP-40, ja se-
koitettiin varovasti yön yli. Sopivasti laimennettu
20 kaniinin anti-human hGH-antiseerumi laitettiin muovi-
pussiin paperin ja NP-40/gelatiinipuskurin (tyypillises-
ti 100 μ l/cm²) kanssa ja inkuboitiin 2 h huoneen läm-
pötilassa varovasti ravistellen. Paperi pestiin nopeasti
vedellä, ja sen jälkeen NP-40/gelatiinilla 1 h, ja mer-
25 kittiin NP-40/gelatiinilla laimennetulla γ -¹²⁵I-Protein
A:lla (New England Nuclear) Seal-a-Meal-pussissa 1 h
huoneen lämpötilassa varovasti ravistellen. Kun paperi
oli pesty useaan kertaan vedellä, se käärittiin sello-
faaniin ja laitettiin kasettiin yön ajaksi intensiteet-
30 tiä parantavalla verkolla varustetun X-Omat-Ar - filmin
(Kodak) kanssa lämpötilaan -70°C.

Geelin varjäys

Polyakryyliamidigeelit, jotka sisälsivät protei-
iinit, värjättiin Oakleyn et al. menetelmällä (41).

Nisäkkään interferonigeenien erityis-signaali-jaksot

Kun viime aikoina on pystytty eristämään cDNA:ita, jotka sisältävät leukosyytti-(7), sidekudos- (19) ja immuuni-interferonien (30) geenit, on hiivojen käytön

5 kehittyminen heterologisten geenien ilmentämissysteeminä (14) tehnyt mahdolliseksi tutkia signaali-peptidijaksoa koodittavien heterologisten geenien ilmentämistä hiivassa.

Kuva 1 esittää viiden erilaisen interferonin signaali-jaksoja. Näiden aminopään jaksojen uskotaan vaikuttavan interferoniproteiinien erityykseen nisäkässoluista.

10 Käsittelyn aikana poistetaan signaali-jakso spesifisen proteaasin avulla katkaisemalla asemien -1 ja +1 välistä, jolloin saadaan interferoni muodossa, joka tunnetaan nimellä "valmis". Näillä jaksoilla on muiden erityssignaali-jaksojen yleiset piirteet (31). Ne ovat kaikki hyvin

15 hydrofobisia, suunnilleen saman pituisia kuin muut signaalit, ja niissä on pieni aminohappo irtoamiskohdan vasemmalla puolella. Vaikka preLeIFA, preLeIFD ja preIFD- γ kaikki irtoavat glysiinin ja kysteiinin välistä, ei tämä

20 ole yleinen sääntö muiden nisäkkäiden signaalien kohdalla, kuten preIFN- β :sta ilmenee.

Itse asiassa ei ole olemassa mitään yleistä organismeille yhteistä tai yhdelle organismille ominaista signaali-jaksoa. Ei ole myöskään olemassa yleistä jaksoa

25 signaali-jakson ja proteiinituotteen valmiin muodon irtoamiskohdassa.

Siksi oli erittäin mielenkiintoista yrittää näiden preinterferonien ilmentämistä hiivassa, jotta voitaisiin määrittää, voivatko nämä heterologiset proteiinit erittyä hiivasta ja minkälainen näiden proteiinien käsittely olisi luonteeltaan. Vaikka hiiva on eukarioottinen organismi kuten nisäkässolutkin, ja

30 vaikka hiivalla näyttää olevan erityisreitti, joka on monessa suhteessa samanlainen kuin kehittyneemmällä eukariooteilla (1,32), on hiiva hyvin primitiivinen

35 eukariootti, ja näiden geenituotteiden käsittely vaatisi

käsittelymenetelmän säilymistä suuressa määrin hiivan ja nisäkässolujen välillä evoluution aikana, jonka tulokset eivät ole ollenkaan selviä.

Pre-interferonigeenien ilmentämisessä käytettävän hiivaplasmidin rakenne

Heterologisen geenin hiivassa ilmentämisessä käytettävän plasmidin rakennetta on kuvattu kirjallisuudessa (14).

Tässä työssä käytetty plasmidi on esitetty kuvassa 2. Tämä plasmidi sisältää pBR322:n osan (33), jossa on ampisilliiniresistenssigeeni (Ap^R) ja E.coli-replikoitumislähde E. colissa tapahtuvan selektiivisen ja stabiilin kasvun aikaan saamiseksi (käytetään välivaiheena in vitro-rakenteen ja hiivan transformaation välillä). Plasmidi sisältää myös TRP1-geenin jaksossa EcoRI - PstI, joka on peräisin hiivan kromosomista III (34 - 36). Tämä geeni tekee mahdolliseksi valikoitumisen $trp1^-$ -hiivassa ja sitä voidaan siten käyttää eristettäessä plasmidia sisältäviä hiivasoluja ja ylläpidettäessä plasmidia. Lisäksi plasmidi sisältää hiivan replikoitumislähteen 2,0 kbp:n jaksossa, joka on peräisin endogeenisestä hiivan 2 μ -plasmidi-DNA:sta (37). Tämä lähde tekee mahdolliseksi DNA:n itsenäisen replikoitumisen ja säilymien plasmidina.

Järjestelmän toinen pääkomponentti on hiivan 3-fosfoglyseraatti-kinaasin (PGK) promoottorijakso, joka aloittaa transkription plasmidin ainoan EcoRI-kohdan läheltä (toinen EcoRI poistettiin täyttämällä restriktiokohta käyttäen E.colin DNA-polymeraasi I:a (Klenow) ja liittämällä päät yhteen (bunt end ligation)).

3-fosfoglyseraattikinaasi-(PGK-)geenin eristystä on käsitelty toisaalla (37a) samoin kuin 1,6 kbp:n promoottorin rakennetta (infra). Hiivan kromosomin III TRP1-geenialueen fragmenttia HindIII/BglIII (34 - 36) käytettiin Hind III:n muuttamisessa Bgl II:ksi liitettäväksi pBR322:n Bam HI-kohdan kanssa, mikä tekee plas-

midista herkän tetrasykliinille (Tc^S). Lisäksi on mainittava, että 2,0 kbp:n fragmentilla on toisena toimintona se, että se sisältää transkription päättämisen/polyadenylaatio-signaalin, joka normaalisti on terminaatio-signaalina 2,0-plasmidin "kykenevälle" geenille (37). Tällainen alue näyttää olevan oleellinen hyvän ilmentämisen kannalta. Oikein orientoituneet geenisiirännäiset, kuten EcoRI-fragmentit, voivat tällöin ilmentyä proteiinina, kun vektori pakataan hiivaan.

10 Erilaisten interferonigeenien ilmentämisessä käytettävien hiivaplasmidien rakenne

Hiivan ilmentämisspasmidi YE-IPT sisältää yhden ECORI-kohdan. Vieraan geenin sijoittaminen tähän nimenomaiseen ECORI-kohtaan johtaa tämän geenin ilmentymiseen hiivan fosfoglyseraattikinaasi-(PGK-) promoottorin alaisena. Helppo tapa sijoittaa erilaisia interferonigeenejä tämän hiivan EcoRI-kohtaan on käyttää DNA-fragmentteja, joissa EcoRI-kohdat ovat erilaisten interferonigeenien aloitus- ja päättämiskodonien vieressä. Me kuvaamme tässä interferonigeenien ilmentämisessä käytettävien tällaisten EcoRI-fragmenttien rakennetta. On tärkeää käyttää EcoRI:ksi muuttajia geenin 3'-päässä, jolloin ne eivät päättä transkriptiota vaan sallivat transkription 2,0-terminaattoriin asti.

25 Olemme aiemmin kuvanneet EcoRI-kohdan, joka on juuri valmiin IFN- α 1-geenin (14,17), valmiin IFN- α 2-geenin (7), valmiin IFN- β -geenin (10) ja valmiin IFN- γ -geenin (30) ATG-initiaatiokodonin edellä.

30 DNA:n restriktioanalyysi osoittaa, että IFN- α 1:n (8) cDNA-kloonin 3'-pään koodittamattomalla alueella on hyvässä paikassa EcoRI-kohta, siten plasmidin pLeIFD3 (17) käsittely EcoRI:lla johtaa 583 bp:n EcoRI-fragmenttiin, joka sisältää kokonaisen IFN- α 1-geenin.

35 Kuva 3 esittää EcoRI-fragmentin, joka sisältää pre-IFN- α 1-geenin, rakennetta. HaeIII-kohta sijaitsee

pre-IFN- α 1:n ensimmäisen ja toisen aminohapon välissä (8). Osittain HaeIII-käsitelty 254 bp:n fragmentti, joka ulottuu tästä HaeIII-kohdasta kooditusalueen keskellä olevaan BglIII-kohtaan, eristettiin. Itsetäydentävä synteettinen oligonukleotidi 5'-CCATGAATTCATGG-3' liitettiin (blunt-end ligation) 254 bp:n HaeIII-BglIII -fragmenttiin, jotta saataisiin ATG-initiaatiokodonia edeltävä EcoRI-kohta. 264 bp:n EcoRI-BglIII -fragmentti eristettiin sitten käsittelemällä ligaatioseosta EcoRI:lla ja BglIII:lla. Tämä EcoRI-BglIII-fragmentti, joka sisältää preIFN- α 1 -geenin etummaisen puoliskon, kiinnitettiin sitten preIFN- α 1 -geenin takapuoliskoon, 372 bp:n BglIII-EcoRI -fragmenttiin, joka oli eristetty IFN- α 1-cDNA-kloonin käsittelyseoksesta BglIII:lla ja EcoRI:lla. EcoRI-fragmentti, joka sisälsi kokonaisen pre-IFN- α 1 -geenin, muodostettiin sitten käsittelemällä ligaatioseosta EcoRI:lla ja eristämällä 636 bp:n fragmentti.

Kuva 4 esittää EcoRI-fragmentin, joka sisältää valmiin IFN- α 2-geenin, rakennetta. 876 bp:n EcoRI-PstI -fragmentti, joka sisältää valmiin IFN- α 2 -geenin, jossa on EcoRI-kohta juuri ATG-initiaatiokodonin edellä ja cDNA-kloonista johdettu 400 bp:n 3'-pään ei-koodittava jakso, eristettiin käsittelemällä plasmidia pLeIFa25 (7) EcoRI:lla ja PstI:lla. Tämän 876 bp:n fragmentin PstI-pää muutettiin sitten EcoRI-kohdaksi adaptorifragmenttia käyttäen. Tämä 978 bp:n adaptorifragmentti sisältää sisäisen EcoRI-kohdan ja PstI-kohdat molemmissa päissä. 230 bp:n osa tästä fragmentista, joka ulottuu toisesta Pst-päästä EcoRI-kohtaan, on peräisin hiivaplasmidin 2 /u-DNA:sta (37). 748 bp:n osuus fragmentin loppuosasta, EcoRI-kohdasta toiseen PstI-päähän, on peräisin bakteeriplasmidista pBR322 (koko fragmentti on peräisin YEpl3:sta (37b)). Tämän adaptorifragmentin liittäminen 876 bp:n EcoRI-PstI -fragmenttiin, joka sisältää valmiin IFN- α 2 -geenin, ja sitä seuraava käsittely EcoRI:lla synnyttää 1096 bp:n fragmentin, joka

sisältää valmiin IFN- α 2 -geenin, jossa on EcoRI-kohdat molemmista päissä.

Kuva 5 esittää EcoRI-fragmentin, joka sisältää pre-IFN- α 2 -geenin, rakennetta. Restriktioanalyysi osoittaa, että sekä pre-IFN- α 1- että α -2 -geenin esijaksossa on sama DdeI-kohta 14. ja 15. aminohapon välissä. Pre-IFN- α 1 -geeniä koodittavasta EcoRI-fragmentistä peräisin olevan 44 bp:n EcoRI-DdeI -fragmentin ja IFN- α 2:n cDNA-kloonista peräisin olevan DdeI-PstI -fragmentin (900 bp) liittäminen toisiinsa, jota seuraa käsittely EcoRI:lla ja PstI:lla, muodostaa 944 bp:n fragmentin. Tämä 944 bp:n fragmentti EcoRI-PstI sisältää IFN- α 1:sta johdetun prepeptidin 14 ensimmäisen aminohapon kooditusjakson, prepeptidin loppuosan kooditusjakson ja IFN- α 2:sta peräisin olevan kokonaisen valmiin proteiinin kooditusjakson. Tämän 944 bp:n fragmentin pstI-pää muutettiin sitten EcoRI-kohdaksi käyttäen adaptorifragmenttia, kuten muodostettaessa EcoRI-fragmentti valmista IFN- α 2:a varten.

Kuva 6 esittää EcoRI-fragmentin, joka sisältää pre-IFN- γ -geenin ja 70 bp:n esijakson, joka edeltää ATG-initiaatiokodonia, rakennetta. IFN- γ -cDNA-kloonin (39) kypsytyksen synnyttää 842 bp:n Sau3A-fragmentin, jossa on 60 bp:n jakso 5'-reunassa, pre-IFN- γ :n koko kooditusjakso ja 290 bp:n koodittamaton jakso. Tämä Sau3A-fragmentti kloonattiin sitten BamHI-kypsytettyyn pUC7-vektoriin, joka on yksisäikeisen faagin M13mp⁷ vastinosa (38). Plasmidi pUC7 johdettiin pBR322:sta poistamalla ensin 2067 emäsparin (bp) EcoRI-PvuII -fragmentti, joka sisältää tetrasykliiniresistanssigeenin, sijoittamalla sitten 425 bp:n HaeII-fragmentti faagin M13 johdannaisesta mp7 (38) tuloksena olevan plasmidin HaeII-kohtaan asemaan 2352 (pBR322-merkinnän mukaan laskettuna). mp7:n HaeII fragmentti sisältää N-päätteisen E. coliin lacZ-geenin kooditusjakson, jossa jakson multi-

restriktioentsyymin kloonaukko on sijoitettuna β - galaktosidaasin 4. ja 5. aminohappotähteen väliin. Vieraan DNA-fragmentin sijoittaminen näihin kloonaukkoihin rikkoo jatkuvuuden lac-promoottorin ja lacZ-geenin välillä ja muuttaa siten JM83:n, joka on transformoitu plasmidilla lac⁺-lac⁻, fenotyyppiä. Koska pUC7:n multirestriktiokloonaukkoissa on kaksi EcoRI-kohtaa BamHI-kohtien sivuilla, johtaisi plasmidin, jossa on 842 bp:n Sau3A-siirrännäinen, käsittely EcoRI:lla 862 bp:n fragmenttiin, joka sisältää kokonaisen pre-IFN- γ -jakson, jonka sivuilla on EcoRI-kohdat.

Plasmidin pIFN- trp48 (30) käsittely EcoRI:lla ja BglII:lla synnyttää 689 bp:n fragmentin, jossa on ATG-initiaatiokodonia edeltävä EcoRI-pää, kokonainen valmiin IFN- γ :n kooditusjakso ja 210 bp:n koodittamaton jakso. BglII-pää muutettiin sitten EcoRI-pääksi liittämällä pre-IFN- γ -EcoRI-fragmentista peräisin oleva 29 bp:n BglII-EcoRI-adaptori edellä kuvatulla tavalla. Sitä seuraava ligaatioseoksen käsittely EcoRI:lla johtaisi 718 bp:n EcoRI-fragmenttiin, joka sisältää valmiin IFN- γ -geenin.

Kuva 7 esittää EcoRI-fragmentin, joka sisältää pre-IFN- γ -geenin, jossa on EcoRI-pää ja jakso AAA ennen ATG-initiaatiokodonia, rakennetta. EcoRI-jaksoa, joka sisälsi yllä kuvatun pre-IFN- γ -geenin, käsiteltiin, EcoRI:lla ja MboII:lla, jolloin syntyi 184 bp:n fragmentti. Tämä fragmentti, joka sisälsi pre-IFN- γ -geenin etuosan, denaturoitiin lämmöllä ja muutettiin (109 5'-kinaasilla synteettiseksi oligonukleotidiksi 5'-pATGAAATATACA, joka koodaa pre-IFN- γ -geenin neljää ensimmäistä aminohappoa. EcoRI-MboII -fragmentti, templaatti ja oligonukleotidi pohjana käytettiin E.coli-DNA -polymeraasia yläsäikeen syntetisoimiseen ja poistamaan 3' -esiintyöntyvä pää pohjasäikeestä. Tuloksena oleva 178 bp:n tylppäpäinen fragmentti, joka ulottuu ATG-initiaatiokodonista ensimmäiseen siitä alaspäin

olevaan MboII-kohtaan, liitettiin sitten itsetäydentävään 5'-TTTGAATTCAAA-3' -EcoRI-liittäjään. Ligaatioseoksen käsittely EcoRI:lla ja DdeI:lla synnyttää 165 bp:n EcoRI-DdeI -fragmentin, joka sisältää pre-IFN- γ -geenin
 5 etuosan. kokonainen geeni koottiin sitten liittämällä 600 bp:n DdeI-EcoRI -fragmentti, joka sisältää IFN- γ -geenin takaosan ja 3' -ei-koodaavan alueen. Ligaatioseosta käsiteltiin sitten EcoRI:lla, jolloin muodostui 765 bp:n EcoRI-gragmentti, joka sisälsi kokonaisen pre-
 10 IFN- γ -geenin.

Yhteenvedo kaikista näistä EcoRI -fragmenttirakenteista (I - IX) on kuvassa 8. Kaikki nämä rakenteet sijoitettiin vektoriin YEpIPT (kuva 2) ilmentämis- ja erityskokeiden tekemiseksi hiivaa käyttäen.

15 Näitä plasmideja sisältävän hiivan avulla tapahtuva interferonien ilmentäminen ja erittyvät määrät

Sen jälkeen kun kuvan 8 mukaiset EcoRI-fragmenttiseen oli sijoitettu YEpIPT:hen (kuva 2), orientoituminen tarkistettu ja sijoitettu hiivaan Trp⁺-täydennystä käyttäen, näitä plasmideja sisältävän hiivan interferonituotanto tutkittiin sytopaattista vaikutusta (CPE) mittavalla kokeella (26) biologisella kokeella) uutteisista, soluseinämateriaalista ja väliaineesta. Interferonitutkimukset tehtiin kolmesta erillisestä hiivaviljelmän
 20 kohdasta. Tutkimusten tulokset ovat taulukossa 1.
 25

Interferonin ilmentämismäärät

Geenirakenne n:o	YEIPRT plas-midi, joka sisältää nämä EcoRI-fragmentit	Hili	Solun si-säinen U/l/Abs ₆₆₀ =1	% solun proteiinista	Soluseinän poiston jäl-keen vapautu-nut määrä (U/l/Abs ₆₆₀)	% solun proteiinista	Solun ul-kopuoli-nen (väli-iinista Abs ₆₆₀ aine)	% solun lopulli-nen proteiinista Abs ₆₆₀	Erittynyt aktiivisuus (%)
I	LeIF D	GM3C-2	130x10 ⁶	1,0	0	0	0	1,0	0
II	pre LeIF D	GM3C-2	27x10 ⁶	0,3	0,4x10 ⁶	0,004	0,8x10 ⁶	1,4	4
III	LeIF A	pep4-3	130x10 ⁶	1,0	0	0	0	1,0	0
IV	(pre D/A) LeIF A	pep4-3	19x10 ⁶	0,2	0,5x10 ⁶	0,005	0,5x10 ⁶	1,0	6
IV	(pre D/A) LeIF A	pep4-3	25x10 ⁶	0,3	N,D,	---	2x10 ⁶	3-4	8
IV	(pre D/A) LeIF A	GM3C-2	28x10 ⁶	0,3	0,3x10 ⁶	0,003	0,5x10 ⁶	1,3	3
V	IFN-γ	pep4-3	0,6x10 ⁶	N,D,	N,D,	---	0	1,0	0
VI	pre IFN-γ + cDNA	pep4-3	0,2x10 ⁶	N,D,	N,D,	---	0,03x10 ⁶	1,2	15
VI	5'-sivun jakso	pep4-3	0,38x10 ⁶	N,D,	N,D,	---	0,06x10 ⁶	0,93	16
VII	pre IFN-γ	pep4-3	0,9x10 ⁶	N,D,	N,D,	---	1,9x10 ⁶	1,0	17
VII	pre IFN-γ	GM3C-2	1,9x10 ⁶	N,D,	N,D,	---	1,9x10 ⁶	0,93	10

a) Katso: Utteiden valmistusmenetelmät. Huomaa, että utteiden valmistuksessa käytettiin kahta menetelmää. Kun soluista valmistettiin sferoplasteja, on "solun sisäinen" määrä todella sisällä ollutta ainetta; kuitenkin ilmauksen N.D (ei määritetty) esiintyessä ovat "sisäinen määrä" ja "soluseinien poiston jälkeen vapautunut määrä" molemmat osana "solun sisäistä" määrää - tämän tyyppisen utteen valmistuksessa solut käsitellään lasihelmillä poistamatta soluseiniä. Huomaa, että utteet valmistettiin lasihelmien avulla sferoplasteja muodostamatta aina IFN-γ:n ja preIFN-γ:n ollessa kyseessä, ja että PBS-puskuria käytettiin 7M GHCl:n sijasta.

b) LeIFA:n ja LeIFD:n ominaisaktiivisuuksien oletetaan kumankin olevan 10⁸ U/mg proteiinia laskuja suoritettaessa. Hiivaviljelmä sisältää noin 100 mg proteiinia, kun viljelmän A₆₆₀ = 1.

c) Katso: Sferoplastien valmistusmenetelmät.

d) Tutkittavan viljelmän A-arvo.

e) Prosenttuaalinen erittyminen on prosenttiluku "vapautunut soluseinien poiston jälkeen" + prosenttiluku "solun ulkopuolelta". Kun sferoplasteja ei muodostettu, "erittynyt prosenttiosuus aktiivisuudesta" ei sisällä soluseinistä erittynyttä aktiivisuutta, ja prosenttiluku on pienempi (ehkä 1/2), kuin sen todellisuudessa tulisi olla.

Ensimmäinen mittauskohta on solun sisällä. Tämä fraktio mitataan valmistamalla solu-uute soluseinien poiston jälkeen, ja näin määritetään erittymätön interferoniaktiivisuus. Kaksi muuta kohtaa ovat väliaine (hiivasolusta kokonaan erillään oleva materiaali) ja vapautunut aktiivisuus, kun soluseinät on poistettu tsymolyaasia käyttäen (erittynyt, mutta soluseiniin ei-kovalenttisesti sitoutunut aine). Sekä väliaine- ja soluseinien poiston jälkeen vapautunut fraktio lasketaan kuuluviksi erittyneeseen kokonaismäärään. Vaihtoehtoisesti, kun soluseiniä ei poistettu (katso: menetelmät) sisältää solun sisäinen aktiivisuus myös soluseiniin kiinnittyneen aktiivisuuden.

Taulukon I yhteydessä tulisi huomata, että (pre D/A)LeIFA on valmis LeIFA-geeni, jossa on hybridi-signaalipeptidijakso (katso kuvat 1 ja 8). Tätä rakennetta on käsitelty aiemmin; mutta kirjallisuuden mukaan se muodostettiin käyttämällä DdeI-restriktiokohtaa, joka on yhteinen preLeIFA:lle ja preLeIFD:lle. Kuvassa 1 näkyy tämä aminohapon -10 kohdalla oleva DdeI-kohta. Alleviivatut aminohapot ovat erilaisia preLeIFD:n ja preLeIFA:n aminohappoketjuissa. Hybridi-(preD/A)LeIFA muistuttaa enemmän preD:a kuin preA:a.

Sekä valmis LeIFA-että LeIFD-geeni (rakenteet I ja III) ilmentyvät hiivassa proteiinimääränä, joka on 1,0 % solun kokonaisproteiinista (2,0 %:n määriä on myös havaittu). Näiden geenien tai esigeenien väärät orientoitumiset eivät ilmenny. Näiden kahden geenin samoin kuin valmiin IFN- γ -geenin ollessa kyseessä ei ilmene erittymistä.

Jos kuitenkin käytetään näiden geenien esijaksoja, löytyy kaikkia kolmea proteiinituotetta väliaineessa erittyneinä tuotteina. Jopa niin suuria määriä kuin 8 % kokonaisaktiivisuudesta on havaittu väliaineessa (pre D/A) LeIFA:n ollessa kyseessä ja absorbanssin ollessa $A_{660} =$

3 - 4. Tulisi huomata, että kaikki nämä plasmidit kasvavat 95 %:ssa soluista Trp^+ -selektiivisen paineen alaisena, mikä on todisteena autonomisesti replikoituvan plasmidin läsnäolosta.

5 (pre D/A)-LeIFA -geenin sisältävän hiivan kasvu-
käyrä ja erityystoiminta väliaineeseen

Kaksi interferonia tuottavaa hiivaa tutkittiin määrittämällä niiden luonteenpiirteet tarkemmin. Nämä hiivat olivat YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3 ja YEplPT-LeIFA
 10 1/pep4-3. Ensimmäinen sisältää kaksi rakenteen IV kopiota (kuva 8) YEplPT:n EcoRI-kohdassa, ja sen tuloksena on aktiivisuus solun sisällä, soluseinässä ja solun ulkopuolella (väliaineessa). Tätä kaksikopioista geeniä tandem-muodossa - molemmat asianmukaisen ilmentämisen
 15 kannalta oikein orientoituneita), joka sisältää plasmidin, käytettiin yksikopiorakenteen sijasta, sillä saatiin joskus suurempia interferoniaktiivisuuspitoisuuksia väliaineeseen. Pep 4 - 3 hiivaa käytettiin, sillä sen proteaasipitoisuudet solun sisällä ja ulkopuolella olivat
 20 suuresti pienentyneet (23), mikä saattaisi olla etu hajomattoman proteiinin (interferonin) väliaineesta saamisen kannalta.

Jälkimmäisessä on rakenne III (kuva 8) YEplPT:ssa, ja se ilmentää valmista LeIFA:a solun sisällä, mutta ei
 25 eritä sitä.

Kuva 9 esittää näiden kahden hiivakannan kasvukäyrää YNB+CAA:ssa (Trp^+ -selektiivinen kasvu). Logaritmisien kasvun vaihe jatkuu $A_{660\text{nm}}$ -arvoon 3 - 4, ja sitten alkaa stationäärivaihe. Käyrät ovat suurinpiirtein identtisiä /mikä viittaa siihen, ettei näiden kahden erilaisen
 30 proteiinin (LeIFA ja (preD/A)-LeIFA) tuotanto vaikuta hiivan kasvuun tai elinkykyyn/. Väliaineelle tehtiin biologinen tutkimus useita kertoja solun kasvun aikana, jotta saataisiin selville näiden kahden kannan interferonituotannon väliaineeseen riippuvuus kasvukäyrästä.
 35 Näistä tuloksista ilmenee, että LeIFA:ssa oleva esijakso

aiheuttaa interferoniaktiivisuuden vapautumisen väliaineeseen. Ilman tätä jaksoa ei aktiivisuutta vapaudu juuri ollenkaan. On myös ilmeistä, että aktiivisuuspi-
toisuudet väliaineessa saavuttavat suurimman arvonsa
5 lähellä stationäärivaihetta.

(pre D/A)-LeIFA:n puhdistus väliaineesta

Jotta saataisiin määritetyksi (pre D/A)-LeIFA:n
hiivan väliaineeseen suuntautuvan erityystapahtuman luon-
ne, oli välttämätöntä puhdistaa proteiinituote väliai-
10 neesta. Jos hiiva pystyy erittämään proteiinia, se toden-
näköisesti käsittelee aminoryhmään päättyvää päätä jol-
lakin tavalla eritysprosessin aikana, kuten nisäkässolut
normaalisti tekevät pre-interferoniproteiinin ollessa
kyseessä. Lisäkokeiden tarkoituksena oli määrittää tämän
15 käsittelyn luonne seuraavalla tavalla:

A) Fermentaatio (5 l)

Kuva 10A esittää interferoniaktiivisuutta solun
seinässä ja solun sisällä saman fermentaation aikana.
Nämä uutteen valmistettiin pelleteimalla ja käsittele-
20 mällä sitten lasihelmillä 7M GHCl:ssa, joten tämä aktii-
visuus sisältää sekä solun sisäisen että soluseinien
sisäisen materiaalin. Tämä aktiivisuus saavutti suurim-
man arvonsa noin 25×10^6 U/l, kun $A_{660\text{nm}} = 1,5 - 2,0$,
mikä viittaa siihen, että solun sisäinen interferoni-
25 tuotanto loppuu logaritmisen vaiheen aikana ennen sta-
tionäärivaihetta, toisin kuin solun ulkopuolisen aineen
ollessa kyseessä. Siten noin 8 % aktiivisuudesta erit-
tyy vapaasti väliaineeseen. Myös nyt voi kuitenkin olla
paljon aktiivisuutta soluseinässä (katso taulukko 1).
30 Uutemateriaali sisältää pääasiallisesti solun sisäistä
interferonia, ja tämä aine puhdistetaan nyt, jotta näh-
täisiin, onko se käsiteltyä vai käsittelemätöntä.

Kuva 10B esittää kasvukäyrää, joka saatiin fer-
mentoimalla YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3:a YNB+CAA:ssa
35 (5 l). Fermentoinnin lopussa interferoniaktiivisuuden

määrä oli noin $2,0 \times 10^6$ U/l MDBK-kokein mitattuna. Suurin tuotanto havaitaan jälleen stationäärivaiheessa. Tulisi huomata, että tässä väliaineessa oleva interferonituote on hyvin stabiili, vaikka ravistelua jatketaan
 5 ylimääräiset 24 h 30°C :ssa stationäärivaiheen alkamisen jälkeen. Tätä väliainetta käytettiin lisäpuhdistusvaiheisiin.

B) Väliainetiivisteen käsittely immuuniaffiniteettikolonilla

10 YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3:n väliaine ultrasuodatettiin ensin. Tämä tiiviste laitettiin kolonniin, joka sisälsi monoklonaalista valmiin LeIFA:n vasta-ainetta. Kun kolonnia oli huuhdottu tris/cys/EDTA-liuoksella (pH=8,0), joka oli 0,2MNaCl:n suhteen, interferoni elu-
 15 oitiin H_2O :lla (pH=5,5) kuvan 11 mukaisesti. Eluoitunut piikki A (nuoli osoittaa H_2O :n lisäämisen aloituskohdan) saatiin tällä menettelyllä, ja siinä on 50 % kolonniin laitetusta aktiivisuudesta. Piikki A yhdistettiin, sul-
 20 seen. Eluoimalla 0,2M etikkahapolla saatiin piikki B (nuoli osoittaa puskurin vaihtokohdan) ja nuoli C osoittaa siirtymisen alkuperäiseen huuhtelupuskuriin.

C) Piikin A aktiivisuuden HPLC-ajo

25 Piikin A fraktiot kylmäkuivattiin ja ajettiin sitten HPLC:lla (katso menetelmät). Kuva 12 esittää tämän ajon tuloksia. 2,5 μg :n näyte puhdistettua LeIFA:a (E.colista) ajettiin erikseen vertailunäytteeksi.

30 Sekä vertailunäytteellä että (pre-D/A)-LeIFA:lla (tai preLeIFA:lla) oli samanlaiset retentioajat, kuten kuvasta ilmenee. Nämä tulokset osoittavat, että väliaineen interferoni on käsiteltyä, sillä preLeIFA:lla on huomattavasti erilainen retentioaika. Varjostettu osa tästä HPLC-ajosta käytettiin proteiinin aminohappojärjestyksen tutkimiseen.

Hiivan väliaineesta puhdistetun (pre-D/A)-LeIFA:n
NH₂-päätteisen jakson tutkiminen

Kuva 13 esittää osittain puhdistetun interferonin aminohappojärjestysanalyysin tuloksia. Ylempi jakso on sellainen, joka oli odotettavissa (pre-D/A)-LeIFA:lla, ellei mitään käsittelyä tapahtuisi. Tämän interferonin normaali irtoamiskohta, joka todennököisesti nisäkäs-

5 soluissa esiintyvä, annetaan kuvassa.

Proteiinijakson aminohappojärjestys saatiin tarkastelemalla, minkä PTH-aminohapon pitoisuus kohosi kussakin vastaavassa Edman-syklissä ja aleni sitten seuraavassa syklissä. PTH-aminohappojen, jotka normaalisti antavat pieniä saantoja (cys, ser, thr, arg, his), oletettiin olevan kyseessä silloin, kun ei ollut havaittavissa minkään muun PTH-aminohapon määrän lisääntymistä. Mg-

10 määrät arvioitiin vertaamalla mitattujen piikkien pinta-alaa PTH-aminohappo-standardiseoksen, joka ajettiin samalla HPLC:lla, antamaan pinta-alaan. Sisäisenä standardina käytettiin kussakin kromatogrammissa norleusiinia, jotta varmistettaisiin retentioaikojen toistettavuus.

Kuva 13 esittää puhdistetulle (pre-D/A)-LeIFA:lle saatuja aminohappojärjestysanalyysin tuloksia. Järjestys, joka olisi odotettavissa, ellei mitään käsittelyä tapahtuisi, ja tämän pre-interferonin normaali irtoamiskohta nisäkässoluissa on myös esitetty. Tehtiin kaksi erillistä ajoa kahdelle soluista ja väliaineesta puhdistetulle eri näytteelle. Kuva 13 osoittaa, että suurin osa väli-

25 aineessa olevasta interferonista oli asianmukaisesti käsiteltyä (64 %), mutta läsnä oli myös toista muotoa (36 %), joka sisälsi kolme ylimääräistä esijakson aminohappoa. Myös solun sisäinen interferoni sisälsi nämä

30 kaksi muotoa, mutta hieman eri suhteessa, samoin kuin kolmatta muotoa, joka sisälsi esijakson 8 aminohappoa. Kokonaista esijaksoa ei havaittu kertaakaan, mikä viittaa siihen, että hiiva käsittelee kaiken pre-IFN:n tavalla.

On mahdollista, että käsitelty muoto, joka sisälsi esijakson kolme aminohappoa, oli seurausta pre-D/A-signaalijakson hybridiluonteesta. Siksi tutkittiin myös ei-hybridisen (pre-D)-LeIFD:n käsittelyä. Pre-D eroaa pre-D/A:sta vain aminohappokohdassa -2 (leu/val). Kun väliaineesta puhdistetun pre-IFN- α 1:n käsittelyä tutkittiin, havaittiin jälleen sekä +1- että -3-muodot (kuva 13). Väliaineessa esiintyi kuitenkin myös pieni määrä -14-muotoa, jota ei havaittu (pre-D/A)-LeIFA:n ollessa kyseessä.

Jotta voitaisiin tutkia heterologisten proteiinien erittymistä *S. cerevisia*esta, olemme muodostaneet plasmidit erilaisten valmiiden interferonien (IFN:ien) ja erilaisten pre-IFN:ien geenien transkription tekemiseksi in vivo. Aina kun hydrofobisten signaalipeptidien kooditusjaksoja on läsnä, tulisi IFN:n virusten vastaista aktiivisuutta esiintyä sekä isäntäsoluissa että viljelmän väliaineessa, kun taas kaikki IFN, jonka synteesi on valmiiden IFN-geenien ohjaamaa, pysyy solun sisällä. Olemme yrittäneet saada selville erittymisen vaatimuksia käyttämällä rakenteita, joissa interferonigeeni on varustettu omilla luonnollisilla signaalijaksoillaan. kuten (pre-D/A)-LeIFA:n ollessa kyseessä, tai joissa se on varustettu hybridi-signaalijaksolla, joka on kahden IFN- α -lajin yhdistelmän tulos, kuten (pre-D/A)-LeIFA:n ollessa kyseessä. Vaikka hiivasolut, joissa oli näitä rakenteita, yleensä erittivät IFN:a viljelmän väliaineeseen, aktiivisuuden määrä vaihteli kantojen välillä, samoin puhdistettu ja tutkittu IFN-laji.

Kolme erittymätöntä interferonimuotoa, jotka muodostivat 90 % ilmentyneen interferonin kokonaismäärästä, puhdistettiin soluista, joissa oli (pre-D/A)-LeIFA -geeni. Yksi muoto (33 %) oli asianmukaisesti käsitelty (+1, kuva 13), toinen muoto (55 %) sisälsi 3 ylimääräistä aminohappoa (-3, kuva 13) ja kolmas muoto (11 %) sisälsi 8 ylimääräistä aminohappoa (-8). Viimeistä

muotoa ei esiintynyt väliaineessa, kun taas kokonaisella esijaksolla varustettua IFN:a ei kertaakaan havaittu soluissa tai väliaineessa.

(pre-D)-LeIFD:n käsittely

5 Ravistuspullokasvatuksen, jota käytettiin (pre-D/A)-LeIFA-hiivalle, sijasta kasvatettiin (pre-D)-LeIFD:a ilmentävä hiiva 10 l:n fermentorissa A_{550} -arvoon 60.

Kun väliaineesta puhdistetun (pre-D)-LeIFD:n (puhdistus samanlainen kuin pre-D/A-LeIFA:lla) käsitte-
 10 lyä tutkittiin, havaittiin sekä +l- että -3-muotoja kuva 13). Väliaineessa esiintyi lisäksi pieni määrä -14-muotoa. Mitään merkkejä solujen hajoamisesta viljelmässä ei havaittu tutkittaessa SDS-geelielektroforeesilla väli-
 aineen proteiinit solun proteiineihin nähden. On mielen-
 15 kiintoista, että tässä suuressa kasvutiheydessä havaittiin LeIFD:lla hyvin suuri prosentuaalinen erittyminen (30 %) väliaineeseen. Tiheät fermentaatiot, joissa kasvatetaan (pre-D/A)-LeIFA:n ilmentävää hiivaa, tuottavat myös näitä suuria prosentuaalisia erityismääriä.

20 Hiiva näyttää käsittelevän sekä erittynyttä että erittymätöntä interferonia. Erittyneen aktiivisuuden määrä vaihtelee riippuen solujen kasvuvaiheesta, suurimpien prosenttisuuksien esiintyessä stationäärivaiheessa ravistuspulloissa ja tiheiden fermentaatioiden loppuvai-
 25 vaiheessa (30 % väliaineessa).

YEplPT-preLeIFA53t:a ja YEpiPT-LeIFAl:a sisältävien hiivojen sisältämien plasmidien rakenteen vahvistus

Hiiva, joka sisälsi näitä kahta plasmidia, ja jota käytettiin edellä kuvattuihin kokeisiin, tutkittiin
 30 vielä poistamalla plasmidit uudelleen hiivasta. Tämä tehtiin erottamalla plasmidi-DNA hiivauutteesta E.colin transformaatiolla, minkä jälkeen seurasi DNA:n valmistus miniscreen-menetelmällä ja plasmidi DNA:n restriktioana-
 lyysi. Useita E.coli -eristettyjä plasmidi DNA:ita ka-
 35 rakteristisoitiin kummallekin hiivatyypille. Plasmidi

sisälsi kaikissa tapauksissa restriktiojakson, jota oli odotettu, mikä viittaa siihen, että (pre-D/A)-LeIFA:a sisältävässä plasmidissa on esijakso ja se puuttuu valmiista LeIFA:a sisältävästä plasmidista.

5 pB:in 3,1 kb:n siirrännäisen restriktiokartta ja osittainen aminohappojärjestysanalyysi

300 μ g pBl:a (37a) käsiteltiin perusteellisesti HindIII:lla reaktioutilavuuden ollessa 500 μ l, ja erotettiin sitten elektroforeettisesti 1 % agarosia sisältävällä preparatiivisella agarosigeelillä (Sea Kem).
 10 3,1 kb:n HindIII-siirrännäinen erotettiin etidiumilla värjätystä geelistä, elektroeluoitiin (39), uutettiin kahdesti yhtä suurilla tilavuuksilla puskurilla kyllästettyä fenolia ja kloroformia ennen etanolisaostusta.
 15 Uudelleen suspentoitu DNA jaettiin osiin ja tehtiin restriktio ryhmällä erilaisia restriktioentsyymejä osittaisen restriktiokartan saamiseksi (kuva A).

30 μ g puhdistettua 3,1 kb:n siirrännäistä käsiteltiin Sau3A:lla ja ajettiin sitten 6 % akryyliamidi-geelillä. Fragmentit, jotka vastasivat pituuksia 265 bp
 20 ja 141 bp, puhdistettiin erikseen elektroeluoimalla yllä kuvatulla tavalla. Kullekin DNA-fragmentille tehtiin sitten DNA-sekvenssianalyysi (39).

Osa tästä DNA-jaksosta on kuvassa B. Aminohapot, jotka vastaavat PGK-rakennegeenin N-päätteisiä aminohappoja, on painettu DNA:n jakson yläpuolelle.

Restriktiokohdan sijoittaminen PGK-5'-promoottorialueelle

Synteettinen oligonukleotidi, jossa on jakso 5' ATTTGTTGTAAA3', valmistettiin tavanomaisin menetelmin
 30 (40). 100 ng tätä pohja-ainetta merkittiin 5'-päästä käyttäen 10 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia reaktioutilavuudelle 20 μ l, joka sisälsi myös 200 μ Ci γ -³²P-ATP:a. Tämä merkitty pohja-aineliuos käytettiin pohja-
 35 aineen täydennysreaktiossa, joka suunniteltiin ensimmäi-

seksi vaiheeksi monovaiheisessa prosessissa *ECORI*-
restriktiokohdan sijoittamiseksi PGK-5'-reuna-DNA:han
juuri ennen PGK-rakennegeenijaksoa. Monivaiheinen proses-
si on seuraava:

5 Vaihe 1 (kuva C)

Pohja-aineen täydennysreaktiot ja 39 bp:n *XbaI*-
Sau3A -PGK-palan kloonaukset.

100 µg pBl:a käsiteltiin täydellisesti *HaeIII*:lla
ja ajettiin sitten 6 % polyakryyliamidigeelillä. Etidiu-
milla värjätyn geelin ylin raita (sisältää PGK:n promoot-
torijakson) eristettiin elektroeluoimalla edellä kuvatul-
la tavalla. Tälle 1200 bp:n DNA:n *HaeIII*-palalle tehtiin
sitten restriktio *HindII*:lla ja ajettiin sitten 6 % akryy-
liamidigeelillä. 650 bp:n raita erotettiin elektroeluo-
15 malla. Eristettiin 5 µg DNA:ta. Tämä 650 bp:n DNA-pala
HaeIII-*HindII* suspentoitiin uudelleen 20 µl:aan deioni-
soitua vettä ja sekoitettiin sitten 20 µl:aan yllä kuvat-
tua fosforyloitua pohjaliuosta. Tämä seos uutettiin ker-
ran fenoli-kloroformilla ja saostettiin sitten etanolilla.
20 Kuivattu DNA suspentoitiin uudelleen 50 µl:aan vettä
ja pidettiin sitten kiehuvaan vesihauteeseen 7 minuuttia.
Tämä liuos jäädytettiin sitten nopeasti hiilihappojää-
etanolihauteeseen (10 - 20 s) ja siirrettiin sitten jää-
vesihauteeseen. Tähän liuokseen lisättiin 50 µl liuosta,
25 joka sisälsi 10 µl (10X DNA-polymeraasi I)-puskuria
(Boehringer Mannheim), 10 µl liuosta, joka oli juuri
tehty 2,5 mM:ksi kunkin deoksinukleosiditrifosfaatin
(dATP, dTTP, dGTP ja dCTP) suhteen, 25 µl deionisoitua
vettä ja 5 yksikköä DNA-polymeraasi I:a (Klenow frag-
30 mentti). Tätä 100 µl:n reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa
4 h. Seos uutettiin sitten kerran fenoli-kloroformilla,
saostettiin etanolilla, kylmäkuivattiin ja tehtiin sitten
perusteellinen restriktio 10 yksiköllä *Sau3A*:a. Tämä
seos ajettiin sitten 6 % akryyliamidigeelillä. Raita,
35 joka vastaa 39 bp:n pituutta, erotettiin geelistä ja
eristettiin sitten elektroeluoimalla edellä kuvatulla

tavalla. Tämän 39 bp:n jakson toinen pää oli tylppä ja toinen, Sau3A-pää, terävä. Tämä fragmentti kloonattiin muunnettuun pFIFtro69-vektoriin (10). 10 μ g pFIFtrp69:a tehtiin lineaariseksi XbaI:lla, uutettiin kerran fenoli-kloroformilla ja saostettiin sitten etanolista. Terävä XbaI-pää täytettiin käyttäen DNA-polymeraasin Klenow-fragmenttia 50 μ l:n reaktiutilavuudessa, joka oli 250 mM kunkin nukleosiditrifosfaatin suhteen. Tämä DNA käsiteltiin BamHI:lla ja ajettiin sitten 6 % akryyliamidi-geelillä. Vektorifragmentti eristettiin geelistä elektro-
 10 eluoimalla ja suspentoitiin sitten uudelleen 20 l:aan deionisoitua vettä. 20 ng tätä vektoria liitettiin 20 ng:aan yllä kuvatulla tavalla syntetisoitua 39 bp:n fragmenttia 4 h:n ajan huoneen lämpötilassa. Viidesosa
 15 ligaatioseoksesta käytettiin muuttamaan E.colikanta 294 ampisilliinia kestäväksi (maljoilla LB + 20 μ g/l amp). Transformaattien plasmidit tutkittiin pikatutkimusmenetelmällä (29). Yksi plasmidi, pPGK-39 (kuva C) valittiin sekvenssianalyysiin. 20 μ g tätä plasmidia kypsytettiin
 20 XbaI:n kanssa, saostettiin etanolilla ja käsiteltiin sitten 1 000 yksiköllä bakteerin alkalifosfataasia 68°C:ssa 45 min. DNA uutettiin kolmesti fenoli-kloroformilla ja saostettiin etanolilla. Defosforyloidut päät merkittiin
 sitten 20 μ l:n reaktiutilavuudessa, joka sisälsi 200
 25 Ci γ -³²P-ATP:a ja 10 yksikköä T₄-polynukleotidikinaasia. Plasmidi käsiteltiin SalI:lla ja ajettiin 6 % akryyliamidigeelillä.

Merkitty siirrännäisjakso eristettiin geelistä ja sekvenssianalyysi tehtiin kemiallisella hajoitusmenetelmällä (39). DNA-jakso tämän promoottorin 3'-päässä
 30 oli odotettu.

Vaihe 2 (kuva D)

312 bp:n promoottorifragmentin PvuI-EcoRI muodostaminen

35 25 μ g pPGK-39:a (kuva C) käsiteltiin samanaikaisesti SalI:lla ja XbaI:lla (5 yksikköä kumpaakin) ja

erotettiin sitten elektroforeettisesti 6 % geelillä. 390 bp:n jakso, joka sisälsi 39 bp:n promoottoriosan, eristettiin elektroeluoimalla. Uudelleen suspentoidulle DNA:lle tehtiin restriktio Sau3A:lla ja erotettiin sitten
 5 elektroforeettisesti 8 % akryyliamidigeelillä. 39 bp:n PGK-promoottorijakso eristettiin elektroeluoimalla. Tämä DNA sisälsi 39 bp:n jakson PGK-promoottorin 5'-päästä fragmentissa Sau3A-XbaI.

25 μ g:lle pBl:a tehtiin restriktio PvuI:lla ja
 10 KpnI:lla ja erotettiin sitten elektroforeettisesti 6 % geelillä. 0,8 kbp:n jakso DNA:ta eristettiin elektroeluoimalla, sitten sille tehtiin restriktio Sau3A:lla ja elektroforeesi 6 % geelillä. PGK-promoottorista eristettiin 265 bp:n jakso (kuva A) elektroeluoimalla.

15 Tämä DNA liitettiin sitten 39 bp:n promoottori-fragmenttiin (yllä kuvattu) 2 h:n ajan huoneen lämpötilassa. Ligaatioseokselle tehtiin restriktio XbaI:lla ja PvuI:lla ja erotettiin sitten elektroforeettisesti 6 % akryyliamidigeelillä. 312 bp:n restriktiofragmentti
 20 Xba-PvuI eristettiin elektroeluoimalla ja se lisättiin sitten ligaatioseokseen, joka sisälsi 200 ng pBR322(33):a [juuri eristetty jättäen pois 162 bp:n restriktiofragmentti PvuI-PstI] ja 200 ng LeIFA-cDNA-geeniä XbaI-PstI, joka oli juuri eristetty 20 μ g:sta pLeIFtrpA:a. Tätä
 25 kolmitekijäistä ligaatioseosta käytettiin E.coli-kannan 294 transformaatioon tetrasykliiniä kestäväksi. Transformaattipesäkkeille tehtiin miniscreen-tutkimus, ja yksi peräkkeistä, pPGK-300 eristettiin sellaisena, jossa on 305 bp:n jakso 5'-reunan DNA:ta fuusioituneena LeIFA-geeniin pBR322-pohjaisessa vektorissa. LeIFA-geenin 5'-päässä on seuraava jakso: -CTAGAAATTC-3', siten XbaI-kohdan fuusioituminen PGK-promoottorifragmentista tähän jaksoon tekee mahdolliseksi lisätä XbaI-kohtaan EcoRI-kohta. pPGK-300 sisältää siten osan PGK-promoottoria
 30 eristettynä fragmenttiin PvuI-EcoRI.

Vaihe 4

1500 bp:n PGK-promoottorifragmentin EcoRI-EcoRI muodostaminen

- 10 μ g pBl:a käsiteltiin PvuI:lla ja EcoRI:lla
 5 ja ajettiin 6 % akryyliamidigeelillä. 1,3 kb:n DNA-jakso PvuI-EcoRI PGK:n 5'-reunan DNA:sta eristettiin elektroeluoimalla. 10 μ g pPGK-300:a käsiteltiin EcoRI:lla ja PvuI:lla ja PvuI:lla ja 312 bp:n promoottorifragmentti eristettiin elektroeluoimalla sen jälkeen, kun käsittelyseos oli erotettu elektroforeettisesti 6 % geelillä.
 10 5 μ g pFRL4:a käsiteltiin EcoRI:lla, saostettiin ~~etanolilla~~ ^{etanoli-} lilla ja käsiteltiin sitten bakteerin alkalifosfaasilla -68°C:ssa 45 min. Kun DNA oli käsitelty kolmesti fenolikloroformi-seoksella, saostettu etanolilla ja suspentoitu uudelleen 20 ml:aan deionisoitua vettä, 200 ng vektoria liitettiin 100 ng:aan pPGK-300:n 312 bp:n EcoRI-PvuI -DNA:ta ja 100 ng:aan pBl:n EcoRI-PvuI -DNA:ta. Ligaatioseosta käytettiin transformoimaan E.coli -kanta 294 ampisillinille resistenssiksi. Joistakin Ap^R-pesäkkeistä saatiin pPGK-1500:a. Tämä plasmidi sisältää 1500 bp:n PGK-promoottorifragmentin DNA-palana EcoRI-EcoRI tai HindIII-EcoRI.

Valmistaa HGH:a (ihmisen kasvuhormoni) ja preHGH:a ilmentävien plasmidien muodostaminen

- 25 Kuvan 14 rakenteet A - E muodostettiin vektoreihin, joissa oli sopivat kohdat. Rakenteessa A laitettiin synteettinen DNA kahdentamaan DNA-jaksoa preHGH-cDNA:n alusta (42) HpaII-kohdasta lähtien, jolloin muodostuu EcoRI ATG-translaation aloituskohdan eteen. Fragmentti
 30 HpaII-PstI saatiin preHGH-cDNA:sta (42), ja tämä synteettisellä DNA:lla varustettu fragmentti liitettiin vektoriin EcoRI-PstI (pHGH 207-1, poistettu EcoRI-PstI -fragmentti, joka sisältää osan Ap^R-geenistä, ja molemmat kohdat kiinnitetty uudelleen Klenow-käsittelyn jälkeen),
 35 joka sisältää HGH-cDNA:n jakson PstI-SmaI (43), rakenteen A saamiseksi. Rakenne B tehtiin plasmidista, joka

sisältää valmiin HGH-geenin, joka on viime aikoina saatu ilmentymään suoraan NH_2 -pääteosan synteettisen kooditusjakson 23 aminohapon jaksona (44). Plasmidi, joka sisältää tämän geenin, käsiteltiin PvuII:lla HGH-geenin ja BamHI:lla Tc^R -geenin kohdalla. Suuri fragmentti, joka sisälsi suurimman osan geenistä, liitettiin sitten synteettiseen DNA:han, joka kahdentaa HGH-geenin loppuosan (TAG) ja muodostaa HindIII-kohdan. Tämä HindIII-kohta liitettiin pBR322:n HindIII-BamHI -fragmenttiin kolmanneksi tekijäksi kolmen tekijän liitosrakenteeseen rakenteen B sisältävän plasmidin muodostamiseksi.

A ja B yhdistettiin sitten kuvan 14 mukaisesti, jolloin saatiin rakenne C. C muunnettiin edelleen D:ksi, jossa HindIII-kohta oli muutettu EcoRI-kohdaksi. Siten saatu EcoRI-pala sijoitettiin hiivan ilmentämisplasmidin YEpIPT EcoRI-kohtaan preHGH-geenin ilmentämiseksi hiivassa. Rakenne E valmistettiin myös käyttäen D:ssä käytettyä muuttajaa, jolloin saatiin valmis interferonigeeni (ilman erityyssignaaliaksoa) EcoRI-fragmenttiin YEpIPT:ssa tapahtuvaa ilmentämistä varten.

Valmiin HGH:n ja preHGH:n ilmentäminen hiivassa
YEpIPT:ssä oleva mHGH-rakenne (E) sijoitettiin pep4-3 trp1 (20B-12) -kantaan, ja uutteen valmistettiin käyttäen lasihelmiä menetelmäosassa kuvatulla tavalla. Lasihelmet lisättiin kuitenkin 10 ml:aan pelleteoituja soluja 0,5 ml:n 0,1 % SDS:a kanssa. Laimennukset tehtiin hevosen seerumiin, ja RIA-kokeet tehtiin aiemmin kuvatulla tavalla (44).

RIA:n mukaan HGH ilmentyi noin 0,5 prosenttina hiivan kokonaisproteiinimäärästä A_{660} :n ollessa 1,0 (0,5 mg/l/ A_{660}). HGH:ta ei havaittu väliaineessa.

Myös YEpIPT:ssa oleva preHGH-rakenne (D) laitettiin hiivaan, ja soluista ja väliaineesta tutkittiin HGH. Solussa havaittiin alempi ilmentämistaso (0,08 mg/l/ A_{660}) eli noin 0,08 % hiivan kokonaisproteiinista.

Määrä on siten noin 1/6 valmiin HGH:n ilmentämästä määrästä, mikä on hyvin samanlainen kuin leukosyytti-interferonitulokset. Tämä ei ehkä kuitenkaan ole oikea vertaus, koska valmiin HGH:n (44) kodonien käyttö on
 5 erilaista 23 aminohapolle kuin samoille hapoille preHGH:n ollessa kyseessä. Tällainen ero saattaa johtaa eroihin näiden kahden tuotteen ilmentymismäärässä (45). 10 % eli $8 \mu\text{g/l} / (A_{660}=1)$ solussa ilmentyneestä määrästä oli preHGH:ta ilmentävän hiivan väliaineessa. 10 l:n fermentorissa, jossa $A_{550}=85$, HGH-pitoisuudella 1 mg/l tapahtui noin 10 % erittyminen väliaineeseen.

PreHGH:n ilmentämisen luonne

Solussa ja sen ulkopuolella olevan HGH-proteiinin määrän vertailu tehtiin yllä kuvatulla tavalla Western
 15 Blotting -menettelyä käyttäen. Tulokset koskevat preHGH:ta ilmentävän hiivan suuritiheyksisen fermentoinnin ($A_{550}=85$) väliainetta. Näkyvissä on yksittäinen raita, joka vastaa valmiin HGH:n kokoa. Tämä raita vastaa 1 - 2 prosenttia hiivan väliaineen proteiinista.

Kun tämä väliaineen HGH puhdistettiin vasta-
 20 aine -affiniteettikromatografialla (Hybritech Ab) ja HPLC:lla interferoneille käytettävällä tavalla, osoitti NH_2 -päästä tehty aminohappojärjestysanalyysi, että lähes 100 % HGH:sta oli valmista HGH:ta (sekvenssianalyysi
 25 tehtiin 10 tähteelle), kuten kuvasta 13 osittain ilmenee. Siten väliaineen HGH on kokonaan oikein käsiteltyä, kuten ihmissoluissakin tapahtuu.

Vaikka hakemuksessa on viitattu erityisiin edullisiin toteutusmuotoihin, on ymmärrettävä, etteivät ne
 30 rajoita keksintöä, vaan keksintö rajoittuu liitteenä oleviin patenttivaatimuksiin.

1. Novick, P., Field, C., ja Schekman, Cell 21, 205-215 (1980).
2. Duntze, et al., Science 168, 1472 (1970).
3. Woods, et al., J. Gen. Microbiol. 51, 115 (1968).
4. Cabib, et al., J. Bacteriology 124, 1586 (1975).
5. Farkas, Microbiol. Rev 43, 117 (1979).
6. Moor, Arch. Mikrobiol. 57, 135 (1967).
7. Goeddel, et al., Nature 287, 411 (1980).
8. Goeddel, et al., Nature 290, 20 (1981).
9. Yelverton, et al., Nucleic Acids Research 9, 731 (1981).
10. Goeddel, et al., Nucleic Acids Research 8, 4057 (1980).
11. Wetzel, American Scientist 68, 664 (1980).
12. Wetzel, et al., Biochemistry 19, 6096 (1980).
13. Davis, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 5376 (1981).
14. Hitzeman, et al., Nature 293, 717 (1981).
15. Kleid, et al., Science 214, 1125 (1981).
16. Lawn, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6103 (1981).
17. Weck, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6153 (1981).
18. Clarke, L. ja Carbon, J. Cell 9, 91-99 (1976).
19. Clarke, L. ja Carbon, J. PNAS 72, 4361-4365 (1975).
20. Birnboim, H.C., ja Doly, J. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979).
21. Hinnen, A., Hicks, J.B., ja Fink, F.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).
22. Backman, K., Ptashne, M., ja Gilbert, W., Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).
23. Jones, E. Genetics 85, 23 (1976).
 24. Faye, G., Leung, D.W., Tachell, K., Hall, B.D., ja Smith, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2258-2262 (1981).
 25. Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, s. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 26. Stewart, W.E. II The Inteferon System (Springer, New York, 1979).
 27. P. Edman, G. Begg, "A Protein Sequencer" Eur. J. Biochem., 1, 80-91 (1967).
 28. Tarr, G.E., Beecher, J.F. Bell, M. ja McKean, D.J. Anal. Biochem. 84, 622-627, (1978).
 29. Wittmann-Liebold, B., Graffunder, H., ja Kohls, H. Anal. Biochem. 75, 621-633 (1976).
 30. Gray, P.W., et al., Nature 295, 503-508 (1982).
 31. Emr, S.D., et al., Nature 285, 82-85 (1980).
 32. Novick, P. ja Schekman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1858-1862 (1979).
 33. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.Y., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, Y.H., ja Falkow, S. Gene 2, 95-113 (1977).
 34. Stinchcomb, D.T., Struhl, K., 34 Davis, R.W. Nature 282, 39-43 (1979).
 35. Kingsman, A.J., Clarke, L., Mortimer, R., ja Carbon, J. Gene 7, 141-153 (1979).

36. Tschumper, G., ja Carbon, J. Gene 10, (1980).
37. Hartley, J.L. ja Donelson, J.E. Nature 286, 860-865 (1980).
- 37a. Hitzeman, R.A., Clarke, L., ja Carbon, J. J. Biol. Chem. 255, 12073 (1980).
- 37b. Broach et al., Gene 8, 121 (1979).
38. Messing, et al., Nucleic Acids Research 9, 309 (1981).
39. Maxam, A.M., ja Gilbert, W. Methods in Enzymol. 65, 490-565 (1980).
40. Crea, R. ja Horn, T. Nucleic Acids Res. 8, 2331-2348.
41. Oakley, B.R. et al., Anal. Biochem. 105, 361 (1980).
42. Goodman, H.M., et al. in Specific Eukaryotic Genes (Eds. Engberg, J., Klenow, H., ja Leick, V.) 179-190 (Munksgaard, Copenhagen, 1979).
43. DeBoer, H., et al. in Promoters: Structure and Function (eds. Prayer) s. 468-481 (1982).
44. Goeddel, D.V. et al., Nature 281, 544 (1979).
45. Bennetzen, J.L., ja Hall, B.D., J. Biol. Chem. 257, 3026 (1982).
46. Ames, G.F.-L., J. Biol. Chem. 249, 634 (1974).
47. Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350 (1979).

Patenttivaatimukset

1. Hiivasoluviljelmä, joka pystyy ekspressoimaan, työstämään ja erittämään hiivaorganismille vierasta proteiinia, t u n n e t t u siitä, että se sisältää 1) eläviä hiivasoluja, jotka on transformoitu ekspressiovektorilla, joka toiminnallisesti sisältää proteiinia ja sen heterologista signaalipolypeptidia koodaavaa DNA:ta, jolloin hiivaorganismi ei normaalisti tuota tai käytä mainittua heterologista signaalia, ja 2) väliainetta, joka ylläpitää soluviljelmää, ja joka sisältää mainittua proteiinia, joka on hiivaorganismien ekspressio-, työstö- ja erityistuote.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että hiivaorganismi on *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Hiivasoluviljelmä, joka pystyy ekspressoimaan, työstämään ja erittämään hiivaorganismille vierasta proteiinia, t u n n e t t u siitä, että se sisältää 1) eläviä hiivasoluja, jotka on transformoitu ekspressiovektorilla, joka toiminnallisesti sisältää proteiinia ja sen heterologista signaalipolypeptidiä koodaavaa DNA:ta, jolloin heterologinen signaalipolypeptidi on proteiinille luontaisen signaalin ja toisen heterologisen signaalipolypeptidin hybridi, ja 2) väliainetta, joka ylläpitää soluviljelmää, ja joka sisältää mainittua proteiinia, joka on hiivaorganismien ekspressio-, työstö- ja erityistuote.

4. Hiivaperäinen ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että se toiminnallisesti sisältää hiivaorganismille vierasta proteiinia koodaavaa DNA:ta ja heterologista signaalipolypeptidiä koodaavaa DNA:ta translaatioluentajaksoissa heterologista proteiinia koodaavan DNA:n kanssa, jolloin heterologinen signaalipolypeptidi on proteiinille luontaisen signaalin ja toisen, heterologisen signaalipolypeptidin hybridi.

5. Menetelmä hiivaorganismille vieraan proteiinin saamiseksi hiivan ekspressio-, työstö- ja erityystuotteena, t u n n e t t u siitä, että

5 (a) muodostetaan ekspressiovektori, joka toiminnallisesti sisältää proteiinia ja heterologista signaalipolypeptidiä koodaavaa DNA:ta, jolloin hiivaorganismi ei normaalasti tuota tai käytä mainittua heterologista signaalia,

10 (b) ekspressiovektorilla transformoidaan hiivaorganismi, jolla pystyy ekspressoimaan ja työstämään proteiinia ja heterologista signaalipeptidiä ja erittämään heterologista proteiinia,

(c) valmistetaan mainitun organismin viljelmä,

(d) viljellään viljelmää ja

(e) otetaan proteiini talteen viljelyväliaineesta.

15 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että talteenotettu heterologinen proteiini erotetaan proteiinimuodoista, joissa on lisäksi heterologisen signaalipolypeptidin aminohappoja.

20 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologinen proteiini on ihmisen kasvuhormoni.

25 8. Menetelmä hiivaorganismille vieraan proteiinin saamiseksi hiivan ekspressio-, työstö- ja erityystuotteena, t u n n e t t u siitä, että muodostetaan ekspressiovektori, joka toiminnallisesti sisältää proteiinia ja vieraalle proteiinille luontaista heterologista signaalipeptidiä koodaavaa DNA:ta, ekspressiovektorilla transformoidaan hiivaorganismi, joka pystyy ekspressoimaan ja työstämään proteiinia ja heterologista signaalipeptidiä ja erittämään heterologista proteiinia, valmistetaan mainitun organismin viljelmä, viljellään viljelmää ja otetaan proteiini talteen viljelyväliaineessa.

30 9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologinen proteiini otetaan talteen viljelyväliaineesta kun viljelmä on saavuttanut stationaarisen vaiheen.

10. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vektori sisältää tandemkopi-
oita heterologista proteiinia koodaavasta DNA:sta.

11. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että heterologinen proteiini on
ihmisen proteiini.

12. Menetelmä hiivaorganismille vieraan proteiinin
saamiseksi hiivan ekspressio-, työstö- ja erityistuotteena,
t u n n e t t u siitä, että muodostetaan ekspressioveкто-
10 ri, joka toiminnallisesti sisältää mainittua proteiinia
ja ei bakteeriperäistä heterologista signaaliptidiä koo-
daavaa DNA:ta, jolloin hiivaorganismi ei normaalisti tuota
tai käytä heterologista signaalia, ekspressiovektorilla
transformoidaan hiivaorganismi, joka pystyy ekspressoimaan
15 ja työstämään proteiinia ja heterologista signaaliptidiä
ja erittämään heterologista proteiinia, valmistetaan maini-
tun organismin viljelmä, viljellään viljelmää ja otetaan
proteiini talteen viljelyväliaineessa.

13. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että heterologinen proteiini on
ihmisen seerumialbumiini.

14. Menetelmä ihmisen kypsän kasvuhormonin saamisek-
si, t u n n e t t u siitä, että hiivaorganismi transfor-
moidaan ekspressiovektorilla, joka toiminnallisesti sisäl-
25 tää ihmisen esikasvuhormonia koodaavaa DNA:ta, joka hiiva-
organismi pystyy ekspressoimaan ja työstämään ihmisen esi-
kasvuhormonia ja erittämään ihmisen kypsää kasvuhormonia,
valmistetaan mainitun hiivaorganismien viljelmä, viljellään
viljelmää ja otetaan talteen ihmisen kypsä kasvuhormoni
30 viljelyväliaineesta.

15. Patenttivaatimuksen 22 mukainen soluviljelmä,
t u n n e t t u siitä, että hiivaperäinen ekspressiovek-
tori lisäksi sisältää heterologista signaalipolypeptidiä
koodaavaa DNA:ta.

35 16. Patenttivaatimuksen 22 mukainen soluviljelmä,
t u n n e t t u siitä, että noin 100 % viljelyväliaineen

heterologisesta proteiinista on kypsää heterologista proteiinia.

17. Patenttivaatimuksen 22 mukainen soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologinen proteiini on
5 ihmisen seerumialbumiini tai kasvuhormoni.

18. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hiivaorganismi on *Saccharomyces cerevisial* ja proteiini on ihmisen kasvuhormoni, ihmisen albumiini tai ihmisen leukosyytti- tai immuuni-in-
10 terferoni.

19. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on glykoproteiini.

20. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on hormoni, virus-
15 antigeeni, ihmisen seerumialbumiini, ihmisen insuliini tai glykoproteiini.

21. Patenttivaatimuksen 22 mukainen soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on ihmisen proteiini.

22. Hiivaorganismisoluviljelmä, t u n n e t t u
20 siitä, että se sisältää

(a) hiivaperäisellä ekspressiovektorilla, joka toiminnallisesti sisältää hiivaorganismille vierasta proteiinia koodaavaa DNA:ta, transformoitua hiivaorganismia ja

(b) viljelyväliainetta, joka sisältää mainittua
25 vierasta proteiinia kypsässä muodossa hiivaerityksen tuotteena, joka muodostuu kun hiivaorganismia viljellään viljelyväliaineessa.

23. *E. colissa* tai *Saccharomyces cerevisiaessa* replikoituva hiivaperäinen ekspressiovektori, t u n n e t t u
30 siitä, että se sisältää heterologista signaalipolypeptidiä koodaavaa DNA:ta translaatioluentajaksossa heterologista proteiinia koodaavan DNA:n kanssa, jolloin signaalipolypeptidi on mainitulle proteiinille luontaisen signaalin ja toisen heterologisen signaalipolypeptidin hybridi, ja jol-
35 loin vektorilla transformoitu *Saccharomyces cerevisiae*-isäntäsolu ekspressoi ja erittää mainittua heterologista proteiinia.

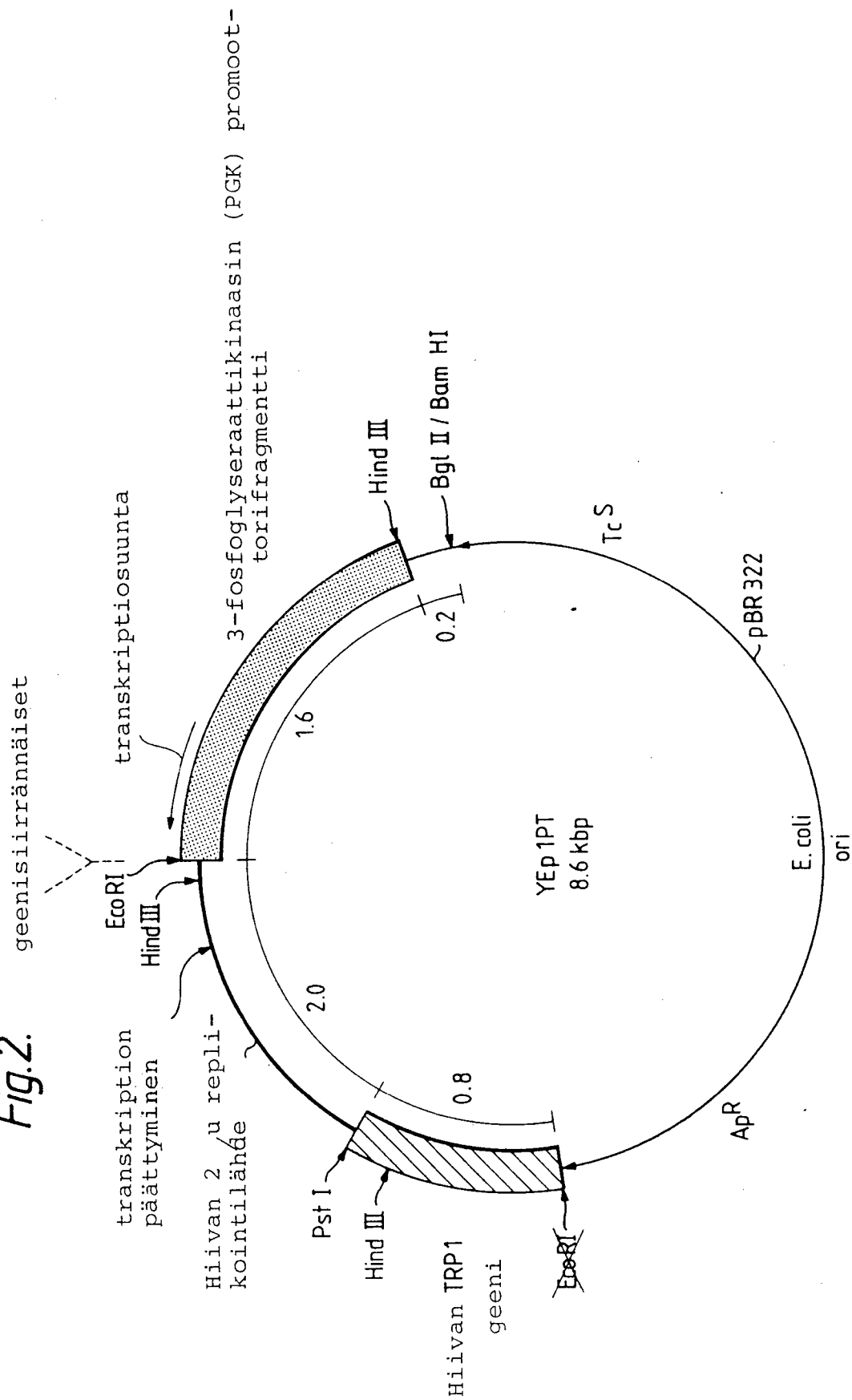
Fig.1.

Erityssignaalien aminohappojärjestykset

	<u>DdeI</u> -kohta															DNA:ssa			Irtoamiskohta						
	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2
Pre A	Met	Ala	<u>Leu</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp
Pre D	Met	Ala	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Met</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp
Pre D/A	Met	Ala	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Met</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp
Pre Y				Met	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ile	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Cys	Ile	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr
Pre B				Met	Thr	Asn	Lys	Cys	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Leu	Ser	Met	Ser	

8/1

Fig.2.



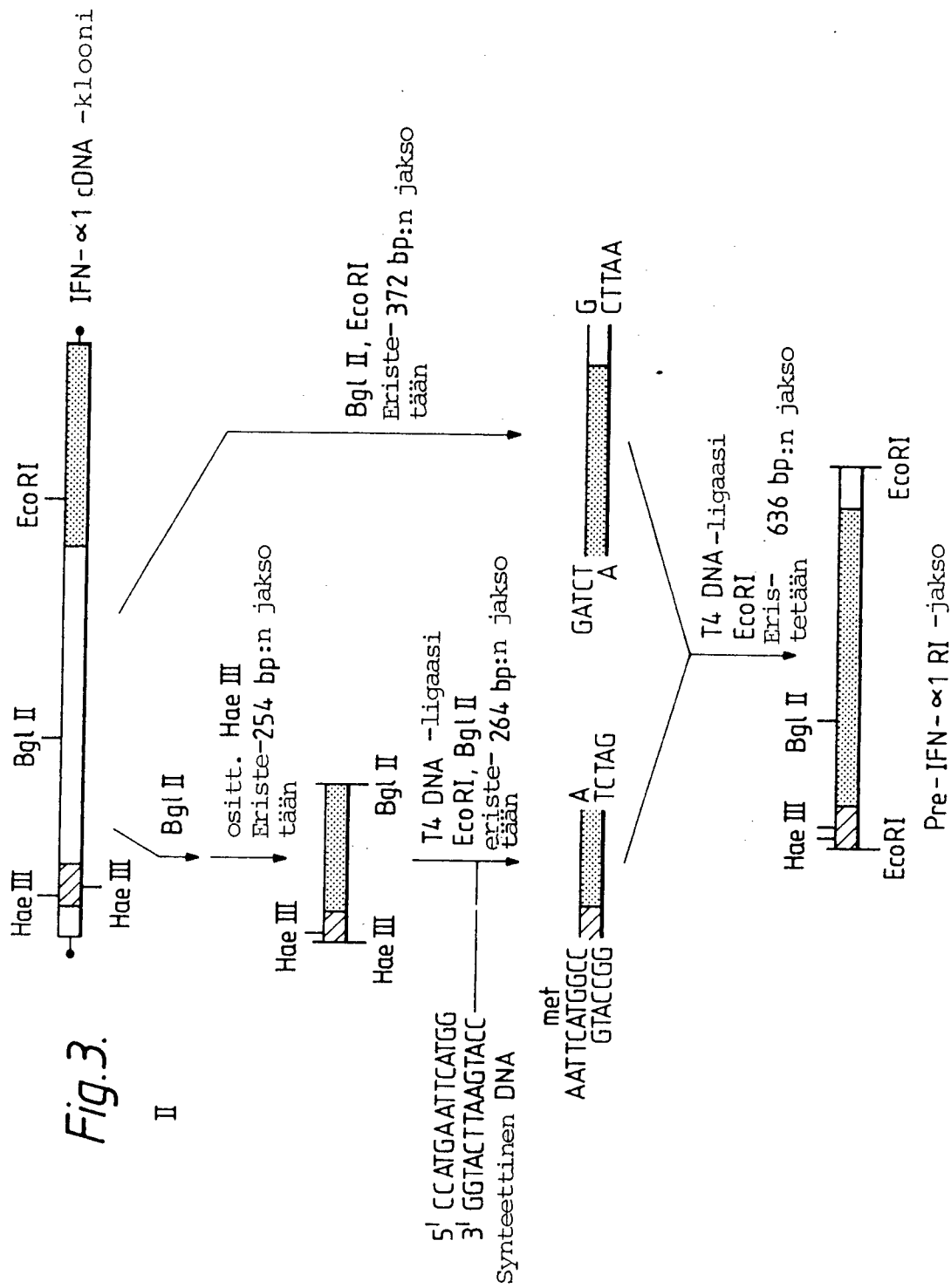
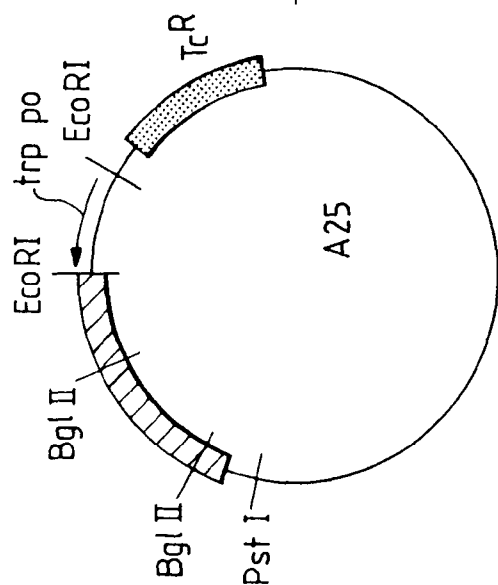
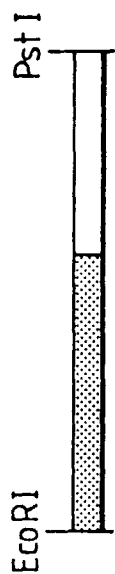


Fig.4.

III



Eristetään
EcoRI, Pst I
876 bp:n jakso

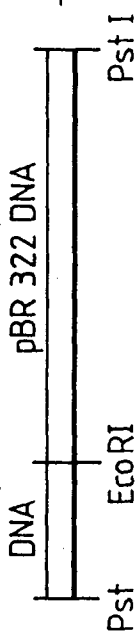


230 bp

2 μ

748 bp

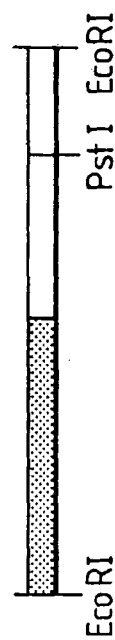
pBR 322 DNA



T4 DNA-ligaasi

EcoRI

Eristetään
1096 bp:n jakso



Valmis IFN- α 2 RI-jakso

Fig.5.

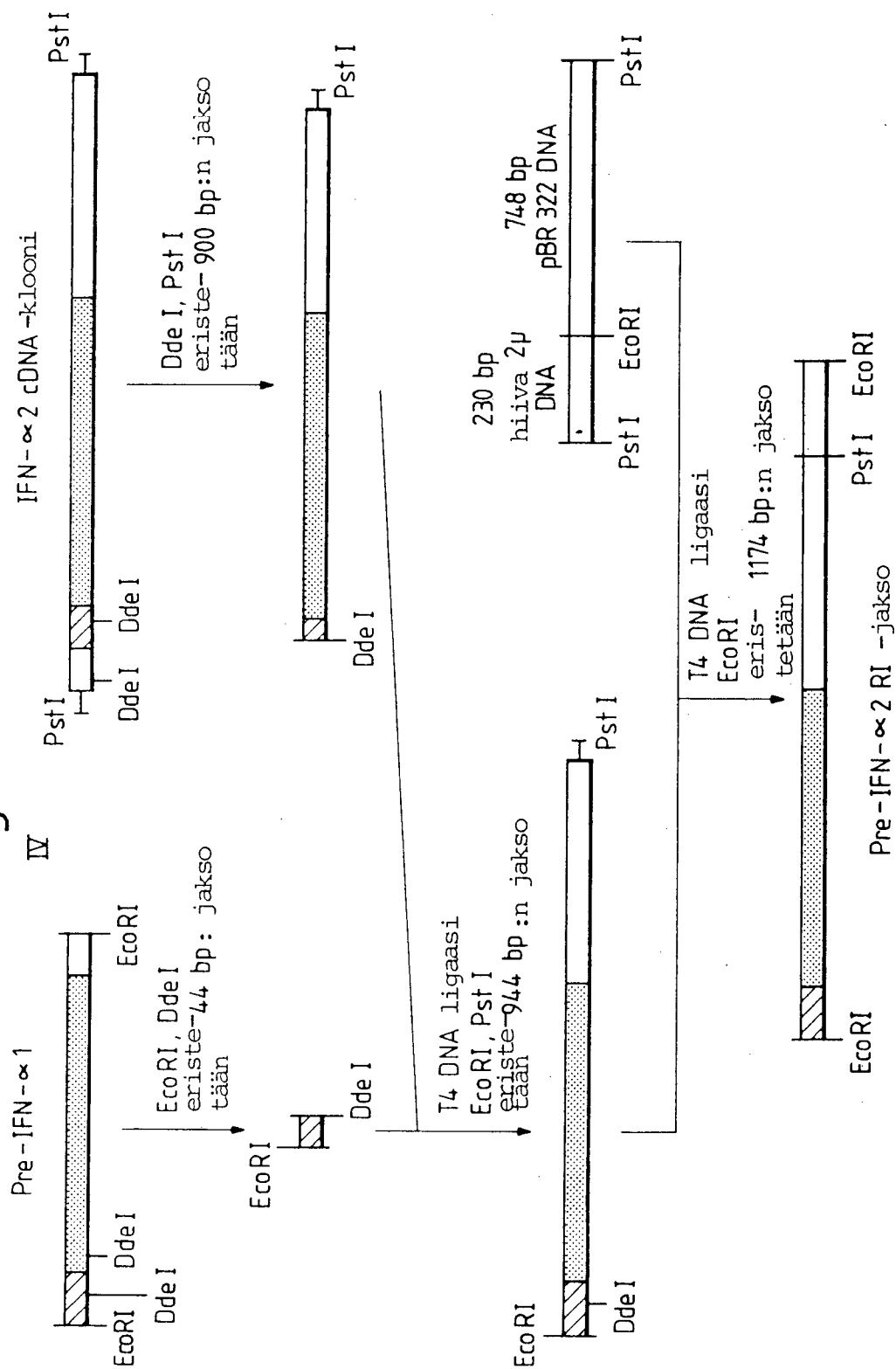
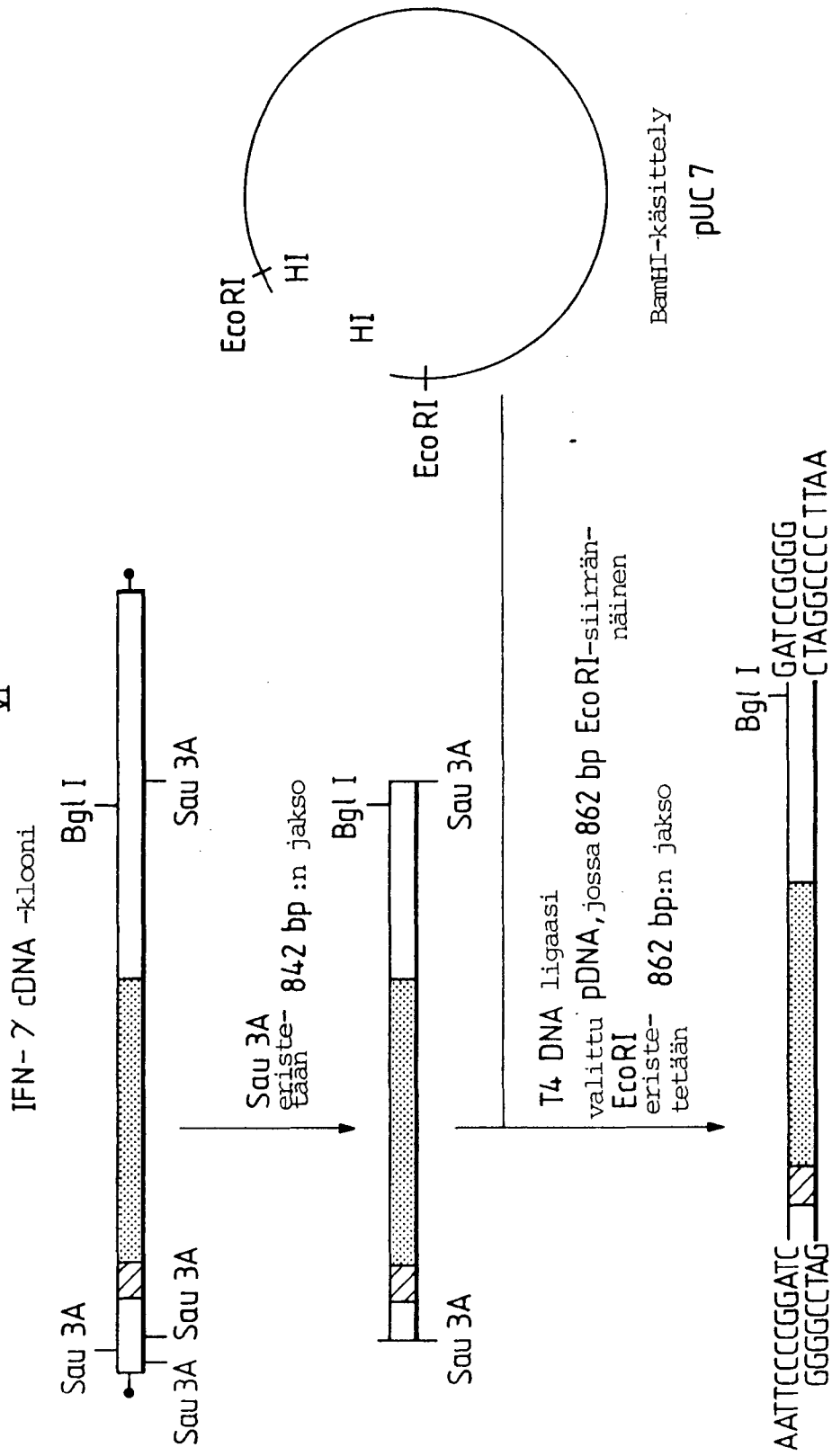


Fig. 6.

IV



Pre-IFN- γ RI - jakso, jossa 70 bp:n esijakso

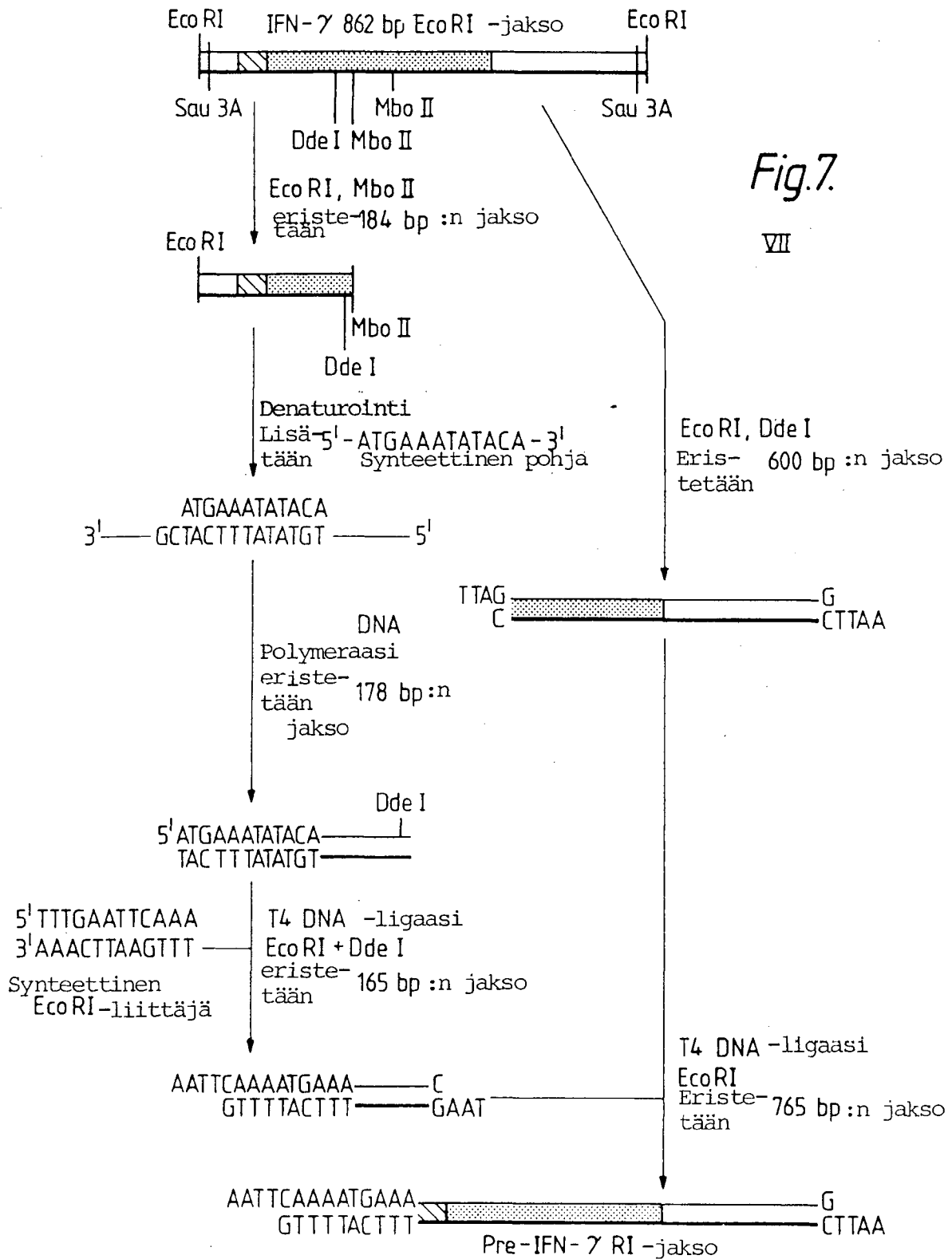


Fig.8.

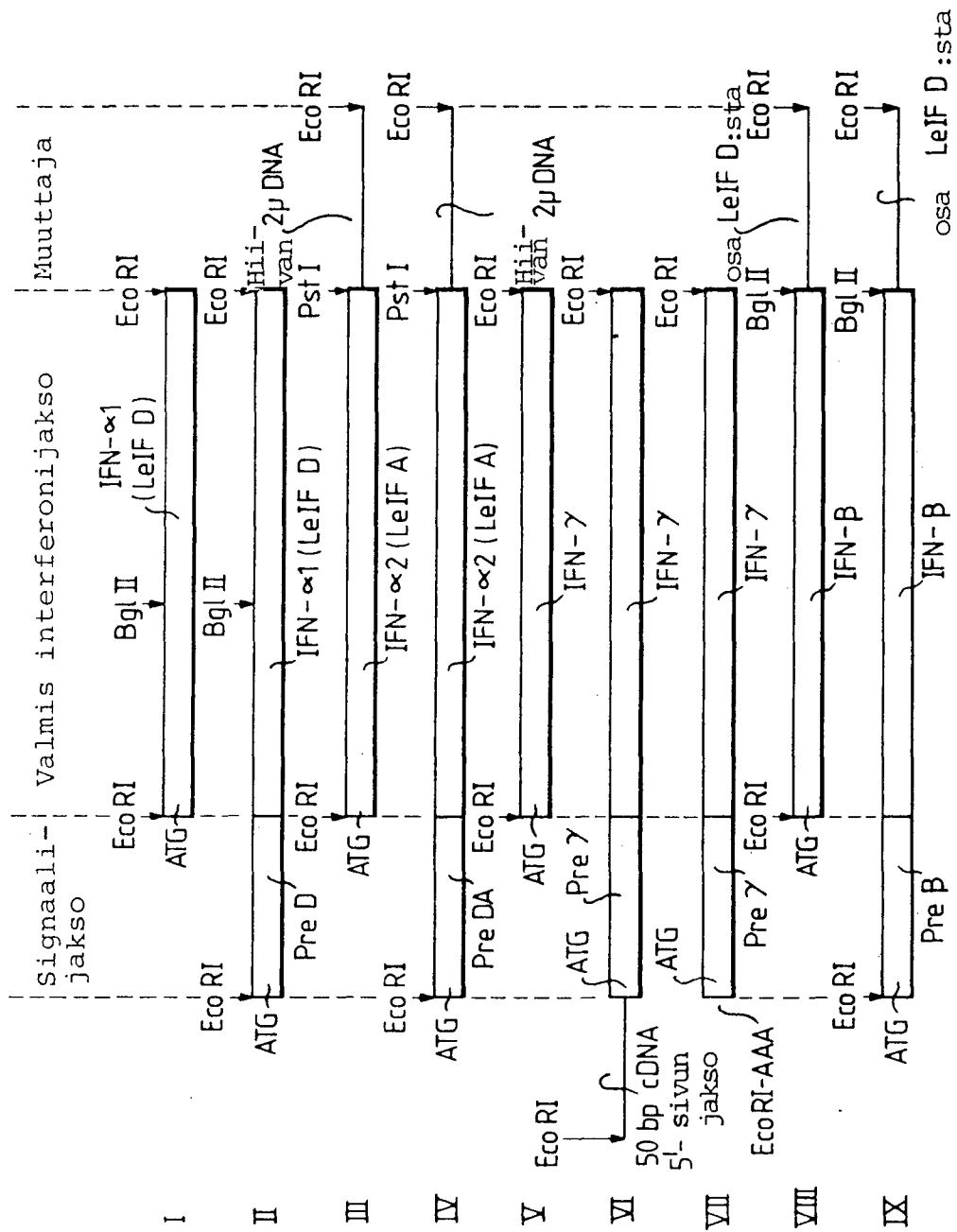
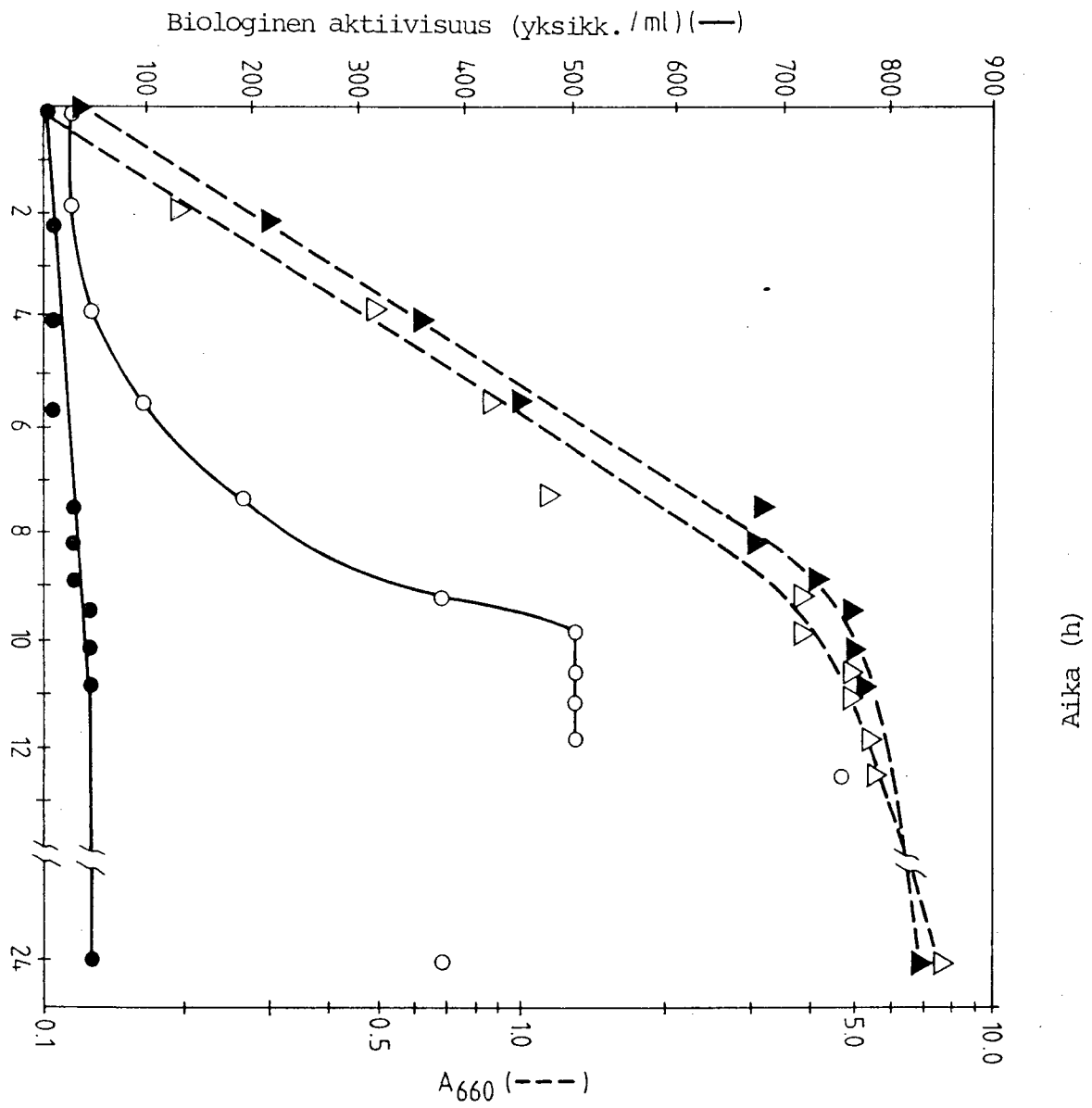
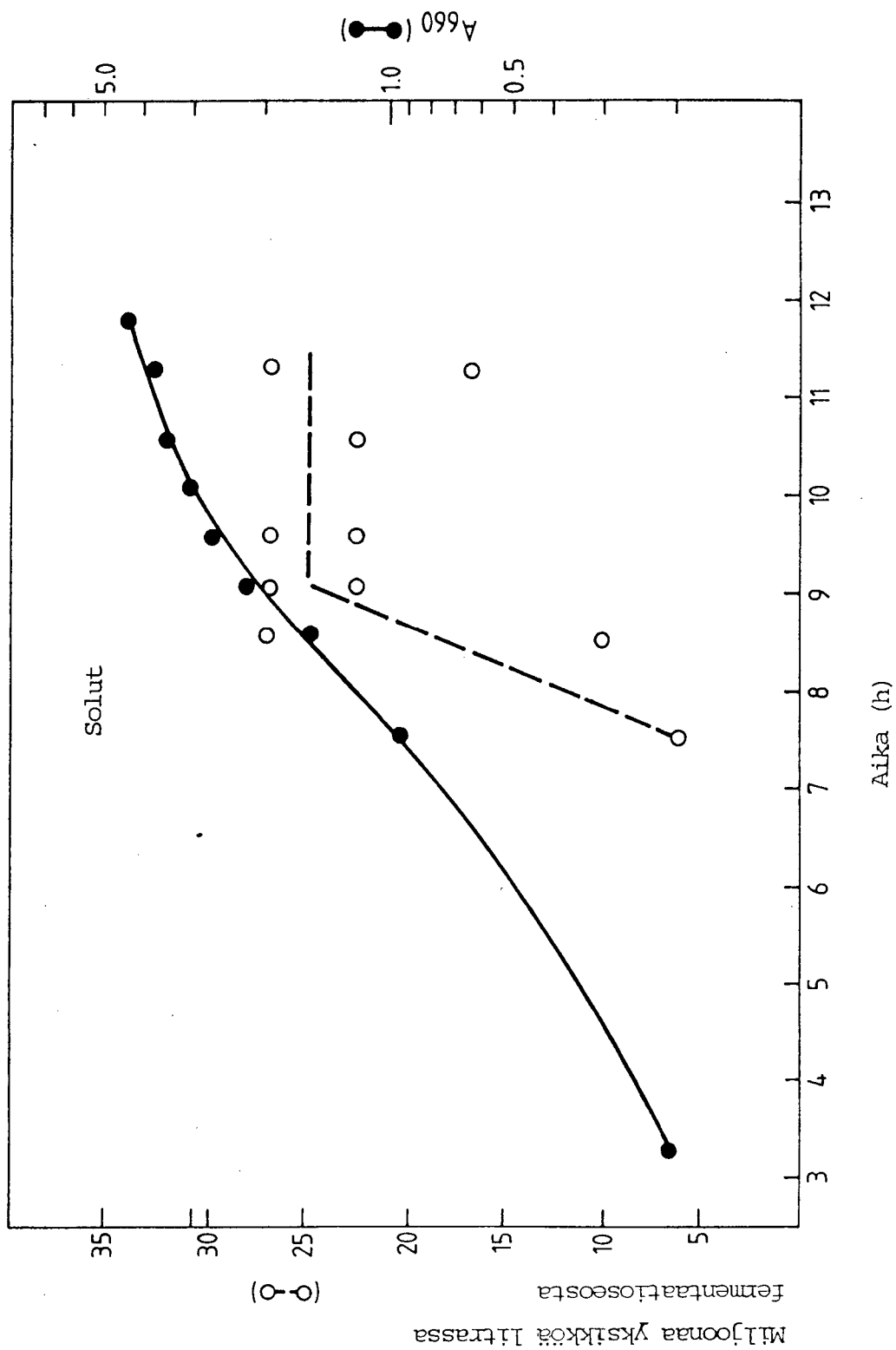


Fig. 9.



K u v a 9

Fig.10a.



Aika (h)

(Keräys)

Fig. 10b.

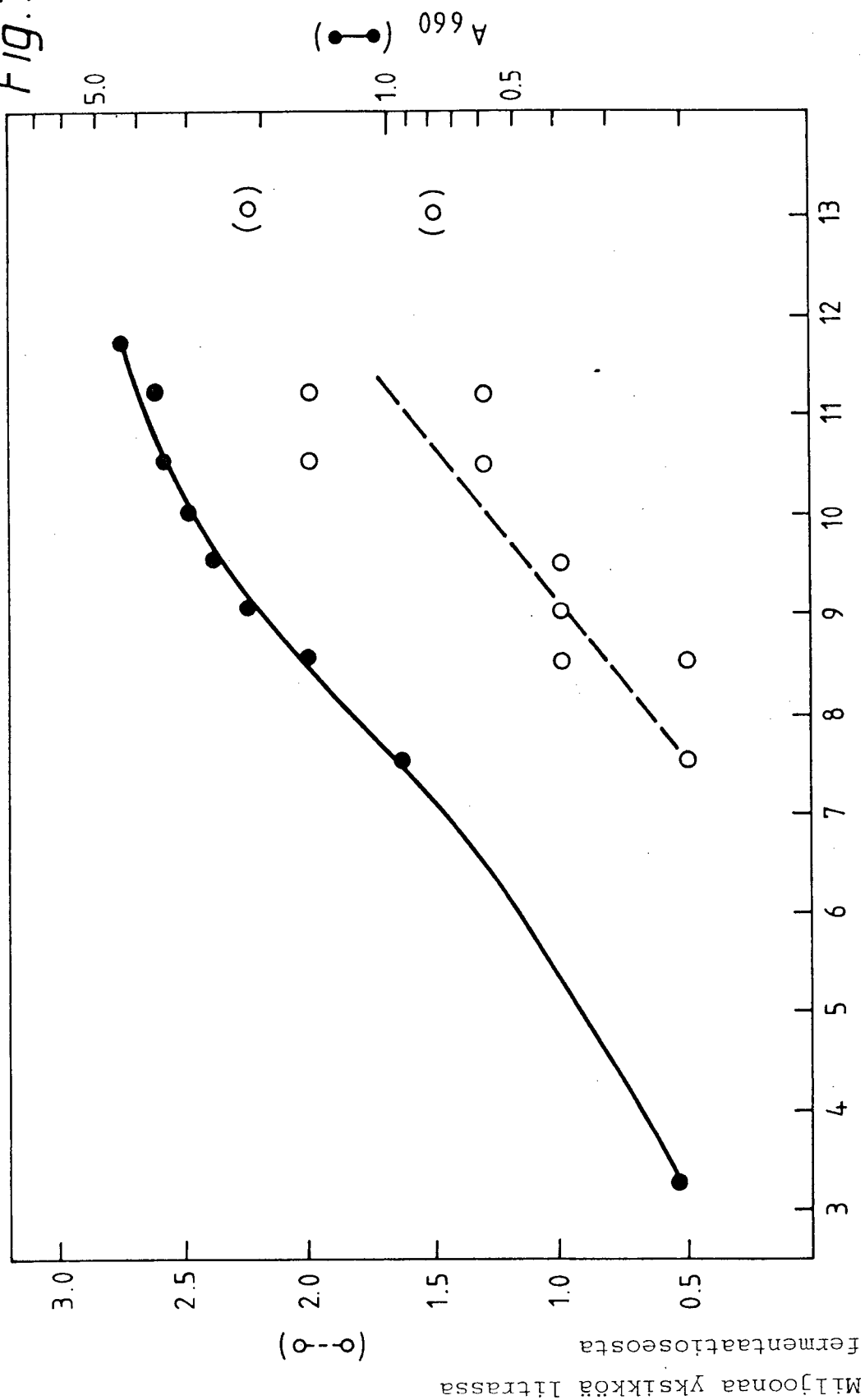


Fig.11.

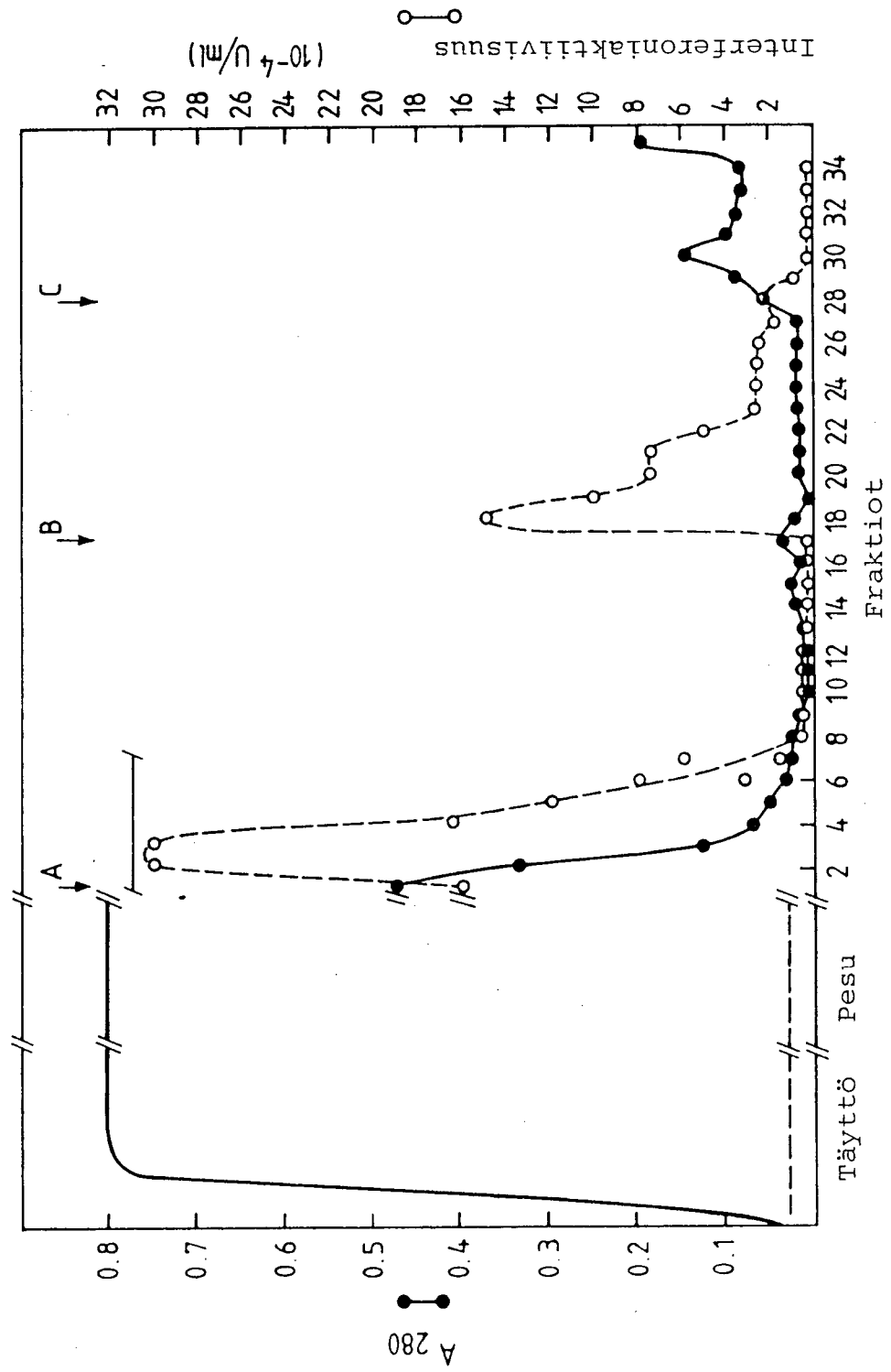


Fig.12.

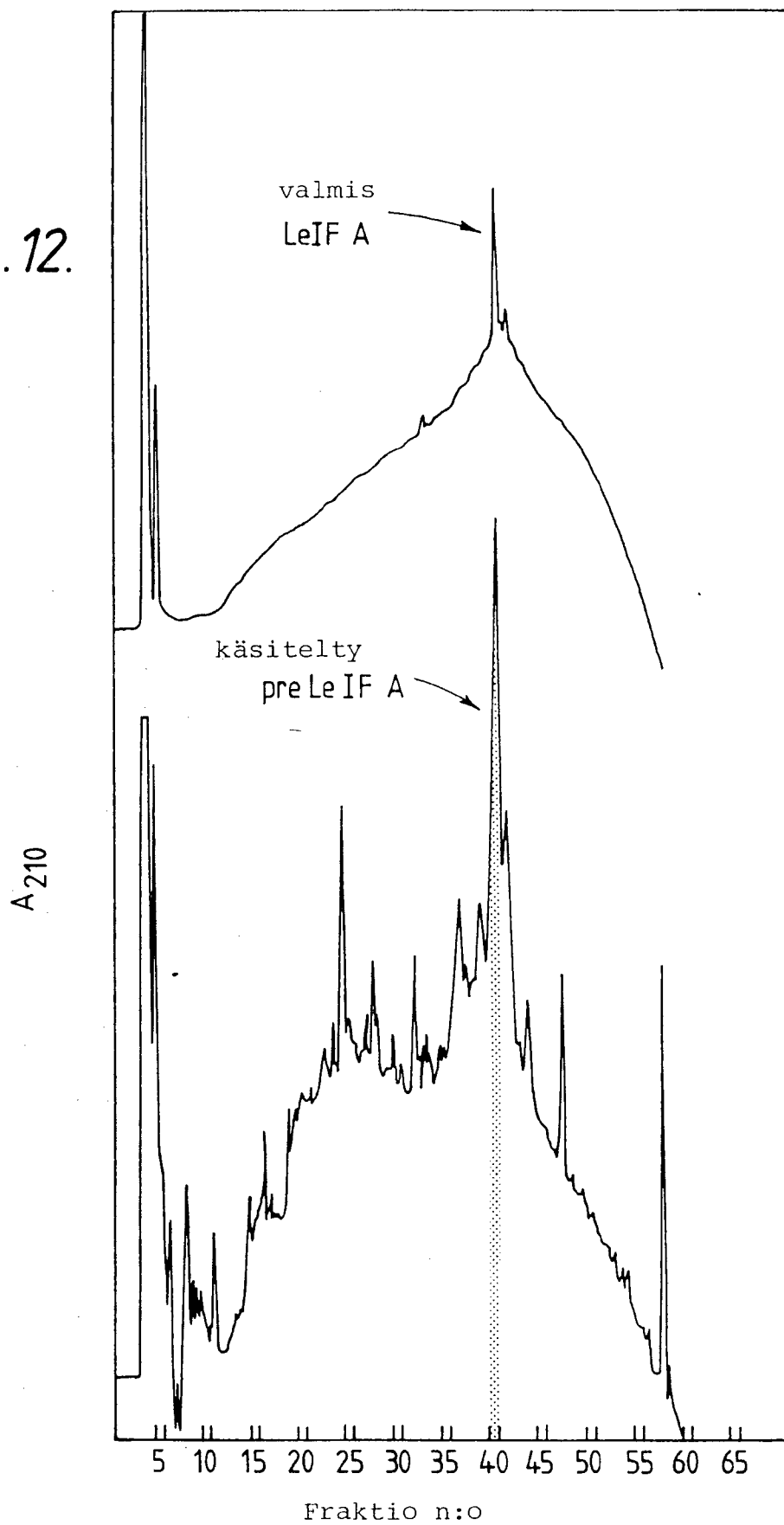


Fig.13.

(pre D/A) LeIF A:n, (pre D) LeIF D:n, ja preHGH:n käsittely hiivassa

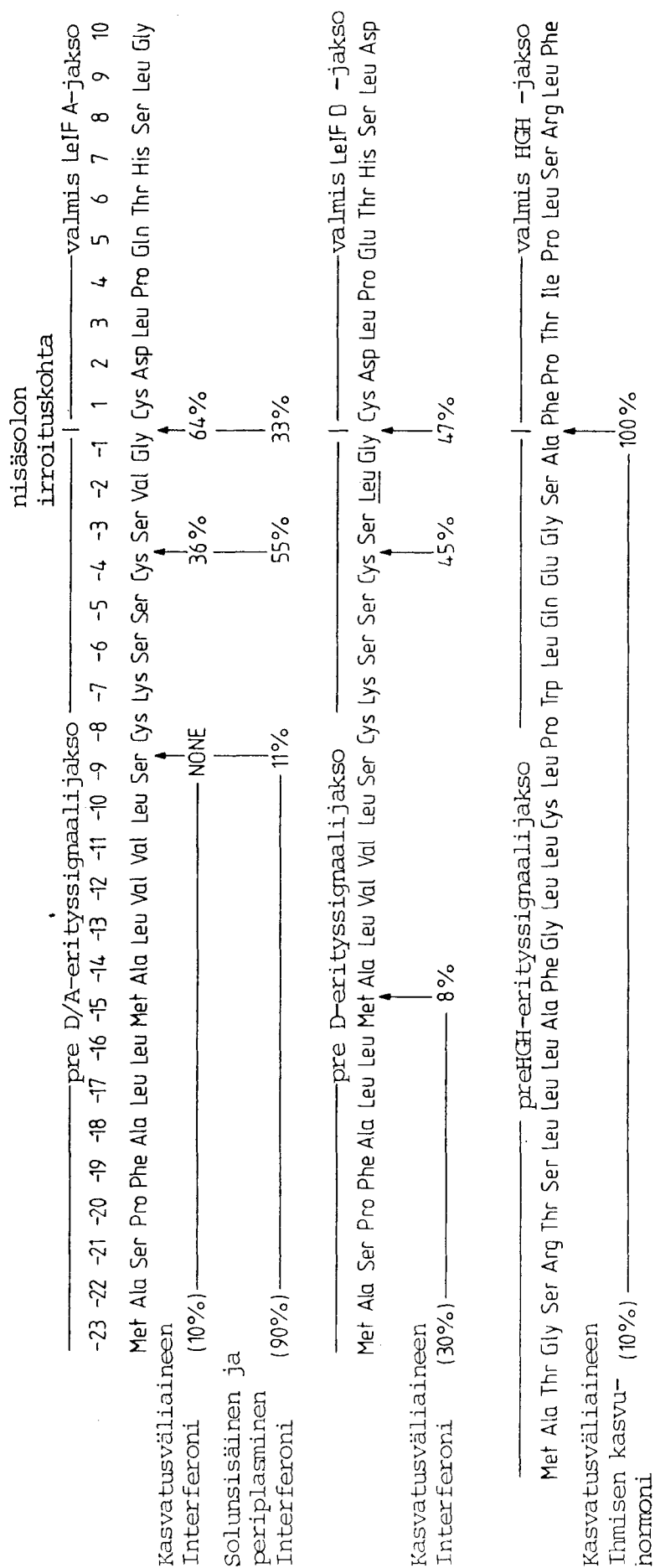


Fig. 14.

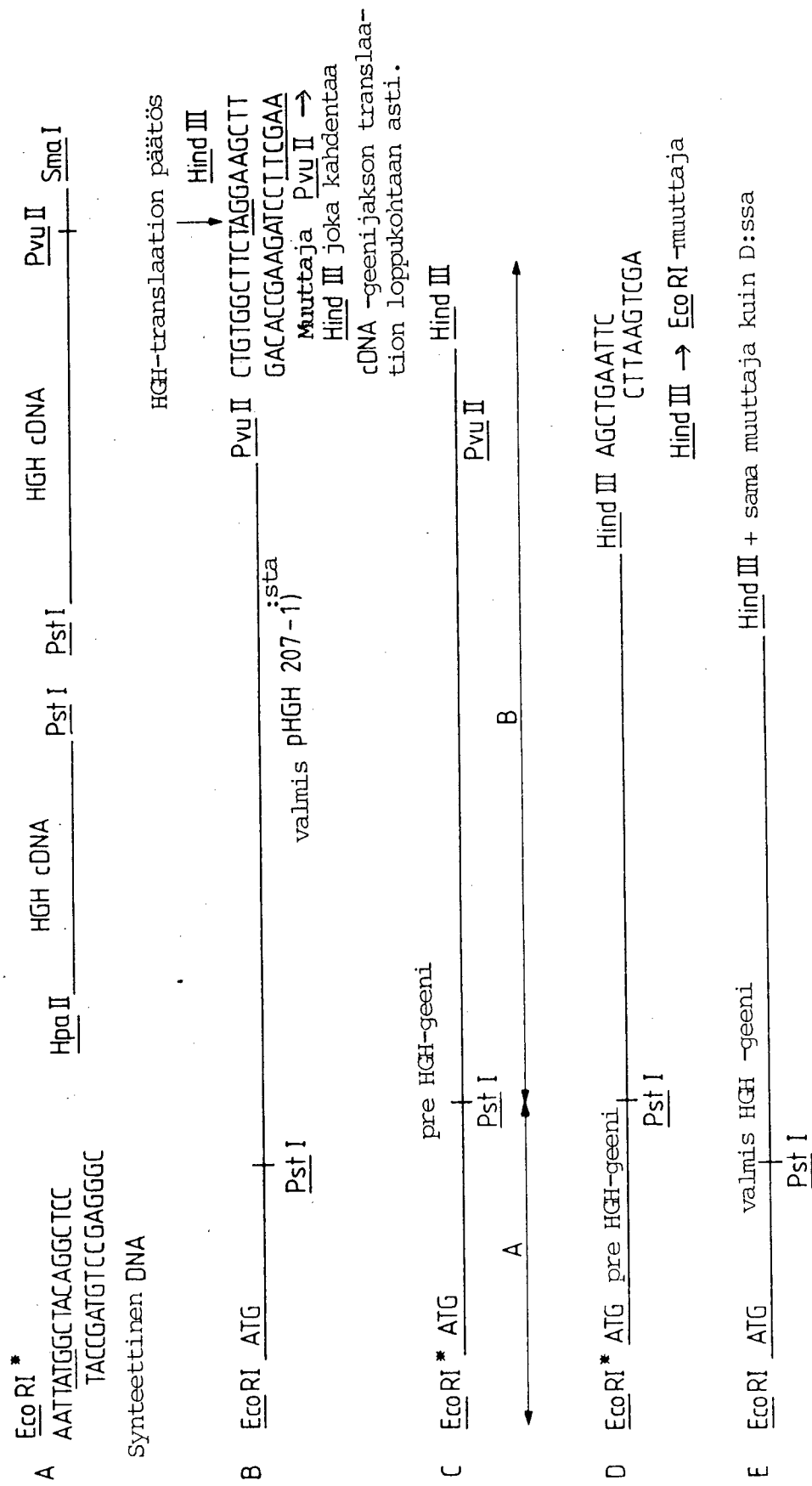


Fig. A.

EcoRI-kohdan sijoittaminen hiivan 3-fosfoglyseraattigeenin 5'-sivun DNA:han

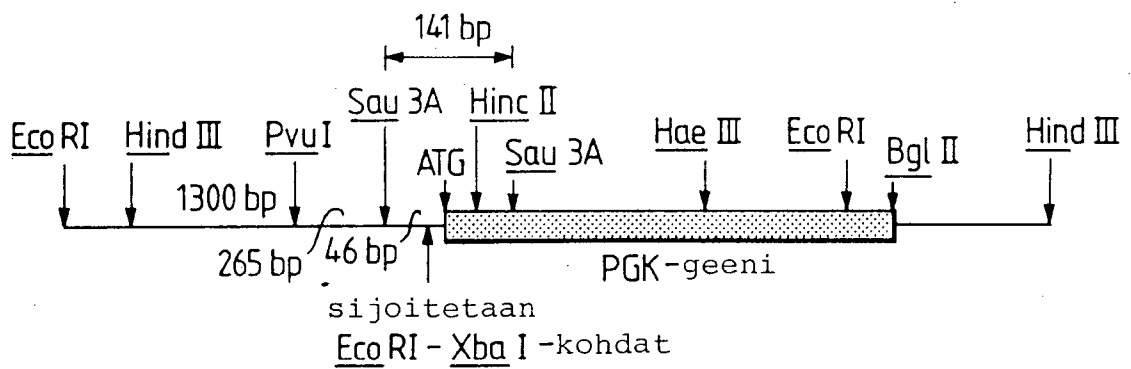
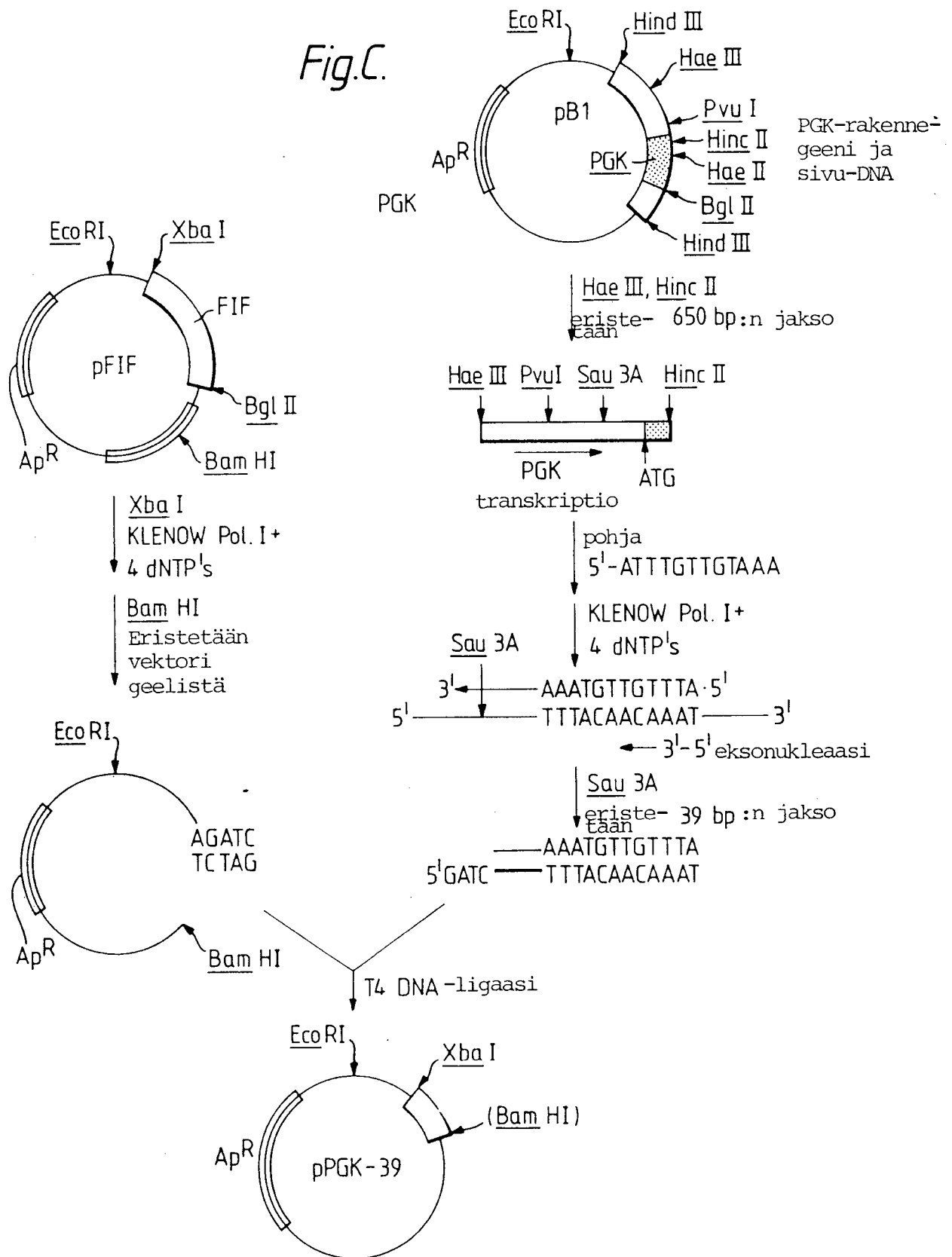


Fig.B.

Hiivan 3-fosfoglyseraattikinaasin
rakennegeenin 5'-pään ja sivu-DNA:n
aminohappojärjestys

5'-----GATCATAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAATAATAAACAATG TCT TTA TCT TCA AAG TTG CTC GTC
-40 -30 -20 -10 -1 MET SER LEU SER SER LYS LEU LEU VAL

Fig.C.



K u v a C

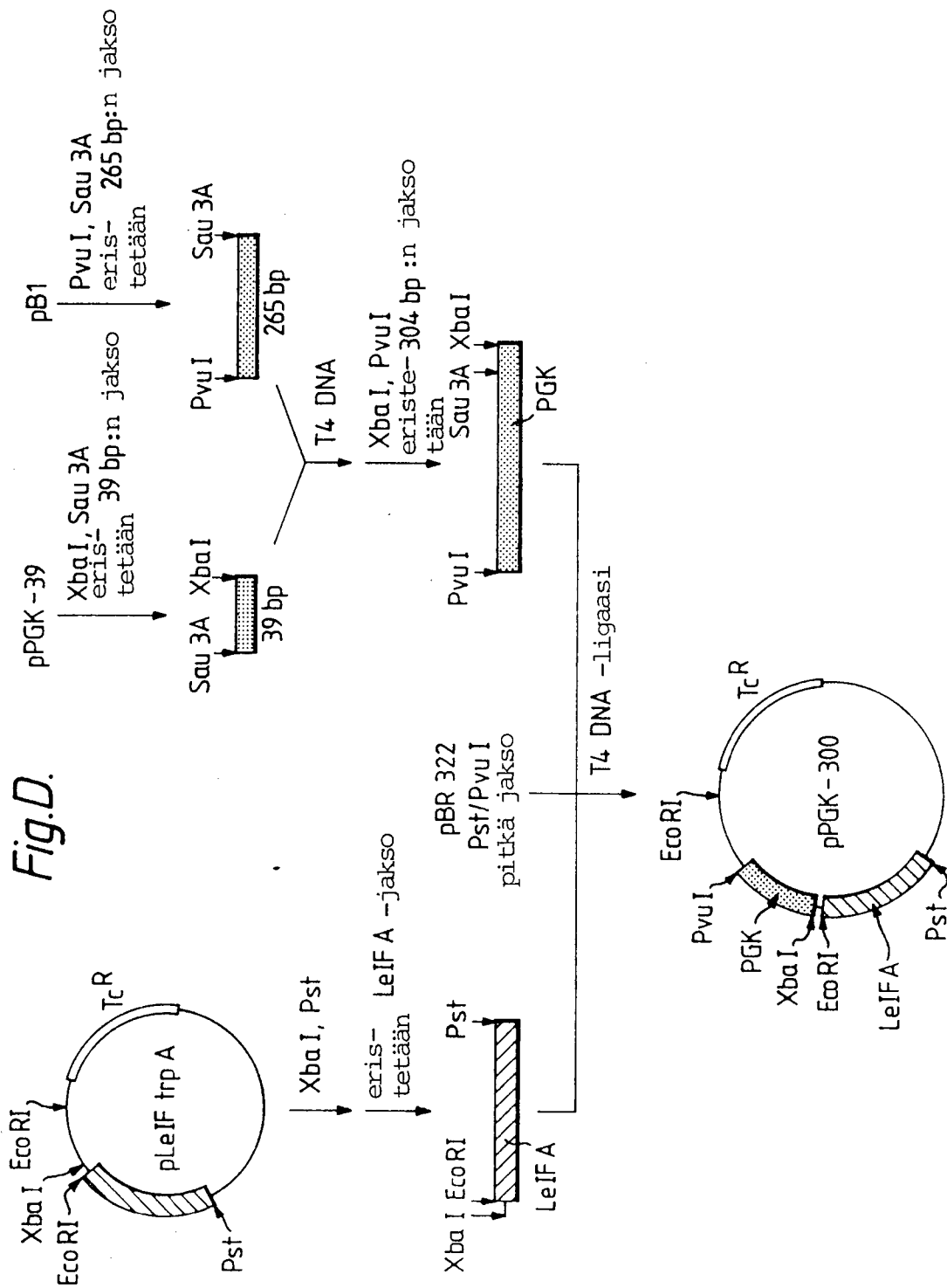
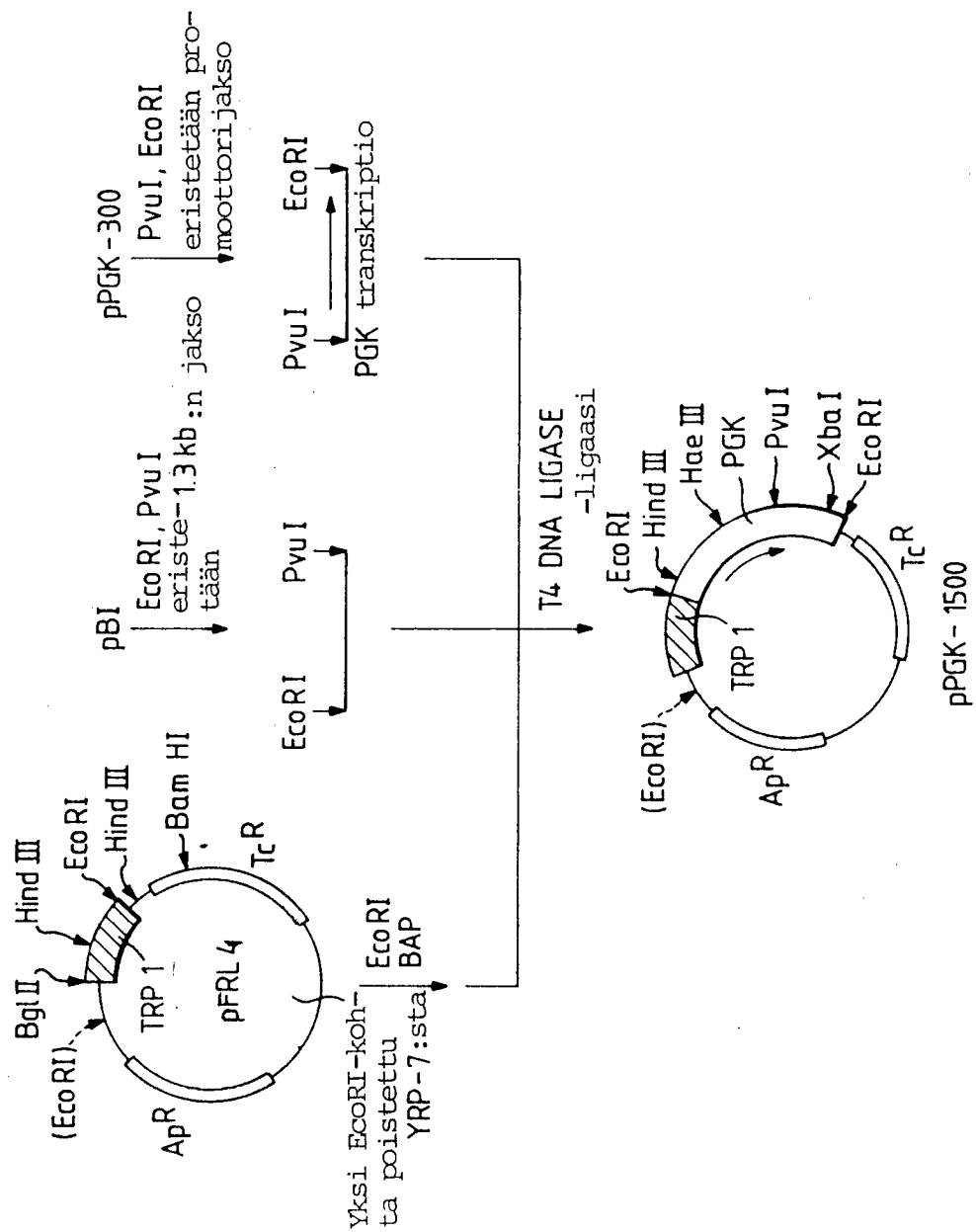


Fig.E.



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

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

FI H 812067 (C12N15/00)

CH

DE

DK

FR

GB H 2068969

NO

SE

US

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

EP _____

WO _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

8/6-89

Järni Kloum

Allekirjoitus