(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 912086 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 912086

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/535
C07K 1/14
C12N 15/27
C12N 1/21
C12P 21/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.04.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.04.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **31.10.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

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

30.04.1990 GB 9009623
20.06.1990 GB 9013773
24.07.1990 GB 9016215
11.02.1991 GB 9102799

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **ZENECA Limited,** Imperial Chemical House, 9 Millbank, London, SW1P 3JF, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Camble, Roger,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)
2 • **Carr, Heather,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)
3 • **Timms, David,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)
4 • **Wilkinson, Anthony James,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

40370 NCIMB

Polypeptidejä

Esillä oleva keksintö koskee jyvässolupesäkkeitä stimuloivan tekijän (G-CSF) johdannaisia, joiden liuosstabiilisuus on hyvä, sekä menetelmiä niiden valmistamiseksi ja niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia.

Pesäkkeitä stimuloivat tekijät ovat luokka proteiinihormoneja, jotka stimuloivat spesifisten verisolutyyppien kuten jyvässolujen lisääntymistä ja funktiota. Jyvässolut ahmivat ja tuhoavat mikrobihyökkääjiä ja solujätettä ja edustavat siten elintärkeää tekijää tulehdusvasteessa. Tässä suhteessa jyvässolut kykenevät luomaan ulokkeina valejalkoja ja livahtamaan verisuonipuusta pintasolukkosoluvuorin väliin. Neutrofiiliset jyvässolut voivat sitten päästä suoraan kosketukseen mikro-organismien kanssa ja tuhota ne käyttäen yksittäisiä entsyymisysteemejä kuten superoksidianioneja muodostavat. Koska jyvässoluilla verenkierrossa on vain lyhyt elinaika (noin 6 - 12 tuntia) ja ne tuhoutuvat funktionsa puitteissa, luuytimen kantasolujen on luotava yhtä paljon jyvässoluja kuin punaisia verisoluja päivittäin. Edelleen tämän jyvässolujen tuotantonopeuden on kohottava valtavasti, jotta tulehduksen asettamat vaatimukset täyttyisivät. Jyvässolujen nopeasta vaihtuvuudesta seurauksena jyvässolutiitteri laskee nopeasti, jos luuydin on vaurioitunut esimerkiksi syöpäkemoterapian, säteilyn, aids-sairauden tai hematologisten häiriötilojen vaikutuksesta, jolloin potilaat ovat taipuvaisia saamaan sietokykynsä ylittävän tulehduksen. Itse asiassa verenmyrkytys on syöpäpotilailla tavallinen kuolinsyy, koska säteilyhoito, kemoterapia tai syöpäsairaus on tuhonnut heidän luuydintään.

Jyvässolupesäkkeitä stimuloivaa tekijää (G-CSF) ovat kirjallisuudessa kuvanneet Wallet, K., et al., Proc.-Natl.Acad.Sci. U.S.A. 82 1526 - 1530, ja sitä on kuvattu niinikään EP-patenttijulkaisussa nro 169 566, sekä PCT-

patenttijulkaisussa nro WO 87/01132. G-CSF:n on osoitettu stimuloivan jyvässolutuotantoa in vivo ja sen funktiolla olevan minimaaliset sivuvaikutukset. Tästä seurauksena humaani-G-CSF:n arvellaan mahdollisesti osoittautuvan käyttökelpoiseksi neutrofiilien vähäisen määrä veressä hallitsemiseksi, joka tila liittyy kemoterapiaan, sädehoitoon, säteilyonnettomuuteen tai autologiseen luuydinsiirtoon. Lisäksi G-CSF:llä saattaa olla käyttöä aidssairauteen liittyvän luuytimen tukahtumisen stimuloinnissa, selkäytimen vajaakehittyneisyysoireyhtymien hoidossa, joille sairauksille ovat tunnusomaisia jyvässolufunktion epänormaalisuudet, sekä lisänä vakavien tulehdusten hoidossa.

Edeltävän lisäksi tiettyjä G-CSF-analogeja on kuvattu PCT-patenttijulkaisussa nro WO 87/01132, EP-patenttijulkaisussa nro 243 153, EP-patenttijulkaisussa nro 256 843, EP-patenttijulkaisussa nro 272 703, sekä julkaisussa Biochem.Biophys.Res.Commun. 159:1 (1989) 103 - 111, Kuga, T., et al.. Edelleen G-CSF:ää ja [Ser^{17}]-G-CSF:ää on modifioitu substituoimalla kysteiini- ja seriinitähteitä asemassa 17, mutta tällaisilla muutoksilla ei päästy haluttuun vaikutukseen (Prot.Engin. 3:4 (1990) 360).

G-CSF:llä ja sen analogeilla, joihin edellä viitattiin, on taipumus olla epästabiileja liuoksessa sikäli, että seisoessaan niillä on taipumus saostua liuoksesta, mistä seuraa lyhyt varastointiaika sekä ongelmia varastoinnissa korkeina pitoisuuksina. Lisäksi G-CSF:llä ja sen tietyillä analogeilla, joihin edellä viitattiin, on taipumus kovalenttiin aggregaatioon varastoitaessa.

Esillä oleva keksintö perustuu modifikaatioiden löytymiseen, jotka voidaan tehdä G-CSF:ään tai sen johdannaiseen, jolla on luontaisesti esiintyvän G-CSF:n aminohapposekvenssi osittain tai kokonaisuudessan ja ainakin yksi sen biologisista ominaisuuksista, esimerkiksi luon-

taisesti esiintyvän humaani-G-CSF:n, liuosstabiilisuuden parantamiseksi.

Täten esillä olevan keksinnön yhden ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannainen, jolla on ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista ja jonka liuosstabiilisuus (tässä määritellyn mukaisesti) on ainakin 35 % pitoisuutena 5 mg/ml, jolloin mainitussa johdannaisessa ainakin natiivin sekvenssin Cys^{17} on korvattu Ser^{17}-tähteellä ja natiivin sekvenssin Asp^{27} on korvattu Ser^{27}-tähteellä.

Esillä olevan keksinnön mukaisiin johdannaisiin on voitu sopivasti suorittaa ainakin yksi seuraavista modifikaatioista:

a) natiivissa sekvenssissä Glu^{11} on korvattu Arg^{11}-tähteellä;

b) natiivissa sekvenssissä Leu^{15} on korvattu Glu^{15}-tähteellä;

c) natiivissa sekvenssissä Lys^{23} on korvattu Arg^{23}-tähteellä;

d) natiivissa sekvenssissä Gly^{26} on korvattu Ala^{26}-tähteellä;

e) natiivissa sekvenssissä Gly^{28} on korvattu Ala^{28}-tähteellä;

f) natiivissa sekvenssissä Ala^{30} on korvattu Lys^{30}- tai Arg^{30}-tähteellä;

g) natiivissa sekvenssissä Lys^{34} on korvattu Arg^{34}-tähteellä;

h) natiivissa sekvenssissä Lys^{40} on korvattu Arg^{40}-tähteellä;

i) natiivissa sekvenssissä Pro^{44} on korvattu Ala^{44}-tähteellä;

j) natiivissa sekvenssissä Leu^{49} on korvattu Lys^{49}-tähteellä;

k) natiivissa sekvenssissä Gly^{51} on korvattu Ala^{51}-tähteellä;

l) natiivissa sekvenssissä Gly^{55} on korvattu Ala^{55}-tähteellä;

m) natiivissa sekvenssissä Trp^{58} on korvattu Lys^{58}-tähteellä;

n) natiivissa sekvenssissä Pro^{60} on korvattu Ser^{60}-tähteellä;

o) natiivissa sekvenssissä Pro^{65} on korvattu Ser^{65}-tähteellä;

p) natiivissa sekvenssissä Pro^{111} on korvattu Glu^{111}-tähteellä;

q) natiivissa sekvenssissä Thr^{115} on korvattu Ser^{115}-tähteellä;

r) natiivissa sekvenssissä Thr^{116} on korvattu Ser^{116}-tähteellä; ja

s) natiivissa sekvenssissä Tyr^{165} on korvattu Arg^{165}-tähteellä.

Edullisesti läsnä on ainakin yksi lisämodifikaatio, joka valitaan kohdista (b) - (s), jolloin erityisen edullisesti läsnä on ainakin yksi lisämodifikaatio, joka on valittu kohdista (b), (d), (e), (f), (n) ja (o), joista lisämodifikaatioista (o) on erityisen edullinen.

Edullisemmin lisämodifikaatio käsittää ainakin yhden seuraavista:

i) natiivissa sekvenssissä Gln^{11}, $Pro^{60,65}$ on korvattu tähteillä Arg^{11}, $Ser^{60,65}$;

ii) natiivissa sekvenssissä Ala^{111}, $Thr^{115,116}$ on korvattu tähteillä Glu^{111}, $Ser^{115,116}$;

iii) natiivissa sekvenssissä Gln^{11}, Trp^{58}, Tyr^{165} on korvattu tähteillä $Arg^{11,165}$, Lys^{58};

iv) natiivissa sekvenssissä Leu^{15}, $Gly^{26,28}$, Ala^{30} on korvattu tähteillä Glu^{15}, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}; tai

v) natiivissa sekvenssissä Asp^{27}, Pro^{44}, Leu^{49}, $Gly^{51,55}$, Trp^{58} on korvattu tähteillä $Lys^{49,58}$, $Ala^{44,51,55}$;

Lisämodifikaatio voi samoin edullisesti käsittää ainakin yhden seuraavista:

vi) natiivissa sekvenssissä Leu^{15}, $Gly^{26,28}$, Ala^{30} on korvattu tähteillä Glu^{15}, $Ala^{26,28}$, Arg^{30};

vii) natiivissa sekvenssissä Pro^{65} on korvattu tähteellä Ser^{65};

viii) natiivissa sekvenssissä $Pro^{60,65}$ on korvattu tähteellä $Ser^{60,65}$; tai

ix) natiivissa sekvenssissä Glu^{11}, Pro^{65} on korvattu tähteillä Arg^{11}, Ser^{65}.

Edellä määritellyt modifikaatiot voidaan siten haluttaessa suorittaa mihin tahansa polypeptidiin, jolla on ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista, molekyylin liuosstabiilisuuden parantamiseksi. Esillä olevan keksinnön mukaiset modifikaatiot voidaan siten suorittaa tällaisiin polypeptideihin, joiden aminohapposekvenssi poikkeaa tässä luontaisesti esiintyville G-CSF-lajeille spesifioidusta suhteessa yhden tai useamman tähteen identiteettiin tai sijaintiin (esimerkiksi substituutiot, pää- tai sisäiset lisäykset ja deleetiot). Esimerkkejä tällaisista polypeptideistä voisivat olla ne, joita on lyhennetty, esimerkiksi deleetioilla; tai ne, jotka ovat hydrolyysia vastaan stabiilimpia (ja joilla siten voi olla korostuneempia tai pitkäaikaisempia vaikutuksia kuin luontaisesti esiintyvällä); tai joita on muutettu yhden tai useamman mahdollisen O-glykosylaatiokeskuksen deletoimiseksi (mikä saattaa johtaa korkeampiin aktiivisuuksiin hiivassa tuotetuissa tuotteissa); tai joista on poistettu tai joissa on korvattu yksi tai useampi kysteiinitähde, esimerkiksi alaniini- tai seriinitähteillä, ja jotka ovat mahdollisesti helpommin eristettävissä aktiivisessa muodossa mikrobisysteemeistä; tai joissa yksi tai useampi tyrosiinitähde on korvattu fenyylialaniinilla, ja jotka voivat sitoutua helpommin tai vähemmän helposti humaani-G-CSF-reseptoreihin kohdesoluissa. Esitetyt modifikaatiot (a) - (s), edullisesti (i) - (ix), voidaan siten suorittaa esimerkiksi joko natiiviin G-

CSF:ään, jossa natiivin sekvenssin Cys^{17} on korvattu tähteellä Ser^{17}, tai sen alleellisiin variantteihin tai analogeihin, joilla tiedetään olevan ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista, kuten ne, joita kuvataan edellä viitteinä mainituissa julkaisussa.

Niillä esillä olevan keksinnön mukaisilla polypeptideillä, jotka on testattu, on todettu olevan aiempaa paremman liuosstabiilisuuden verrattuna vastaavaan modifioimattomaan polypeptidiin samalla, kun ne joko ovat säilyttäneet merkittävän biologisen aktiivisuuden tai kun niiden biologinen aktiivisuus on jopa parantunut.

Edeltävästä ilmenee, että ominaisuus liuosstabiilisuus ei ole sama kuin ominaisuus liukoisuus. Liuosstabiilisuus on aineen alentunut taipumus saostua liuoksesta fysiologisissa pH-, lämpötila- ja ionivahvuusolosuhteissa.

Liuosstabiilisuus mitataan tässä määrittämällä G-CSF-johdannaisen prosentuaalinen osuus, joka on jäljellä liuoksessa fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa 14 päivän jälkeen 37 °C:ssa lähtien alkupitoisuudesta 1 mg/ml, 5mg/ml ja/tai 10 mg/ml. Liuosstabiilisuuden mittausta kuvataan yksityiskohtaisesti jäljempänä verrokkiesimerkissä 4. Kätevästi tämän keksinnön mukaisten polypeptidien liuosstabiilisuus pitoisuutena 5 mg/ml on ainakin 35 %, mielellään ainakin 50 % ja edullisesti ainakin 75 %. Edullisesti esillä olevan keksinnön mukaisten polypeptidien liuosstabiilisuus pitoisuutena 10 mg/ml on ainakin 75 %, etenkin ainakin 85 %.

Ilmaisulla "luontaisesti esiintyvä G-CSF" tarkoitetaan tässä käytettynä niitä G-CSF-lajeja, joita on todettu esiintyvän luonnossa, ja joihin lukeutuvat ne kaksi polypeptidiä, joiden aminohapposekvenssit esitetään julkaisussa SEQ ID nro 37. Nämä kaksi polypeptidiä poikkeavat toisistaan vain siinä, että tripeptidi-insertti Val-Ser-Glu esiintyy yhdessä polypeptidissä asemien 35 ja 36 välissä, mutta puuttuu toisesta. Kautta tämän patenttiseli-

tyksen käytetty numerointijärjestelmä perustuu luontaisesti esiintyvään polypeptidiin, joka on vailla Val-Ser-Glu-inserttiä ja ilmaisulla "natiivi" tässä käytettynä tarkoitetaan tätä polypeptidiä, joka on vailla Val-Ser-Glu-inserttiä. Huomattakoon, että esillä oleva keksintö soveltuu G-CSF:n kaikkiin luontaisesti esiintyviin muotoihin ja sen edellä kuvattuihin analogeihin, ja polypeptidin asemanumeroiden vastaava uudelleenasettelu saattaa olla tarpeen riippuen modifioitavaksi valitun luontaisesti esiintyvän G-CSF:n muodosta.

Esillä olevan keksinnön seuraavan ominaispiirteen mukaan annetaan käyttöön DNA-sekvenssi, joka koodittaa kokonaisuudessaan tai osittain edellä määritellyn mukaisen luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaisen aminohapposekvenssin. Tällaiset sekvenssit voivat esimerkiksi käsittää 1) mukaan sisällytettyjä edullisia kodoneja ilmentämistä valituissa ei-nisäkäsisännissä silmällä pitäen; 2) mukaan sisällytettyjä keskuksia pilkkomista restriktioendonukleaaseilla silmällä pitäen; ja/tai 3) mukaan sisällytettyjä ylimääräisiä aloitus-, lopetus- tai väli-DNA-sekvenssejä, jotka helpottavat helposti ilmennettävien vektorien rakentamista. Esillä olevan keksinnön mukaisiin DNA-sekvensseihin lukeuvat sekvenssit, jotka ovat käyttökelpoisia ilmennyksen prokaryoottisissa tai eukaryoottisissa isäntäsoluissa varmistamiseksi, ja esillä olevan keksinnön mukaiset johdannaiset voivat olla joko glykosyloidussa tai ei-glykosyloidussa muodossa riippuen valitusta isäntäsolusta. Silloin kun esillä olevan keksinnön mukainen johdannainen saadaan ei-glykosyloidussa muodossa, esimerkiksi ilmennyksen prokaryoottisissa isäntäsoluissa seurauksena, johdannainen voidaan haluttaessa glykosyloida kemiallisesti esimerkiksi nisäkäs- tai muilla eukaryoottisilla hiilihydraateilla.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan yhdistelmä-DNA-vek-

tori, joka sisältää edellä määritellyn DNA-sekvenssin. Yhdistelmä-DNA-vektori voi esimerkiksi olla biologisesti funktionaalinen plasmidi- tai virus-DNA-vektori.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä edellä määritellyn yhdistelmä-DNA-vektorin valmistamiseksi, jonka mukaan edellä määritelty DNA-sekvenssi insertoidaan vektoriin.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan prokaryoottinen tai eukaryoottinen isäntäsolu, joka on stabiilisti transformoitu tai transfektoitu edellä määritellyllä yhdistelmä-DNA-vektorilla.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä edellä määritellyn prokaryoottisen tai eukaryoottisen isäntäsolun valmistamiseksi, jonka mukaan prokaryoottinen tai eukaryoottinen solu transformoidaan tai transfektoidaan edellä määritellyllä yhdistelmä-DNA-vektorilla stabiilisti transformoidun tai transfektoidun prokaryoottisen tai eukaryoottisen isännän saamiseksi.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaisen valmistamiseksi, jonka mukaan keksinnön mukaista prokaryoottista tai eukaryoottista isäntäsolua viljellään mainitun johdannaisen saamiseksi. Menetelmään kuuluu edullisesti myös vaihe, jossa mainittu, keksinnön mukainen DNA-sekvenssi ilmentämällä tuotettu johdannainen eristetään keksinnön mukaisessa yhdistelmä-DNA-vektorissa.

Esillä olevan keksinnön mukaisissa menetelmissä käytetyt isäntäsolut ovat edullisesti prokaryoottisia kuten E. coli, mutta ne voivat olla hiivasoluja kuten Saccharomyces cerevisiae tai nisäkässoluja kuten CHO-solut (kiinalaisen hamsterin munasarjasolut).

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan farmaseuttinen koostumus, joka käsittää vaikuttavana ainesosana ainakin yhtä esillä olevan keksinnön mukaista luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaista yhdistettynä farmaseuttisesti hyväksyttävään kantajaan tai täyteaineeseen.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä hematopoieettisen terapian antamiseksi nisäkkäälle, jonka mukaan kohteelle annetaan tehokas määrä esillä olevan keksinnön mukaista johdannaista.

Esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä leukemiasolujen lisääntymisen estämiseksi, jonka mukaan kohteelle annetaan tehokas määrä esillä olevan keksinnön mukaista johdannaista.

Kuviossa 1 esitetään nukleotidisekvenssi 167 ep:n fragmentille, johon viitataan esimerkissä 1;

kuviossa 2 esitetään aminohapposekvenssi ja vastaava nukleotidisekvenssi natiiville humaani- (hu-) G-CSF:lle restriktiokeskuksineen;

kuviossa 3 esitetään aminohapposekvenssi ja vastaava nukleotidisekvenssi [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF:lle restriktiokeskuksineen;

kuviossa 4 esitetään T4-kopiointipäättäjän nukleotidisekvenssi, johon sisältyvät (a) päissä SalI- ja HindIII-restriktiokeskukset; ja (b) päissä SalI- ja StyI-restriktiokeskukset;

kuviossa 5 esitetään restriktiokartta pTB357:lle (kutsutaan tässä myös pLB004:ksi);

kuviossa 6 esitetään nukleotidisekvenssi EcoRI-SalI-fragmentille, johon viitataan verrokkiesimerkissä 6(b), jolloin kuitenkin interferoni-$alfa_2$-geenisekvenssi puuttuu;

kuviossa 7 esitetään restriktiokartta pLB015:lle (kutsutaan tässä myös pICI-0080:ksi);

kuviossa 8 esitetään restriktiokartta pICI1079:lle;

kuviossa 9 esitetään restriktiokartta pICI-54:lle (kutsutaan tässä myös pCG54:ksi);

kuviossa 10 esitetään restriktiokartta pCG61:lle;

kuviossa 11 esitetään restriktiokartta pICI-1107:lle, jossa viivoitettu alue edustaa geenisekvenssiä, joka koodittaa [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF:n;

kuviossa 12 esitetään restriktiokartta pCG300:lle (jota kutsutaan tässä myös pICI-1295:ksi).

Mielellään tämän keksinnön mukaiset johdannaiset valitaan sisältämään jokin lisämodifikaatio (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) tai (ix), edellä määritellyn mukaisesti, edullisesti jokin lisämodifikaatio (i), (ii), (iv), (vi), (vii), (viii) tai (ix), ja erityisesti jokin lisämodifikaatio (ii), (iv), (vi), (vii), (viii) tai (ix).

Erityisen edullisia esillä olevan keksinnön mukaisia johdannaisia hyvän liuosstabiilisuutensa ansiosta ovat:

[Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

[Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-G-CSF;

[Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-G-CSF;

[$Arg^{11,23}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

[$Arg^{11,34}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

[$Arg^{11,40}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

[Ala^{1}, Thr^{3}, Tyr^{4}, $Arg^{5,11}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

[Arg^{11}, $Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-G-CSF;

[$Arg^{11,165}$, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, $Lys^{30,58}$]-G-CSF;

[Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$, $Lys^{30,49,58}$]-G-CSF;

[$Arg^{11,165}$, $Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$, $Lys^{30,49,58}$]-G-CSF;

[Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Arg^{30}]-hu-G-CSF.

Erityisen edullisia keksinnön mukaisia johdannaisia erinomaisen liuosstabiilisuutensa ja hyvän spesifisen aktiivisuutensa ansiosta ovat:

i) [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

ii) [Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-G-CSF;

iii) [Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-G-CSF;

iv) [$Arg^{11,40}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

v) [$Arg^{11,23}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

vi) [$Arg^{11,165}$, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, $Lys^{30,58}$]-hu-G-CSF;

vii) [Arg^{11}, $Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-hu-G-CSF;

viii) [Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Arg^{30}]-hu-G-CSF;

ix) [Ala^{1}, Thr^{3}, Tyr^{4}, $Arg^{5,11}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF;

x) [$Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF;

xi) [Arg^{11}, $Ser^{17,27,65}$]-hu-G-CSF; ja

xii) [$Ser^{17,27,65}$]-hu-G-CSF;

joista edullisimmat ovat (i), (ii), (iii), (vi), (vii), (viii), (x), (xi) ja (xii).

Nämä viimemainitut humaani-G-CSF-johdannaiset eivät ainoastaan osoita erinomaisia liuosstabiilisuusominaisuuksia, vaan niillä on niinikään parempi spesifinen aktiivisuus luontaisesti esiintyvään humaani-G-CSF:ään verrattuna.

Esisekvenssi metioniini voi joko olla läsnä tai puuttua esillä olevan keksinnön mukaisista polypeptideistä, mutta on kätevästi läsnä.

On todettu edulliseksi käyttää pAT153:een perustuvaa tuotantovektoria, joka käsittää:

i) promoottorin ja silloin kun tarkoituksenmukaista, operaattorin sille, esimerkiksi trp-promoottorin tai T7A3-promoottorin. T7A3-promoottori on A3-promoottori bakteriofagista T7 (katso Dunn, J.J., ja Studier, F.W., J.Mol.Biol. 166 (1983) 477 - 535). Bakteriofagi-T7-DNA:n

täydellinen nukleotidisekvenssi ja T7-geeniyksiköiden sijainnit on esitetty tässä viitteessä;

ii) ribosomisitoutumiskeskussekvenssin, esimerkiksi trp-johtoribosomisitoutumiskeskussekvenssin;

iii) kloonauskeskuksen ilmennettävälle geenille;

iv) T4-kopiointipäätössekvenssin (katso SEQ ID nro 51 ja kuvio 4);

v) cer-sekvenssin (Summers, D., et al., MGG 201 (1985) 334 - 338);

vi) tetrasykliinirepressorigeenin (Tet R);

vii) tetrasykliiniresistenssigeenin (Tet A);

viii) monirestriktioentsyymitunnistussekvenssejä.

Julkaisussa SEQ ID nro 50 esitetään sekvenssi, johon sisältyy EcoRI-restriktioendonukleaasikeskus (nukleotidit 1 - 6), A3-promoottorisekvenssi (nukleotidit 7 - 52), trp-johtoribosomisitoutumiskeskussekvenssi (nukleotidit 53 - 78) ja luenta-aloituskodoni (nukleotidit 79 - 81).

Saattaa olla edullista viljellä keksinnön mukaisen johdannaisen ilmentämään kykenevää isäntää kasvualustassa, johon lisätään hiivauutetta käsittävä lisäaine. Edullisesti hiivauutetta käsittävän lisäaineen lisääminen käynnistetään ennalta määrättynä ajankohtana viljelyn aloittamisen jälkeen. Hiivauutetta käsittävän lisäaineen lisäysnopeus on edullisesti sellainen, että kasvualustasta ei lopu hiivauute. Tämän on erityisen edullista silloin, kun tuotantovektoria käytetään T7A3-promoottorin kanssa.

Saattaa niinikään olla edullista viljellä isäntää, joka on transformoitu esillä olevan keksinnön mukaista johdannaista koodittavan geenimateriaalin käsittävällä yhdistelmä-DNA-vektorilla, kun läsnä on leusiinia ja/tai treoniinia määränä, joka riittää tuottamaan esillä olevan keksinnön mukaisen johdannaisen kasvaneen akkumulaation. Täten erityisen edullisesti fermentointi suoritetaan leu-

siinin läsnä ollessa silloin, kun tuotantovektoria käytetään trp-promoottorin kanssa.

Sen lisäksi, että löydettiin modifikaatioita, joita voidaan tehdä G-CSF:ään tai sen johdannaiseen, joka käsittää luontaisesti esiintyvän G-CSF:n aminohapposekvenssin osittain tai kokonaisuudessaan ja jolla on ainakin yksi sen biologisista ominaisuuksista, liuosstabiilisuuden parantamiseksi, esillä oleva keksintö perustuu edelleen modifioitujen tekniikoiden löytymiseen tällaisten G-CSF-lajien ja niiden johdannaisten puhdistamiseksi.

Täten esimerkiksi PCT-patenttijulkaisussa nro WO 87/01132 ei julkisteta pesuaineen poistamista, etenkään N-lauroyylisarkosiinin suolan muodossa (esim. sarkosyyli), tässä PCT-patenttijulkaisussa valmistetuista G-CSF-analogeista. Tämän vuoksi oli tarpeen identifioida tällainen tekniikka, jotta esillä olevan keksinnön mukaisten G-CSF-johdannaisten liuosstabiilisuus voitaisiin määrittää korkeilla pitoisuuksilla ja jotta koostumustutkimuksia voitaisiin suorittaa. Keksinnön yhdessä suoritusmuodossa pesuaineen poistaminen suoritettiin fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (pH 7,2 - 7,5) läsnä ollessa. Fosfaattipuskuroitu suolaliuos voidaan kätevästi valmistaa isotoonisesta suolaliuoksesta ja sen koostumus voi täten olla esimerkiksi esimerkissä 1 kuvatun mukainen. Tässä suhteessa todettiin, että muut puskurit olivat vähemmän edullisia, koska joko pesuaineen poistuminen, etenkin N-lauroyylisarkosiinin (suolan muodossa), oli hitaampaa tai enemmän proteiinia saostui. Edelleen edullisesti suoritetaan diasuodatus, edullisesti tässä vaiheessa, koska tämän todettiin parantavan tehoa aiheuttamatta lisää proteiinin saostumista. Esimerkiksi diasuodatus todettiin edulliseksi tavanomaiseen diffuusioanalyysiin verrattuna. Edelleen todettiin, että pesuainepitoisuus, etenkin N-lauroyylisarkosiinin suolan muodossa (esim. sarkosyyli) pitoisuus, voitiin alentaa alle 1 %:iin säilyttäen erotus kromato-

grafia-ajossa. Alkuperäisen pesuainepitoisuuden alentaminen edistää pesuaineen poistoa ja täten edullisesti käytetään minimipitoisuus pesuainetta, esimerkiksi N-lauroyylisarkosiinia (suolan muodossa, esim. sarkosyyli), mikä sopii erotuksen säilyttämiseen kromatografiaajossa. Pesuaineen, esimerkiksi N-lauroyylisarkosiinin (suolan muodossa), esim. sarkosyylin, nimenomainen pitoisuus, on täten 0,8 % - 0,2 %, edullisesti 0,5 - 0,2 %, etenkin noin 0,3 %.

Edeltävän ohella todettiin, että pesuaineen, kuten N-lauroyylisarkosiinin (suolan muodossa), esim. sarkosyylin, poistaminen aktivoi hiukan proteolyyttistä aktiivisuutta, mikä saattaa vaikeuttaa tuotearviointia. Edelleen on todettu, että tämä proteolyyttinen aktiivisuus saattaa merkittävästi aleta ja jopa poistua, jos pesuaineen poistamisen diasuodattamalla jälkeen pH lasketaan alle 7,0:aan ennen huomattavan proteolyysin tapahtumista, kätevästi diasuodattamalla ja edullisesti dialysoimalla. Täten esillä olevan keksinnön edelleen seuraavassa suoritusmuodossa proteolyyttisen aktiivisuusjäämän vähentäminen tai poistaminen voidaan suorittaa pH:ssa, joka on alle 7,0, mutta joka on riittävän korkea polypeptidin merkittävän hydrolyysin välttämiseksi. pH voi edullisesti olla 6,0 - 4,5, edullisesti 5,8 - 5,0, etenkin noin 5,4. Keksinnön tämän suoritusmuodon edelleen seuraava etu on, että E. coli -epäpuhtaudet ja/tai hajonnut tai väärin laskostunut proteiini voidaan saostaa suorittamalla tämä pH:n alentaminen. Edullisesti puhdistukseen sisältyy vaiheena kokoeksluusiokromatografia, koska muutoin proteolyyttisen hajoamisen muodostama ongelma pahenee ja vaikka tämä suoritusmuoto alentaa tätä hajoamista, se tekee tämän poistamisesta vaikeata.

Edeltävien menetelmien lisäksi liuosstabiilisuuden saaminen G-CSF:ään tai sen johdannaiseen mahdollistaa uuttomenetelmän huomattavan yksinkertaistamisen. Täten

esillä olevan keksinnön edelleen seuraavan ominaispiirteen mukaan käyttöön annetaan menetelmä keksinnön mukaisen aktiivisen johdannaisen (edellä määritellyn mukaan) uuttamiseksi sen inkluusiokappaleesta, jonka mukaan 1) mainittu inkluusiokappale lietetään pesuaineeseen, etenkin N-lauroyylisarkosiiniin suolan muodossa (esim. sarkosyyli), 2) suoritetaan hapettaminen, 3) pesuaine poistetaan esimerkiksi tässä edellä kuvatun mukaisesti, ja 4) pesuaineen poistamisen jälkeen saatua liuosta pidetään korotetussa lämpötilassa, esimerkiksi 30 - 45 °C:ssa, edullisesti 34 - 42 °C:ssa, epäpuhtautena läsnä olevan bakteeriproteiinin, tuoteoligomeerien ja/tai hajoamistuotteiden saostamiseksi. Mainittua liuosta pidetään kätevästi mainitussa korotetussa lämpötilassa 6 - 24 tunnin ajan, mielellään 8 - 18 tunnin ajan, edullisesti 10 - 14 tunnin ajan, etenkin noin 12 tunnin ajan.

Esillä olevan keksinnön mukainen uuttomenetelmä voidaan esimerkiksi suorittaa aikaansaamalla lyysi isäntäsoluissa, mitä seuraa sentrifugointi inkluusiokappaleen saamiseksi esimerkiksi pelletin muodossa. Inkluusiokappale voidaan sitten liettää pesuaineeseen kuten esimerkiksi N-lauroyylisarkosiiniin suolan muodossa (esim. sarkosyyli), edullisesti 1 - 3-%:inen, etenkin noin 2-%:inen N-lauroyylisarkosiini suolan muodossa (esim. sarkosyyli). Liettämistä pesuaineeseen voi seurata hapetus, esimerkiksi kuparisulfaatin ($CuSO_4$) läsnä ollessa, mitä puolestaan voi seurata sentrifugointi.

Silloin kun inkluusiokappaleen peseminen on mahdollista, käytetään edullisesti ureaa eikä esimerkiksi deoksikolaattia.

Esillä olevan keksinnön mukainen uuttomenetelmä mahdollistaa tuotantomenetelmän yksinkertaistamisen esimerkiksi siten, että tarve käyttää kokoekskluusiokolonneja poistuu. Lisäksi tuotteen korkea saanto lämpökäsittelyvaiheesta vaikuttaa olevan yksi esillä olevan keksinnön mu-

kaisten johdannaisten aiempaa paremman liuosstabiilisuuden suomista eduista. Itse asiassa mitä suurempi liuosstabiilisuus on, sitä paremmin proteiini sopii uuteen uuttomenetelmään. Täten esimerkiksi edullisesti tätä uuttomenetelmää sovelletaan esillä olevan keksinnön mukaisten sellaisten johdannaisten uuttamiseen, joiden liuosstabiilisuus on ainakin 85 % pitoisuudessa 10 mg/ml. Kun tunnettu analogi [Met^{-1}, Ser^{17}]-G-CSF uutettiin edeltävällä menetelmällä, käänteisfaasi-HPLC:n mukaan vain 40 % halutusta tuotteesta oli liuoksessa 1 mg:n/ml kokonaisproteiinipitoisuuden sisältävän retentaatin lämpökäsittelyn jälkeen. Pitoisuudessa 3 mg/ml kokonaisproteiinia vain 19 % analogista oli liuoksessa.

Kaikki nukleotidisekvenssit, joihin tässä viitataan, spesifioidaan tavanomaisessa 5' - 3'-suunnassa.

Esillä olevan keksinnön mukaiset johdannaiset perustuvat humaani-G-CSF:ään, jota kutsutaan myös hu-G-CSF:ksi.

Koska esimerkeissä valmistetut johdannaiset kaikki valmistetaan käyttäen E. colia, esisekvenssi metioniini on yleensä läsnä.

Seuraaviin materiaaleihin viitataan jäljempänä verrokkiesimerkeissä ja esimerkeissä ja niiden koostumus on seuraava:

Tässä käytettynä ilmaisulla "N-lauroyylisarkosiini" tarkoitetaan mainitun aineen käyttöä suolan muodossa. Täten esimerkeissä N-lauroyylisarkosiinia käytetään natriumsuolansa muodossa.

Restriktioentsyymien puskurit:

Stabiilisuus: stabiileja -20 °C:ssa.

Puskurikoostumus:

Puskuriainesosat	**Loppupitoisuus mmol/litra (1/10 laimennettu asetuspuskuri)**				
	A	**B**	**L**	**M**	**H**
Tris-asetaatti	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-asetaatti	10	-	-	-	-
$MgCl_2$	-	5	10	10	10
K-asetaatti	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Ditioerytritoli (DTE)	-	-	1	1	1
Ditiotreitoli (DTT)	0,5	-	-	-	-
2-merkaptoetanoli	-	1	-	-	-
pH 37 °C:ssa	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Edeltäviä puskureita on saatavana valmistajalta Boehringer Mannheim.

Paikkaohjattu mutatointimenettely - Verrokkiesimerkki 2

Puskuri 1
100 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM NaCl
20 mM $MgCl_2$

Puskuri 2
10 mM Tris-HCl pH 8,0
20 mM NaCl
1 mM EDTA

Puskuri 3
12 mM Tris-HCl pH 7,7
30 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
8 mM 2-merkaptoetanoli

Puskuri 4 60 mM Tris-HCl pH 8,0
90 mM NaCl
6 mM $MgCl_2$
10 mM DTT

Nukleotidiseos 1 250 µM kutakin dATP:tä, dGTP:tä, dCTP=S:ää (dCTP:n fosforotioaattijohdannainen), dTTP:tä ja 1 mM ATP

Nukleotidiseos 2 250 µM kutakin dATP:tä, dGTP:tä, dCTP:tä, dTTP:tä ja 350 µM ATP

M9-minimikasvualusta

Ammoniumkloridi	1 g
Dinatriumvetyortofosfaatti	6 g
Kaliumdivetyortofosfaatti	3 g
Natriumkloridi	0,5 g
Tislatussa vedessä	1 litra

Lisäaineet/75 ml

300 µl	50-%:ista glukoosiliuosta
75 µl	1 M $MgSO_4$-liuosta
75 µl	0,1 M $CaCl_2$-liuosta
75 µl	4 mg/ml tiamiiniliuosta
75 µl	20-%:ista kasaminohappoliuosta

Hivenaineliuos (TES)

TES:n koostumus on seuraava:

$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	0,1 mg/litra	100 µg/litra
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,04 mg/litra	40 µg/litra
$KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,01 mg/litra	10 µg/litra
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/litra	10 µg/litra
H_3BO_3	0,005 mg/litra	5 µg/litra
KI	0,1 mg/litra	100 µg/litra
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,1 mg/litra	100 µg/litra
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	0,0045 ng/litra	4,5 µg/litra
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,02 mg/litra	20 µg/litra
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 mg/litra	20 µg/litra

ja sitä lisätään kasvualustaan pitoisuus 0,5 ml/-litra.

Geneclean (TM)

Pakkaus sisältää 1) 6 M natriumjodidiliuosta; 2) konsentroitua liuosta, jossa on natriumkloridia, Tris:iä ja EDTA:ta, natriumkloridi/etanoli/vesipesun valmistamiseksi; 3) Glassmilk (TM) - 1,5 ml:n ampulli, joka sisältää 1,25 ml piidioksidimatriisilietettä vedessä.

Tämä on DNA-puhdistustekniikka, joka perustuu Vogelsteinin ja Gillespien menetelmään, joka julkaistiin julkaisussa Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76 (1979) 615.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää mitä tahansa menetelmää, jota kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Satunnaisleimauspakkaus: Pharmacia-tuote nro 27-9250

Menetelmää kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis, ss. 10.13 - 10.17 (julkaisija Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Sequenase (TM)

Kemiallisesti modifioitu T7-DNA-polymeraasi:

perustuu Taborin ja Richardsonin menettelyyn, joka julkaistiin julkaisussa Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 84 (1987) 4767 - 4771.

T4-DNA-ligaasi

Tätä kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis, ss. 5.60 - 5.64 (julkaisija Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), ja sitä kuvaavat myös Weiss, B., et al., J.Biol.Chem. 243 (1968) 4543.

Seuraavat ei-rajaavat esimerkit esitetään vain havainnollistamismielessä.

Esimerkki 1

[$Ser^{17,27}$]-humaani-G-CSF:n valmistus

Vaiheiden a) ja b) menettelyt verrokkiesimerkistä 1 toistettiin seuraavasti modifioiden:

Oligonukleotideilla SEQ ID nrot 24, 25, 26 ja 27 (jäljempänä määritellyn mukaisesti) korvataan vastaavasti SEQ ID nrot 1, 2, 3 ja 4 (jäljempänä määritellyn mukaisesti).

c) [$Ser^{17,27}$]-humaani-G-CSF:n geenin kloonaaminen ilmennysvektoriin

Edellä kuvattu geeni (katso kuvio 3 ja SEQ ID nro 49) kloonattiin plasmidivektoriin pICI0020. Tämä vektori on pAT153-pohjainen plasmidi, jossa 651 ep:n EcoRI-AccI-alue on korvattu 167 ep:n EcoRI-ClaI-fragmentilla (SEQ ID nro 47), joka koostuu seuraavista:

(1) synteettinen E. coli -trp-promoottori ja trp-johtoribosomisitoutumiskeskus

(2) luenta-aloituskodoni

(3) monirestriktioentsyymitunnistussekvenssi, joka on saatu M13mp18:sta ja sisältää keskukset KpnI:lle, BamHI:lle, XbaI:lle, SalI:lle, PstI:lle, SphI:lle ja HindIII:lle

(4) synteettinen kopiointipäätössekvenssi

Tämän alueen DNA-sekvenssi on esitetty kuviossa 1.

pICI0020-ilmennysvektori pilkottiin täydellisesti KpnI:llä (BCL) liuoksessa 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM magnesiumkloridi. DNA saostettiin etanolilla -20 °C:ssa liuoksesta, joka sisälsi pitoisuuden 0,3 M natriumasetaatti, minkä jälkeen 3'-tahmeapäät poistettiin käsittelemällä T4-DNA-polymeraasilla 10 minuutin ajan 37 °C:ssa seuraavasti:

DNA (1 µg) vedessä (16 µl)
10X T4-polymeraasipuskuri (2 µl)
0,33 M Tris-asetaatti pH 7,9
0,1 M magnesiumasetaatti
0,66 M kaliumasetaatti
5 mM ditiotreitoli
1 mg/ml nautaseerumialbumiini (BSA, Pentax-fraktio V)
2 mM dNTP-seos (1 µl)
T4-DNA-polymeraasi (1 µl; 2,5 yksikköä/µl; BCL)

Vettä (80 µl) lisättiin ja seosta uutettiin fenolikloroformilla (100 µl) ja sitten kloroformilla (100 µl). Lisättiin 3 M natriumasetaattiliuosta (10 µl), minkä jälkeen DNA saostettiin etanolilla (250 µl) -20 °C:ssa, ja pilkottiin sitten täydellisesti SalI:llä (BCL) liuoksessa 150 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ ja 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). Kpn-fragmentti, joka oli sijoitettu tasapäisenä SalI-vektoriin, puhdistettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä ja eristettiin käyttäen Geneclean- (tavaramerkki) valmistetta noudattaen valmistajan (Bio101, USA) suosittelemaa menettelyä.

Synteettinen geeni eristettiin pSTP1-vektoreista seuraavasti. Vektorit pilkottiin ScaI:llä ja SalI:llä (molemmat valmistajalta BCL) liuoksessa 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ ja 10 mM Tris-HCl (pH 7,5). 530 ep:n fragmentti puhdistettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä ja eristettiin

käyttäen Geneclean- (tavaramerkki) valmistetta noudattaen valmistajan (Bio101, USA) suosittelemaa menettelyä.

Ligatointia varten seosta, jossa oli ScaI-SalI-geenifragmentti (50 ng) ja pICI0020-vektorifragmentti (100 ng) 20 µl:ssa liuosta, joka sisälsi pitoisuudet 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % w/v PEG-8000:aa ja T4-DNA-ligaasia (2 yksikköä; BRL), inkuboitiin 16 °C:ssa 20 tunnin ajan. Saadulla seoksella transformoitiin transformoitumiskelpoisia E. coli -HB101-soluja (valmistajalta BRL) tässä kuvatun mukaisesti. Transformantit valikoitiin kasvun suhteen L-agar-maljapinnoilla, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi 50 µg/ml ampisilliinia, ja ne seulottiin kyseisen geenin läsnäolon suhteen käyttäen pesäkehybridisaatiota ^{32}P-leimattuun koettimeen (SEQ ID nro 24) tässä kuvatun mukaisesti. Plasmidi-DNA valmistettiin 6 positiivisesti hybridisoituvasta pesäkkeestä, sitä puhdistettiin sentrifugoimalla seesiumkloridigradientissa ja sekvenssistä varmistuttiin dideoksisekventoinnilla tässä kuvatun mukaisesti.

Tämän geenin sisältävä plasmidi nimettiin pICI-1080:ksi.

d) Geenin [$Ser^{17,27}$]-G-CSF:lle sisältävän ilmennyskasetin alakloonaus M13mp18:aan

Seuraava alakloonaus suoritettiin lähtökohdan saamiseksi esimerkeissä 3 - 8 yksityiskohtaisesti esiteltyjen G-CSF-johdannaisten valmistamiseksi.

Plasmidi-DNA pICI1080:sta (puhdistettu seesiumkloriditiheyssentrifugointia käyttäen) pilkottiin täydellisesti EcoRI:llä ja SalI:llä (BCL) valmistajan ohjeita noudattaen. Pieni EcoRI-SalI-fragmentti, joka sisälsi trp-promoottorin ja [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin, eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä käyttäen Geneclean- (tavaramerkki) valmistetta. Tämä fragmentti kloonattiin EcoRI-SalI-pilkottuun M13mp18-vektoriin (DNA saatu valmistajalta Amersham International; entsyymit BCL:ltä). Fragmentit

ligatoitiin toisiinsa 5x BRL -ligatointipuskurissa käyttäen BRL:n T4-DNA-ligaasia (kuvattu aiemmin). Ligatointiseoksella transfektoitiin transformoitusmiskelpoisia E. coli -TG1-soluja (joista oli tehty transformoitusmiskelpoisia kalsiumkloridimenetelmällä Mandelin ja Higan mukaan kuten kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Maniatis et al., Cold Spring Harbor). Transfektoidut solut lietettiin TY-pinta-agariin, joka sisälsi 2 % X-Gal:ia DMF:ssä ja 200 µl log-kasvuvaiheessa olevia E. coli -TG1-soluja, ja maljoitettiin 2x TY -agarmaljoihin (TY-pinta-agar: 8 g Bactotryptone-valmistetta, 5 g hiivauutetta, 5 g NaCl:ää, 3,75 g Bacto-agaria 500 µl:ssa steriiliä vettä; TY-maljat: 8 g Bactotryptone-valmistetta, 5 g hiivauutetta, 5 g NaCl:ää, 7,5 g Bacto-agaria 500 ml:ssa steriiliä vettä). Neljä valkeaa plakkia noukittiin 4 x 2 ml:n eriin 1-%:ista E. coli -TG1-solulietettä TY-liemessä (8 g Bactotryptone-valmistetta, 5 g hiivauutetta, 5 g NaCl:ää 500 ml:ssa steriiliä vettä) ja kasvatettiin 6 tunnin ajan 37 °C:ssa. 2 ml:n viljelmät jaettiin 0,5 ml:n ja 1,5 ml:n eriksi. Bakteerit sentrifugoitiin eroon liuoksesta Eppendorf- (tavaramerkki) mikrofugissa ja supernatantit siirrettiin steriileihin eppendorf- (tavaramerkki) putkiin. 0,5 ml:n eriä säilytettiin -20 °C:ssa fagivarastoina. 1,5 ml:n eristä valmistettiin yksisäikeistä DNA:ta noudatten menetelmää Amersham International M13 -sekventointikäsikirjassa (katso alla). Sitten nämä DNA-näytteet sekventoitiin käyttäen oligonukleotideja SEQ ID nro 22, SEQ ID nro 23, ja M13-yleissekventointialuketta. Reaktiot suoritettiin käyttäen Sequenase-pakkausta (tavaramerkki) valmistajan ohjeiden mukaan.

Kaikkien 4 kloonin DNA-sekvenssi oli [$Ser^{17,27}$]-G-CSF:lle oikea.

Yksisäikeisen DNA:n valmistus suuressa mittakaavassa

Yksisäikeistä DNA:ta pitoisuutena 200 - 500 µg DNA:ta/ml sisältävien valmisteiden saamiseksi käytettiin valmistajan Amersham International menettelyä "Oligonucleotide Directed Mutagenesis" (suom. "Oligonukleotidiohjattu mutatointi"). Yksityiskohtaisesti menettely suoritetaan seuraavasti:

A. Valmistetaan 1 ml:n fagivarastoliete.

1. Yksi yksittäinen E. coli -TG1-pesäke noukitaan glukoosi/minimikasvualustamaljasta. Sitä kasvatetaan yön yli 10 ml:ssa 2 x TY -kasvualustaa ravistellen 37 °C:ssa. 10 µl lisätään 20 ml:aan tuoretta kasvualustaa ja ravistellaan 37 °C:ssa 3 tunnin ajan.

2. 1 ml 2 x TY -kasvualustaa siirrostetaan 10 ml:n steriiliin viljelyputkeen, jossa on 100 µl 3 tunnin viljelmää vaiheesta 1.

3. 1 ml:n viljelmään siirrostetaan yhdistelmä-DNA-plakki.

4. Inkuboidaan 4 tunnin ajan ravistellen 37 °C:ssa. Siirretään mikrosentrifugiputkeen.

5. Sentrifugoidaan 5 minuutin ajan ympäristön lämpötilassa. Supernatantti kaadetaan uuteen putkeen.

Varastoidaan yön yli 4 °C:ssa. Valmistetaan yön yli kasvanut E. coli -TG1-viljelmä seuraavaa vaihetta silmällä pitäen.

B. Kasvatetaan 100 ml:n fagiviljelmä.

1. 100 ml:aan 2 x TY -kasvualustaa siirrostetaan 1 ml yön yli kasvanutta TG1-viljelmää ja ravistellaan 37 °C:ssa, kunnes optinen tiheys $O.D._{500}$ on 0,3.

2. 1 ml fagisupernatanttia kohdasta A5 (edellä) lisätään 100 ml:n viljelmään.

3. Inkuboidaan 5 tunnin ajan ravistellan 37 °C:ssa. Siirretään sentrifugiputkiin.

4. Sentrifugoidaan 5 000 x g:ssä 30 minuutin ajan 4 °C:ssa.

5. Supernatantti siirretään puhtaaseen sentrifugiputkeen. On huolellisesti varottava ottamasta mukaan soluja (bakteeripelletti säilytetään ympyrän muotoisen DNA:n (rfDNA) valmistamiseksi).

6. 0,2 tilavuutta 20-%:ista (w/v) PEG 6000 -liuosta, jossa on pitoisuus 2,5 M NaCl, lisätään supernatanttiin. Sekoitetaan hyvin ja jätetään sitten seisomaan 1 tunniksi 4 °C:seen.

7. Sentrifugoidaan 5 000 x g:ssä 20 minuutin ajan 4 °C:ssa. Supernatantti heitetään pois.

8. Sentrifugoidaan 5 000 x g:ssä 5 minuutin ajan, minkä jälkeen kaikki jäljellä oleva PEG/NaCl poistetaan ulosvedetyllä pasteurpipetillä.

9. Viruspelletti uudelleenlietetään 500 µl:aan vettä (kahteen kertaan tislattua) ja siirretään mikrosentrifugiputkeen (1,5 ml).

10. Sentrifugoidaan 5 minuutin ajan mikrosentrifugissa loppujen solujen poistamiseksi. Supernatantti siirretään puhtaaseen mikrosentrifugiputkeen.

11. 200 µl 20-%:ista PEG-liuosta, jossa on pitoisuus 12,5 M NaCl, lisätään supernatanttiin, sekoitetaan hyvin ja jätetään sitten seisomaan ympäristön lämpötilaan 15 minuutiksi.

12. Sentrifugoidaan 5 minuutin ajan, supernatantti heitetään pois.

13. Sentrifugoidaan 2 minuutin ajan. Kaikki PEG/-NaCl-jäämät poistetaan varovaisesti ulosvedetyllä pasteurpipetillä.

14. Viruspelletti uudelleenlietetään 500 µl:aan kahteen kertaan tislattua vettä.

15. 200 µl kyllästettyä fenoliliuosta, jossa kyllästäjänä on liuos 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA. Sekoitetaan nopeasti vorteks-sekoittajalla.

16. Putkea seisotetaan 15 minuutin ajan huoneenlämpötilassa.

17. Sentrifugoidaan 3 minuutin ajan.

18. Supernatantti siirretään puhtaaseen putkeen.

19. Vaiheet 15 - 18 toistetaan.

20. 500 µl kloroformia lisätään ja vesifaasia uutetaan kahteen kertaan.

21. 50 µl 3 M natriumasetaattiliuosta ja 1 ml absoluuttista etanolia lisätään. Sekoitetaan.

22. Sijoitetaan kuivajää-etanolihauteeseen 20 minuutiksi.

23. Sentrifugoidaan 15 minuutin ajan.

24. Kukin pelletti pestään 1 ml:lla etanolia -20 °C:ssa. Pesuneste kaadetaan pois.

25. Pelletti kuivataan tyhjössä ja uudelleenlietetään 50 µl:aan kahteen kertaan tislattua vettä.

Saanto tästä menettelystä on 100 - 200 µg yksisäikeistä DNA:ta.

e) Fermentointi

pICI1080 transformoitiin E. coli -kantaan MSD 522 ja saadut yhdistelmä-DNA-transformantit puhdistettiin ja varastoitiin glyseroliin varastokannoiksi -80 °C:seen.

Varastosta otettiin viljelmänäyte, joka viivasiirrostettiin agar-maljapinnoille, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi L-ampisilliiniä, yksittäisten pesäkkeiden eristämiseksi kasvatuksen yön yli 37 °C:ssa jälkeen. Yksi haluttu pesäke irrotettiin ja uudelleenlietettiin 10 ml:aan L-ampisilliinilientä ja 100 µl lietettä siirrostettiin välittömästi jokaiseen kymmenestä 250 ml:n erlenmeyerkolvista, joissa oli 75 ml L-ampisilliinilientä. 16 tunnin kasvatuksen 37 °C:ssa kiertävässä ravistelijassa

jälkeen kolvien sisällöt yhdistettiin ja pooli siirrostettiin fermentoriin, jossa oli 20 litraa LCM50-kasvualustaa.

LCM50:n koostumus

- valmistetaan tislattuun veteen:

	g/litra
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NaCl	0,5
Kaseiinihydrolysaatti (Oxoid L41)	2,0
$(NH_4)_2SO_4$	10,00
Hiivauute (Difco)	10,00
Glyseroli	35,00
L-leusiini	2,5
L-treoniini	0,9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,03
Tiamiini	0,008
$FeSO_4$/sitruunahappo	0,84/0,02
Hivenaineliuos (TES)	0,5 ml

Fermentoinnit suoritettiin sitten lämpötilassa 37 °C ja pH:ssa 6,7, jota pH:ta säädeltiin lisäämällä automatisoidusti 6 M natriumhydroksidiliuosta. Liuenneen hapen paineen (dOT-) asetusasema oli 50 %:n ilmakyllästys, ja sitä säädeltiin alunperin säätämällä automatisoidusti sekoittajanopeutta fermentorissa. Ilmavirtaus fermentoriin, joka oli aluksi 20 litra/min, mikä vastaa 1 tilavuutta/tilavuus/min (VVM), nostettiin 50 litraksi/min (2,5 VVM) fermentorin sekoittimen nopeuden lähestyessä 80 - 90 % maksimistaan. Koska hapensiirtonopeus (OTR) fermentoreissa ei riittänyt tyydyttämään bakteerien hapenottonopeutta (OUR) silloin, kun solutiheys oli suurempi kuin tiheys, joka vastaa arvoa $O.D._{550}$ = 50 kuvatuissa olosuhteissa, dOT:tä fermentorissa tätä suuremmilla solutiheyksillä ylläpidettiin 50 %:n ilmakyllästysasteessa rajoittamalla

bakteerien hapenottonopeutta. Tähän päästiin koostamalla kasvualusta tulemaan hiilen rajoittamaksi $O.D._{550}$-lukemassa 50, ja sitten syöttämällä rajaavaa hiililähdettä yhdessä ammoniumsulfaatin ja hiivauutteen kanssa nopeudella, joka rajoitti bakteerien kasvunopeutta.

Fermentointien annettiin kestää 16 tunnin ajan, jona aikana otettiin näytteitä, joista mitattiin optinen tiheys ($O.D._{550}$), solukuivapaino sekä G-CSF:n akkumuloituminen soluihin. G-CSF-akkumulaatio mitattiin pyyhkäisemällä näytebakteerien kokosolulysaateista saadut Coomassie Blue -värillä värjätyt SDS-PAGE-geelit alalla hyvin tunnetulla tavalla.

$O.D._{550}$-arvon kohotessa 25:een fermentoreihin pumpattiin kaseiinihydrolysaattiliuosta (100 g/litra Oxoid L41) nopeudella 1,5 g/litra/tunti.

$O.D._{550}$-lukeman kohottua arvoon noin 50 fermentointierän hiililähdevaranto kului loppuun, mikä johti dOT:n nopeaan kohoamiseen 50 %:n ilmakyllästysasteesta. Tällöin fermentoreihin pumpattiin syöttöliuosta, joka sisälsi glyserolia (470 g/litra), hiivauutetta (118 g/litra) ja ammoniumsulfaattia (118 g/litra) nopeudella, joka ensin palautti ja sitten säilytti dOT:n 50 %:n ilmakyllästysasteessa sekoitettaessa fermentoria noin 80 %:n nopeudella maksimista. Noin 13 - 14 tunnin kuluttua tämä syöttöerä korvattiin toisella syötöllä, joka sisälsi vain glyserolia (715 g/litra) ja ammoniumsulfaattia (143 g/litra). Kaseiinihydrolysaattisyöttö pidettiin tasolla 1,5 g/litra/tunti koko ajan. Noin 16 tunnin kuluttua kun viljelmän mikroskooppinen tarkastelu osoitti, että valtaosassa soluista oli suuria inkluusiokappaleita, bakteerit otettiin talteen käyttäen Sorvall RC3B -sentrifugia (7 000 x g, 30 min, 4 °C) ja varastoitiin jäädytettyinä -80 °C:seen.

f) Puhdistus

Jäädytetty solupasta (500 g) uudelleenlietettiin 4 °C:ssa liuokseen 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8,0 (5

litraa) käyttäen Silverson-malli AXR-homogenisaattoria. Lietteessä olevissa soluissa tuotettiin lyysi käyttämällä liete 3 kertaan Manton-Gaulin-homogenisaattorin läpi paineen ollessa 420 kp/cm^2, minkä jälkeen lietettä sentrifugoitiin 5 000 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC3C -sentrifugissa käyttäen H6000A-roottoria. Supernatantti heitettiin pois ja pellettifraktio varastoitiin - 20 °C:seen ennen jatkopuhdistusta.

Pellettifraktio (60 - 100 g) sulatettiin ja uudelleenlietettiin 1-%:iseen (w/v) deoksikoolihappoliuokseen (natriumsuola), jossa oli pitoisuudet 5 mM EDTA, 5 mM ditiotreitoli, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 (1 200 ml), ja joka sisälsi 1 mg:n/ml natriumatsidia, käyttäen Polytron-homogenisaattoria, joka käsitti PTA 20 -sondin ja jossa nopeuden asetusarvo oli 5. Lietettä sekoitettiin 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 6 500 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC5C -sentrifugissa käyttäen GSA-roottoria. Supernatantti heitettiin pois, minkä jälkeen pellettiä käsiteltiin kahdesti samalla tavalla. Sitten pelletti uudelleenlietettiin kahdesti veteen (1 litra) sentrifugoiden 15 000 x g:ssä 20 minuutin ajan. Pestyjä inkluusiokappaleita sisältävä lopullinen pelletti liuotettiin liuokseen 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (150 ml), jossa oli 2 % (w/v) N-lauroyylisarkosiinin natriumsuolaa (sarkosiinia) ja pitoisuus 1 mg/ml natriumatsidia. Kupari(2)sulfaattia lisättiin pitoisuuteen 20 µM ja seosta sekoitettiin 16 tunnin ajan 20 °C:ssa, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 30 000 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC5C -sentrifugissa käyttäen SS34-roottoria. Johdannaisen sisältävää supernatanttia säilytettiin - 20 °C:ssa 50 ml:n erinä ennen jatkopuhdistamista.

Liuotettu johdannainen (20 ml) sulatettiin ja käytettiin 5 µm:n suodattimen läpi mahdollisen hiukkasjakoisen materiaalin poistamiseksi. Suodos panostettiin Ultrogel AcA54-kolonniin (5 x 90 cm), jota oli tasapainoitettu

4 °C:ssa liuoksella 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, joka sisälsi 0,3 % (w/v) N-lauroyylisarkosiinia (natriumsuola) sekä natriumatsidia 1 mg/ml. Kolonnia eluoitiin samalla puskurilla virtausnopeuden ollessa 2,5 ml/min keräten 10 ml:n fraktioita. Johdannaisproteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin pooliksi (noin 100 ml) ja varastoitiin 4 °C:seen.

Johdannaista sisältävät fraktiopoolit useista kolonneista yhdistettiin (300 - 500 ml) ja dialysoitiin liuosta vastaan, joka käsitti pitoisuudet 10 mM natriumfosfaatti, 150 mM natriumkloridi, pH 7,4 (3 - 5 litraa) ja natriumatsidia pitoisuuden 1 mg/ml, käyttäen Amicon CH2A-1S -spiraalipanosdiasuodatuslaitteistoa, joka oli varustettu S1Y10-membraanilla (kynnysarvo 10 kD:tä). Retentaattia sentrifugoitiin 30 000 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC5C -sentrifugissa käyttäen SS34-roottoria, minkä jälkeen supernatanttia dialysoitiin Spectropor-dialyysiputkissa, joiden kynnysarvo oli 6 - 8 kD:tä, 40 tunnin ajan vastaan 3 vaihtokertaa (8 litraa/300 ml supernatanttia) liuosta, jossa oli pitoisuudet 20 mM natriumasetaatti, 100 mM natriumkloridi, pH 5,4, sekä natriumatsidia 1 mg/ml. Muodostunut sakka poistettiin sentrifugoimalla 30 000 x g:ssä 30 minuutin ajan, minkä jälkeen supernatanttia dialysoitiin 24 tunnin ajan vettä vastaan, joka sisälsi natriumatsidia 1 mg/ml, ja sitten 72 tunnin ajan 6 vaihtokertaa vettä vastaan. Lopuksi saatu retentaatti kirkastettiin sentrifugoimalla 30 000 x g:ssä 30 minuutin ajan ja varastoitiin jäädytettynä -20 °C:seen (proteiinipitoisuus noin 1 mg/ml) tai 4 °C:seen kylmäkuivauksen jälkeen.

N-lauroyylisarkosiinin (natriumsuola) pitoisuus oli laskenut alle 0,001 %:n (w/v) diasuodatuksen jälkeen, ja alitti dialyysin vettä vastaan jälkeen käytetyn käänteisfaasi-HPLC-menetelmän toteamiskynnyksen (noin 0,0001 %).

Esimerkki 2

[Ser^{17,27}]-humaani-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 1 kuvattu menettely toistettiin suorittaen kuitenkin seuraavat muutokset:

Dupleksi-I fosforyloitiin käyttäen T4-polynukleotidikinaasia, minkä jälkeen sitä pilkottiin MstII:lla (10 yksikköä) 1 x H -puskurissa (BCL; 30 µl) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa.

Saostamisen etanolilla jälkeen 143 ep:n EcoRI-MstII-fragmenttia puhdistettiin 10-%:isessa polyakryyliamidigeelissä, jossa oli pitoisuus 7 M urea, se eristettiin elektroeluutiolla geelipalasesta ja DNA-säikeet juotettiin kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 1.

Edellä kuvattu synteettinen EcoRI-MstII-fragmentti kloonattiin verrokkiesimerkissä 1 kuvattuun plasmidivektoriin pAG88. Vektorin valmistamiseksi pAG88:aa (10 µg) pilkottiin MstII:lla (20 yksikköä; BCL) 1 X H -puskurissa (BCL; 100 µl) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa. DNA saostettiin etanolilla 0,3 M natriumasetaattiliuoksesta -20 °C:ssa, minkä jälkeen sitä pilkottiin EcoRI:llä (20 yksikköä; BCL) 1 X H -puskurissa (BCL; 100 µl) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa. Saostuksen etanolilla jälkeen suurikokoista EcoRI-MstII-fragmenttia puhdistettiin 1-%:isessa agaroosigeelissä, minkä jälkeen sitä puhdistettiin käyttäen Geneclean (tavaramerkki) -tuotetta valmistajan (Bio101, USA) kuvaaman mukaisesti. Synteettisen fragmentin sisältyvistä pesäkkeistä varmistuttiin seulomalla radioaktiivisella koettimella, joka oli valmistettu oligonukleotidista (SEQ ID nro 24) ja sekvenssin oikeellisuudesta varmistuttiin DNA-sekventoimalla verrokkiesimerkissä 1 kuvatun mukaisesti. [Ser^{17,27}]-G-CSF-geenin sisältävä plasmidi nimettiin pICI1107:ksi. Geeni kloonattiin ilmennysvektoriin pICI0020, minkä jälkeen fermentointi ja proteiinin puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 3

[Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF:n valmistus

Verrokkiesimerkissä 2 kuvattu menettely toistettiin käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi esimerkissä 1 tai 2 kuvatun [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin. Käytetyt mutageeniset oligonukleotidit nimettiin nimillä SEQ ID nro 28 ja SEQ ID nro 29 (jäljempänä määritellyn mukaisesti).

Tripletin ACG oligossa SEQ ID nro 28 tehtävänä on muuttaa Gln asemassa 11 Arg:ksi, ja ensimmäisen ja viimeisen AGA-tripletin oligossa SEQ ID nro 29 tehtävänä on muuttaa Pro asemissa 65 ja 60 Ser-tähteeksi. Mutatointi suoritettiin kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2 käyttäen oligoa SEQ ID nro 29 yksittäisalukemutatoinnissa. Tällöin saatiin yksittäinen plakki, joka sisälsi muutokset Pro 60 Ser ja Pro 65 Ser. Yksisäikeinen DNA valmistettiin tästä plakista kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2. Tätä DNA:ta käytettiin mutatointitemplaattina yksittäisalukemutatoinnissa käyttäen oligoa SEQ ID nro 28 mutatointialukkeena. Tällöin saatiin > 100 plakkia, joista 3 seulottiin DNA-sekventoimalla kuten aiemmin kuvattiin. Kaikki kolme olivat vastaanottaneet koko muutossarjan. Kaksisäikeinen rfDNA valmistettiin yhdestä plakista noudattaen menettelyä yksisäikeisen DNA:n valmistamiseksi suuressa mittakaavassa (vaihe d) esimerkissä 1) vaiheeseen B5. rfDNA uutettiin bakteeripelletistä Birnboimin ja Dolyn alkalisen lyysin menettelyllä (Nucl.Acids Res. 7 (1979) 1513 - 1523) ja sitä puhdistettiin seesiumkloriditiheysgradienttisentrifugoimalla kuten kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Sambrook, Fritsch ja Maniatis (Cold Spring Harbor -julkaisu). Puhdistettua rfDNA:ta pilkottiin EcoRI:llä ja SalI:llä puskurissa H aiemmin kuvatun mukaisesti ja pieni fragmentti, joka sisältää trp-promoottorin, ribosomisitoutumiskeskuksen, luenta-aloituskodonin ja [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF-gee-

nin, joka eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä käyttäen valmistetta Geneclean (TM). Fragmentti ligatoitiin EcoRI-SalI:llä pilkottuun pICI0020-vektoriin käyttäen inserttiä 2:1-mooliylimäärä vektoriin nähden sekä T4-DNA-ligaasia (BRL) ja ligatointipuskuria, oleellisesti kuten aiemmin kuvattiin. Ligatointiseoksella transformoitiin E. coli -kanta HB101. Transformantit valikoitiin kasvun suhteen L-agarmaljoissa, joissa kasvualusta sisälsi 50 µl/ml ampisilliiniä. Pesäkkeet seulottiin insertoidun DNA:n läsnäolon suhteen suorittamalla restriktioanalyysi plasmidi-DNA:sta, joka valmistettiin Birnboimin ja Dolyn menetelmän mukaan kuten kuvataan käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Sambrook, Fritsch ja Maniatis (Cold Spring Harbor -julkaisu). Plasmidi-DNA:lla, joka saatiin odotusten mukaisen 619 ep:n EcoRI-SalI-insertin sisältävästä pesäkkeestä, transformoitiin E. coli -kanta MSD522 ja tulos nimettiin pICI1239:ksi. Fermentointi ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 4

[$Ser^{17,27,115,116}$, Glu^{111}]-humaani-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi esimerkissä 1 tai 2 kuvatun [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin. Käytetty mutatointioligonukleotidi nimettiin oligoksi SEQ ID nro 30 (jäljempänä määritellyn mukaisesti).

Tripletin GCT tehtävänä on muuttaa Thr asemassa 116 Ser-tähteeksi, ja AGA-tripletin tehtävänä on muuttaa Thr asemassa 115 Ser-tähteeksi ja tripletin TTC tehtävänä on muuttaa Ala asemassa 111 Glu:ksi. Mutatointimenettely suoritettiin oleellisesti kuten kuvataan esimerkissä 3 ja ilmennyskasetti siirrettiin ilmennysplasmidiin, jolloin saatiin pICI1243. Fermentointi ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 5

[Arg^{11}, $Ser^{17,27}$, Lys^{58}, Arg^{165}]-humaani-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi esimerkissä 1 tai 2 kuvatun [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin. Käytetyt mutatointioligonukleotidit nimettiin oligoiksi SEQ ID nro 28, SEQ ID nro 31 ja SEQ ID nro 32 (jäljempänä määritellyn mukaisesti).

Tripletin TTT oligossa SEQ ID nro 31 tehtävänä on muuttaa Trp asemassa 58 Lys-tähteeksi, ja oligossa SEQ ID nro 32 toisen GCG-tripletin tehtävänä on muuttaa Tyr asemassa 165 Arg-tähteeksi.

Mutatointimenettely suoritettiin aluksi kaksoisalukekokeena käyttäen oligoja SEQ ID nro 31 ja SEQ ID nro 32 mutatointioligonukleotideina kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2. Tällöin saatiin 2 plakkia, jotka molemmat käsittivät SEQ ID nro 32 -muutoksen (Tyr 165 Arg) mutta eivät SEQ ID nro 31 -muutosta. Yksisäikeinen DNA valmistettiin toisesta näistä plakeista kuten kuvattiin esimerkissä 1. Tätä DNA:ta käytettiin mutatointitemplaattina kaksoisalukemutatoinnissa käyttäen oligoja SEQ ID nro 28 ja SEQ ID nro 31 mutatointialukkeina. Tällöin saatiin 2 plakkia, joista toinen sisälsi täydellisen muutossarjan, ja ilmennyskasetti siirrettiin ilmennysplasmidiin, jolloin saatiin pICI1246. Fermentointi ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 6

[Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-humaani-G-CSFn valmistus

a) Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi esimerkissä 1 tai 2 kuvatun [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin. Käytetyt mutatointioligonukleotidit nimetään oligoiksi SEQ ID nro 33 ja SEQ ID nro 34 (jäljempänä kuvatun mukaisesti).

Tripletin TTC oligossa SEQ ID nro 33 tehtävänä on muuttaa Leu asemassa 15 Glu-tähteeksi. Oligossa SEQ ID nro 34 ensimmäisen TTT-tripletin tehtävänä on muuttaa Ala asemassa 30 Lys-tähteeksi ja triplettien AGC tehtävänä on muuttaa Gly:t asemissa 28 ja 26 Ala-tähteiksi.

Mutatointimenettely suoritettiin oleellisesti kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2 kaksoisalukekokeena ja ilmennyskasetti siirrettiin ilmennysplasmidiin, jolloin saatiin pICI1266. Fermentointi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

b) Puhdistus

Jäädytetyssä solupastassa aikaansaatiin lyysi ja raakapellettifraktio erotettiin kuten esimerkissä 1. Inkluusiokappaleet tämän proteiinin sisältävässä pelletissä liuotettiin deoksikoolihappo- (-natriumsuola-) puskuriin, jota kuvattiin esimerkissä 1. Tälle proteiinille käytettiin seuraavaa modifioitua menettelyä.

Raakapellettifraktio (60 - 100 g) sulatettiin ja uudelleenlietettiin liuokseen 25 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (1 200 ml) käyttäen Polytron-homogenisaattoria, joka oli varustettu PTA 20 -sondilla ja jonka nopeuden asetusarvo oli 5. Lietettä sekoitettiin huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 6 500 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC5C -sentrifugissa käyttäen GSA-roottoria. Supernatantti heitettiin pois ja pellettiä käsiteltiin kahdesti samalla tavalla. Pelletti uudelleenlietettiin sitten kahdesti veteen (1 litra) sentrifugoiden kuten esimerkissä 1. Tämän jälkeen puhdistusmenettely suoritettiin kuten esimerkissä 1.

Esimerkki 7

[$Ser^{17,27}$, $Lys^{49,58}$, $Ala^{44,51,55}$]-humaani-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi esimerkissä 1 tai 2 kuvatun [$Ser^{17,27}$]-G-CSF-geenin. Käytetyt

mutatointioligonukleotidit nimettiin oligoiksi SEQ ID nro 35 ja SEQ ID nro 36 (jäljempänä määritellyn mukaisesti).

Oligossa SEQ ID nro 35 triplettien AGC tehtävänä on muuttaa Gly Ala:ksi asemassa 51 ja Pro Ala:ksi asemassa 44, ja tripletin TTT tehtävänä on muuttaa Leu Lys-tähteeksi asemassa 49. Oligossa SEQ ID nro 36 tripletin TTT tehtävänä on muuttaa Trp Lys-tähteeksi asemassa 58 ja toisen AGC-tripletin tehtävänä on muuttaa Gly Aln-tähteeksi asemassa 55.

Mutatointi suoritettiin kaksoisalukekokeena kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2. Tällöin saatiin 16 plakkia. 8 plakkia seulottiin DNA-sekventoimalla kuten kuvattiin esimerkissä 3. Kaikki plakit käsittivät SEQ ID nro 36 -muutokset (Gly 55 Ala, Trp 58 Lys), mutta yksikään ei sisältänyt SEQ ID nro 35 -muutoksia. Yksisäikeinen DNA valmistettiin yhdestä näistä plakeista kuten kuvattiin esimerkissä 1(d), ja sitä käytettiin mutatointitemplaattina yksittäisalukemutatoinnissa käyttäen SEQ ID nro 35 -oligoa mutatointialukkeena. Tällöin saatiin 50 plakkia, joista 3 seulottiin DNA-sekventoimalla; kahdessa oli täydellinen muutossarja. Ilmennyskasetti ilmennysplasmidiin siirtämällä saatiin pICI1297. Fermentointi ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 8

[Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-humaani-G-CSF:n valmistus

Toistettiin esimerkissä 3 kuvattu menettely käyttäen mutatointitemplaatti-M13mp18:aa, joka sisälsi [Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-humaani-G-CSF-geenin, esimerkissä 6 kuvatun mukaisesti. Käytetty mutatointioligonukleotidi on nimeltään SEQ ID nro 28, ja sen tehtävänä on muuttaa Gln asemassa 11 Arg:ksi. Modifioitu geeni eristettiin ja ligatoitiin pICI0020-vektoriin (esimerkki 1). Tällä vektorilla transformoitiin E. coli -kanta MSD522 kuten kuvataan esimerkissä 3 ja tuote nimettiin pICI1347:ksi. pICI1347-

plasmidi-DNA eristettiin MSD522:sta, sitä puhdistettiin seesiumkloriditiheyssentrifugoimalla ja se pilkottiin täydellisesti BamHI:llä ja SalI:llä (BCL). Plasmidi-DNA:ta (5 µg) inkuboitiin 37 °C:ssa 2 tunnin ajan BCL-puskurissa (100 µl), jonka suolapitoisuus oli korkea (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM ditioerytritoli), ja joka sisälsi BamHI:tä (40 yksikköä) ja SalI:tä (50 yksikköä). DNA saostettiin lisäämällä 3 M natriumasetaattia (10 µl) ja absoluuttista etanolia (250 µl) ja jäähdyttämällä -20 °C:ssa 2 tunnin ajan, minkä jälkeen se otettiin talteen sentrifugoimalla (10 min 10 000 kierr./min), kuivattiin tyhjössä ja liuotettiin veteen (10 µl). Lisättiin näytepanostuspuskuria (2 µl, jossa oli pitoisuudet 240 mM Tris-asetaatti, pH 7,8, 6 mM EDTA, 20 % sakkaroosia, 0,2 % ksyleenisyanolia ja 0,2 % bromifenolisinistä), ja seos panostettiin preparatiiviseen 0,7-%:iseen agaroosigeeliin (40 mM Tris-asetaatissa (pH 7,8), 1 mM EDTA), joka sisälsi etidiumbromidia (0,5 µl/ml), minkä jälkeen suoritettiin 1 tunnin kestävä elektroforeesiajo 100 voltin jännitettä käyttäen. Suurikokoinen BamHI-SalI-vektorifragmentti eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä käyttämällä Geneclean- (tavaramerkki) valmistetta. Vastaavalla tavalla pICI1239-plasmidi-DNA esimerkistä 3 eristettiin ja pilkottiin BamHI:llä ja SalI:llä. Pieni BamHI-SalI-fragmentti, joka sisälsi Ser-kodonit asemissa 60 ja 65, eristettiin ja ligatoitiin edellä kuvattuun suurikokoiseen BamHI-SalI-vektorifragmenttiin. Seoksella transformoitiin E. coli -kanta MSD522 ja plasmidi nimettiin pICI1348:ksi. Fermentointi ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Esimerkki 9

Toistettiin esimerkkien 1 ja 2 menettely käyttäen E. coli -kantaa TG1 E. coli -kannan MSD522 asemesta fermentointivaiheessa (katso esimerkiksi esimerkki 1(e)).

Esimerkki 10

Vaihtoehtoinen uuttomenetelmä humaani-[Met^{-1}, Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-G-CSF:lle

Jäädytettyä solupastaa (640 g) uudelleenlietettiin 4 °C:ssa liuokseen 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM ditiotreitoli, 2 M urea, pH 8,0, joka sisälsi natriumatsidia 1 mg:n/ml (5 litraa), käyttäen Polytron-homogenisaattoria, joka oli varustettu PTA20-sondilla ja jonka nopeuden asetusarvo oli 7/8. Lietteen käsittämiin soluihin tuotettiin lyysi käyttämällä liete 3 kertaan Manton-Gaulin Lab 60/60 -homogenisaattorin läpi paineen ollessa 420 kp/cm^2 ja huuhtoen vielä 1 litralla puskuria. Jäähdyttämiseksi käytettiin kertaläpäisy-Conair-jäähdytintä -20 °C:ssa. Lysaattia sentrifugoitiin 5 000 x g:ssä 30 minuutin ajan Sorvall RC3C -sentrifugissa käyttäen H6000A-roottoria.

Supernatantti heitettiin pois ja pelletti (noin 450 g) uudelleenlietettiin samaan puskuriin (10 litraa). Lietettä sekoitettiin 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 5 000 kierr./min kierrosnopeudella 30 minuutin ajan kahdessa Sorvall RC3C -sentrifugissa käyttäen H6000A-roottoreita. Supernatantti heitettiin pois, ja pellettiä käsiteltiin kahdesti samalla tavalla. Sitten pelletti uudelleenlietettiin kahdesti veteen (10 litraa) ja lietettä sentrifugoitiin 5 000 kierr./min kierrosnopeudella 30 minuutin ajan. Pestyt inkluusiokappaleet sisältävät lopulliset pelletit uudelleenlietettiin N-lauroyylisarkosiinin natriumsuolan 2-%:iseen (w/v) liuokseen 50 mM Tris-HCl:ssä, pH 8,0 (1 litra), jossa oli natriumatsidia 1 mg/ml, käyttäen Polytron-homogenisaattoria, jonka nopeuden asetusarvo oli 7. Lisättiin 20 mM kupari(2)sulfaattiliuosta vedessä (1,5 ml), ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 10 000 kierr./min kierrosnopeudella 30 minuutin ajan Sorvall RC5C -sentrifugissa käyttäen GSA-roottoria.

Johdannaisen sisältävä supernatantti suodatettiin 5 µm:n suodattimen läpi mahdollisen hiukkasjakoisen materiaalin poistamiseksi, sitä laimennettiin 4 °C:ssa 6x lisäämällä 50 mM Tris-HCl:ää, pH 8,0, jossa oli natriumatsidia 1 mg/ml, minkä jälkeen se diasuodatettiin maksimipaineessa Amicon DC20 -ultrasuodatuslaitteessa, joka oli varustettu S10Y10-panoksella (10 kD:n kynnysarvo) vastaan liuosta 10 mM natriumfosfaatti, 150 mM natriumkloridi, pH 7,4 (90 litraa), jossa oli 1 mg/ml natriumatsidia. Diasuodatuksen loppuvaiheissa muodostui sakka.

Retentaatti (2,1 mg/ml kokonaisproteiinipitoisuus, 1,7 mg/ml tuotetta) kerättiin 4 litran kierrekorkeilla varustettuihin polypropyleeniastioihin ja inkuboitiin 37 °C:ssa yön yli. Muodostunut sakka poistettiin sentrifugoimalla 5 000 kierr./min kierrosnopeudella 45 minuutin ajan Sorvall RC3C -sentrifugissa, minkä jälkeen supernatantti varastoitiin 4 °C:seen.

Tarkkailu SDS-PAGE:lla ja käänteisfaasi-HPLC:llä osoitti, että viimeisessä lämpökäsittelyssä epäpuhtauksina läsnä olevat E. coli -proteiinit, tuoteoligomeerit ja hajoamistuotteet saostuivat selektiivisesti noin 85 %:n halutusta tuotteesta jäädessä liuokseen. Kirkastettu ja lämpökäsitelty tuoteliuos, jossa pitoisuutta oli voimakkaasti kohotettu, oli täysin biologisesti aktiivista ja stabiili pitoisuutena 20 mg/ml 37 °C:ssa 2 viikon ajan ilman, että ilmeni mitään merkkejä proteolyyttisestä hajoamisesta, ja niin, että saostuminen oli alle 20 %. Tästä saatiin erinomainen välituote seuraavaan kromatografiseen puhdistukseen.

Esimerkki 11

G-CSF:n ja sen johdannaisten karakterisointi

[Met^{-1}, Ser^{17}]-G-CSF:n ja sen johdannaisten (esimerkit 1 - 9) vesiliuos (proteiinipitoisuus noin 1 mg/ml) konsentroitiin pitoisuuteen vähintäin 11 mg/ml proteiinia käyttäen Amicon YM10 -membraania 4 °C:ssa. Mahdollisen

saostumisen konsentroinnin aikana estämiseksi lähtöliuoksen pH 5,5 säädettiin ensin pH 8,5:een lisäämällä ammoniumhydroksidia loppupitoisuuteen noin 0,25 mM. Konsentroinnissa liuoksen pH oli laskenut noin 8,0:aan.

Konsentroidun proteiiniliuoksen pitoisuus säädettiin 10 mg:aan/ml proteiinia (arvioitu siitä, että 1 mg:n/ml liuoksesta saadaan A_{280} = 1,0) lisäämällä 20x konsentroitua, fosfaattipuskuroitua suolaliuosta. Tästä liuoksesta, jossa johdannaisen pitoisuus oli 10 mg/ml liuoksessa 10 mM natriumfosfaatti, 150 mM natriumkloridi, pH 7,4 (PBS), saatiin yhteinen varastoliuos, josta määrittää proteiinin homogeenisuus, identiteetti, biologinen aktiivisuus ja liuosstabiilisuus.

Valmistettiin samoin varastoliuos humaani-G-CSF:stä pitoisuudeksi 1 mg/ml PBS:ään kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 1.

Jokaisen proteiinin osoitettiin olevan ainakin 95-%:isesti yhtä ainesosaa SDS-PAGE:lla, joka ajettiin pelkistävissä ja ei-pelkistävissä olosuhteissa, sekä käänteisfaasi-HPLC:llä. Toistuvista aminohappokoostumusanalyyseista happohydrolyysin 6 N HCl:llä jälkeen 110 °C:ssa saatiin aminohapposuhteet kullekin johdannaiselle, ja proteiinipitoisuus varastoliuoksessa pystyttiin määrittämään tarkasti. Tätä proteiinipitoisuutta yhdessä keskimääräisten biomääritystiitterien kanssa, jotka saatiin ainakin kuutena eri päivänä, käytettiin johdannaisen spesifisen aktiivisuuden määrittämiseksi. Valittujen johdannaisten N-pään sekvenssianalyysista sekä elektronisuihkumassaspektrometri-analyysista saatiin odotusten mukaiset sekvenssit ja molekyylipainot.

Esimerkki 12

[Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF:n valmistus käyttäen tuotantovektoria, joka käsittää trp-promoottorin

a) Plasmidi-pICI1239 (jota kuvattiin esimerkissä 3), pilkottiin EcoRI:llä ja SalI:llä puskurissa H aiemmin

kuvatun mukaisesti. Pieni EcoRI-SalI-fragmentti, joka sisälsi trp-promoottorin, ribosomisitoutumiskeskuksen ja geenin [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:lle, eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä käyttäen Geneclean- (TM) valmistetta. Vektorifragmentti valmistettiin pICI0080:sta (katso verrokkiesimerkki 6) pilkkomalla EcoRI:llä ja XhoI:llä puskurissa H, ja suurikokoinen EcoRI-XhoI-fragmentti eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä käyttäen Geneclean- (TM) valmistetta. Pieni EcoRI-SalI-fragmentti ligatoitiin EcoRI-XhoI-vektorifragmenttiin käyttäen inserttiä 2:1-mooliylimäärä vektoriin nähden aiemmin kuvatun mukaisesti, minkä jälkeen ligatointiseoksella transformoitiin E. coli -kanta MSD522. Transformantit valikoitiin kasvun suhteen L-agarmaljoissa, joissa kasvualusta sisälsi tetrasykliiniä (15 µg/ml). Valittiin 3 pesäkettä, joita kasvatettiin M9-minimikasvualustassa (75 ml), joka sisälsi lisäaineita ja tetrasykliiniä (15 µg/ml), 37 °C:ssa 20 tunnin ajan kiertävässä ravistelijassa. Proteiiniakkumulaatio mitattiin pyyhkäisemällä kokosolulysaatin Coomassie Blue -värillä värjätyt SDS-PAGE-geelit. Kaikki 3 kloonia ilmensivät [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n. Yhdestä pesäkkeestä saatu plasmidi-DNA nimettiin pICI-1327:ksi ja promoottorin sekä geenin sekvenssistä varmistuttiin tavanomaisilla dideoksisekventointimenettelyillä aiemmin kuvatun mukaisesti.

b) Fermentointi

pICI1327:llä transformoitiin E. coli -kanta MSD522 ja saadut yhdistelmä-DNA-kannat puhdistettiin ja varastoitiin glyserolivarastokantoina -80 °C:seen.

Varastosta otettiin viljelmänäyte, joka viivasiirrostettiin agarmaljapinnoille, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi tetrasykliiniä, yksittäisten pesäkkeitten erottamiseksi kasvatuksen 37 °C:ssa yön yli jälkeen. Haluttu yksittäinen pesäke poistettiin ja uudelleenlietettiin 10 ml:aan tetrasykliinilientä, minkä jälkeen 100 µl

siirrostettiin välittömästi kuhunkin kolmeen 250 ml:n erlenmeyerkolviin, joissa oli 75 ml tetrasykliinilientä. 16 tunnin kasvatuksen jälkeen 37 °C:ssa kiertävässä ravistelijassa kolvien sisällöt yhdistettiin pooliksi, joka siirrostettiin fermentoriin, jossa oli 20 litraa kasvualustaa.

Kasvualustan koostumus

- valmistetaan tislattuun veteen:

	g/litra
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NaCl	0,5
Kaseiinihydrolysaatti (Oxoid L41)	2,0
$(NH_4)_2SO_4$	10,00
Hiivauute (Difco)	10,00
Glyseroli	35,00
L-leusiini	0,625
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,03
Tiamiini	0,008
$FeSO_4$/sitruunahappo	0,04/0,02
Hivenaineliuos (TES)	0,5 ml/litra
Tetrasykliini	10 mg/litra

Fermentoinnit suoritettiin sitten lämpötilassa 37 °C ja pH:ssa 6,7, jota pH:ta säädeltiin lisäämällä automatisoidusti 6 M natriumhydroksidiliuosta. Liuenneen hapen paineen (dOT-) asetusasema oli 50 %:n ilmakyllästys, ja sitä säädeltiin alunperin säätämällä automatisoidusti sekoittajanopeutta fermentorissa. Ilmavirtaus fermentoriin, joka oli aluksi 20 litra/min, mikä vastaa 1 tilavuutta/tilavuus/min (VVM), nostettiin 50 litraksi/min (2,5 VVM) fermentorin sekoittimen nopeuden lähestyessä 80 - 90 % maksimistaan. Koska hapensiirtonopeus (OTR) fermentoreissa ei riittänyt tyydyttämään bakteerien hapenottonopeutta (OUR) silloin, kun solutiheys oli suurempi kuin ti-

heys, joka vastaa arvoa $O.D._{550}$ = 50 kuvatuissa olosuhteissa, dOT:tä fermentorissa tätä suuremmilla solutiheyksillä ylläpidettiin 50 %:n ilmakyllästysasteessa rajoittamalla bakteerien hapenottonopeutta. Tähän päästiin koostamalla kasvualusta tulemaan hiilen rajoittamaksi $O.D._{550}$-lukemassa 50, ja sitten syöttämällä rajaavaa hiililähdettä yhdessä ammoniumsulfaatin ja hiivauutteen kanssa nopeudella, joka rajoitti bakteerien kasvunopeutta.

Fermentointien annettiin kestää 18 tunnin ajan, jona aikana otettiin näytteitä, joista mitattiin optinen tiheys ($O.D._{550}$), solukuivapaino sekä [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF:n akkumuloituminen soluihin. [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF-akkumulaatio mitattiin pyyhkäisemällä näytebakteerien kokosolulysaateista saadut Coomassie Blue -värillä värjätyt SDS-PAGE-geelit alalla hyvin tunnetulla tavalla.

$O.D._{550}$-arvon kohotessa 35:een (8,5 tunnin kuluttua) fermentoreihin pumpattiin kaseiinihydrolysaattiliuosta (100 g/litra Oxoid L41) nopeudella 0,75 g/litra/tunti.

$O.D._{550}$-lukeman kohottua arvoon noin 50 fermentointierän hiililähdevaranto kului loppuun, mikä johti dOT:n nopeaan kohoamiseen 50 %:n ilmakyllästysasteesta. Tällöin fermentoreihin pumpattiin syöttöliuosta, joka sisälsi glyserolia (470 g/litra), hiivauutetta (118 g/litra) ja ammoniumsulfaattia (118 g/litra) nopeudella, joka ensin palautti ja sitten säilytti dOT:n 50 %:n ilmakyllästysasteessa sekoitettaessa fermentoria noin 70 - 80 %:n nopeudella maksimista. Kaseiinihydrolysaattisyöttö pidettiin tasolla 0,75 g/litra/tunti koko ajan. Noin 18 tunnin kuluttua kun viljelmän mikroskooppinen tarkastelu osoitti, että valtaosassa soluista oli suuria inkluusiokappaleita, bakteerit otettiin talteen käyttäen Sorvall RC3B -sentrifugia (7 000 x g, 30 min, 4 °C) ja varastoitiin jäädytettyinä -80 °C:seen.

f) Puhdistus

Puhdistaminen suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1(f).

Esimerkki 13

[Arg^{11}, Ser^{17,27,60,65}]-humaani-G-CSF:n valmistus käyttäen tuotantovektoria, jossa on T7A3-promoottori

EcoRI-SalI-fragmentti, joka sisälsi T7A3-promoottorin, trp-johtoribosomisitoutumiskeskussekvenssin ja geenin [Ser^{17,27}]-hu-G-CSF:lle, alakloonattiin M13mp18:aan kuten kuvattiin esimerkin 1 kohdassa d). EcoRI-SalI-fragmentin sekvenssi on esitetty oligossa SEQ ID nro 50 sekä kuviossa 3; SEQ ID nro 50 koostuu EcoRI-restriktiokeskuksesta (nukleotidit 1 - 6), bakteriofagin T7 A3-promoottorisekvenssistä (nukleotidit 7 - 52), trp-johtoribosomisitoutumiskeskussekvenssistä (nukleotidit 53 - 78) ja luenta-aloituskodonista (nukleotidit 79 - 81). Kuviossa 3 esitetään SalI-restriktiokeskukseen päättyvä [Ser^{17,27}]-humaani-G-CSF:n nukleotidisekvenssi. Huomattakoon, että oligossa SEQ ID nro 50 3'-pään ATG-kodoni edeltää välittömästi ACT-kodonia, joka koodittaa treoniinin (aminohappo 1) kuviossa 3. 5'-nukleotidisekvenssi AATTCAGT puuttuu täten EcoRI-SalI-fragmentista. EcoRI-SalI-fragmentti voidaan valmistaa niinikään leikkaamalla se pICI1295:stä (katso verrokkiesimerkki 7). Paikkaohjattu mutatointi suoritettiin yksisäikeisellä DNA:lla kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 2 käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 28 Gln-kodonin asemassa 11 muuttamiseksi Arg:ksi. Kaksisäikeinen rfDNA valmistettiin plakista, joka sisältää Gln^{11} → Arg^{11} -muutoksen esimerkissä 3 kuvatun mukaisesti lukuunottamatta, että vaiheessa B3 inkuboitiin 3 tunnin ajan 5 tunnin asemesta, ja pilkkomisessa käytettiin EcoRI:tä (aiemmin kuvatun mukaisesti) ja SnaBI:tä (kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 5). Saatu 144 ep:n EcoRI-SnaBI-fragmentti, joka sisältää T7A3-promoottorin, trp-johtoribosomisitoutumiskeskussekvenssin ja Arg^{11}-kodonin

käsittävän geenifragmentin, eristettiin ja ligatoitiin EcoRI-SnaBI:llä pilkottuun vektoriin pICI1327:stä (joka sisältää kodonit tähteille Ser^{60} ja Ser^{65} ja jota kuvataan esimerkissä 12). Ligatointiseoksella transformoitiin E. coli -kanta MSD522 ja transformantit valikoitiin kasvun perusteella L-agarmaljoissa, joissa kasvualusta sisältää tetrasykliiniä (15 µg/mg). Plasmidi-DNA pesäkkeestä, joka sisälsi odotusten mukaiset T7A3-promoottorin ja [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF-geenisekvenssin, identifioitiin sekventoimalla DNA eristetystä plasmidista ja nimettiin pICI1386:ksi.

Fermentointi suoritettiin kahdella vaihtoehtoisella menetelmällä (b) ja (c) alla. Menetelmä (b) suoritettiin 37 °C:ssa ja 16 tunnin fermentoinnin kuvatun mukaisesti jälkeen mikrobibiomassapitoisuus oli 35 g/litra, ja [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF:ää arvioitiin akkumuloituneen pitoisuus 7 g/litra fermentointilietettä. Menetelmä (c) suoritettiin 30 °C:ssa ja fermentointi oli siten hitaampaa, mikä johtui alhaisemmasta fermentointilämpötilasta. Menetelmän (c) osalta 35 tunnin kuluttua mikrobibiomassa oli 55 g/litra ja [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF-saannoksi arvioitiin akkumuloituneen 15 g/litra fermentointilietettä.

b) E. coli -kanta CGSC 6300 (genotyyppi F^-, $lambda^-$, lac+), joka saatiin talletuslaitoksesta E. coli Genetic Stock Centre, transformoitiin plasmidilla pICI1386. Saatua kantaa CGSC 6300 (pICI1386) puhdistettiin ja ylläpidettiin glyserolissa varastokantana -80 °C:ssa. Varastoviljelmästä otettiin näyte, joka viivasiirrostettiin agarmaljapinnoille, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi L-tetrasykliiniä, yksittäisten pesäkkeitten saamiseksi kasvatuksen yön yli (16 tuntia) 37 °C:ssa jälkeen.

Yksittäinen CGSC 6300 -pesäke (pICI1386) poistettiin ja uudelleenlietettiin 10 ml:aan L-tetrasykliinilientä, minkä jälkeen 100 µl siirrostettiin välittömästi

kuhunkin 20:een 250 ml:n erlenmeyerkolviin, joissa oli 75 ml L-tetrasykliinilientä. 16 tunnin kasvatuksen 37 °C:ssa jälkeen kiertävässä ravistelijassa kolvien sisällöt yhdistettiin pooliksi, joka siirrostettiin fermentoriin, jossa oli 20 litraa modifioitua LCM50-kasvualustaa. Kasvualustan koostumus on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1: Kasvualustan koostumus

Modifioitu LCM50-kasvualusta (A)

- valmistetaan tislattuun veteen:

	g/litra
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NaCl	0,5
Kaseiinihydrolysaatti (Oxoid L41)	2,0
$(NH_4)_2SO_4$	10,00
Hiivauute (Difco)	20,00
Glyseroli	35,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,03
Tiamiini	0,008
$FeSO_4$/sitruunahappo	0,04/0,02
Hivenaineliuos (TES)	(0,5 ml/litra)
Tetrasykliini	(10 mg/litra)

Fermentointi suoritettiin sitten lämpötilassa 37 °C ja pH:ssa 6,7, jota pH:ta säädeltiin lisäämällä automatisoidusti 6 M natriumhydroksidiliuosta. Liuenneen hapen paineen (dOT-) asetusasema oli 50 %:n ilmakyllästys, ja sitä säädeltiin alunperin säätämällä automatisoidusti sekoittajanopeutta fermentorissa. Ilmavirtaus fermentoriin, joka oli aluksi 20 litra/min, mikä vastaa 1,0 tilavuutta/-tilavuus/min (VVM), nostettiin 45 litraksi/min käsin fermentorin sekoittimen nopeuden lähestyessä maksimiaan (1 000 kierr./min). Fermentoinnin annettiin kestää 16 tun-

nin ajan, jona aikana otettiin näytteitä, joista mitattiin viljelmän optinen tiheys ($O.D._{550}$), biomassapitoisuus, kokonaismikrobiproteiinipitoisuus sekä [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-humaani-G-CSF:n akkumuloituminen bakteerisoluihin. Akkumulaatio mitattiin pyyhkäisemällä näytebakteerien kokosolulysaateista saadut Coomassie Blue -värillä värjätyt SDS-PAGE-geelit alalla hyvin tunnetulla tavalla. Kokonaismikrobiproteiini määritettiin Lowryn menetelmällä. Hiivauuteliuos (225 g/litra) pumpattiin fermentoriin 4,5 tunnin kuluttua siirrostuksesta pitoisuudessa 1,7 g/litra/tunti.

Hiililähde- (glyseroli) varannon kasvualustassa loppuessa dOT kohosi nopeasti 50 %:n ilmakyllästyksestä. Tällöin lietteeseen pumpattiin glyserolia (714 g/litra) ja ammoniumsulfaattia (143 g/litra) sisältävää syöttöliuosta. Koska bakteerien hapenottonopeus (OUR) lähestyi fermentorin maksimaalista hapensiirtonopeutta (OTR) juuri ennen kuin hiililähde kasvualustaerästä kului loppuun, syöttönestettä pumpattiin fermentoriin nopeudella, joka rajoitti bakteerien OUR:n noin 80 - 90 %:iin fermentorin maksimi-OTR:stä. Syöttönopeutta säädettiin käsin palauttamaan ja sitten pitämään dOT:n 50 %:n ilmakyllästysasteella kuvatuissa olosuhteissa.

c) Kohdassa (b) kuvattu fermentointimenetelmä toistettiin mutta 30 °C:n lämpötilassa ja 35 tuntia kestävänä. 30 °C:n fermentointilämpötilaa lukuunottamatta kasvualusta- ja fermentointiolosuhteet olivat identtiset kohdassa (b) kuvattuihin nähden.

d) Puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1(f).

Esimerkki 14

[Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Arg^{30}]-hu-G-CSF:n valmistus

Mutatointitemplaatti, M13mp18, joka sisälsi [Glu^{15}, $Ser^{17,27}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-hu-G-CSF-geenin, valmistettiin kuten kuvattiin esimerkin 1 kohdassa (d), jolloin plasmidi

pICI1080 korvattiin plasmidilla pICI1266. Esimerkin 3 mukainen menettely toistettiin käyttäen edeltävää templaattia ja mutatointioligonukleotidia nimeltä SEQ ID nro 37. Sen tehtävänä oli muuttaa Lys-kodoni asemassa 30 Arg:ksi. Kaksisäikeinen rfDNA valmistettiin yhdestä halutun muutoksen käsittävästä fagista. EcoRI-SalI-ilmennyskasetti eristettiin ja kloonattiin pICI0080:aan kuten kuvattiin esimerkissä 12, jolloin saatiin pICI1343.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 3 ja puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Esimerkki 15

[$Arg^{11,23}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Mutatointitemplaatti, M13mp18, joka sisälsi [Arg^{11}, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF-geenin, valmistettiin kuten kuvattiin esimerkin 1 kohdassa (d), jolloin plasmidi pICI1080 korvattiin plasmidilla pICI1239. Esimerkin 3 mukainen menettely toistettiin käyttäen edeltävää templaattia ja mutatointioligonukleotidia nimeltä SEQ ID nro 38. Sen tehtävänä oli muuttaa Lys-kodoni asemassa 23 Arg:ksi. Kaksisäikeinen rfDNA valmistettiin yhdestä halutun muutoksen käsittävästä fagista ja ilmennyskasetti eristettiin ja kloonattiin kuten kuvattiin esimerkissä 14, jolloin saatiin pICI1388.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 16

[$Arg^{11,34}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 15 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 39 oligon SEQ ID nro 38 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa Lys-kodoni asemassa 34 Arg:ksi), jolloin saatiin pICI1389.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 17

[$Arg^{11,40}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 15 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia nimeltä SEQ ID nro 40 oligon SEQ ID nro 38 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa Lys-kodoni asemassa 40 Arg:ksi), jolloin saatiin pICI1390.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 18

[Ala^{1}, Thr^{3}, Tyr^{4}, $Arg^{5,11}$, $Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 15 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 41 oligon SEQ ID nro 38 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa kodonit tähteille Thr, Leu, Gly ja Pro asemissa 1, 3, 4 ja 5 tähteiksi Ala, Thr, Tyr ja vastaavasti Arg), jolloin saatiin pICI1391.

Tämän esimerkin mukainen polypeptidi havainnollistaa sitä, että esillä olevan keksinnön mukaista modifikaatiota voidaan soveltaa polypeptidiin, jolla tiedetään olevan G-CSF-aktiivisuutta, polypeptidin liuosstabiilisuuden kohottamiseksi. Tunnettu polypeptidi on [Ala^{1}, Thr^{3}, Tyr^{4}, Arg^{5}, Ser^{17}]-hu-G-CSF, jota kuvataan EP-patenttijulkaisussa nro 272 703, jonka patentin omistaa Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 19

[Arg^{11}, $Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 4 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidin SEQ ID nro 30 tilalla oligoa SEQ ID

nro 28 (tämän tehtävänä on muuttaa Gln-kodoni asemassa 11 Arg:ksi). Ilmennyskasetti siirrettiin pICI0020:n asemesta ilmennysplasmidiin pICI0080 kuten kuvattiin esimerkissä 14, jolloin saatiin pICI1405.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 20

[$Ser^{17,27,60,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 19 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 29 oligon SEQ ID nro 28 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa kodonit Pro-tähteille asemissa 60 ja 65 Ser:ksi), jolloin saatiin pICI1400.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 21

[Arg^{11}, $Ser^{17,27,60}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 6 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotideja SEQ ID nro 28 ja SEQ ID nro 42 oligojen SEQ ID nro 33 ja SEQ ID nro 34 tilalla. Näiden tehtävänä on muuttaa kodonit Gln:lle asemassa 11 ja Pro:lle asemassa 60 vastaavasti Arg:ksi ja Ser:ksi). Ilmennyskasetti siirrettiin ilmennysplasmidiin pICI0080 pICI0020:n asemesta, jolloin saatiin pICI1401.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 22

[Arg^{11}, $Ser^{17,27,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 43 oligon SEQ ID nro 29 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa kodoni Pro-tähteelle asemassa 65 Ser:ksi), jolloin saatiin pICI1418.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 23

[$Ser^{17,27,60}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 19 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 42 oligon SEQ ID nro 28 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa kodoni Pro:lle asemassa 60 Ser:ksi), jolloin saatiin pICI1402.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 24

[$Ser^{17,27,65}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 4 kuvattu menettely toistettiin käyttäen oligonukleotidia SEQ ID nro 43 oligon SEQ ID nro 30 tilalla (tämän tehtävänä on muuttaa Pro-kodoni asemassa 65 Ser:ksi), jolloin saatiin pICI1420.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi sekä otsikkoyhdisteen puhdistus suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1.

Esimerkki 25

[Arg^{11}, $Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-hu-G-CSF:n valmistus

Plasmidia pICI1348, jota kuvattiin esimerkissä 8, pilkottiin XbaI:llä puskurissa M, ja sitten SalI:llä puskurissa H, minkä jälkeen suurikokoinen XbaI-SalI-vektorifragmentti eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä aiemmin kuvatun mukaisesti. Plasmidia pICI1243, jota kuvattiin esimerkissä 4, pilkottiin XbaI:llä ja SalI:llä aiemmin kuvatun mukaisesti, minkä jälkeen pieni XbaI-SalI-fragmentti eristettiin 0,7-%:isesta agaroosigeelistä ja ligatoitiin edeltävään XbaI-SalI-vektorifragmenttiin. Ligatointiseoksella transformoitiin E. coli -kanta MSD 522 ja transformantit valikoitiin kasvun perusteella L-agar-

maljapinnoilla, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi ampisilliiniä (50 µg/ml). Kolme pesäkettä seulottiin proteiini-ilmennyksen osalta kuten kuvattiin esimerkissä 12, mutta korvaten tetrasykliini ampisilliinillä pitoisuutena 50 µg/ml. Plasmidi-DNA oikeanlaisen proteiinin ilmentävästä pesäkkeestä nimettiin pICI1421:ksi.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 3 ja puhdistus kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Esimerkki 26

[$Arg^{11,165}$, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Glu^{26,28}$, $Lys^{30,58}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Mutatointitemplaatti, M13mp18, joka sisälsi geenin [Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$, Lys^{30}]-hu-G-CSF:lle, valmistettiin kuten kuvattiin esimerkin 1 kohdassa (d), jolloin plasmidi pICI1080 korvattiin pICI1348:lla (jota kuvattiin esimerkissä 8). Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen edeltävää templaattia ja oligoiksi SEQ ID nro 28 ja SEQ ID nro 29 nimettyjen mutatointioligonukleotidien tilalla oligoja SEQ ID nro 44 ja SEQ ID nro 32 (näiden tehtävänä on muuttaa Trp-kodoni asemassa 53 Lys:ksi ja Tyr-kodoni asemassa 165 Arg:ksi), jolloin saatiin pICI1422.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 3 ja puhdistus kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Esimerkki 27

[Arg^{11}, Glu^{15}, $Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$, $Lys^{30,49,58}$]-hu-G-CSF:n valmistus

Mutatointitemplaatti valmistettiin kuten kuvattiin esimerkissä 26. Esimerkissä 4 kuvattu menettely toistettiin käyttäen edeltävää templaattia ja SEQ ID nroksi 30 nimetyn mutatointioligonukleotidin tilalla oligoa SEQ ID nro 45 (tämän tehtävänä on muuttaa kodonit Pro:lle asemassa 44, Leu:lle asemassa 49 ja Gly:lle asemissa 51 ja 55

Ala:ksi, Lys:ksi, Ala:ksi ja vastaavasti Ala:ksi), jolloin saatiin pICI1423.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 3 ja puhdistus kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Esimerkki 28

[$Arg^{11,165}$, $Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$, $Lys^{30,49,58}$]-hu-G-CSF valmistus

Mutatointitemplaatti valmistettiin kuten kuvattiin esimerkin 1 kohdassa (d), jolloin pICI1080 korvattiin pICI1423:lla, jota kuvattiin esimerkissä 27. Esimerkissä 3 kuvattu menettely toistettiin käyttäen edeltävää templaattia ja korvaten oligoiksi SEQ ID nro 28 ja SEQ ID nro 29 nimetyt oligonukleotidit oligoilla SEQ ID nro 32 ja SEQ ID nro 30, jolloin saatiin pICI1424.

Jatkokäsittely otsikkoyhdisteen saamiseksi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 3 ja puhdistus kuten kuvattiin esimerkissä 6.

Verrokkiesimerkki 1

Humaani-G-CSF:n valmistus

a) Synteettisen geenin valmistus humaani-G-CSF:lle

DNA-sekvenssi (kuvio 2), joka koodittaa kuvion 2 mukaisen polypeptidin (humaani-G-CSF) aminohapposekvenssin, suunniteltiin ottaen huomioon seuraavat näkökohdat:

1) DNA-sekvenssissä on oltava yksisäikeiset koheesiopäät, jotta se voidaan ligatoida plasmidissa sopiviin kohtiin.

2) DNA-sekvenssissä on oltava sarja restriktioendonukleaasisekvenssejä kautta koko geenin myöhemmän geneettisen manipuloinnin helpottamiseksi.

3) DNA-sekvenssissä on oltava luentapäätöskodoni.

4) Kodonit koodialueen 5'-päässä valittiin normaalisti runsaasti A/T:tä sisältäviksi. Muut kodonit valittiin normaalisti E. colin ilmennyksessään suosimista.

Geeni koottiin 18 oligonukleotidista nimeltä SEQ ID nro 1 - SEQ ID nro 28, jotka esitetään jäljempänä.

Oligonukleotidien valmistus

Jäljempänä esitetyt oligonukleotidisekvenssit valmistettiin käyttäen Applied Biosystems 380A -DNA-syntetisaattoria 5'-dimetoksitrityyliemässuojatuista nukleosidi-2-syaanietyyli-N,N-di-isopropyylifosforamidiiteista ja suojatut nukleosidit kytkettiin huokoisiin lasitukiin, joissa huokoskoko oli säädelty, käyttäen suuruusluokkaa 0,2 mikromoolia olevaa mittakaavaa laitevalmistajan Applied Biosystems Inc. toimittamien suoritusohjeiden mukaan.

Vaihtoehtoisesti oligonukleotidisekvenssit voidaan valmistaa manuaalisilla menetelmillä kuten kuvaavat Atkinson ja Smith julkaisussa "Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach" (M.T. Gait, toim., IRL Press, Oxford, Washington DC, ss. 35 - 81).

Yksityiskohdissaan oligonukleotidisekvenssien valmistus Applied Biosystems 380A -DNA-syntetisaattorilla suoritettiin seuraavasti:

Kukin valmis oligonukleotidi lohkaistiin kiinteästä tuesta ja siitä poistettiin kaikki suojaryhmät, minkä jälkeen se liuotettiin veteen (1 ml). Oligonukleotidiliuoksiin (400 µl) lisättiin 3 M natriumasetaattiliuosta (pH 5,6; 40 µl) ja etanolia (1 ml), minkä jälkeen seokset varastoitiin -70 °C:seen 20 tunniksi. Muodostuneet sakat otettiin sentrifugoimalla talteen (13 000 kierr./min, 10 minuuttia) ja saadut pelletit pestiin etanoli/vedellä (7:3) (200 µl) ja kuivattiin sitten nopeasti tyhjössä, minkä jälkeen ne liuotettiin veteen (15 µl) ja 10 µl:aan formamidi/väriseosliuosta (10 mM NaOH, 0,5 mM EDTA, 0,01 % bromifenolisinistä, 0,01 % ksyleenisyanolia, 80 % formamidia).

Oligonukleotideja puhdistettiin 10-%:isessa polyakryyliamidigeelissä 50 mM Tris-boraatissa (pH 8,3), joka sisälsi pitoisuuden 8,3 M urea. Oikeanmittaiset oligonuk-

leotidit tunnistettiin UV-varjostuksella (Narang et al., Methods Enzymol. 68 (1979) 90 - 98), normaalisti voimakkain nauha, ja leikattiin geelistä sekä elektroeluoitiin 5 mM Tris-boraatissa (pH 8,3) 300 mV:n jännitteellä 3 - 4 tunnin ajan. Vesiliuokset konsentroitiin noin 200 µl:ksi käsittelemällä n-butanolilla (sekoitus, vortekspyöritys ja ylemmän orgaanisen kerroksen poistaminen). Puhdistetut oligonukleotidit saostettiin -70 °C:ssa 20 tunnissa 0,3 M natriumasetaattiliuoksesta etanolia lisäämällä (2,5 tilavuutta).

Geenin kokoaminen

Oligonukleotideja SEQ ID nro 2 - SEQ ID nro 17 (kumpikin 400 pM) (jäljempänä määritellyn mukaisesti) fosforyloitiin käyttäen T4-polynukleotidikinaasia (3,6 yksikköä) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa 25 µl:ssa liuosta, joka sisälsi ATP:tä (800 pM, jossa 25 pM gamma-^{32}P-ATP:tä), pitoisuudet 100 µM spermidiini, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) ja 0,1 mM EDTA. Liuoksia kuumennettiin 100 °C:ssa 5 minuutin ajan reaktioiden päättämiseksi, minkä jälkeen ne sekoitettiin pareittain taulukossa 1 esitetyn mukaisesti dupleksien A - I saamiseksi (oligonukleotideja SEQ ID nro 1 ja SEQ ID nro 18 (400 mM 25 µl:ssa) käytettiin fosforyloimattomina). Lisättiin 0,3 M natriumasetaattia (pH 5,6, 200 µl) ja etanolia (850 µl) ja dupleksejа saostettiin -20 °C:ssa 20 tunnin ajan. Saadut sakat otettiin sentrifugoimalla talteen ja pestiin etanoli:vedellä (7:3) ja liuotettiin sitten veteen (50 µl). Oligonukleotidiparit juotettiin yhteen kuumentamalla ensin liuoksia 100 °C:ssa 2 minuutin ajan kiehuvassa vesihauteessa. Sen jälkeen hauteen annettiin jäähtyä hitaasti 40 °C:seen (mikä kestää noin 4 tuntia). Kolme dupleksiparia sisältävät liuokset yhdistettiin esitetyn mukaisesti (katso taulukko 1), jolloin saatiin ryhmät I - III, jotka kylmäkuivattiin ja liuotettiin 30 µl:aan liuosta, joka sisälsi T4-DNA-ligaasia (1 yksikkö; BRL), pitoisuudet 50 mM Tris (pH 7,6), 10

mM magnesiumkloridi, 5 % (w/v) PEG 8000 -valmistetta, 1 mM ATP, 1 mM DTT (BRL, Focus 8:1 (1986), Winter) ja DNA:ta ligatoitiin 30 °C:ssa 5 minuutin ajan ja sitten 20 tunnin ajan 16 °C:ssa. Lisättiin 3 M natriumasetaattia (20 µl) ja vettä (150 µl) ja tuote saostettiin lisäämällä etanolia (750 µl) ja jäähdyttämällä -20 °C:ssa 20 tunnin ajan. Sakka otettiin talteen sentrifugoimalla ja pestiin etanolilla (1 ml), minkä jälkeen se liuotettiin veteen (15 µl) ja formamidi/väriseokseen (10 µl) ja puhdistettiin 10-%:isessa polyakryyliamidigeelissä liuoksessa 50 mM Tris-boraatti (pH 8,3), 1 mM EDTA ja 8,3 M urea. Sopivan pituisten (173 - 186 emästä) säikeiden nauhat tunnistettiin ottamalla autoradiokuva ja eristettiin yhdessä elektroeluoimalla yksittäisestä geelipalasta kuten edellä kuvattiin yksittäisille oligonukleotidisekvensseille. DNA-säikeet juotettiin ensin kuumentamalla vesiliuosta (50 µl) 100 °C:ssa 2 minuutin ajan ja antamalla sitten liuoksen jäähtyä 40 °C:seen 4 tunnissa.

Ryhmät I, II ja III ligatoitiin yhteen oleellisesti kuten kuvattiin ryhmävalmistukselle, jolloin tuotteena saatiin kuviossa 2 esitetty geenisekvenssi. Saostamisen jälkeen geeni fosforyloitiin käyttäen T4-polynukleotidikinaasia kuten kuvattiin aiemmin yksittäisille oligonukleotideille, minkä jälkeen se liuotettiin veteen (20 µl).

Taulukko 1

Dupleksi	Oligonukleotidi	Kpl emäksiä säikeessä	
		ylempi:	alempi:
A	SEQ ID nro 1 + SEQ ID nro 2	62	64
B	SEQ ID nro 3 + SEQ ID nro 4	60	60
C	SEQ ID nro 5 + SEQ ID nro 6	48	51
D	SEQ ID nro 7 + SEQ ID nro 8	63	60
E	SEQ ID nro 9 + SEQ ID nro 10	63	63
F	SEQ ID nro 11 + SEQ ID nro 12	60	63
G	SEQ ID nro 13 + SEQ ID nro 14	63	60
H	SEQ ID nro 15 + SEQ ID nro 16	60	60
I	SEQ ID nro 17 + SEQ ID nro 18	55	53
I	A + B + C	170	175
II	D + E + F	186	186
III	G + H + I	178	173

b) Synteettisen humaani-G-CSF-geenin kloonaus

Edellä kuvattu synteettinen geeni kloonattiin plasmidivektoriin, pSTP1 (Windass et al., Nucl.Acids Res. 10 (1983) 6639).

Vektorin valmistamiseksi 10 µg STP1:tä liuotettiin veteen (37,5 µl) ja 10X B-restriktiopuskuriin (4,5 µl) (BCL). Restriktioendonukleaasi SalI (3 µl) (BCL, 8 yksikköä/µl) lisättiin ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan, kunnes linearisoitua plasmidia esiintyi voittopuolisesti superkierteisiin ja lovettuihin rengasmuotoihin verrattuna. DNA saostettiin etanolilla 4 °C:ssa 30 minuutissa, se pestiin etanoli:vedellä (7:3) ja liuotettiin sitten veteen (39,5 µl), 10X H-puskuriin (4,5 µl) (BCL). Restriktioendonukleaasi EcoRI (1 µl) (BCL, 90 yksikköä/µl) lisättiin ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan, kunnes suurikokoinen EcoRI-SalI-fragmentti oli vallitseva. DNA:ta saostettiin -20 °C:ssa 20 tunnin ajan, minkä jälkeen se pestiin etanoli:vedellä (7:3) ja liuotettiin sitten veteen (20 µl).

Suurikokoinen EcoRI-SalI-fragmentti puhdistettiin preparatiivisessa 1-%:isessa agaroosigeelissä, elektro-

eluoitiin ja saostettiin kuten kuvattiin aiemmin sekä liuotettiin sitten veteen (20 µl). Synteettisen geenin ligatoimiseksi seosta, jossa oli vektori-DNA:ta (2 µl EcoRI-SalI-fragmenttiliuosta), synteettinen geeni (5 µl aiemmin kuvattua vesiliuosta, 5X ligaasipuskuria (6 µl - 250 mM Tris pH 7,6, 50 mM $MgCl_2$, 25 % (w/v) PEG 8000 -valmistetta, 5 mM ATP, 5 mM DTT, exBRL), vettä (15 µl) ja T4-DNA-ligaasia (2 µl, 1 U/µl), inkuboitiin 16 °C:ssa 4 tunnin ajan. DNA-seosta käytettiin sellaisenaan (joko 1 µl pelkkää ligatointiseosta tai 2 µl ligatointiseosta laimennettuna 5X vedellä) E. coli -kannan HB101 transformoimiseksi. DNA-seos (1 tai 2 µl) lisättiin transformoitumiskelpoisiin E. coli -HB101-soluihin (20 µl, BRL) jäissä ja seosta inkuboitiin jäissä 45 minuutin ajan, minkä jälkeen soluille annettiin 45 sekuntia kestävä lämpöshokki 42 °C:ssa. Kahden minuutin jäissä kuluttua 100 µl SOC-puskuria (Bactotryptone 2 %, hiivauute 0,5 %; NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM; $MgCl_2$, $MgSO_4$ 20 mM (10 mM kumpaakin); glukoosi 20 mM) lisättiin ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Lietenäytteitä maljoitettiin L-maljapinnoille, joissa maljoissa kasvualusta sisälsi 50 µl/ml ampisilliinia. Transformantit seulottiin kloonatun synteettisen geenin läsnäolon suhteen käyttäen pesäkehybridisaatioanalyysia ja vakiomenetelmiä, joita kuvataan julkaisussa "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Maniatis et al. (Cold Spring Harbor) sekä UK-patenttihakemusjulkaisussa nro 8 502 605. Kaikkiaan 100 pesäkettä viivasiirrostettiin suodattimille (Schleicher & Schuell), kasvatettiin 37 °C:ssa 20 tunnin ajan, tuotettiin soluihin lyysi sekä paistettiin. Suodatinta hybridisoitiin 65 °C:ssa 20 tunnin ajan radioaktiiviseen koettimeen, joka oli valmistettu oligonukleotidisekvenssistä SEQ ID nro 1 käyttäen satunnaisleimauspakkausta (Pharmacia). Viittä pesäkettä 1 - 5, jotka antoivat positiivisen hybridisaatiosignaalin, kasvatettiin L-liemessä 37 °C:ssa 20 tunnin

ajan pienessä mittakaavassa (100 ml) ja plasmidi-DNA valmistettiin sentrifugoimalla seesiumkloridigradientissa oleellisesti kuten kuvataan julkaisussa "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Maniatis et al. (Cold Spring Harbor).

DNA sekventoitiin tavanomaisella dideoksiketjupäämenetelmällä kuten kuvaavat Sanger et al. julkaisussa Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74 (1977) 5463 - 5467) käyttäen Sequenase- (tavaramerkki) pakkausta (United States Biochemical Corporation). Oligonukleotideja SEQ ID nro 19 - SEQ ID nro 23 (jäljempänä määritellyn mukaisesti, katso myös taulukko 2) käytettiin sekventointialukkeina.

Taulukko 2

Koodi	**Alukkeen sijoituskohta**
SEQ ID nro 19	214 - 234 ylempi säie
SEQ ID nro 20	333 - 353 ylempi säie
SEQ ID nro 21	375 - 395 alempi säie
SEQ ID nro 22	207 - 227 alempi säie
SEQ ID nro 23	69 - 93 alempi säie

Plasmidi-DNA kloonista 5 sisälsi kuviossa 2 esitetyn DNA-sekvenssin. Plasmidilla (pAG88) transformoitiin transformoitumiskelpoisia soluja seuraavista E. coli -kannoista tavanomaisilla menettelyillä:

HB101

CGSC 6300 (jota kutsutaan jatkossa myös kannaksi MSD 522).

E. coli -kantoja HB101 ja MSD 522 (CGSC 6300) on vapaasti saatavana. Täten ne voidaan esimerkiksi saada talletuslaitoksesta E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA. Lisäksi E. coli HB101 voidaan lisäksi saada esimerkiksi valmistajalta BRL yrityksen Gibco

Limited Unit 4, Cowley Mill Trading Estate, Longbridge Way, Uxbridge, UB8 2YG, Middlesex, Englanti, tai Gibco Laboratories, Life Technologies Inc., 3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA toimittamana. Kannan HB101 genotyyppiä kuvataan edellä mainitussa käsikirjassa "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" luonnehdinnalla Sup E44 hsd S20 (r_B^- m_B^-)rec A 13 ara-14 F$^-$leu 6 thi-1 proA2 lac Y1 gal K2 rps L20 xyl$^-$5 mtl$^-$1. Kannan MSD 522 (CGSC 6300) genotyyppi on esitetty esimerkissä 13.

c) Humaani-G-CSF-geenin kloonaus ilmennysvektoriin

Edellä kuvattu geeni kloonattiin plasmidiin pICI0020 esimerkissä 1(c) kuvatun mukaisesti, jolloin saatiin ilmennysplasmidi pICI1056.

d) Fermentointi

Plasmidi pICI1056 transformoitiin ja fermentointi suoritettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1(e) humaani-G-CSF-ilmennyksen saamiseksi.

e) Puhdistus

Puhdistaminen suoritettiin kuten kuvataan suurempien määrien hu-G-CSF:ää saamiseksi kehitettynä toisena puhdistusmenettelynä PCT-patenttijulkaisussa nro WO 87/-01132 sivuilla 48 ja 49, jolloin viimeinen dialyysi suoritettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta vastaan.

Verrokkiesimerkki 2

Geenien valmistus humaani-G-CSF-johdannaisille paikkaohjatulla mutatoinnilla

Käytettiin Ecksteinin ja kanssatyöntekijöiden fosforotioaattimenetelmää:

Taylor, J.W., et al., Nucl.Acids Res. (1985) 8749 - 8764;

Taylor, J.W., et al., Nucl.Acids Res. (1985) 8765 - 8785;

Nakamaye, K., et al., Nucl.Acids Res. (1986) 9679 - 9698;

Sayers, J.R., et al., Nucl.Acids Res. (1988) 791 - 802.

Menettely voidaan suorittaa käyttäen valmistajan Amersham International pakkausta. Menetelmää hahmotellaan alla, jolloin alkuperäiseen menetelmään on suoritettu muutoksia koskien useamman kuin yhden mutatointioligonukleotidin käyttöä sekä niiden oligonukleotidien inkubointilämpötilaa, joiden pituus ylittää 30 emästä.

1. Mutanttioligonukleotidi juotetaan yksisäikeiseen DNA-templaattiin:

Yksisäikeistä DNA-templaattia (1 µg/µl)	5 µl
Fosforyloitua mutatointioligonukleotidia (1,6 pmol/1µl)	2,5 µl
Puskuria 1	3,5 µl
Vettä	6 µl

Käytettäessä kahta mutatointioligonukleotidia samanaikaisesti 2,5 µl (1,6 pmol/1µl) kumpaakin fosforyloitua oligonukleotidia lisättiin 5 µl:aan yksisäikeistä DNA-templaattia (1 µg/µl) 3,5 µl:ssa puskuria 1 ja 3,5 µl:ssa vettä. Käytettäessä 3 mutatointioligonukleotidia 2,5 µl (1,6 pmol/µl) kutakin fosforyloitua oligonukleotidia lisättiin 5 µl:aan yksisäikeistä DNA:ta (1 µg/µl 3,5 µl:ssa puskuria 1 ja 1 µl:ssa vettä). Edeltävät ainesosat sijoitettiin tulpalliseen putkeen 70 °C:seen vesihauteeseen 3 minuutiksi, jos oligonukleotidin pituus oli < 30 emästä, tai kiehuvaan vesihauteeseen 3 minuutiksi, jos oligonukleotidin pituus oli > 30 emästä. Putki sijoitettiin sitten 37 °C:seen vesihauteeseen 30 minuutiksi.

2. Mutantti-DNA-säikeen synteesi ja ligatointi:

Juottoreaktioseokseen lisättiin:

$MgCl_2$-liuosta	5 µl
Nukleotidiseosta 1 (sisältää dCTP-alfa-S:ää)	19 µl
Vettä	6 µl

Klenow-fragmenttia (6 yksikköä) 1,5 µl

T4-DNA-ligaasia (5 yksikköä) 2 µl

Edeltävät ainesosat sijoitettiin 16 °C:seen vesihauteeseen, johon ne jätettiin yön yli.

3. Yksisäikeisen (ei-mutatoituneen) DNA:n poistaminen käyttäen kertakäyttöisiä suodatusyksiköitä

Reaktioseokseen vaiheesta 2 lisättiin seuraavat ainesosat:

Vettä 170 µl

5 M NaCl-liuos 30 µl

250 µl:n näyte lisättiin suodatusyksikön yläosaan ja sentrifugoitiin 1 500 kierr./min kierrosnopeudella 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa Sorvall RT6000B -pöytäsentrifugissa käyttäen ulospäin kääntyvää Sorvall H1000B -roottoria. Näyte kulkee kahden nitroselluloosakalvon läpi, jotka sitovat yksisäikeisen DNA:n kaksisäikeisen DNA:n kulkiessa vapaasti alla odottavaan keräysputkeen.

100 µl 500 mM NaCl-liuosta lisättiin, minkä jälkeen pyöritettiin uudestaan 10 minuutin ajan mahdollisesti jäljelle olevan rfDNA:n pesemiseksi pois.

Suodokseen lisättiin seuraavat ainesosat:

3 M natriumasetaattia (pH 6,0) 28 µl

Kylmää etanolia (-20 °C) 700 µl

Seos sijoitettiin kuivajää-etanolihauteeseen 20 minuutiksi, minkä jälkeen sentrifugoitiin Eppendorf-mikrofugissa 15 minuutin ajan.

Sen jälkeen pelletti uudelleenlietettiin 10 µl:aan puskuria 2.

4. Ei-mutanttisäikeen loveaminen käyttäen NciI:tä

Vaiheen 3 reaktioseokseen lisättiin 65 µl puskuria 3 ja 8 yksikköä NciI:tä (1 µl). Seos sijoitettiin 37 °C:seen vesihauteeseen 90 minuutiksi.

5. Ei-mutanttisäikeen pilkkominen käyttäen eksonukleaasi-III:ea

Vaiheen 4 reaktioseokseen lisättiin:

500 mM NaCl-liuosta	12 µl
Puskuria 4	10 µl
Eksonukleaasi-III:ea (50 yksikköä)	2 µl

Seos sijoitettiin 37 °C:seen vesihauteeseen ja inkuboitiin 30 minuutin ajan 37 °C:ssa (50 yksikköä eksonukleaasi-III:ea pilkkoo suunnilleen 3 000 emästä 30 minuutissa). Sitten seos sijoitettiin 70 °C:seen vesihauteeseen 15 minuutiksi entsyymien inaktivoimiseksi.

6. Aukkoja käsittävän DNA:n jälleenpolymerointi ja ligatointi

Vaiheen 5 reaktioseokseen lisättiin:

Nukleotidiseosta 2	13 µl
$MgCl_2$-liuosta	5 µl
DNA-polymeraasi-I:tä (4 yksikköä)	1 µl
T4-DNA-ligaasia (2,5 yksikköä)	1 µl

Seos sijoitettiin 16 °C:seen hauteeseen 3 tunniksi.

7. Transformoitumiskelpoisten E. coli -TG1-solujen transformointi DNA:lla:

300 µl vastavalmistettuja transformoitumiskelpoisia E. coli -TG1-soluja (jotka valmistettiin noudattaen Mandelin ja Higan menetelmää) transformoitiin 20 µl:lla reaktioseosta vaiheesta 6 (tehden kaksinkertainen määritys).

Transformantit maljoitettiin matolle log-kasvuvaiheessa olevia TG1-soluja TY-pinta-agarille TY-maljoissa ja inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa.

E. coli -kantaa TG1 on vapaasti saatavana esimerkiksi talletuslaitoksesta E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA sekä valmistajalta Amersham International plc, Amersham Place, Little Chalfont, Amersham, Buckinghamshire HP7 9NA, Englanti heidän "in vitro" -mutatointisysteeminään, joka on oligonukleotidiohjatun mutatoinnin tarvikkeita sisältävä pakkaus (tuotekoodi RPN 1523).

Verrokkiesimerkki 3

G-CSF-biomääritys

Tekijäriippuvainen solulinja, Paterson - G-CSF (FDCP-G), joka saatiin laitoksesta the Paterson Institute, Manchester, Englanti, kloonattiin rajaavan laimentamisen menetelmällä G-CSF:n läsnä ollessa. G-CSF:lle responsiivista kloonia, joka nimettiin klooniksi E7, käytettiin humaaniyhdistelmä-DNA-G-CSF-aktiivisuudenmäärittämiseksi. 2,5 x 10^3 FDCP-G-klooni-E7-solua 100 µl:ssa RPMI 1640 -kasvualustaa, jossa oli 10 % FCS:ää, lisättiin samaan tilavuuteen RPMI 1640 -kasvualustaa, jossa oli 10 % FCS:ää sekä G-CSF:ää. Jokainen G-CSF-näyte mitattiin 10:stä kaksinkertaisesta laimennoksesta. 10 % FCS:ää (vasikansikiöseerumi) sisältävän RPMI 1640 -kasvualustan (katso Moore, G.E., et al. JAMA 199 (1967) 519) lopputilavuus 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn kussakin kuopassa oli 200 µl. Mikrotiitterilevyä inkuboitiin 37 °C:ssa ilmakehässä, jossa oli 5 % CO_2:ta, kostutetussa inkubaattorissa, 4 päivän ajan. Kuoppaa kohden lisättiin 1,0 µCi:tä titrattua tymidiiniä ja inkuboitiin vielä 6 tunnin ajan. Solut otettiin talteen lasikuitusuodatinpapereille ja radioaktiivisuustaso määritettiin suorittamalla nestetuikelaskenta. Tritioidun tymidiinin mukaanliittymistaso todettiin suoraan verrannolliseksi läsnä olevan G-CSF:n määrään. FDCP-G-klooni-E7-määritys kalibroitiin käyttäen humaaniyhdistelmä-DNA-G-CSF:ää, joka saatiin valmistajalta Amersham International ja jonka ilmoitettu spesifinen aktiivisuus oli 10^8 yksikköä/mg proteiinia.

G-CSF-näytteiden tehot määritettiin vertaamalla tunnettuun standardiaktiivisuuteen.

G-CSF-aktiivisuusyksiköt/ml laskettiin seuraavasta kaavasta:

$$\left[\begin{array}{l}\text{G-CSF-standardin}\\ \text{laimennos, joka}\\ \text{antaa 50 \%:n maks.-}\\ \text{nousun } {}^{3}\text{H-tymidiini-}\\ \text{liittymisessä}\end{array}\right] + \left[\begin{array}{l}\text{Näytteen se}\\ \text{laimennos, joka}\\ \text{antaa 50 \%:n maks.-}\\ \text{nousun } {}^{3}\text{H-tymidiini-}\\ \text{liittymisessä}\end{array}\right] \times \left[\begin{array}{l}\text{Yksikköä/ml}\\ \text{aktiivisuus}\\ \text{G-CSF-}\\ \text{standardissa}\end{array}\right]$$

Verrokkiesimerkki 4

G-CSF:n ja sen johdannaisten liuosstabiilisuus

G-CSF:n ja johdannaisten varastoliuosten sopivista laimennoksista fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) testattiin liuosstabiilisuus 4 °C:ssa esimerkissä 9 kuvatun mukaisesti. Liuoksia, joissa pitoisuus oli 1 mg/-ml, 5 mg/ml ja joskus 10 mg/ml proteiinia PBS:ssä, inkuboitiin 37 °C:ssa 14 päivän ajan. Liuoksia tarkasteltiin visuaalisesti säännöllisin väliajoin merkkien saostumisesta havaitsemiseksi. 14 päivän kuluttua kutakin liuosta sentrifugoitiin 14 000 kierr./min kierrosnopeudella 20 minuutin ajan, supernatantti poistettiin dekantoimalla ja pelletti uudelleenliuotettiin PBS:ään, jossa oli 1 % (w/v) N-lauroyylisarkosiinia. Kokonaisproteiinisisältö kussakin supernatantissa ja uudelleenliuotettu sakka arvioitiin A_{280}-mittauksilla ja monomeeripitoisuus kussakin arvioitiin käänteisfaasi-HPLC:llä. Nämä ilmaistiin prosentteina vastaavista tuloksista, jotka saatiin liuoksista inkubointia aloitettaessa, ja liuoksesta, jossa pitoisuus oli 1 mg/ml ja jota inkuboitiin 4 °C:ssa 14 päivän ajan. Vaihteluja kokonaisproteiini- ja monomeeriarvioiden välillä havaittiin vain joissakin uudelleenliuotetuissa pelleteissä. Kustakin lähtöpitoisuudesta liuokseen jääneen proteiinin prosentuaalinen osuus supernatanteissa on koottu oheiseen taulukkoon.

Tuotteen spesifinen aktiivisuus kussakin supernatantissa inkuboinnin jälkeen osoitettiin samaksi kuin lähtöliuoksessa, eikä eroja havaittu SDS-PAGE:ssa pelkistävissä tai ei-pelkistävissä olosuhteissa.

Saatiin seuraavat tulokset:

G-CSF-johdannaiset	Spes. akt. (U/mgx10^9)	Liuosstabiilisuus* 1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
[Met^{-1}]hu G-CSF	0,4	23	nd	nd
[Met^{-1},Ser^{17}]hu G-CSF	1,0	80	20	nd
[Met^{-1},$Ser^{17,27}$]hu G-CSF	1,5	80	40	nd
[Met^{-1},Arg^{11},$Ser^{17,27,60,65}$] hu G-CSF	1,2	98	94	92
[Met^{-1},$Ser^{17,27}$,Glu^{111},$Ser^{115,116}$]hu G-CSF	2,7	100	72	50
[Met^{-1},$Ser^{17,27}$,$Arg^{11,165}$,Lys^{58}] hu G-CSF	1,2	92	77	47
[Met^{-1},Glu^{15},$Ser^{17,27}$,$Ala^{26,28}$, Lys^{30}]hu G-CSF	1,0	100	100	94
[Met^{-1},$Ser^{17,27}$,$Lys^{49,58}$,$Ala^{44,51,55}$] hu G-CSF	1,0	84	69	44
[Met^{-1}, Arg^{11},Glu^{15},$Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28}$,Lys^{30}] hu G-CSF	2,6	100	103	93
[Met^{-1},Glu^{15},$Ser^{17,27}$,$Ala^{26,28}$, Arg^{30}]hu G-CSF	0,85	100	100	100
[Met^{-1},$Arg^{11,23}$,$Ser^{17,27,60,65}$] hu G-CSF	2,5	100	98	88
[Met^{-1},$Arg^{11,34}$,$Ser^{17,27,60,65}$] hu G-CSF	1,4	105	92	80
[Met^{-1},$Arg^{11,40}$,$Ser^{17,27,60,65}$] hu G-CSF	1,3	108	100	87
[Met^{-1},Ala^{1},Thr^{3},Tyr^{4},$Arg^{5,11}$, $Ser^{17,27,60,65}$]hu G-CSF	1,5	106	100	89
[Met^{-1},Arg^{11},$Glu^{15,111,115,116}$,$Ala^{26,28}$,Lys^{30}]hu G-CSF	0,5	100	100	100
[Met^{-1},$Arg^{11,165}$,Glu^{15},$Ser^{17,27,60,65}$ $Ala^{26,28}$,$Lys^{30,58}$]hu G-CSF	0,65	100	100	100
[Met^{-1},Arg^{11},Glu^{15},$Ser^{17,27,60,65}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$,$Lys^{30,49,58}$] hu G-CSF	0,20	100	100	95

[Met^{-1},$Arg^{11,165}$,$Glu^{15,111}$, $Ser^{17,27,60,65,115,116}$, $Ala^{26,28,44,51,55}$,$Lys^{30,49,58}$] hu G-CSF	0,05	100	100	100
[Met^{-1},Arg^{11},$Ser^{17,27}$]hu G-CSF	0,73	97	35	12
[Met^{-1},$Ser^{17,27,60,65}$]hu G-CSF	0,71	100	94	86
[Met^{-1},Arg^{11},$Ser^{17,27,60}$]hu G-CSF	0,81	99	65	32
[Met^{-1},Arg^{11},$Ser^{17,27,65}$]hu G-CSF	0,80	100	96	89
[Met^{-1},$Ser^{17,27,60}$]hu G-CSF	0,80	95	68	36
[Met^{-1},$Ser^{17,27,65}$]hu G-CSF	0,83	100	94	90

* Prosenttiosuus, joka on jäänyt liuokseen PBS:ään 14 päivän 37 °C:ssa jälkeen (määritetään UV:llä; käytettävissä olevalla HPLC:llä).

nd merkitsee "ei suoritettu".

[Met^{-1}, Ser^{17}]-hu-G-CSF voidaan saada kuten kuvataan verrokkiesimerkissä 5.

Edeltävät tulokset osoittavat, että esillä olevan keksinnön mukaiset modifikaatiot parantavat liuosstabiilisuutta ilman G-CSF-aktiivisuuden menetystä, jolloin [Met^{-1}, Ser^{17}]-hu-G-CSF alkaa pitoisuutena 5 mg/ml saostua 3 tunnissa.

Verrokkiesimerkki 5

[Ser^{17}]-hu-G-CSF:n valmistus

Esimerkissä 2 kuvattu menettely [Met^{-1}, $Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF:n valmistamiseksi toistettiin tehden seuraavat muutokset:

1) Fosforyloitava dupleksi valmistettiin oligonukleotidisekvensseistä SEQ ID nrot 24, 25, 3 ja 4, jolloin sekvenssit SEQ ID nro 3 ja 4 korvasivat vastaavasti esimerkeissä 1 ja 2 käytetyt sekvenssit SEQ ID nro 26 ja 27.

2) Dupleksi, johon kohdassa (1) viitataan, fosforyloitiin käyttäen T4-polynukleotidikinaasia, mutta sitä pilkottiin SnaBI:llä (10 yksikköä) 1 x M -puskurissa (BCL; 30 µl) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa.

3) Puhdistuksen etanolilla jälkeen puhdistettiin 72 ep:n EcoRI-SnaBI-fragmentti eikä 143 ep:n EcoRI-MstII-fragmenttia.

4) Synteettinen EcoRI-SnaBI-fragmentti kloonattiin plasmidivektoriin pAG88 kuten kuvattiin verrokkiesimerkissä 1 ja vektorin valmistamiseksi pAG88:aa pilkottiin SnaBI:llä (20 yksikköä; BCL) 1 x M -puskurissa (BCL; 100 µl) 2 tunnin ajan 37 °C:ssa eikä MstII:lla 1 x H -puskurissa.

5) Etanolisaostuksen jälkeen 1-%:isesta agaroosigeelistä puhdistettiin suurikokoinen EcoRI-SnaBI-fragmentti suurikokoisen EcoRI-MstII-fragmentin asemesta.

6) [Ser^{17}]-hu-G-CSF-geenin sisältävä plasmidi nimettiin pICI1105:ksi.

Verrokkiesimerkki 6

pICI0080:n valmistus

a) pTB357:n (jota tässä kutsutaan pLB004:ksi) valmistus

Plasmidissa pTB357 on repressoitu tetrasykliiniresistenssimääre, jollainen tavataan luontaisesti esiintyvästä plasmidista RP4. Tämä repressoitu systeemi salpaa tetA-geenin ilmentymisen tetrasykliinin puuttuessa, kun sitä vastoin useimpien lääkeresistenssimekanismien ilmentyminen on konstitutiivinen.

Tet-lokuksen kartoittivat ensimmäisinä RP4:ään Barth ja Grinter (J.Mol.Biol. 113 (1977) 455 - 474). Tämän osoitettiin koostuvan viereisistä geeneistä: tetA, rakenneresistenssigeeni ja tetR, repressorigeeni, ja tämä alue on sekventoitu (Klock et al., J.Bacteriol. 161 (1985) 326 - 332). Nämä geenit sijaitsevat vierekkäisissä BglII-SmaI- ja SmaI-SmaI-fragmenteissa. BglII-keskus on ainutkertainen

RP4:ssä, mutta SmaI-keskuksia on viisi (Lanka, Lurz ja Furste, Plasmid 10 (1983) 303 - 307).

i) tetA + tetR -geenien kloonaus

Plasmidi RP4 on perusteellisesti dokumentoitu (Datta et al., J.Bacteriol. 108 (1971) 1244) ja sitä on vapaasti saatavana. Lisäksi plasmidi RP4 on talletettu talletuslaitokseen the National Collection of Type Cultures, 61 Colindale Avenue, Lontoo, NW9 5HT hakunumeroilla 50078 ja 50437. Tämän plasmidin sisältäviä E. coli -kantoja kasvatettiin selektiivisissä liemiviljelmissä ja plasmidi-DNA eristettiin käyttäen suurennettua mittakaavaa Holmesin ja Quigleyn menetelmästä (Holmes ja Quigley, Anal.Biochem. 114 (1981) 193 - 197). Siitä poistettiin proteiinit käsittelemällä 2,5 M ammoniumasetaatilla, minkä jälkeen se uudelleensaostettiin isopropanolilla. Tätä plasmidi-DNA:ta käsiteltiin valmistajan suosittelemissa olosuhteissa restriktioentsyymillä BglII leikellen se kokonaan. Sen jälkeen se pilkottiin osittain XmaI:llä käyttäen laimennettua entsyymiä ja lyhyitä inkubointiaikoja. XmaI on SmaI:n isoskitsomeeri, mutta se tuottaa 4-nukleotidikoheesiopäät leikkauskohtiinsa.

Vektoriplasmidi pUC8 (Yanisch-Perron, Vieira ja Messing, Gene 33 (1985) 103 - 119) valmistettiin vastaavalla tavalla ja leikeltiin BamHI:llä ja XmaI:llä täydellisesti. RP4-fragmentit kloonattiin tähän vektoriin ligatoimalla T4-ligaasilla 12 °C:ssa 16 tunnin ajan. Tällä transformoitiin E. coli C600, josta oli tehty transformoitumiskelpoinen käyttäen kalsiumkloridimenetelmää (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Sitten viljelmät maljoitettiin kasvualustalle, joka valikoi tetrasykliiniresistenssin suhteen.

E. coli -kantaa C600 on vapaasti saatavana lukuisista lähteistä, mukaan lukien useat viljelmäkokoelmat kuten E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA, jossa sen hakunumero on nro GCSC 3004. E. coli -kannan

C600 genotyyppi on K12 thr-1 leuB6 thi-1 hsdS1 lacY1 tonA21 lambda⁻supE44.

Useita pesäkkeitä, joilla oli tämä resistenssi, tutkittiin etsien odotettua fenotyyppiä (ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssi, mutta ei kanamysiiniresistenssiä, joka osoittaisi itse RP4:ää). Pesäkkeille, joilla oli oikeat resistenssit, suoritettiin kloonianalyysi eristämällä plasmidi-DNA (Holmesin ja Quigleyn menetelmä). Nämä valmisteet leikeltiin EcoRI:llä ja HindIII:lla ja analysoitiin geelielektroforeettisesti. Tämä varmisti kloonatun insertin koon, joksi todettiin juuri se 2,45 ke:tä, joka RP4:n BglII-XmaI-XmaI-fragmentille oli ennustettu. Klooni, joka käsittää tämän tetA- ja tetR-geenit sisältävän fragmentin, nimettiin pTB344:ksi.

ii) Tet-geenin poistaminen pAT153:sta

Tet-geenin poistaminen vektoriplasmidista pAT153 oli välttämätöntä ennen tetA + tetR -kasetin RP4:stä insertointia geenin kahdentumisen estämiseksi, mikä tapahtuessaan voisi johtaa geneettiseen epästabiilisuuteen. Samoin tet-geeni ei mahdollisesti tule tehokkaasti suppressoiduksi ei-kognaatti-tetR:n toimesta. Poistaminen suoritettiin eristämällä plasmidi-DNA pAT153:sta ja pilkkomalla se EcoRI:llä ja AvaI:llä. Näiden keskuksien väliin kloonattiin synteettiset oligonukleotidit, joiden sekvenssi oli SEQ ID nro 59:

5' AATTCGCATGCGGATCCATCGATC3'

3'GCGTACGCCTAGGTAGCTAGAGCC5'

Nämä sopivat EcoRI- ja AvaI-koheesiopäihin ja sisältävät lisäksi SphI-, BamHI- ja ClaI-keskukset. Transformoinnin ja valikoinnin jälkeen klooneista tutkittiin tetrasykliiniresistenssimääreen menetys. Plasmidi-DNA yhdestä kloonista sekventoitiin sen varmistamiseksi, että ennustettu sekvenssi oli oikea. Tämä plasmidi nimettiin pCH19:ksi.

iii) TetA + tetR -geenien insertointi

TetA- ja tetR-geenit eristettiin pTB344:stä EcoRI -PstI-fragmenttina. pUC8-vektori tuhottiin leikkaamalla SspI:llä, koska se käsittää saman valikointimääreen (ampisilliiniresistenssi) kuin pCH19. Plasmidi-pCH19-DNA pilkottiin EcoRI:llä ja PstI:llä ja ligatoitiin sitten tet-geenit sisältävään 2,45 ke:n fragmenttiin. Tällä transformoitiin E. coli -kanta C600 maljoittaen viljelmä valikoiden tetrasykliiniresistenttien pesäkkeittein suhteen. Tet-geenien insertointi suunniteltiin korvaamaan valtaosin bla-geenit pCH19:ssä, joka oletettavasti täten menettää ampisilliiniresistenssimääreensä. Ampisilliiniresistenssin katoaminen transformanteista varmistettiin. Muutamasta kloonista eristettiin sitten plasmidi-DNA, jolle suoritettiin restriktioanalyysi. Tämä varmisti, että rakennetulla plasmidilla oli aiottu rakenne. Se nimettiin pTB351:ksi.

iv) Cer-sekvenssin insertointi

Luontaisesti esiintyvä plasmidi ColE1 tulee hyvin stabiilisti ylläpidetyksi E. colissa, kun taas sen johdannaiset pBR322 ja pAT153 eivät. Summers ja Sherratt (Cell 36 (1984) 1097 - 1103) osoittivat, että tämä johtui siitä, etteivät johdannaiset sisällä lyhyttä (283 ep:tä) sekvenssiä nimeltä cer, joka esiintyy kantaplasmidissa. Tämä sekvenssi sisältää paikkaspesifisen plasmidimultimeerierotussysteemin, joka estää homologisessa DNA-yhdistymisessä muodostuneiden plasmidimultimeerien akkumulaation. Tällaisilla multimeereillä on tuhoisa vaikutus jakaantumisprosessiin, joka normaalisti varmistaa stabiilin periytymisen tytärplasmideille bakteerisolujen jakaantuessa.

Cer-sekvenssi (Summers, D., et al., MGG 201 (1985) 334 - 338) eristettiin plasmidista pKS492 (joka saatiin D. Sherratilta) 289 ep:n fragmenttina pilkkomalla BamHI:llä ja TaqI:llä. Plasmidi pTB351 eristettiin DNA:na E. coli -dam-kannasta, jottei dam+-metylaatiosysteemi salpaisi sen

ClaI-keskusta. Tämä DNA pilkottiin BamHI:llä ja ClaI:llä (nämä molemmat keskukset on viety synteettiseen oligonukleotidiin silmällä pitäen tätä kloonausta). Cer-fragmentti ligatoitiin pilkottuun vektoriin, minkä jälkeen tuotteella transformoitiin E. coli -kanta C600 valikoiden tetrasykliiniresistenssin suhteen. Transformanttipesäkkeille suoritettiin kloonianalyysi käyttäen AvaI-restriktiota ja geelielektroforeesia. Ylimääräisen, noin 300 ep:n mittaisen DNA-nauhan läsnäolo osoitti cer-fragmentin siirtymisen. Muilla restriktioanalyyseilla varmistettiin, että saatujen plasmidien rakenteet olivat oikeat. Yksi näistä nimettiin pTB357:ksi (kuvio 5), ja sitä kutsutaan niinikään pLB004:ksi.

b) Plasmidi pCH101

Plasmidi pCH101 vastaa pICI0020:ta (katso esimerkki 1c) lukuunottamatta, että EcoRI- SalI-fragmentin (katso kuvio 1) korvaa fragmentti, joka koostuu oligosta SEQ ID nro 53 (katso myös kuvio 6) sekä interferoni-alfa$_2$-geenisekvenssistä kuten kuvaavat Edge, M.D., et al., Nucl.Acids Res. 11 (1983) 6419 - 6435. Tässä suhteessa oligon SEQ ID nro 53 3'-pään ATG-kodoni edeltää välittömästi TGT-kodonia, joka koodittaa kysteiinin (aminohappo 1) interferoni-alfa$_2$-sekvenssissä edellä mainitussa viitteessä Edge, M.D., et al., Nucl.Acids Res. 11 (1983) 6419 - 6435. 5'-nukleotidisekvenssi GATCCATG ja komplementaarinen 3'-nukleotidisekvenssi GTAC puuttuvat siten edellä mainitun viitteen mukaisesta nukleotidisekvenssistä.

c) Ilmennyskasetin insertointi pTB357:ään

Ilmennyskasetti, joka koostui trp-promoottorista, ribosomisitoutumiskeskuksesta ja interferoni-alfa$_2$-geenistä, eristettiin plasmidista pCH101 (katso b edellä) EcoRI-SphI-restriktiofragmentissa. Tämä ligatoitiin tuotantovektoriin (pTB357) (katso edellä (a)), joka oli vastaavasti pilkottu EcoRI:llä ja SphI:llä. Tällä DNA:lla transformoitiin transformoitumiskelpoinen E. coli C600

-viljelmä ja tetrasykliiniresistentit pesäkkeet eristettiin. Muutama näistä testattiin DNA-kloonianalyysilla, jolloin tutkittiin, oliko niihin siirtynyt ilmennyskasetin käsittämä SstI-restriktiokeskus. Tässä suhteessa positiiviset kloonit testattiin edelleen restriktiokartoituksella sen varmistamiseksi, että odotusten mukainen rakenne oli oikea. Niistä testattiin myös siirtynyt kyky tuottaa interferoni-alfa$_2$-proteiinia, mikä analysoitiin käyttäen Coomassie-sinisellä värjättyä polyakryyliamidi-SDS-geeliä. Yksi tällainen varmennettu klooni nimettiin pLB005:ksi.

d) T4-kopiointipäättäjän insertointi pTB244:ään

T4-kopiointipäätössekvenssiSalI-HindIII-fragmentin (67 emäsparin mittainen) muodossa (katso SEQ ID nro 51 sekä kuvio 4a) insertoitiin välivektorin pTB244 (jota kuvataan EP-patenttijulkaisussa nro 237 269) monikloonauskeskukseen sen SalI- ja HindIII-keskuksien väliin. Kloonianalyysilla varmistettiin tämän rakenteen rakenne (pTB244. T4 ter). Tästä vektorista eristettiin sitten SstI-SphI-fragmentti, joka sisälsi suurimman osan monikloonauskeskuksesta sekä T4-päättäjän. Tämä insertoitiin pLB005:een, joka oli vastaavasti pilkottu SstI:llä ja SphI:llä, jolloin interferoni-alfa$_2$-geeni tuli korvatuksi mutta jäljelle jäi kasetti, joka koostui trp-promoottorista, monikloonauskeskuksesta ja T4-päättäjästä. Tästä rakenteesta varmistuttiin kloonianalyysilla ja plasmidi nimettiin pLB013:ksi.

e) Monikloonauskeskuksen substituutio

Monikloonauskeskus pLB013:ssa ei ole ihanteellinen tähän vektoriin monessa suhteessa: SalI-, BamHI- ja SmaI-keskukset eivät ole ainutkertaisia vaan ne löytyvät plasmidista toisaaltakin. Siksi tämä fragmentti leikattiin irti pilkkomalla SstI:llä ja XbaI:llä (molemmat ainutkertaisia) ja sen paikalle insertoitiin synteettiset oligonukleotidit, joilla oli sekvenssi SEQ ID nro 54:

5' AGCTCCATATGGTACCAGATCTCTCGAGAGTACTT

GGTATACCATGGTCTAGAGAGCTCTCATGAAGATC 5'

Klooneista analysoitiin, oliko niihin siirtynyt uusia restriktiokeskuksia, mistä sitten varmistuttiin sekventoimalla. Yksi tällainen plasmidi nimettiin pLB014:ksi. Uudet, täten insertoidut kloonauskeskukset ovat: NdeI, KpnI, BglII, XhoI ja ScaI, joita seuraavat aiemmat XbaI ja SalI.

f) Jatkomodifointi

Todettiin, että vierekkäisiä SstI- ja NdeI-keskuksia pLB014:ssä ei voitu pilkkoa kummallakaan näistä restriktioentsyymeistä sen paremmin samanaikaisesti kuin sarjassakaan oletettavasti, koska ne sijaitsevat niin lähellä toisiaan. Tämän vuoksi niiden väliin insertoitiin lisäsekvenssi. Tämä suoritettiin pilkkomalla pLB014 SstI:llä ja KpnI:llä ja insertoimalla sitten synteettinen oligonukleotidi SEQ ID nro 55:

5' AGCTCAGCTGCAGCATATGGTAC

GTCGACGTCGTATAC 5'

Klooneista analysoitiin, oliko niihin siirtynyt ylimääräinen PvuII- tai PstI-keskus, mistä sitten varmistuttiin sekventoimalla. Yksi tällainen plasmidi nimettiin pLB015:ksi (= pICI0080) (katso kuvio 7). Tämän plasmidin vastoin kuin pLB014:n SstI ja NdeI pilkkovat tehokkaasti. Tämä suoritetaan, jotta saadaan kohta, johon insertoida erilaisia ribosomisitoutumiskeskuksia oikein asemoituina suhteessa ylävirran trp-promoottoriin ja NdeI:een, jonka on määrä liittää mukaan ilmennettävän geenin ATG-aloituskodoni.

Verrokkiesimerkki 7

Plasmidin pICI1295 (jota kutsutaan myös pCG300:ksi) rakentaminen

a) pCG54:n tuottaminen pICI1079:stä

pICI1079 on ampisilliiniresistentti, pAT153:sta saatu plasmidi, joka sisältää seuraavat yksiköt EcoRI- ja StyI-restriktiokeskuksien välissä:

(i) CI857 fagista lambda;

(ii) lambda-P_L-promoottori;

(iii) synteettinen ribosomisitoutumiskeskus;

(iv) synteettinen interferoni-alfa$_2$-geenisekvenssi;

(v) synteettinen kopiointipäätössekvenssi, joka saadaan fagista T4, SalI- ja StyI-restriktiokeskuksien välissä. Tämän kopiointipäättäjän DNA-sekvenssi on esitetty kuviossa 4 ja oligossa SEQ ID nro 56.

pICI1079 on esitetty kuviossa 8.

pICI1079 on talletettu Budapestin sopimuksen nojalla talletuslaitokseen the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB2 1RY, Skotlanti, UK (NCIMB nro 40370, talletuspäivämäärä 19. helmikuuta 1991).

pCG54 rakennettiin, jotta saataisiin käyttöön ilmennysvektori, joka sisältää samat promoottori-, ribosomisitoutumiskeskus- ja kopiointipäätössekvenssit kuin edellä, eli: lambda-P_L, RBS7 ja T4, mutta josta puuttuu geenisekvenssi, joka koodittaa spesifisen proteiinin tuotantoa. Tällainen rakenne antaisi käyttöön perusilmennysvektorin, joka sisältää oleelliset yksiköt, jotka mahdollistavat kopioinnin ja luennan minkä tahansa kiinnostavan proteiinin tuottamiseksi, joka voitaisiin insertoida tähän vektoriin myöhempien kloonaustapahtumien puitteissa.

Vektorin rakentaminen aloitettiin pilkkomalla restriktioendonukleaaseilla pICI1079 sen vastaavasti EcoRI- ja SalI-keskuksista. Tässä pilkkomisvaiheessa vapautui vektorifragmentti, joka sisältää pICI1079-rungon täydel-

lisenä mukaan lukien geenit plasmidireplikaatiolle ja antibioottiresistenssifunktioille, sekä T4-kopiointipäätössekvenssin. Fragmentti eristettiin puhdistusvaiheissa agaroosigeelissä käyttäen Geneclean-valmistetta DNA-fragmentin loppupuhdistuksessa.

Tähän vektorifragmenttiin siirrettiin toinen pienempi, kooltaan noin 1,2 ke:n DNA-fragmentti. Tämä toinen fragmentti voidaan saada esimerkiksi DNA-synteesillä tai paikkaohjatusti mutatoimalla tai PCR-mutatoimalla pieni EcoRI-SalI-restriktiofragmentti, joka saatiin pICI1079:stä edellä kuvatun mukaisesti. Tämä toinen fragmentti sisälsi täsmälleen samanarvoiset promoottori- ja ribosomisitoutumissekvenssit kuin alunperin esiintyi pICI1079:ssä, minkä lisäksi siinä oli käytettävissä EcoRI- ja SalI-keskukset sen 5'- ja vastaavasti 3'-päässä, jolloin saatavilla oli yhteensopivat päät ligatoinnin pICI1079-fragmenttiin suorittamiseksi. Ligatointireaktiosta Gibco-BRL-entsyymin T4-DNA-ligaasin vastaavine puskureineen läsnä ollessa saatiin tuotteena rakenne pCG54.

Tämän rakenteen sisältävät kloonit eristettiin alunperin sen jälkeen, kun ligatointireaktioseosnäytteellä oli transformoitu transformoitumiskelpoisia E. coli -soluja kannasta HB101.

Talteen saatu pCG54-rakenne oli kooltaan 3,682 ke:tä ja se sisälsi oleelliset ominaispiirteet, joita hahmotellaan kuviossa 9 esitetyssä kartassa.

b) pCG61:n tuottaminen pCG54:stä (jota kutsutaan myös pICI54:ksi)

Suunniteltiin synteettisiä oligonukleotidisekvenssejä, jotta mukaan saataisiin sekä T7A3-promoottorin luontainen sekvenssi että niinikään sekvenssi, joka toimisi tehokkaana luenta-aloitusalueena, joka mahdollistaisi minkä tahansa viereensä kloonatun polypeptidigeenisekvenssin oikeaoppisen prosessoinnin. Sopivaksi ehdokassekvenssiksi täksi viimemainituksi alueeksi tunnistettiin

RBS1, trp-ribosomisitoutumissekvenssi. Tämän vuoksi syntetisoitiin kaksi komplementaarista oligonukleotidia nimeltä SEQ ID nro 57 ja SEQ ID nro 58 kaksisäikeisen DNA-liittäjän muodostamiseksi, joka sisältää T7A3-promoottori- ja RBS1-sekvenssit.

Oligonukleotidit valmistettiin 84-meereinä tavanomaista menettelyjärjestelyä sekä ABI-geenisyntetisaattoria käyttäen. Nämä suunniteltiin siten, että kaksisäikeisessä muodossa synteettisissä fragmenteissa olisi restriktioendonukleaasikeskukset EcoRI ja KpnI 5'- ja vastaavasti 3'-päässä. Pituutensa johdosta näitä oligomeerejä ei voitu puhdistaa HPLC:llä, ja puhdistaminen suoritettiin käyttäen akryyliamidigeelielektroforeesia sekä 10-%:inen akryyliamidi/7 M ureageeliä.

Ennen puhdistusta oligomeerit tarkastettiin ensin koon mukaan jaoittelevassa geelissä sen varmistamiseksi, ettei ainoastaan niiden koko ollut oikea vaan että myös valmistetut näytteet sisälsivät suurimpana osuuteenaan tarvittavia oligomeerejä eivätkä epäpuhtautena korkeaa osuutta pienempiä sekundaarioligonukleotideja, joita valmistuu synteesin sivutuotteina.

Akryyliamidigeelit valmistettiin vakiomenetelmillä käyttäen geelipolymerisaatiokatalysaattoreina ammoniumpersulfaattia ja N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiinia.

Oligonukleotidien koonmääritys edellytti, että ne saatiin näkymään elektroforeesin jälkeen. Tämän vuoksi näytteet jouduttiin leimaamaan radioaktiivisesti ^{32}P:tä käyttäen. Tämä teki mahdolliseksi näytteen laadun määrityksen elektroforeesin jälkeen autoradiokuva ottamalla.

Oligonukleotidinäytteet saatiin raakamuodossa eifosforyloituina. Tätä seikkaa hyödynnettiin radioleimaustarkoituksiin siten, että näytteet voitiin "kuuma"-leimata 5'-päässä fosforyloimalla entsyymiä T4-polynukleotidikinaasi käyttäen.

Oligomeerit saatiin synteesistä ei-fosforyloidussa muodossa, jolloin puhdistuksen jälkeen kullekin oligomeerille yksinään suoritettiin fosforylaatioreaktio, jossa ATP:tä käytettiin kunkin molekyylin 5'-pään fosforyloimiseksi T4-polynukleotidikinaasin läsnä ollessa (katso "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis, s. 5.68 - 5.71). Fosforyloimisen jälkeen kyseiset kaksi komplementaarista oligonukleotidia juotettiin toisiinsa kaksisäikeisen DNA-dupleksin saamiseksi, joka sisältää T7A3-promoottori- ja RBS1-sekvenssin.

Vektorimolekyyli pCG54 pilkottiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja KpnI. Restriktiopilkkomisessa muodostuu 2,3 ke:n vektorifragmentti sekä 1,1 ke:n fragmentti, joka sisältää lambda-P_L-promoottori- sekä RBS1-sekvenssin. Tämä kloonausvaihe toteutetaan lambda-P_L-RBS1-sekvenssin korvaamiseksi synteettisellä EcoRI-KpnI-fragmentilla, joka käsittää T7A3-RBS1-sekvenssin. pCG54:n pilkkomisesta saatua 2,3 ke:n vektorifragmenttia puhdistettiin käyttäen tavanomaista menettelyjärjestelyä, agaroosigeelielektroforeesia sekä Geneclean-metodiikkaa DNA:n poistamiseksi agaroosifragmenteista.

84 ep:n synteettinen EcoRI-KpnI-fragmentti ligatoitiin edellä valmistettuun vektorimolekyyliin ja ligatoidulla DNA:lla transformoitiin E. coli -HB101-soluja. Positiiviset yhdistelmä-DNA-kloonit valikoitiin eroon ampisilliiniresistenssin perusteella. Transformoinnin jälkeen seulontatarkoituksiin valittiin lukuisia pesäkkeitä, jotka sisälsivät yhdistelmä-DNA-plasmidin.

Kloonauksessa vektoriin sisällytetyksi tulleen synteettisen fragmentin koko (84-meeri) oli sellainen, että yhdistelmä-DNA-plasmidi-DNA-näytteiden restriktioanalyysi olisi epätarkoituksenmukainen yksinkertaisena seulontamenetelmänä. Kooltaan näin pienet insertit eivät ole helposti havaittavissa agaroosigeelielektroforeesissa.

Itse fragmentti ei sisällä mitään sisäistä restriktioendonukleaasikeskusta, joka osoittaisi ensin mainitun läsnäolon. Tämän vuoksi yhdistelmä-DNA-kloonien alustavassa seulonnassa käytettiin pesäkehybridisaatiomenetelmää (katso Grunstein ja Hogness, Proc.Natl.Acad.Sci. 72 (1975) 3961). Nitroselluloosasuodattimet, jotka sisälsivät immobilisoitua plasmidi-DNA:ta yhdistelmä-DNA-klooneista, hybridisoitiin koettimeen, joka oli valmistettu satunnaisradioleimaamalla synteettiset, juotetut oligonukleotidit SEQ ID nro 57 ja SEQ ID nro 58. DNA leimattiin käyttäen alfa^{32}P-dCTP:tä ja inkuboimalla Klenow-polymeraasilla 37 °C:ssa 2 tunnin ajan. Yhdistelmä-DNA-pesäkkeet, jotka antoivat positiivisen hybridisaatioreaktion, valittiin plasmidi-DNA-tuotantoon. Plasmidi-DNA valmistettiin kussakin tapauksessa käyttäen suhteellisen suuren mittakaavan menetelmää, johon kuului CsCl-tiheysgradienttisentrifugointi, puhtauden varmistamiseksi; katso "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory), s. 1.42 - 1.52. Valmistamalla DNA tällaisella menetelmällä varmistetaan korkealaatuinen materiaali, joka soveltuu käytettäväksi myöhemmissä kloonausoperaatioissa ja sekvenssianalyysissa.

Yhdistelmä-DNA-klooneista eristetty plasmidi-DNA kokonaisuudessaan otettiin toiseen seulontaan sekvenssianalyysia käyttäen, millä varmistettiin, että oligonukleotidisekvenssi kloonausliitoksissa sekä itse T7A3-RBS1-fragmentti olivat ehdottomasti oikeanlaiset. Sekventointimenettelynä käytettiin Sequenase-systeemiä ja käyttöön valittu sekventointialuke oli esimerkiksi pBR322 UP (pBR322-yleisaluke). Sekventointi suoritettiin käyttäen Sangerin dideoksiketjupääsekventointitekniikkaa.

Kloonit, joiden sekvenssi oli oikea, nimettiin uudeksi ilmennysrakenteeksi pCG61, joka sisälsi T7A3-pro-

moottorin, RBS1-sekvenssin sekä T4-päätössekvenssin (katso kuvio 10).

c) pCG300:n (jota kutsutaan myös pICI1295:ksi) tuottaminen pCG61:stä

Sekvenssi- ja synteesivaiheet, jotka tarvitaan G-CSF-analogin [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF rakentamiseksi, ovat kuten kuvataan esimerkissä 1 (katso kuvio 3). Tämä G-CSF-analogisekvenssi eristettiin rakenteesta, jossa geeni oli sisällytetty plasmidiin pST1, jolloin oli saatu pICI1107 (katso esimerkki 2). pICI1107:ää pilkottiin ScaI:llä ja suurikokoinen fragmentti eristettiin elektroforeesin agaroosigeelissä sekä Geneclean-puhdistuksen jälkeen. Tätä fragmenttia pilkottiin sitten restriktioendonukleaasilla SalI, jolloin saatiin [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-geeni ScaI-SalI-restriktiofragmentissa, joka soveltuu kloonattavaksi pCG61:een (katso kuvio 10).

Restriktiopilkkomisen SalI:llä jälkeen tarvittava fragmentti eristettiin käyttäen jälleen kerran agaroosigeelipuhdistustekniikoita.

Vektorimolekyyliä pCG61 pilkottiin restriktioentsyymillä KpnI. Pilkkominen tällä entsyymillä tuottaa 3'-ylijäämäpään, josta sitten tehtiin tasainen käyttäen entsyymiä T4-polymeraasi; katso "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. painos, Sambrook, Fritsch ja Maniatis, s. 5.44 - 5.47. T4-polymeraasiaktiivisuus inaktivoitiin lämmöllä inkuboimalla 70 °C:ssa 30 minuutin ajan, minkä jälkeen DNA otettiin talteen saostamalla etanolilla. Pelletti liuotettiin steriiliin tislattuun veteen ja liukoiseksi tehty DNA pilkottiin SalI:llä. KpnI- (ei tasaista päätä) -SalI-vektorifragmentti otettiin talteen saostamalla etanolilla, mitä seurasi agaroosigeelielektroforeesi- ja puhdistustekniikoiden käyttö.

ScaI-SalI-[$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-fragmentti ligatoitiin sitten tasapäiseksi tehtyyn KpnI-SalI-vektoriin. Ligatoidulla DNA:lla transformoitiin E. coli -kanta HB101. Yh-

distelmä-DNA-kloonit valikoitiin ampisilliiniresistenssin perusteella.

Mahdollisten yhdistelmä-DNA-kloonien alustavassa seulonnassa käytettiin hybridisaatiota. Radioleimattu koetin valmistettiin satunnaisleimaamalla EcoRI-SalI-fragmentti (joka sisältää [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-geenisekvenssin), joka oli valmistettu plasmidista pICI1107. Tätä hybridisoitiin pesäkkeisiin, joiden DNA oli immobilisoitu nitroselluloosasuodattimien pinnalle. Sen jälkeen valmistettiin plasmidi-DNA 24 kloonista, jotka olivat hybridisoituneet tähän seulojaan. Kaikki DNA-valmistukset suoritettiin nopealla miniprep-valmistusmenetelmällä; katso Birnboim ja Doly, Nucl.Acids Res. 7 (1979) 1513. Nämä yhdistelmä-DNA-valmisteet seulottiin toistamiseen restriktioanalyysia käyttäen. DNA:n linearisoituminen BamHI:n vaikutuksesta, joka on ilmennyskasetissa ainutkertainen keskus, osoittaa [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-sekvenssin läsnäolon.

Suoritettiin sekvenssianalyysi [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-geenin läsnäolon varmistamiseksi, sekä sen varmistamiseksi, että emässekvenssit kloonausliitoksissa ja kautta [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-geenin olivat oikein. Tässä tarkoituksessa valmistettiin suuressa mittakaavassa plasmidi-DNA-näytteitä 16 yhdistelmä-DNA-kloonista käyttäen CsCl-tiheysgradienttisentrifugointitekniikkaa puhtauden varmistamiseksi. Sekventointivaiheet suoritettiin sekvenssijärjestelyn mukaan, jolloin valittu sekventointialuke oli pBR322-yleisaluke (EcoRI). Kaksi yhdistelmä-DNA-klooneista sisälsi oikean sekvenssin [$Ser^{17,27}$]-hu-G-CSF-fragmentin ScaI-päässä ja kautta itse G-CSF-peptidisekvenssin. Kloonit nimettiin ilmennysrakenteeksi pCG300 (katso kuvio 12).

(Sekvenssiluettelo)

SEQ ID nro 1
Sekvenssin pituus: 62 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC (47) CTG CTG AAG TGT CTC (62)

SEQ ID nro 2
Sekvenssin pituus: 64 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CTG TTC GAG ACA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CGG CAG AGA GCT TGC (45) TGG ACC CAG TGG AGT ACTG (64)

SEQ ID nro 3
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT CTG CAG GAA (45) AAG CTG TGC GCA ACC (60)

SEQ ID nro 4
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC ACC ATC GCC (45) TTG AAT TTT ACG TAC (60)

SEQ ID nro 5
Sekvenssin pituus: 48 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG (48)

SEQ ID nro 6
Sekvenssin pituus: 51 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CGG GAT CCC CAG AGA GTG ACC GAG CAG CAC CAG TTC CTC AGG GTG (45) GCA CAG (51)

SEQ ID nro 7
Sekvenssin pituus: 63 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA (45) CAA CTG GCA GGC TGC TTG (63)

SEQ ID nro 8
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CTG GCT CAA GCA GCC TGC CAG TTG TAA AGC TTG GGA CGG GCA AGA (45) GCT CAG TGG AGC CCA (60)

SEQ ID nro 9
Sekvenssin pituus: 63 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
AGC CAG CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG
CAG (45) GCT CTA GAA GGC ATC TCT (63)

SEQ ID nro 10
Sekvenssin pituus: 63 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TTC AGG AGA GAT GCC TTC TAG AGC CTG CAG CAG ACC CTG GTA
CAG (45) GAA CAG ACC GGA GTG CAG (63)

SEQ ID nro 11
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT
GCC (45) GAC TTC GCT ACT ACC (60)

SEQ ID nro 12
Sekvenssin pituus: 63 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TTG CCA TAT GGT AGT AGC GAA GTC GGC AAC GTC CAG CTG CAG
TGT (45) GTC CAG GGT GGG CCC CAA (63)

SEQ ID nro 13
Sekvenssin pituus: 63 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG (45) CCG ACT CAG GGT GCG ATG (63)

SEQ ID nro 14
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TGC TGG CAT CGC ACC CTG AGT CGG CTG CAG TGC CGG AGC CAT ACC (45) CAG TTC CTC CAT CTG (60)

SEQ ID nro 15
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG (45) GTT GCC TCC CAT CTT (60)

SEQ ID nro 16
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCT CTG AAG ATG GGA GGC AAC CAG AAC ACC GCC TGC GCG CCG CTG (45) GAA AGC AGA GGC GAA (60)

SEQ ID nro 17
Sekvenssin pituus: 55 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC (45) CAG CCG TTAG (55)

SEQ ID nro 18
Sekvenssin pituus: 53 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TCGACTTA CGG CTG GGC CAG GTG ACG CAG AAC GCG GTA AGA CAC CTC (47) GAG GAA (53)

SEQ ID nro 19
Sekvenssin pituus: 21 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TACAACTGGCAGGCTGCTTGA (21)

SEQ ID nro 20
Sekvenssin pituus: 21 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GACGTTGCCGACTTCGCTACT (21)

SEQ ID nro 21
Sekvenssin pituus: 21 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TGCCGGAGCCATACCCAGTTC (21)

SEQ ID nro 22
Sekvenssin pituus: 21 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCCTGCCAGTTGTAAAGCTTG (21)

SEQ ID nro 23
Sekvenssin pituus: 26 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCACCATCGCCTTGAATTTTACGTAG (26)

SEQ ID nro 24
Sekvenssin pituus: 62 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC (47) CTG CTG AAG TCT CTC (62)

SEQ ID nro 25
Sekvenssin pituus: 64 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CTG TTC GAG AGA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CGG CAG AGA GCT TGC (45) TGG ACC CAG TGG AGT ACTG (64)

SEQ ID nro 26
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT CTG CAG GAA (45) AAG CTG TGC GCA ACC (60)

SEQ ID nro 27
Sekvenssin pituus: 60 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC ACC GCT GCC (45) TTG AAT TTT ACG TAC (60)

SEQ ID nro 28
Sekvenssin pituus: 29 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CTT CAG CAG GAA AGA ACG CGG CAG AGA GC (29)

SEQ ID nro 29
Sekvenssin pituus: 33 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GC TTG GGA AGA GCA AGA GCT CAG AGA AGC CCA C (32)

SEQ ID nro 30
Sekvenssin pituus: 40 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CTG TTG CCA TAT GCT AGA AGC GAA GTC TTC AAC GTC CAG C (40)

SEQ ID nro 31
Sekvenssin pituus: 27 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT CCC CAG (27)

SEQ ID nro 32
Sekvenssin pituus: 27 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
ACG CAG AAC GCG GCG AGA CAC CTC GAG (27)

SEQ ID nro 33
Sekvenssin pituus: 29 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
G TTC GAG AGA CTT TTC CAG GAA AGA CTG C (29)

SEQ ID nro 34
Sekvenssin pituus: 33 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
C CTG CAG TTT CGC AGC GCT AGC TTG AAT TTT AC (33)

SEQ ID nro 35
Sekvenssin pituus: 37 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CAG AGA GTG AGC GAG CTT CAC CAG TTC CTC AGC GTG G (37)

SEQ ID nro 36
Sekvenssin pituus: 29 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT AGC CAG AG (29)

SEQ ID nro 37
Sekvenssin pituus: 30 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CAG CTT TTC CTG CAG ACG CGC AGC GCT AGC (30)

SEQ ID nro 38
Sekvenssin pituus: 29 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CC GCT GCC TTG AAT ACG ACG TAC CTG TTC (29)

SEQ ID nro 39
Sekvenssin pituus: 30 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GGT TGC GCA CAG ACG TTC CTG CAG AGC CGC (30)

SEQ ID nro 40
Sekvenssin pituus: 29 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
G GTG GCA CAG ACG GTA GGT TGC GCA CAG C (29)

SEQ ID nro 41
Sekvenssin pituus: 45 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CG CGG CAG AGA GCT TGC ACG GTA GGT TGG AGC CAT TGTCGATACC (45)

SEQ ID nro 42
Sekvenssin pituus: 24 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCA AGA GCT CAG AGA AGC CCA CGG (24)

SEQ ID nro 43
Sekvenssin pituus: 39 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CA GCC TGC CAG TTG TAA AGC TTG GGA GCT GCA AGA GCT C (39)

SEQ ID nro 44
Sekvenssin pituus: 27 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
GCT CAG AGA AGC TTT CGG GAT CCC CAG (27)

SEQ ID nro 45
Sekvenssin pituus: 46 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen
CGG GAT AGC CAG AGA GTG AGC GAG TTT CAC CAG TTC CTC AGC GTG G (46)

SEQ ID nro 46
Sekvenssin pituus: 174/177 aminohappoa
Sekvenssityyppi: aminohappo
Topologia: lineaarinen

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln
1 5 10

Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg
15 20

Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu
25 30

Lys Leu (Val Ser Glu)$_m$ Cys Ala Thr Tyr Lys Leu
35 40

Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His
45 50

Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys
65 70

Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr
75 80 85

Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln
100 105

Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp
110 115

Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala
120 125

Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe
130 135 140

Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val
145 150

Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
155 160

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln
165 170

(jossa m on 0 tai 1)

SEQ ID nro 47
Sekvenssin pituus: 168 + 166 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

```
AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT    50
    GACCGT TTATAAGACT TTACTCGACA ACTGTTAATT AGTAGCTTGA    46

AGTTAACTAG TACGCAAGTT CACGTAAAAA GGGTATCGAC              90
TCAATTGATC ATGCGTTCAA GTGCATTTTT CCCATAGCTG              86

AATGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTAG   140
TTACCATGGG CCCCTAGGAG ATCTCAGCTG GACGTCCGTA CGTTCGAATC   136

CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT TTTTTTAT                           168
GGGCGGATTA CTCGCCCGAA AAAAAATAGC                         166
```

SEQ ID nro 48
Sekvenssin pituus: 534 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi ja vastaava proteiini
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

```
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG   50
         Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
           1               5                  10

CTG AAG TGT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT   98
Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala
 15                  20                  25                  30

CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA   146
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
                    35                  40                  45
```

```
CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC     194
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
            50                  55                  60

TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG     242
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
        65                  70                  75

CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC     290
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly
    80                  85                  90

ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT     338
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
95                  100                 105                 110

GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG     386
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
                115                 120                 125

GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT     434
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
            130                 135                 140

GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG     482
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
        145                 145                 155

AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG     530
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
    160                 165                 170                 174

TAA G                                                           534
```

SEQ ID nro 49
Sekvenssin pituus: 534 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi ja vastaava proteiini
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

```
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG  50
         Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
           1               5                  10

CTG AAG TCT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT  98
Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala
 15                  20                  25                  30

CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA 146
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
                 35                  40                  45

CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC 194
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
             50                  55                  60

TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG 242
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
         65                  70                  75

CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC 290
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly
     80                  85                  90

ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT 338
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
 95                  100                 105                 110
```

GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG 386
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
115 120 125

GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT 434
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
130 135 140

GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG 482
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
145 145 155

AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG 530
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
160 165 170 174

TAA G 534

SEQ ID nro 50
Sekvenssin pituus: 81 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

GAATTCAACA AAACGGTTGA CAACATGAAG TAAACACGGT ACGATGTACC 50
ACAAGTTCAC GTAAAAAGGG TATCGACAATG 81

SEQ ID nro 51
Sekvenssin pituus: 67 + 67 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

```
TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAAG   60
    GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC   56

CATGCGA          67
GTACGCTTCGA      67
```

SEQ ID nro 52
Sekvenssin pituus: 72 + 72 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

```
TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAG   60
    GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTC   56

CATGCGGATC CC      72
GTACGCCTAG GGGAAC  72
```

SEQ ID nro 53
Sekvenssin pituus: 118 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT 50
AGTTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA 100
TTGGAGGATG ATTAAATG 118

SEQ ID nro 54
Sekvenssin pituus: 35 + 35 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

AGCTCCATAT GGTACCAGAT CTCTCGAGAG TACTT 35
GGTATA CCATGGTCTA GAGAGCTCTC ATGAAGATC 35

SEQ ID nro 55
Sekvenssin pituus: 23 + 15 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

AGCTCAGCTG CAGCATATGG TAC 23
GTCGAC GTCGTATAC 15

SEQ ID nro 56
Sekvenssin pituus: 72 + 72 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAAG 60
GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56

CATGCGGATC CC 72
GTACGCCTAG GGGAAC 72

SEQ ID nro 57
Sekvenssin pituus: 84 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

AAT TCA ACA AAA CGG TTG ACA ACA TGA AGT AAA CAC GGT ACG ATG 45
TAC CAC AAG TTC ACG TAA AAA GGG TAT CGA CAA TGG TAC 84

SEQ ID nro 58
Sekvenssin pituus: 76 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: yksi
Topologia: lineaarinen

CAT TGT CGA TAC CCT TTT TAC GTG AAC TTG TGG TAC ATC GTA CCG 45
TGT TTA CTT CAT GTT GTC AAC CGT TTT GTT G 76

SEQ ID nro 59
Sekvenssin pituus: 24 + 24 emästä
Sekvenssityyppi: nukleotidi
Säikeitä: kaksi
Topologia: lineaarinen

AATTCGCATG CGGATCCATC GATC 24
GCGTAC GCCTAGGTAG CTAGAGCC 24

Patenttivaatimukset:

1. DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se koodittaa kokonaan tai osittain aminohapposekvenssin luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaiselle, jolla johdannaisella on ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista ja jonka liuosstabiilisuus (tässä määritellyn mukaisesti) on ainakin 35 % pitoisuutena 5 mg/ml, jolloin mainitussa johdannaisessa ainakin natiivin sekvenssin Cys^{17} on korvattu Ser^{17}-tähteellä ja natiivin sekvenssin Asp^{27} korvattu Ser^{27}-tähteellä.

2. Yhdistelmä-DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-sekvenssin.

3. Menetelmä patenttivaatimuksen 2 mukaisen yhdistelmä-DNA-vektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-sekvenssi insertoidaan vektoriin.

4. Prokaryoottinen tai eukaryoottinen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on stabiilisti transformoitu tai transfektoitu patenttivaatimuksen 2 mukaisella yhdistelmä-DNA-vektorilla.

5. Menetelmä patenttivaatimuksen 4 mukaisen prokaryoottisen tai eukaryoottisen isäntäsolun valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että prokaryoottinen tai eukaryoottinen isäntäsolu transformoidaan tai transfektoidaan patenttivaatimuksen 2 mukaisella yhdistelmä-DNA-vektorilla stabiilisti transformoidun tai transfektoidun prokaryoottisen tai eukaryoottisen isännän saamiseksi.

6. Menetelmä luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaisen valmistamiseksi, jolla johdannaisella on ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista ja jonka liuosstabiilisuus (tässä määritellyn mukaisesti) on ainakin 35 % pitoisuutena 5 mg/ml, jolloin mainitussa johdannaisessa ainakin natiivin sek-

venssin Cys^{17} on korvattu Ser^{17}-tähteellä ja natiivin sekvenssin Asp^{27} korvattu Ser^{27}-tähteellä, joka menetelmä on t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 4 mukaista prokaryoottista tai eukaryoottista isäntäsolua viljellään mainitun johdannaisen saamiseksi.

7. Menetelmä luontaisesti esiintyvän G-CSF:n johdannaisen uuttamiseksi sen inkluusiokappaleesta, kun johdannaisella on ainakin yksi luontaisesti esiintyvän G-CSF:n biologisista ominaisuuksista ja kun sen liuosstabiilisuus (tässä määritellyn mukaisesti) on ainakin 35 % pitoisuutena 5 mg/ml, jolloin mainitussa johdannaisessa ainakin natiivin sekvenssin Cys^{17} on korvattu Ser^{17}-tähteellä ja natiivin sekvenssin Asp^{27} korvattu Ser^{27}-tähteellä, joka menetelmä on t u n n e t t u siitä, että

1) mainittu inkluusiokappale lietetään pesuaineeseen, 2) hapetetaan, 3) pesuaine poistetaan, ja 4) pesuaine poistamalla saatua liuosta pidetään korotetussa lämpötilassa epäpuhtauksina läsnä olevien bakteeriproteiinin, tuoteoligomeerien ja/tai hajoamistuotteiden saostamiseksi, samalla kun mainittu johdannainen säilytetään liuoksessa aktiivisessa muodossa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että uutettavan johdannaisen liuosstabiilisuus on ainakin 85 % pitoisuutena 10 mg/ml.

Fig. 1.

```
EcoR1
AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT    50
    GACCGT TTATAAGACT TTACTCGACA ACTGTTAATT AGTAGCTTGA    46

   HpaI
AGTTAACTAG TACGCAAGTT CACGTAAAAA GGGTATCGAC              90
 TCAATTGATC ATGCGTTCAA GTGCATTTTT CCCATAGCTG              86

    KpnI    BamHI   XbaI   SalI   PstI   SphI
AATGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTAG   140
TTACCATGGG CCCCTAGGAG ATCTCAGCTG GACGTCCGTA CGTTCGAATC   136

                          ClaI
CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT TTTTTTAT                           168
GGGCGGATTA CTCGCCCGAA AAAAAATAGC                         166
```

Fig. 2.

```
EcoRI  ScaI

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG CTG AAG TGT    59
    GTCA TGA GGT GAC CCA GGT CGT TCG AGA GAC GGC GTC AGA AAG GAC GAC TTC ACA
         Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys
          1               5                  10                  15
               SnabI                                                 FspI

CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA 119
GAG CTT GTC CAT GCA TTT TAA GTT CCG CTA CCA CGC CGA GAC GTC CTT TTC GAC ACG CGT
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala
         20                  25                  30                  35
                        MstII                                 BamHI

ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG 179
TGG ATG TTT GAC ACG GTG GGA CTC CTT GAC CAC GAC GAG CCA GTG AGA GAC CCC TAG GGC
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
         40                  45                  50                  55
              SacI                    HindIII

TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG 219
ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
         60                  65                  70                  75
                                                 XbaI
```

Fig.2(JATKUU)

```
CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299
GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CGA GAT CTT CCG TAG AGA GGA
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro
         80                  85                  90                  95
                                                                    NdeI

GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA 359
CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GTC GAC CTG CAA CGG CTG AAG CGA TGA TGG TAT
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile
        100                 105                 110                 115

TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG 419
ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC GTC GGC TGA GTC CCA CGC TAC
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
        120                 125                 130                 135
                                      BssHII

CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT 479
GGT CGT AAG CGG AGA CGA AAG GTC GCC GCG CGT CCG CCA CAA GAC CAA CGG AGG GTA GAA
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu
        140                 145                 150                 155
            XhoI                                                        SalI

CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G       534
GTC TCG AAG GAG CTC CAC AGA ATG GCG CAA GAC GCA GTG GAC CGG GTC GGC ATT CAGCT
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
        160                 165                 170             174
```

Fig.3.

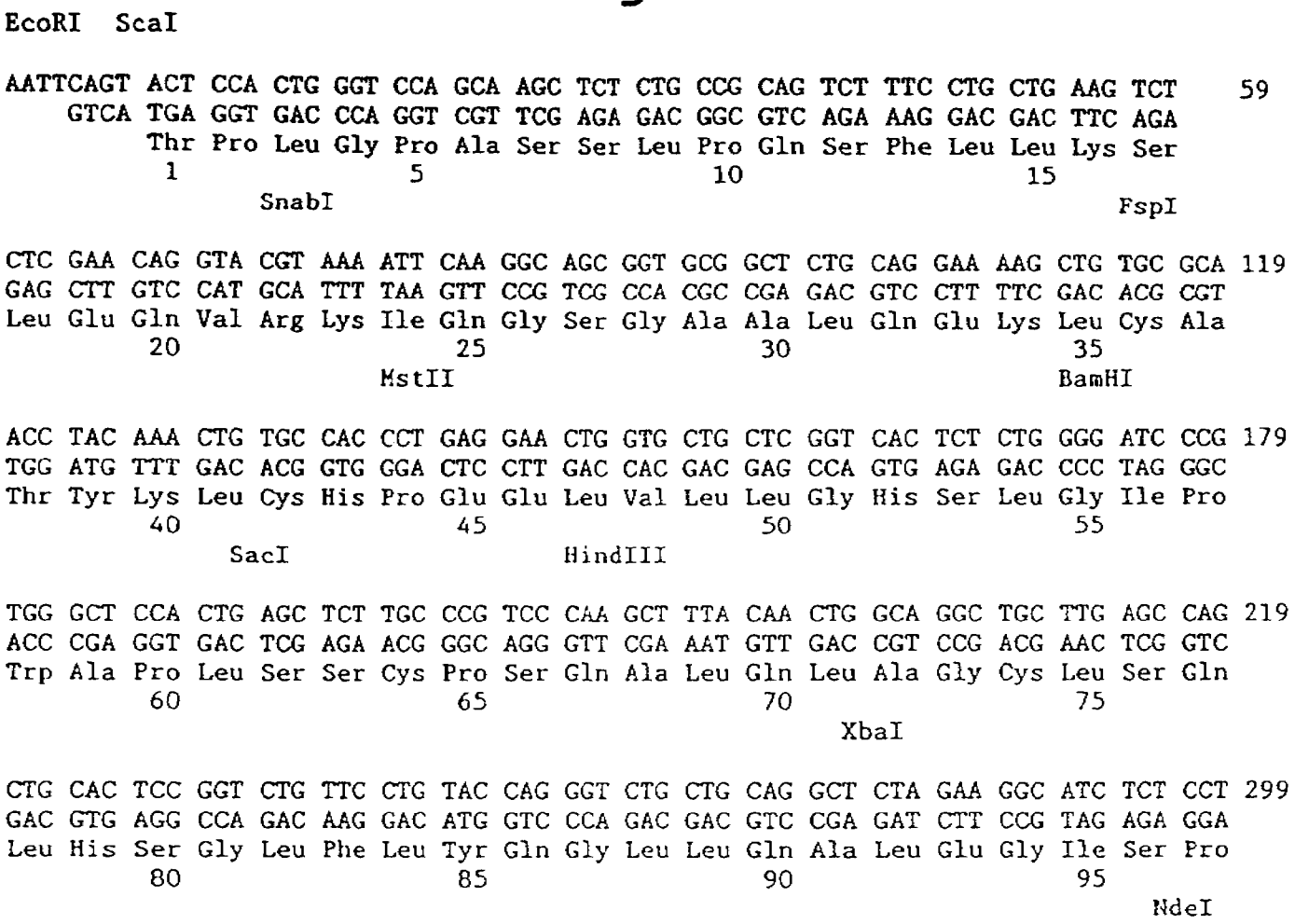

EcoRI ScaI
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG CTG AAG TCT 59
GTCA TGA GGT GAC CCA GGT CGT TCG AGA GAC GGC GTC AGA AAG GAC GAC TTC AGA
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser
1 5 10 15
SnabI
FspI
CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA 119
GAG CTT GTC CAT GCA TTT TAA GTT CCG TCG CCA CGC CGA GAC GTC CTT TTC GAC ACG CGT
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala
20 25 30 35
MstII
BamHI
ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG 179
TGG ATG TTT GAC ACG GTG GGA CTC CTT GAC CAC GAC GAG CCA GTG AGA GAC CCC TAG GGC
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro
40 45 50 55
SacI
HindIII
TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG 219
ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
60 65 70 75
XbaI
CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299
GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CGA GAT CTT CCG TAG AGA GGA
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro
80 85 90 95
NdeI

Fig. 3 (JATKUU)

```
GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA 359
CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GTC GAC CTG CAA CGG CTG AAG CGA TGA TGG TAT
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile
        100                 105                 110                 115

TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG 419
ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC GTC GGC TGA GTC CCA CGC TAC
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
        120                 125                 130                 135
                                        BssHII

CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT 479
GGT CGT AAG CGG AGA CGA AAG GTC GCC GCG CGT CCG CCA CAA GAC CAA CGG AGG GTA GAA
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu
        140                 145                 150                 155

            XhoI                                                    SalI
CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G       534
GTC TCG AAG GAG CTC CAC AGA ATG GCG CAA GAC GCA GTG GAC CGG GTC GGC ATT CAGCT
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
        160                 165                 170             174
```

Fig. 4.

a) KOPIOINTIPÄÄTÖSSEKVENSSI

```
   SalI
5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
3'     GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

      SphI HindIII
   AAAGCATGCA            3'
   TTTCGTACGTTCGA        5'
```

b)

```
   SalI
5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
3'     GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

      SphI BamHI  StyI
   AAAGCATGCGGATCCC      3'
   TTTCGTACGCCTAGGGGAAC  5'
```

Fig.5.

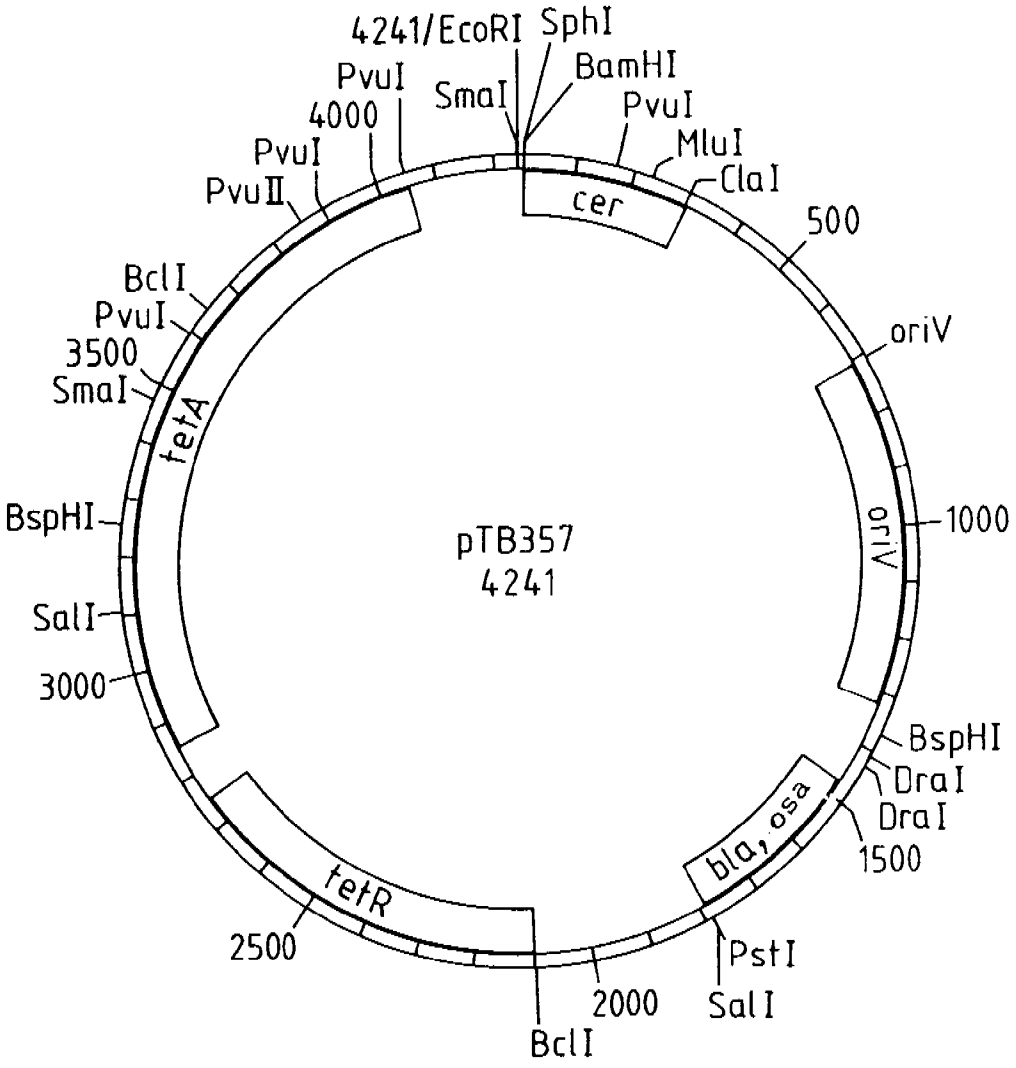

4241/EcoRI
SphI
BamHI
PvuI
MluI
ClaI
500
oriV
1000
BspHI
DraI
DraI
1500
PstI
SalI
2000
BclI
2500
tetR
bla, osa
ori V
cer
tetA
BclI
PvuI
3500
SmaI
BspHI
SalI
3000
PvuII
PvuI
4000
PvuI
SmaI
pTB357
4241

Fig. 6.

EcoRI

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT

HpaI

AGTTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA

TTGGAGGATG ATTAATG

Fig. 7.

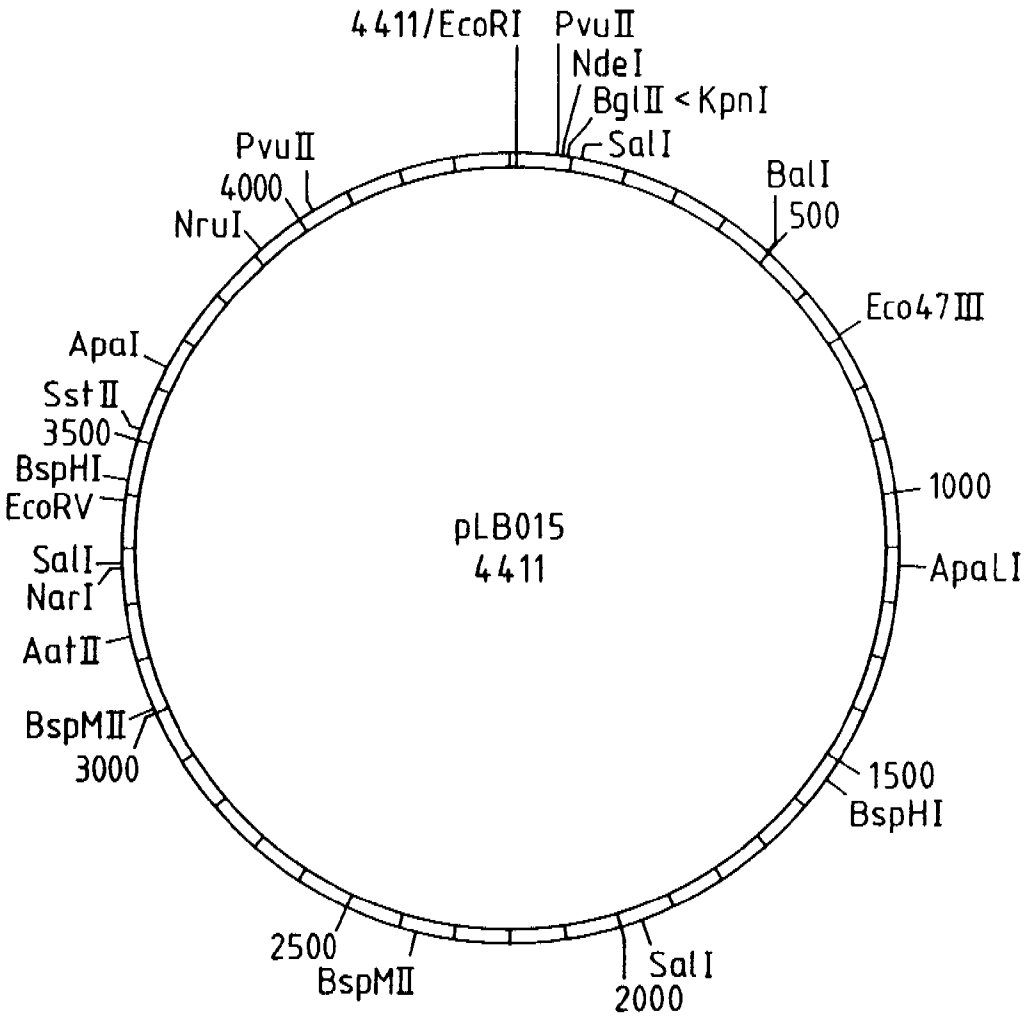


Fig. 8.

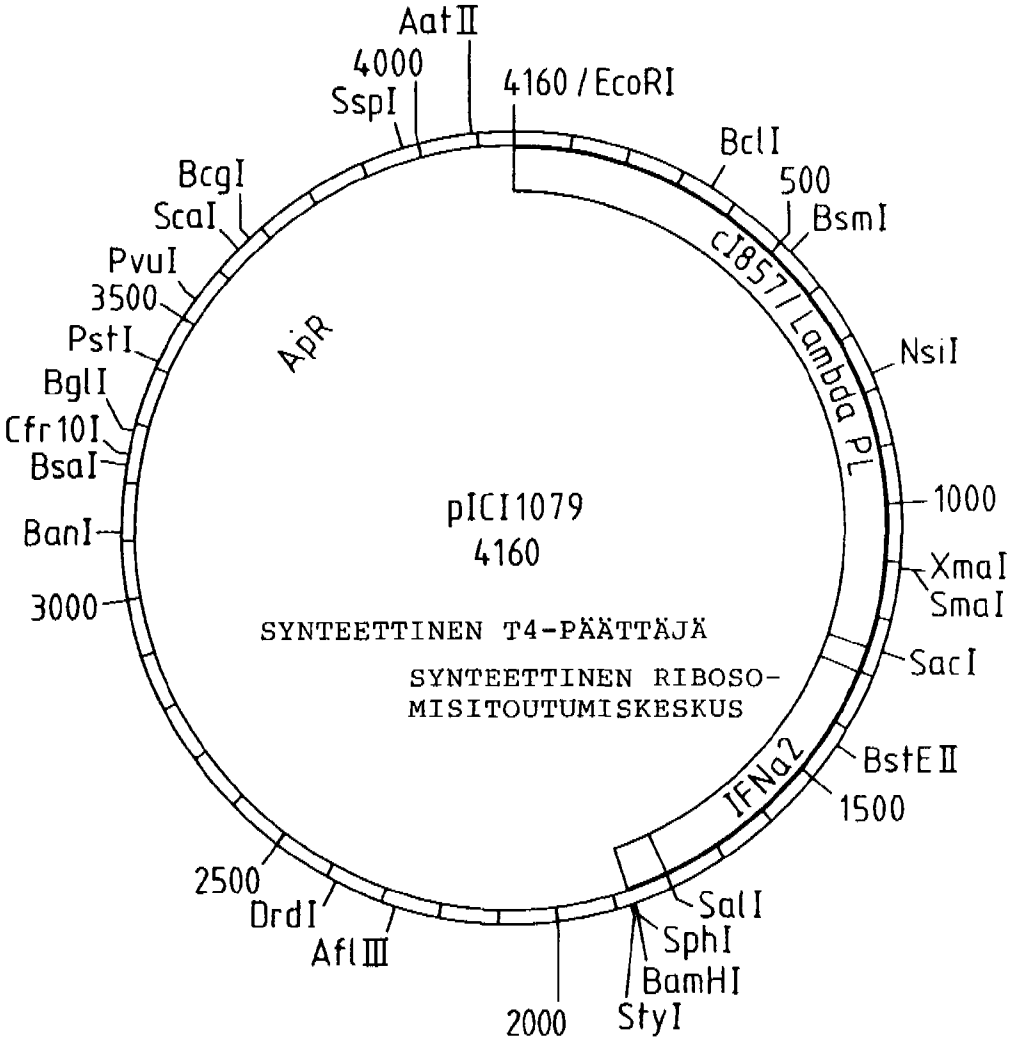

AatII
4000
SspI
4160 / EcoRI
BclI
500
BsmI
BcgI
ScaI
PvuI
3500
PstI
BglI
Cfr10I
BsaI
BanI
3000
ApR
cI857
Lambda PL
NsiI
1000
XmaI
SmaI
SacI
BstEII
1500
IFNa2
SalI
SphI
BamHI
StyI
2000
AflIII
DrdI
2500
pICI1079
4160
SYNTEETTINEN T4-PÄÄTTÄJÄ
SYNTEETTINEN RIBOSO-
MISITOUTUMISKESKUS

Fig.9.

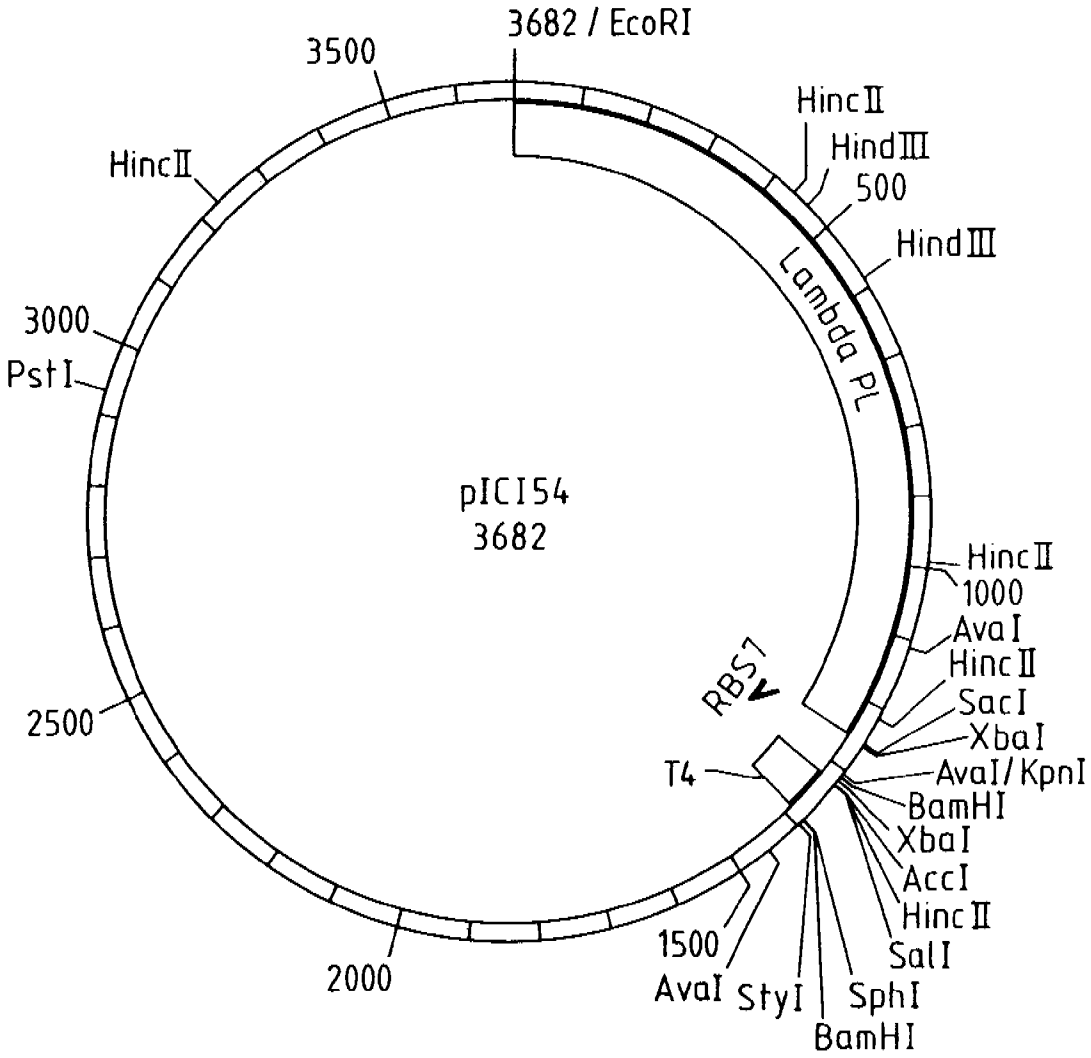

3682 / EcoRI
3500
HincII
HindIII
500
HindIII
Lambda PL
HincII
HincII
3000
PstI
pIC154
3682
1000
AvaI
HincII
SacI
XbaI
AvaI/KpnI
BamHI
XbaI
AccI
HincII
SalI
SphI
BamHI
StyI
AvaI
1500
2000
2500
T4
RBS7

Fig.10.

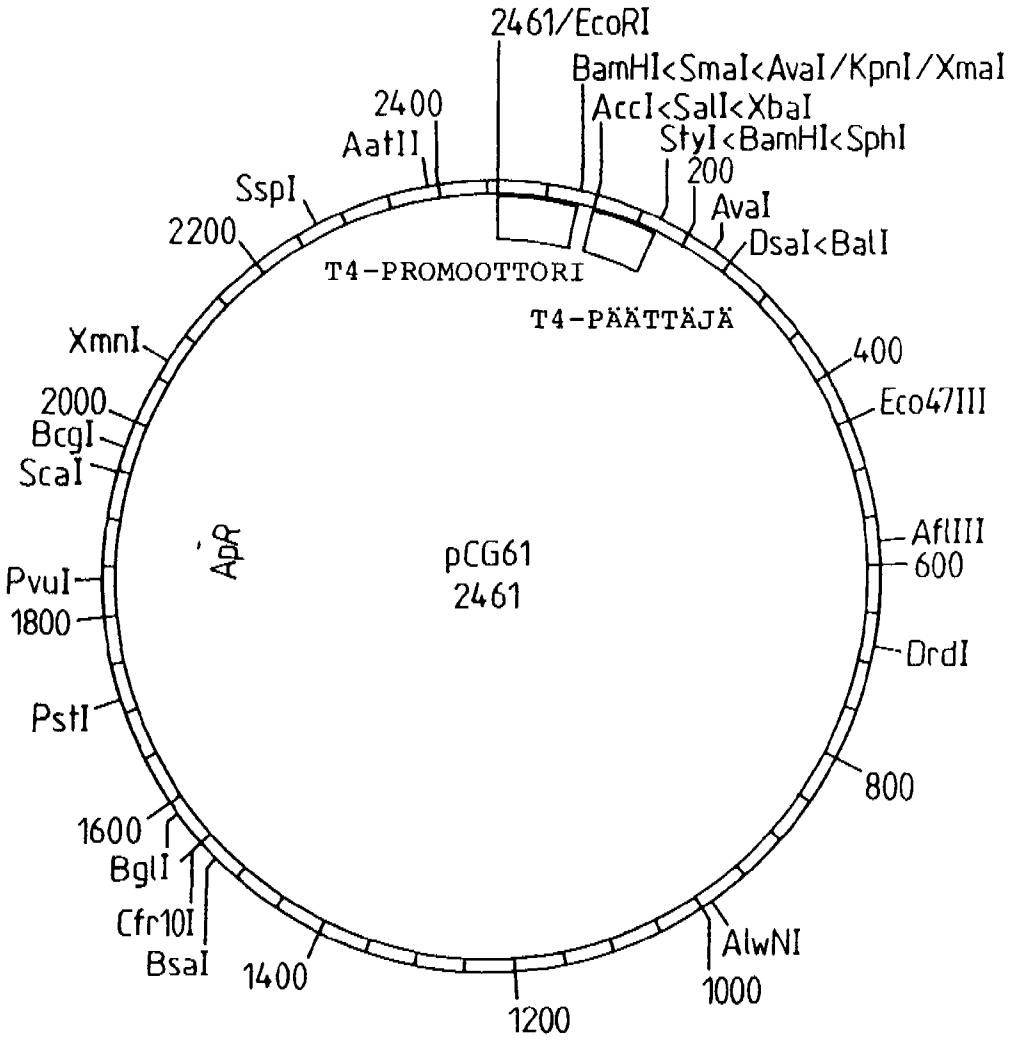

2461/EcoRI
BamHI<SmaI<AvaI/KpnI/XmaI
AccI<SalI<XbaI
StyI<BamHI<SphI
AvaI
DsaI<BalI
400
Eco47III
AflIII
600
DrdI
800
AlwNI
1000
1200
1400
BsaI
Cfr10I
BglI
1600
PstI
1800
PvuI
2000
BcgI
ScaI
XmnI
2200
SspI
AatII
2400
200
T4-PROMOOTTORI
T4-PÄÄTTÄJÄ
ApR
pCG61
2461

Fig. 11.

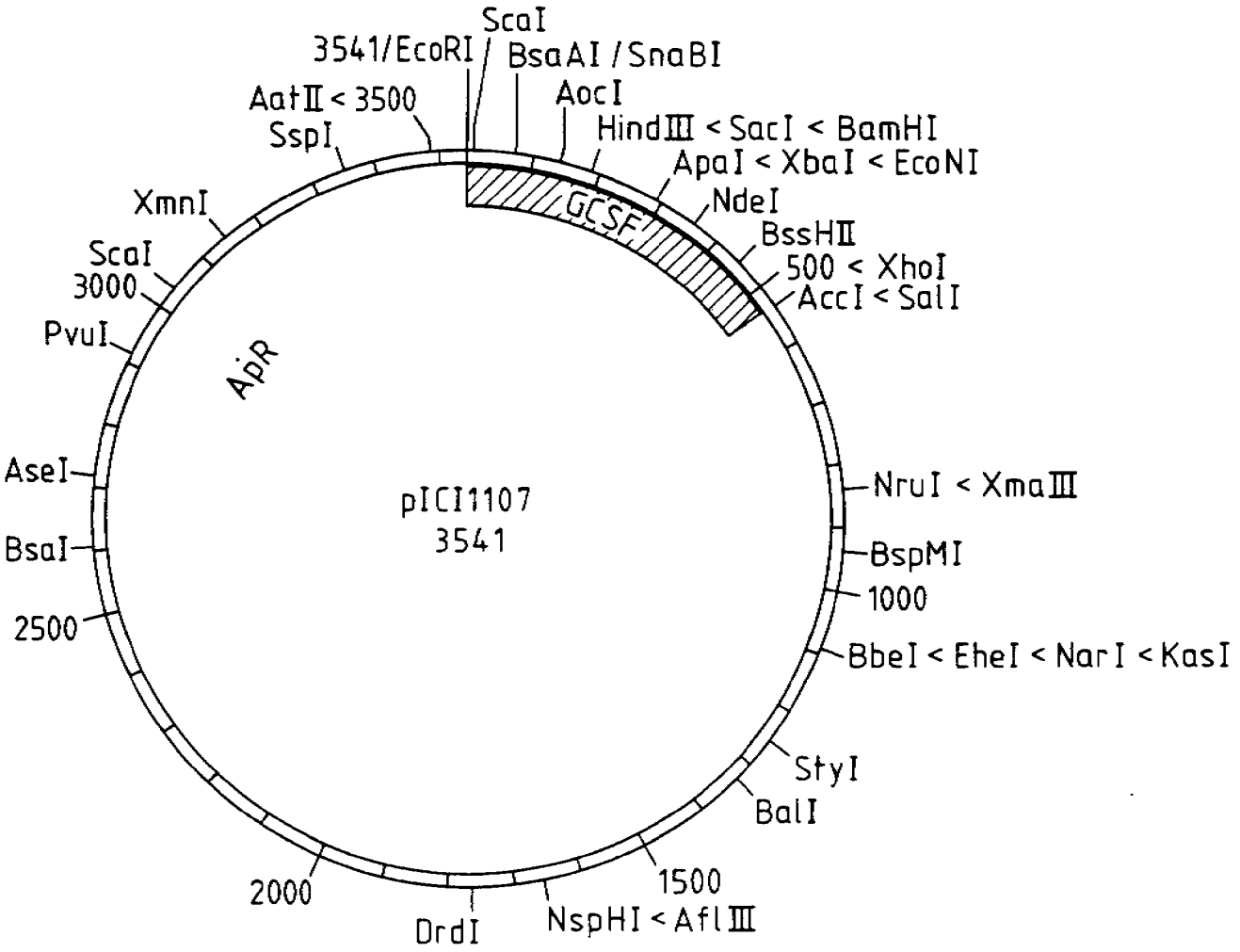
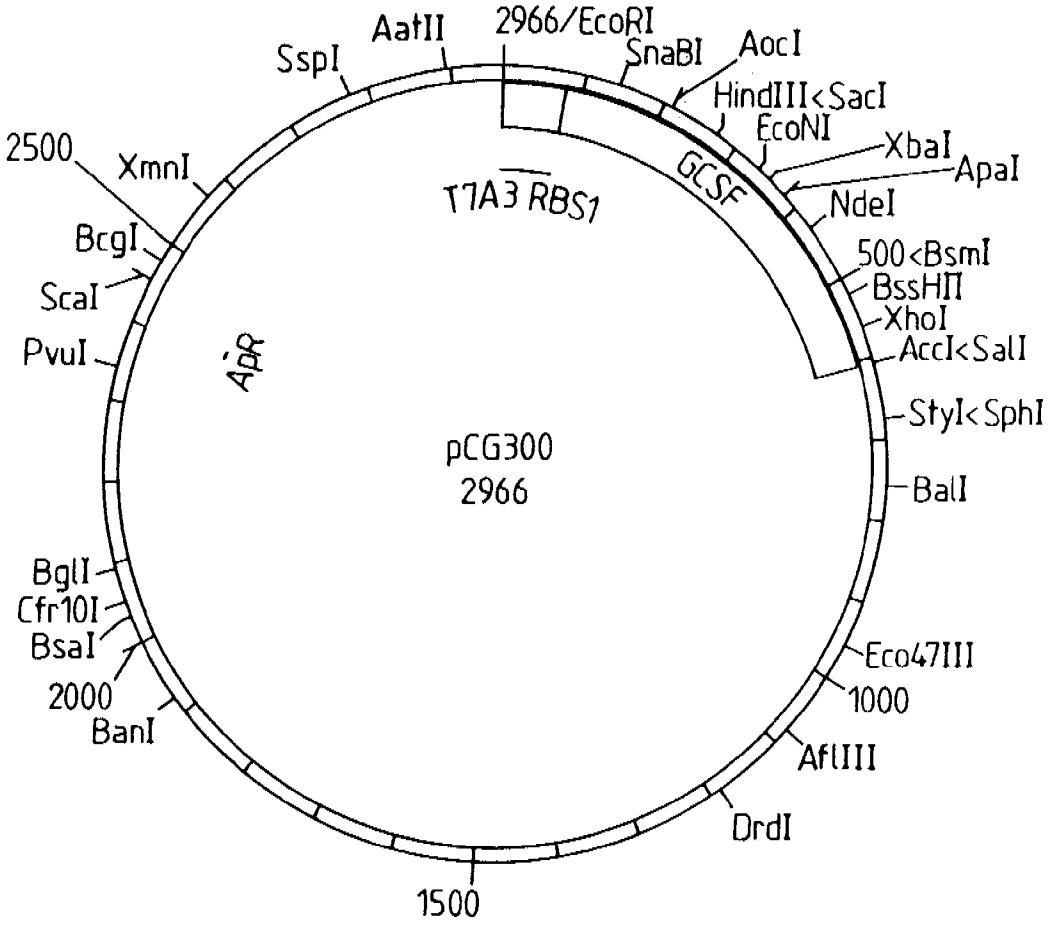

ScaI
3541/EcoRI
BsaAI / SnaBI
AatII < 3500
AocI
SspI
HindIII < SacI < BamHI
ApaI < XbaI < EcoNI
XmnI
NdeI
GCSF
BssHII
ScaI
500 < XhoI
3000
AccI < SalI
PvuI
ApR
AseI
NruI < XmaIII
pICI1107
3541
BsaI
BspMI
1000
2500
BbeI < EheI < NarI < KasI
StyI
BalI
1500
2000
NspHI < AflIII
DrdI

Fig.12.


AatII
2966/EcoRI
SnaBI
AocI
SspI
HindIII<SacI
EcoNI
XbaI
ApaI
2500
XmnI
T7A3 RBS1
GCSF
NdeI
BcgI
500<BsmI
BssHII
ScaI
XhoI
PvuI
AccI<SalI
ApR
StyI<SphI
pCG300
2966
BalI
BglI
Cfr10I
BsaI
Eco47III
2000
1000
BanI
AflIII
DrdI
1500