



FI000109360B



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 109360 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.07.2002

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/12, C07K 14/59, A61K 38/24

(21) Patentihakemus - Patentansökning

934023

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

14.09.1993

(24) Alkuperä - Löpdag

02.01.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

14.09.1993

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/00122

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

15.03.1991 US 670085 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Applied Research Systems Ars Holding N.V., Pietermaai 15, Curacao, ALANKOMAIDEN ANTILLIT, (AN)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Kelton, Christie Ann, 4 Valentine Road, Hopkinton, MA 01748, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Cheng, Shirley Vui Yen, 1 Longfellow Place, Apt. 2215, Boston, MA 02114, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Nugent, Noreen Patrice, 38 Westgate Road, Framingham, MA 01701, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Schweickhardt, Rene Lynn, 148 Presidents Lane, Apt. 10, Quincy, MA 02169, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Ihmisen follikkelia stimuloivan hormonin reseptori
Human follikelstimulerande hormon receptor

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö koskee oleellisen puhdasta ihmis-FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovaa fragmenttia tai mutanttia, mainittua reseptoria, fragmenttia tai mutanttia koodittavaa DNA:ta, mainittua DNA:ta käsittäviä ekspresiovektoreita, soluja, jotka on transfektoitu mainituilla ekspresiovektoreilla, ja menetelmiä mainitun reseptorin, fragmentin tai mutantin kasvattamiseksi kasvattamalla mainittuja transfektoituja soluja. Keksintö koskee myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät mainittua reseptoria, fragmenttia tai mutanttia, samoin kuin menetelmiä potilaiden hoitamiseksi tällaisilla koostumuksilla endogeenisen FSH-bioaktiivisuuden vähentämiseksi. Keksintö koskee myös parannettua ihmis-FSH-määrittystä keksinnön mukaisista reseptoria, fragmenttia tai mutanttia käyttämällä.

Uppfinningen avser en väsentligt ren human FSH-receptor eller dess fragment eller mutant, som binder FSH, DNA, som kodar för den nämnda receptorn, det nämnda fragmentet eller den nämnda mutanten, en exprimeringsvektor omfattande nämnd DNA, celler som har transfekterats med de nämnda exprimeringsvektorerna, och förfaranden för framställning av den nämnda receptoren, det nämnda fragmentet eller den nämnda mutanten genom att odla de nämnda transfekterade cellerna. Uppfinningen avser även farmaceutiska kompositioner innehållande den nämnda receptorn, fragmentet eller mutanten, likaväl som förfaranden för behandling av patienter med sådana kompositioner för reducering av endogenisk FSH-bioaktivitet. Uppfinningen avser även en förbättrad bestämning av human FSH genom användning av en receptor, fragment eller mutant enligt uppfinningen.

**Ihmisen follikkeliä stimuloivan hormonin reseptori - Human
follikelstimulerande hormonreceptor**

Tämä patenttihakemus on jatkohakemus US-patenttihakemukselle
5 07/670,085, jätetty 15.03.1991, josta etuoikeus vaaditaan.

Keksinnön tausta

Tämä keksintö liittyy ihmisen follikkeliä stimuloivan hormo-
nin reseptoriin ja sen synteisiin yhdistelmä-DNA-tekniikoil-
la.

- 10 Follikkeliä stimuloiva hormoni (FSH) on aivolisäkkeestä pe-
räisin oleva heterodimeerinen glykoproteiinihormoni, jolla on
rakenteellisia samankaltaisuuksia luteinisoivan hormonin (LH)
ja tyreotropiinin (TSH) kanssa, jotka molemmat myös muodostu-
vat aivolisäkkeessä, ja sikiön suonikalvon gonadotropiinin
15 (CG) kanssa, joka muodostuu istukassa. Hormonit ovat suhteel-
lisen suuria (28 - 38 kDa) ja koostuvat yhteisestä α -alayksi-
köstä, joka on ei-kovalenttisesti sitoutunut erilliseen β -
alayksikköön, joka välittää reseptoriinsitoutumisspesifisyy-
den.
- 20 Näiden hormonien solureseptorien tiedetään olevan membraaniin
kiinnittyneiden reseptorien G-proteiiniin liittyneen luokan
jäseniä, jotka aktivoituina stimuloivat adenylyylisyklaasin
aktiivisuuden kasvua. Tästä on tuloksena on solunsisäisen
toisen välittäjän adensiini-3',5'-monofosfaatin (cAMP) tason
25 kohoaminen, mikä puolestaan aiheuttaa steroidisynteessin ja
-erityksen lisääntymisen. Näiden reseptorien aminohapposek-
venssien hydropaattisuuskaaviot paljastavat kolme yleistä
aluetta: (1) hydrofiilisen aminotermiinalisen alueen, jonka
katsotaan olevan aminotermiinalinen solunulkoinen alue, (2)
30 pituudeltaan membraanin poikki ulottuvan 7 hydrofobisen seg-
mentin, jonka katsotaan olevan transmembraaninen alue, ja (3)
karboksitermiinalisen alueen, joka sisältää mahdollisia fos-

forylaatiokohtia (seriini-, treoniini- ja tyrosiinitähteitä) ja jota pidetään karboksiterminaalisenä solunsisäisenä tai solulima-alueena. Glykoproteiinihormonireseptoriperheen erottaa muista G-proteiiniin liittyneistä reseptoreista, kuten
5 β 2-adrenergisistä, rodopsiini- ja substanssi K -reseptoreista, hormonin sitomiseen liittyvän hydrofiilisen aminoterminaalisen alueen suuri koko.

FSH-reseptori ekspressoituu kivesten Sertoli-soluissa ja munasarjojen munarakkulasoluissa. Vaikka on ymmärretty oleellisen puhtaan ihmis-FSH-reseptorin aikaansaamisen tarve, ei luonnosta peräisin olevien valmisteiden puhdistus ole käytännöllistä eikä todennäköisesti olisi riittävää sallimaan aminohapposekvenssin määrityksen. Hiljattain eräs ryhmä on kloonannut cDNA:n, joka koodittaa rotta-FSH-reseptoria, päätellyt
15 aminohapposekvenssin ja ekspressoinut sitä nisäkässoluissa (Sprengel, Mol. Endocrinol. 4 (1990) 525). Eräs toinen ryhmä, jonka aikomuksena oli kloonata TSH-reseptori, ilmeisesti myös kloonasi ja tunnisti osan ihmisen FSH-reseptorin transmembraanisesta alueesta (Parmentier, Science 246 (1989) 1620).

20 **Keksinnön yhteenveto**

Tämä keksintö käsittää ei-terapeuttiseen käyttöön tarkoitetun oleellisen puhtaan ihmis-FSH-reseptorin tai sen fragmentin tai mutantin, joka sitoo FSH:ta ja sisältää sekvenssissä nro 2 esitetyn aminohapposekvenssin 1 - 678, DNA:n, joka koodittaa mainittua reseptoria, fragmenttia tai mutanttia, ekspresiovektorit, jotka käsittävät mainittua DNA:ta, solut, jotka on transfektoitu mainituilla ekspresiovektoreilla, ja menetelmät mainitun reseptorin, fragmentin tai mutantin tuottamiseksi kasvattamalla mainittuja transfektoituja soluja. Tämä
25 keksintö sisältää myös ei-terapeuttiseen käyttöön tarkoitetut koostumukset, jotka sisältävät mainittua reseptoria, fragmenttia tai mutanttia. Kuvataan myös parannettu ihmisen FSH:n määritys keksinnön mukaista reseptoria, fragmenttia tai mutanttia käyttäen.
30

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on ihmisen FSH-reseptori-cDNA-kloonien kartta. Esitetään osittainen restriktioendonukleaasikartta, joka määritettiin yhdistämällä DNA-sekvenssitiedot, jotka oli johdettu kunkin viiden kloonin osista. Merkitään 0,2 kiloemäsparin (kb) differentiaalit. Alueet, joihin kloonit liittyvät, ilmaistaan kiinteillä viivoilla restriktioendonukleaasikartan alapuolella. Kloonin merkintä ja likimääräinen koko yksikössä kb ilmaistaan kunkin kiinteän viivan vasemmalla ja oikealla puolella, vastaavasti. Kooditetun proteiinin aminoterminaalisen solunulkoisen alueen, transmembraanisen alueen ja karboksiterminaalisen solunsisäisen alueen likimääräiset sijainnit ilmaistaan katkonuolilla restriktioendonukleaasikartan yläpuolella. Insertion (luultavasti intronin tai intronin osan) asema 5-10-kloonissa ilmaistaan avoimella laatikolla.

Kuvioissa 2A ja 2B kuvataan strategia, jota käytettiin "täysimittaisen" ihmisen FSH-reseptori-cDNA:n muodostamiseen yhdistelmä-DNA-tekniikalla tarkoituksena ekspressoida kooditettu proteiini nisäkässolulinjassa.

Kuvio 3 on kaavio ekspressiovektoriplasmidista, jota käytettiin CHO-DUKX-solulinjojen kehittämiseen, jotka linjat olivat stabiilisti transfektoituneet ihmisen FSH-reseptorilla.

Kuvio 4 on kaavio ekspressiovektoriplasmidista, jota käytettiin kehitettäessä Y1-solulinjoja, jotka ovat stabiilisti transfektoituneet ihmisen FSH-reseptorilla.

Kuviossa 5 kuvataan solunsisäiset cAMP-tasot, jotka mitattiin CHO-DUKX-solulinjalla CHOFSHR4Q-13, joko FSH:n (ympyrät) tai LH:n (kolmiot) erilaisilla annoksilla käsittelyn jälkeen. Jokainen piste edustaa keskiarvoa. Keskiarvot esitetään pystysuorilla palkeilla.

Kuviossa 6 kuvataan progesteronitasot, jotka mitattiin Y1-solulinjan Y1HFSHR4-38 kasvatusväliaineesta FSH:n eri annok-

silla käsittelyn jälkeen. Pystysuorat palkit kuvaavat progesteronimittausten keskivirhettä kullakin FSH-annoksella.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tässä käytettäessä ihmisen FSH-reseptori ja sen FSH:hen si-
5 toutuvat fragmentit tai mutantit viittaavat polypeptideihin,
jotka voivat tunnistaa ja selektiivisesti sitoutua ihmisen
FSH:n kanssa ja jotka eivät tuota merkittävää immunologista
vastetta ihmisissä. Siten tämä keksintö sisältää ihmisen FSH-
reseptorin, jolla on sekvenssi nro 2:ssa kuvattu aminohappo-
10 sekvenssi, samoin kuin sen FSH:hen sitoutuvat fragmentit tai
mutantit, joilla säilyy hyvin korkea homologia-aste (ts. ai-
nakin 95-prosenttinen identtisyys) kuvatun aminohapposekvens-
sin tai ainakin sen solunulkoisen osan kanssa. Ihmisen FSH-
reseptorin fragmentteja, jotka tämä keksintö sisältää, ovat
15 mm. ne fragmentit, jotka jäävät jäljelle sen jälkeen kun so-
lulima- ja/tai transmembraaniset alueet on poistettu täydestä
polypeptidistä. Eräs erityisen edullinen fragmentti, jonka
tämä keksintö sisältää, on aminoterminaalinen solunulkoinen
osa, joka käsittää suunnilleen aminohapot 1 - 349 ihmisen
20 FSH-reseptoriaminohapposekvenssistä, joka esitetään sekvens-
sissä nro 2. Koska jotkin silmukat, jotka yltyvät transmemb-
raanisten alueiden poikki (luetellaan Piirteet-osassa, sek-
venssi nro 2), ovat myös solunulkoisia, nämä voivat liittyä
(esimerkiksi sopivien välikemolekyylien kautta) fragmenttiin,
25 joka sisältää aminoterminaalisen solunulkoisen osan sitoutu-
misen parantamisen. Polypeptidi voi olla glykosyloitua, kuten
luonnollisessa reseptorissa, tai se voi olla osaksi tai täy-
sin deglykosyloitua.

Edelleen ajatellaan, että vain osaa edellä kuvatusta amino-
30 terminaalaisesta solunulkoisesta alueesta voidaan käyttää te-
hokkaasti FSH:n sitomiseen, koska on hyvin todennäköistä, et-
tä täydellinen solunulkoinen alue ei ole välttämätön tähän
tarkoitukseen. Siten voidaan helposti tuottaa ja testata te-
hokkaan FSH:hen sitoutumisen suhteen fragmentti, joka on jon-

kin verran lyhyempi kuin täydellisen solunulkoisen alueen 349 aminohappoa. Niin kauan kuin solunulkoisen osan FSH:hon sitoutuva alue pysyy ehjänä, koko käytetyn fragmentin pituus ei ole kriittinen. Tästä syystä odotetaan myös, että ei-häiritseviä aminohappoja voidaan lisätä solunulkoisen alueen tai sen FSH:hon sitoutuvan fragmentin jompaankumpaan päähän vaikuttamatta haitallisesti polypeptidin kapasiteettiin sitoutua FSH:hon. Niinpä tämä keksintö käsittää ihmisen FSH-reseptorin fragmentin, joka käsittää oleellisen osan solunulkoisesta alueesta ja jolla säilyy oleellisesti samat FSH:hon sitoutumisen ominaispiirteet kuin täydellisellä solunulkoisella alueella.

Keksinnön suoja-alaan kuuluvat myös edellä kuvatun reseptorin ja fragmenttien mutanttimuodot. Tällaisia mutantteja ovat konservatiiviset substituutiot 1 - 10 aminohappotähteessä, jolloin tällaisten substituutioiden sijainti ja luonne valitaan niin, etteivät ne merkittävästi heikennä modifioidun reseptorin tai sen fragmentin FSH:hon sitoutumisen ominaispiirteitä.

Oleellisen puhdas ihmisen FSH-reseptori tai sen fragmentti tai mutantti valmistetaan eristämällä ja kloonamalla sitä koodittava DNA cDNA:sta tai genomikirjastosta, liitetään DNA-vektoriin transfektoimalla isäntäsolut vektorilla, kasvattamalla transfektoituja isäntäsoluja olosuhteissa, jotka sallivat reseptorin fragmentin tai mutantin ekspression, ja ottamalla reseptori, fragmentti tai mutantti talteen viljelmästä.

DNA, jota käytetään ekspressiovektorien tekemiseen, voi olla genomi-DNA:ta tai cDNA:ta, joka koodittaa ihmisen FSH-reseptoria, ja voi sisältää alueita, jotka edistävät ekspressiota, kuten introneita, promoottoreita, edistäjiä ja vastaavia. DNA:ta voidaan helposti modifioida nukleotidien substituutiolla, deletiolla tai insertiolla (esimerkiksi kohtaspezifisellä mutageneesillä), joka ei vaikuta haitallisesti eks-

pressoidun proteiinin biologiseen tai FSH:hen sitoutumisen aktiivisuuteen. Voidaan esimerkiksi tehdä konservatiivisia substituutioita (mutaatioita), jotka muuttavat 1 - 10 aminohappoa vaikuttamatta ekspressoidun proteiinin (muteiinin) kokonaisrakenteeseen ja -aktiivisuuteen haitallisesti. Samalla lailla voidaan poistaa määrättyjä DNA:n osia, kuten ne osat, jotka koodittavat solulima- ja/tai transmembraanisia alueita niin, että proteiinista ekspressoituu vain fragmentti, kuten liukoinen solunulkoinen alue. Ihmisen FSH-reseptori tai FSH:hon sitoutuva fragmentti tai näiden mutantti voi myös ekspressoitua fuusioproteiinin osana. Eräs tällainen fuusio-
5 proteiini sisältäisi karboksiterminaalisisessa päässä polypeptidin, joka antaisi ominaispiirteet, jotka helpottaisivat proteiinin puhdistusta tai puhdistetun proteiinin immobilisointia kiinteälle alustalle käytettäväksi FSH-määrittämissä tai FSH-puhdistusprotokollissa. Eräs toinen tällainen fuusio-
10 proteiini sisältäisi aminoterminalisisessa päässä katkaistavan polypeptidin, joka helpottaisi ekspressiota.

Keksinnön mukaisesti tuotettu ihmisen FSH-reseptori on oleellisen puhtaasta, tarkoittaen, että se on oleellisen vapaata biologisista satunnaisista aineista, jotka normaalisti liittyvät luonnollisista lähteistä uutettuun FSH-reseptoriin, kuten esimerkiksi bakteereista, viruksista ja muista proteiineista. Reseptori voidaan formuloida ei-terapeuttiseen käyttöön tarkoitetuiksi koostumuksiksi sekoittamalla sopivien hyväksyttävien väliaineiden kanssa ammattimiesten tuntemalla tavalla.
20

Yleensä koostumukset voidaan formuloida oraaliseen, parenteraaliseen (mukaan lukien ihonalaiseen, lihaksensisäiseen ja laskimonsisäiseen), vaginaaliseen, rektaaliseen, bukkaliseen (mukaan lukien kielenalaiseen), transdermaaliseen tai intranasaaliseen antoon. Parenteraaliseen antoon tarkoitettut koostumukset ovat normaalisti nesteliuoksen, -dispersion tai -emulsion, edullisesti isotonisessa muodossa; vaginaaliseen tai rektaaliseen antoon voiteena tai peräpuikkona; oraaliseen
30
35

tai bukkaaliseen antoon tablettina tai kapselina; ja intranasaaliseen antoon jauheena, nenätippoina tai suihkeena. Voidaan käyttää erilaisia hitaasti vapauttavia, depotsiirränäis- tai injisoitavia annostelumuotoja. Aktiivinen komponentti voidaan myös sisällyttää vapauttamisen kontrolloimiseksi polymeerimatriiseihin, liposomeihin ja mikropalloihin.

Nämä koostumukset voidaan mukavasti antaa annosyksikkömuodossa ja voidaan valmistaa millä hyvänsä farmaseuttisen alan hyvin tuntemista menetelmistä. Parenteraaliseen antoon tarkoitetut formulaatiot voivat sisältää tavallisina täyteaineina steriiliä vettä tai suolaliuosta, alkyleeniglykoleja, kuten propyleeniglykoli, polyalkyleeniglykoleja, kuten polyetyleeniglykoli, kasvisperäisiä öljyjä, hydrogenoituja naptaleeneja ja vastaavia. Vaginaaliseen tai rektaaliseen antoon tarkoitetut formulaatiot, esimerkiksi peräpuikot, voivat sisältää täyteaineina esimerkiksi polyalkyleeniglykoleja, vaseeliinia, kaakaovoita ja vastaavia. Nasaaliseen antoon tarkoitetut formulaatiot voivat olla jauhemuodossa ja voivat sisältää täyteaineina esimerkiksi laktoosia tai dekstraania tai voivat olla vesi- tai öljyliuoksia annettavaksi nenätippojen tai mitatun suihkeen muodossa. Bukkaaliseen antoon tyyppillisiä täyteaineita ovat mm. sokerit, kalsiumstearaatti, esihyytelöity tärkkelys ja vastaavat. Liuos- tai jauheformulaatioon voidaan lisätä yhtä tai useaa surfaktanttihappoa tai -suolaa. Sopivia surfaktanttisuoloja ovat ne, jotka säilyttävät lisääntyneen peptidiabsorption ilmiön, samoin kuin yhdisteen surfaktanttiominaispiirteet ja jotka eivät ole haitallisia kohteelle tai muuten esteellisiä.

Ei-terapeuttiseen käyttöön tarkoitettuja koostumuksia, jotka sisältävät keksinnön mukaista ihmisen FSH-reseptoria tai sen FSH:hon sitoutuvia fragmentteja tai mutantteja, voidaan antaa sitoutumaan endogeenisen, verenkierrossa olevan FSH:n kanssa kohteessa ja siten kontrolloimaan bioaktiivisen FSH:n käytävissä olevaa tasoa. Siten keksinnön mukaisia koostumuksia käytetään tehokkaasti endogeenisen FSH-bioaktiivisuuden alen-

tamiseen. Naisella tällaista käsittelyä voidaan käyttää tehokkaasti estämään munarakkulan kasvu ja kypsyminen, estäen täten raskauden. Miehellä tällaista käsittelyä voidaan käyttää tehokkaasti siittiöiden muodostumisen estoon. Eräs erityisen sopiva koostumus edellä olevaan tarkoitukseen sisältää
5 ihmisen FSH-reseptorin fragmenttia, joka sisältää aminotermi-
naalisen solunulkoisen alueen tai sen oleellisen osan, jolla on oleellisesti samat FSH:hon sitoutumisen ominaispiirteet.

Oleellisen puhdasta ihmisen FSH-reseptoria voidaan edullisesti käyttää myös tavanomaisiin FSH:n reseptorimäärityksiin kuten esimerkiksi niihin, jotka kuvataan julkaisussa: Reichert; Endocrinology 94 (1974) 483. Keksinnön mukaisen puhtaan reseptorin tai sen FSH:ta sitovan fragmentin korvaaminen parantaa oleellisesti tällaisten määritysten yhdenmu-
15 kaisuutta ja suorituskykyä. Fragmentti, joka sisältää aminotermi-
naalisen solunulkoisen alueen, tai sen FSH:ta sitova fragmentti ja/tai fuusioproteiini voidaan myös liittää affiniteettikolonneihin FSH:n puhdistamiseksi nesteistä, uutteista ja vastaavista.

20 Reseptori voidaan sisällyttää stabiiliin solulinjaan, edullisesti eukariotiseen solulinjaan, ja edullisimmin nisäkäsolulinjaan, joka voi tuottaa mitattavan biologisen vasteen reseptoria stimuloitaessa. Soluvasteen mittaus määritettävän FSH:n läsnä ollessa (esimerkiksi testiseerumissa,
25 plasmassa, kasvatusväliaineissa, kudoshomogenaateissa ja vastaavissa) antaisi käyttöön bioaktiivisuuden indikaation, ja antaisi täten käyttöön erittäin käyttökelpoisen diagnostisen määrityksen. Tällaista solulinjaa voitaisiin myös käyttää seulottaessa kemiallisia kirjastoja aineiden suhteen, jotka
30 voisivat olla vuorovaikutuksessa FSH-reseptorin kanssa tai testaamaan peptidejä tai pieniä proteiineja niiden kyvyn suhteen sitoutua FSH-reseptoriin nopeakäyttöisessä seulontajärjestelmässä. Eräs esimerkki nopeakäyttöisestä seulontajärjestelmästä, jossa ligandin sitoutuminen yhdistelmä-DNA-FSH-reseptoriin antaa tulokseksi mitattavan tuotteen kuten cAMP:n
35

tai progesteronin muodostumisen tai muodostumisen estymisen. Tällaista järjestelmää voisi edelleen parantaa liittämällä toimintakykyisesti helposti mitattavan merkkielementin kuten sellaisen, joka tuottaa bioluminenssia (esimerkiksi lusife-
5 raasigeeni) reseptorisignaali-transduktioreitille (esimerkiksi käyttämällä cAMP-vaste-elementtiä).

Oleellisen puhdasta ihmisen FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovia fragmentteja tai mutantteja voidaan myös käyttää röntgenkristallografisessa analyysissä molekyyli-mallien kehittä-
10 miseksi. Tällaiset mallit ovat käyttökelpoisia ihmisen FSH-reseptorin hormoninsitomisalueiden tertiäärin rakenteen määrittämisessä. Tällainen informaatio antaisi selvän käsityksen FSH:n ja sen reseptorin välisten todellisten kontaktialueiden rakenteesta, auttaen siten suunnittelemaan peptide-
15 jä, joilla on FSH-agonistista tai antagonistista aktiivisuutta.

Yhdistelmä-DNA-tekniikat, jotka soveltuvat tuottamaan keksinnön mukaisia proteiineja ja DNA:ta, mukaan lukien sopivien mutaatiotekniikoiden, vektorien, isäntäsolujen, kasvatusolo-
20 suhteiden ja vastaavien tunnistuksen, ovat ammattimiesten hyvin tuntemia ja kuvataan riittävästi esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 4 761 371 ja kansainvälisessä PCT-patenttijulkaisussa WO88/09818, joiden kuvaukset liitetään tähän viitteeksi. Jäljempänä olevissa esimerkeissä ovat koetyöselo-
25 tukset, bakteeri- ja bakteriofagikasvatusväliaineet ja kemialliset liuokset kuvataan yksityiskohtaisesti teoksessa Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ellei muuta viitettä esitetä.

Esimerkki 1

Ihmisen FSH-reseptori-cDNA-kloonien eristys ja karakterisointi

Kirjaston seulonta

- 5 Rotta-FSH-reseptori-cDNA-klooni, joka on samanlainen kuin julkaisussa Sprengel, Mol. Endocrinol. 4 (1990) 525 kuvattu, saatiin tri William Moyle'lta, University of Medicine ja Dentistry of New Jersey-Robert Wood Johnson Medical School. Tämä cDNA-klooni insertoitiin myöhäiseen V40-ekspressiovektori-
- 10 pSVL:ään (Pharmacia LKB, tuote nro 27-4509-01) ja sai nimen pSVLFSHR. 2,1 kb:n DNA-fragmentti, joka sisälsi alueen, joka vastaa täydellistä rotta-FSH-reseptoriproteiinin koodaus-
- 15 aluetta, katkaistiin plasmidista käyttämällä restriktioendonukleaasikohtia XbaI ja BamHI. Sulatettu DNA fraktioitiin koon mukaan geelielektroforeesilla, ja 2,1 kb:n rotta-FSH-reseptorifragmentti puhdistettiin elektroluoinnilla geelistä. Tätä puhdistettua DNA-fragmenttia käytettiin koettimena kirjastoseulontaan ihmisen FSH-reseptori-cDNA-kloonien tunnistamiseksi.
- 20 lambda gt11 cDNA -kirjasto, joka oli muodostettu RNA:sta, joka oli uutettu ihmisen kiveksistä, ostettiin yhtiöstä Clontech, Palo Alto, CA (luettelonumero HL1010b) ja monistettiin ennen käyttöä. 20 erää monistettua kirjastoa, vastaten noin $7,5 \times 10^4$ täplän muodostavaa yksikköä (pfu), adsorboitiin kukin noin 0,5 ml:aan E. coli -kannan Y1088 suspensiota. Suspensio oli valmistettu kasvattamalla Y1088:n yön yli viljeltyä viljelmää 37 °C:ssa NZYM:ssä tai LB:ssä, jota oli täydennetty 0,2 %:lla maltoosia ja 10 mM MgSO₄:llä, pelleteimällä solut ja suspendoimalla ne sitten uudelleen 10 mM MgSO₄:ään
- 30 OD₆₀₀-tasolle 0,5. Noin 6,5 ml sulatettua NZYM-huippuagarosia (0,7 %), lämpötilassa 48 °C, lisättiin kuhunkin faagi/solu-suspensioon, ja tulokseksi saatu seos kaadettiin yhdelle 20:stä 150 mm:n NZYM-agarlevylle (esilämmitetty 42 °C:seen).

Primääriseen seulontaan levyille siirretyn faagin kokonaislukumäärä oli noin $1,5 \times 10^6$. Neljän tunnin 42°C :ssa inkuboinnin jälkeen, minkä jälkeen seurasi jäähdytys 4°C :ssa useiden tuntien ajan, muodostettiin rinnakkaismäärityksin nitroselluloosasuodatin (Millipore)-täpläkohotukset kustakin levystä menettelytavoilla, jotka kuvataan julkaisussa: Benton ja Davies; Science 196 (1977) 180. Sattumanvaraista oligonukleotidialustusmenettelytapaa, jonka ovat kuvanneet Feinberg ja Vogelstein (Anal. Biochem. 137 (1983) 266), käytettiin muodostamaan, templaatti-rotta-FSH-reseptori-DNA-fragmentista, joka kuvataan edeltävässä kappaleessa, ^{32}P -leimattu koetin, jonka spesifinen aktiivisuus oli $1 - 2 \times 10^9$ cpm/ μg . Nitroselluloosasuodatinfaagikohotusten esihybridisointi suoritettiin puskurissa, joka sisälsi 50 % formamidia, 5X SSC [1X SSC:ssä on 0,15 M natriumkloridia, 0,015 M natriumsitraattia], 20 mM natriumfosfaattipuskuria, pH 7,2, 10X Denhardt'in reagenssia (50X Denhardt'in reagenssissa on 1 % Ficoll, 1 % polyvinyyli-pyrrolidonia ja 1 % naudanseerumialbumiinia) ja 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA:ta 37°C :ssa noin 6 tunnin ajan. Suodattimien hybridisointi suoritettiin samassa puskurissa paitsi, että rotta-FSH-reseptori-DNA-koetinta lisättiin konsentraatiossa noin 3×10^6 cpm/ml puskuria. Kun oli hybridisoitu 16 - 24 tunnin ajan 37°C :ssa, ylimääräinen koetin pestiin suodattimilta 2X SSC:llä, 0,1 % SDS huoneenlämpötilassa 30 min ajan, sitten 0,2X SSC:ssä, 0,1 % SDS 37°C :ssa 60 min ajan. Seuraavaksi suodattimet paljastettiin yön yli -70°C :ssa XAR-filmille (Kodak). Primäärisestä kirjastoseulasta tunnistettiin 6 rinnakkaispositiivista. Täplää sisältäviä agartulppia poistettiin 150 mm:n levyiltä laajakärkisellä pasteurpipetillä alueilta, joissa paikannettiin positiiviset kloonit. Faagi eluoiitiin liuottamalla tulppia SM:ssä. Sitten suspendoitu faagi levitettiin uudelleen 150 mm:n NZYM-agarlevyille primääriseen seulontaan kuvatulla tavalla. Levyt, jotka sisälsivät noin 500 pfu/levy, valittiin sekundääriseen seulontaan. Menettelytavat, joita käytettiin sekundäärisen seulonnan suodatinkoho-

tuksiin ja suodatinhybridisointeihin, olivat samat kuin primäärisesulle seulonalle kuvatut.

Sekundäärises seulonnan jälkeen tunnistettiin 5 oletettua positiivista ihmisen FSH-reseptoria ja eristettiin puhdistetuina λ gt11-bakteriofagikloonit. Ne saivat seuraavat nimet: 5 1-5, 5-10, 11-11, 13-9 ja 15-6.

Oletettujen ihmisen FSH-reseptori-cDNA-kloonien DNA-sekvenssien määrittäminen

λ gt11-cDNA-isolaateista valmistettiin kustakin bakteriofagi-DNA käyttämällä levylysaattimenetelmää, joka kuvataan käsikirjassa Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, s. 2.118. Bakteriofagi-DNA sulatettiin EcoRI-restriktioendonukleaasilla ja fraktioitiin sitten koon mukaan agarosi-geelillä cDNA-insertiofragmenttien puhdistusta varten. Puhdistetut cDNA-insertiot alikloonattiin pUC18:n EcoRI-kohtaan seuraavien kloonauksen ja sekvenssintikäsittelyjen helpottamiseksi. Kaksisäikeinen plasmidi-DNA puhdistettiin isäntäkanta E. coli MC1061:n 5 ml:n viljelmistä pienimittakaavaisella alkaliliuotusmenetelmällä (Sambrook, sama, s. 1.25), sitten puhdistettiin edelleen ajamalla Elutip-d-kolonniin (Schleicher & Schuell, Keene, NH) läpi valmistajan työohjetta käyttäen. Sitten puolet kustakin pienimittakaavaisesta plasmidinvalmistuksesta saadusta plasmidi-DNA:sta denaturoitiin 25 0,2 N NaOH:ssa, 0,2 mM EDTA, tilavuudessa 20 μ l huoneenlämpötilassa 10 min ajan. Denaturoitu plasmidi-DNA neutraloitiin ja saostettiin etanolilla lisäämällä 7,5 μ l 7,5 M ammoniumasetaattia ja 110 μ l 100-prosenttista etanolia ja jäädyttämällä seos nestetyypessä. DNA-sakka pelletoitettiin sentrifugomalla mikrofugissa 10 min ajan. DNA-pelletit pestiin 70-prosenttisella etanolilla ja kuivatettiin. Sekvenssintireaktiot suoritettiin Sequenase T7-DNA-polymeraasilla (United States Biochemical) valmistajan ohjeiden mukaan. Alustavat sekvenssintireaktiot suoritettiin eteenpäin suuntautuvilla ja kää-

teisillä sekvensointialukkeilla (Pharmacia LKB) pUC18:n polylinkkerialueelle. Alustavasta sekvensoinnista saatuja tietoja käytettiin suunniteltaessa ihmis-FSH-reseptorispesifisiä sekvensointialukkeita. Alukkeet joko syntetisoitiin malli 391
5 Applied Biosystems DNA-syntetisaattorilla tai tilattiin yhteisöstä National Biosciences, Inc., Hamel, MN. Jonkin verran DNA-sekvenssitietoja saatiin alikloonaamalla alkuperäisten kloonien pienempiä restriktioendonukleaasifragmentteja pUC18:aan ja toistamalla sekvensointireaktiot eteenpäin suunnatuilla ja käänteisillä alukkeilla.
10

Alustavat sekvenssitiedot osoittivat, että mikään viidestä cDNA-isolaatista ei edustanut ihmis-FSH-reseptorin täysimitaista proteiininkoodausaluetta, mutta että yhdistettyjä sekvenssitietoja klooneista voitiin käyttää täydellisen proteiinisekvenssin pääättelemiseen. Kuviossa 1 esitetään kaavakuva viiden kloonin suhteellisista asemista suhteessa täydelliseen ihmis-FSH-reseptori-cDNA-sekvenssin karttaan. Täydellinen ihmis-FSH-reseptori-cDNA-sekvenssi, joka saatiin yhdistämällä sekvenssitiedot päällekkäisistä klooneista käyttämällä Genetics Computer Group (GCG) fragmentinkokoamistietokoneohjelmaa, kuvataan sekvenssissä nro 1 ja päätelty aminohapposekvenssi kuvataan sekvenssissä nro 2. Ihmis-FSH-reseptorin DNA-sekvenssin analyysistä saatiin tulokseksi pitkän avoimen lukualueen tunnistus, joka lukualue oli pituudeltaan 2085 nukleotidia ja joka kooditti 695 aminohapon proteiinia.
15
20
25

Sen vuoksi ihmisen FSH-reseptori on 3 aminohappoa pitempi kuin rotta-FSH-reseptori. Rotta- ja ihmis-FSH-reseptori-DNA- ja proteiinisekvenssien väliset prosentuaaliset kokonaisidenttisyudet määritettiin käyttämällä GCG Bestfit -ohjelmaa, ja ne olivat 87 % ja 90 %, vastaavasti. Ihmis-FSH-reseptorin solunulkoisen aminoterminaalisen hydrofiilisen osan pituudeksi arvioidaan 349 aminohappoa, ja sillä on 87 %:n identtisyys rotta-FSH-reseptorin vastaavan alueen kanssa. Näiden kahden lajin seitsemän membraanin poikki ulottuvilla alueilla, jotka
30
35 ovat silloittuneet kolmella solunulkoisella ja kolmella so-

lunsisäisellä silmukalla, on 95 %:n identtisyys, ja karboksi-terminaalisilla solunsisäisillä alueilla on vain 81 %:n identtisyys. Osittainen aminohapposekvenssi, joka on julkaistu julkaisussa: Parmentier; Science 246 (1989) 1620-1622, vastaa aminohappoja 399 - 525 sekvenssissä nro 2.

Kloonit 5-10 oli variantti, joka sisälsi 0,25 ke:n insertion T:n jälkeen nukleotidiasemassa 448 sekvenssissä nro 1. Insertion DNA-sekvenssi ei ollut samanlainen rotta- tai ihmis-FSH-reseptori-DNA-sekvenssin minkään osan kanssa, eikä se myöskään ollut samanlainen minkään Genbank- tai EMBL DNA-sekvenssitietokannoissa olevan tunnetun sekvenssin kanssa. Vastaava alue kloonissa 11-11 ei sisältänyt tätä insertiota. LH-reseptori-cDNA-kloonit, jotka on eristetty ihmisen kilpirauhas-cDNA-kirjastosta, sisältävät samanlaisia variaatioita (Frazier, Mol. Endocrinol. 4 (1990) 1264-1276). Nämä variantit ovat todennäköisesti peräisin epätäydellisesti ja/tai tavallisesta poiketen liittyneistä mRNA-molekyyleistä. 3'-liitoskonsensussekvenssin (CAG'G) läsnäolo 5-10-insertion 3'-liitoskohdassa on tätä selitystä tukeva todiste.

pUC18-plasmidit, jotka sisältävät 11-11- (kutsutaan nimellä pFHSR11-11), 15-6- (kutsutaan nimellä pFHSR15-6) ja 5-10-cDNA-insertion (kutsutaan nimellä pFHSR5-10), talletettiin kansainväliseen talletuslaitokseen American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, 01.03.1991, tulonumeroilla ATCC68538, ATCC68540 ja ATCC68539, vastaavasti. Nämä talletukset tehtiin kansainvälisen Budapestin sopimuksen kaikkien vaatimusten mukaisesti.

Esimerkki 2

Vektorien konstruointi täysimittaisen ihmis-FSH-reseptorin ekspressoointiin nisäkässoluissa

Strategia ihmis-FSH-reseptori-DNA-konstruktion muodostamiseen yhdistelmä-DNA-tekniikalla nisäkässoluissa ekspressoointia varten esitetään kuvioissa 2A ja 2B. Viitaten kuvioon 2A, 5'-

pään 691 emäsparin (bp) NsiI/BamHI-fragmentti, joka sisälsi aloitus-ATG:n, puhdistettiin pFMSHR11-11:stä ja alikloonattiin pUC18:aan, joka oli sulatettu PstI:llä ja BamHI:llä. Tulokseksi saatu plasmidi, pFMSHR11-11nb, linearisoitiin SphI:llä. Päättettiin tylypiksi käsittelymällä DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentilla (New England Biolabs, Beverly, MA). Kun tylyppiin päihin oli liitetty XhoI-linkkerit (New England Biolabs, Beverly, MA), seos sulatettiin XhoI:llä ja BamHI:llä, ja puhdistettiin geelillä noin 700 emäsparin 5'-pään ihmis-FSH-reseptorifragmentti. Fragmentti ihmis-FSH-reseptori-cDNA:n keskiosasta eristettiin pFMSHR11-11:stä sulattamalla BamHI:llä ja SphI:llä ja puhdistamalla geelillä sopivan 734 emäsparin palan. Ihmis-FSH-reseptorin 3'-fragmentti, joka sisälsi TAA-lopetuskodonin, eristettiin pFMSHR15-6:sta sulattamalla plasmidin ensin DraIII:lla, tekemällä sitten päät tylypiksi reaktiossa T4-DNA-polymeraasin kanssa. Tylyppiin päihin liitettiin XhoI-linkkerit, ja tulokseksi saatu seos sulatettiin SphI:llä ja XhoI:llä, ja eristettiin ja puhdistettiin 3'-pään (suunnilleen) 690 emäsparin SphI/XhoI-fragmentti.

Kuvioon 2B viitaten, 5'-pään 700 emäsparin XhoI/BamHI- ja keskiosan 734 emäsparin BamHI/SphI-ihmis-FSH-reseptori-cDNA-fragmentit alikloonattiin pUC18-XhoI:een (muodostettu tässä laboratoriossa muuttamalla SmaI-kohdan pUC18-polylinkkerissä XhoI-kohdaksi XhoI-linkkereillä), joka oli sulatettu XhoI:llä ja SphI:llä. Tulokseksi saatu plasmidi, pFMSHR1.4xs, sulatettiin XhoI:llä ja SphI:llä. Sulatettu DNA fraktioitiin koon mukaan elektroforeesilla 5 - 6-prosenttisella polyakryyliamidigeelillä, ja leikattiin ja puhdistettiin elektroeluutiolla noin 1400 emäsparin fragmentti, joka sisälsi ihmis-FSH-reseptori-cDNA:n 5'- ja keskialueet. 3'-pään SphI/XhoI-fragmentti, joka sisältää TAA-lopetuskodonin, alikloonattiin pUC18-XhoI:een, joka oli sulatettu SphI:llä ja XhoI:llä. Tulokseksi saatu plasmidi, pFMSHR675sx, sulatettiin SphI:llä ja EcoRI:llä. Sulatettu DNA fraktioitiin 5 - 6-prosenttisella

polyakryyliamidigeelillä, ja leikattiin ja puhdistettiin elektroeluutiolla noin 700 emäsparin pätkä. Täydellinen ihmis-FSH-reseptorin koodausalue koottiin yhdistämällä 5'-pään 1400 emäsparin XhoI/SphI-fragmentin 3'-pään 700 emäsparin SphI/EcoRI-fragmentin kanssa liitoksessa pUC18-XhoI:n kanssa, joka oli sulatettu XhoI:llä ja EcoRI:llä. Oikea kokoonpano konstruktioilla, joka sai nimen pHFSHRX, varmistettiin restriktioendonukleaasisulatuksella ja DNA-sekvensoinnilla. Täydellisesti yhdistelmä-DNA-tekniikalla valmistettu ihmis-FSH-reseptorin 2,1-ke XhoI-fragmentti, joka sisältää noin 18 emäsparia 5'-pään ei-koodisekvenssistä ja 12 emäsparia 3'-pään ei-koodisekvenssistä koko ihmis-FSH-reseptoriproteiinin koodialueen lisäksi, katkaistiin pHFSHRX:stä XhoI-sulatuksella. Sulatettu DNA fraktioitiin koon mukaan elektroforeesilla 0,7-prosenttisella agarosigeelillä. 2,1 kiloemäksen XhoI-fragmentti leikattiin geelistä, puhdistettiin elektroeluoimalla Little Blue TankTM -tankissa (ISCO) valmistajan suosittelemaa menettelytapaa käyttäen, ja insertoitiin nisäkässoluekspressiovektoriplasmidien XhoI-kloonaukseen Plasmidit, jotka sisälsivät insertion sopivassa orientaatioissa ihmis-FSH-reseptori-mRNA-transkriptiota varten, valittiin restriktioendonukleaasifragmenttianalyyysillä. Ennen nisäkässoluihin lisäämistä ekspressiovektoriplasmidi-DNA puhdistettiin joko kahdella peräkkäisellä suurinopeuksisella sentrifugoinnilla cesiumkloriditiheysgradienttien läpi tai käyttämällä "plasmid maxi"-reagenssipakkausta (Qiagen, Chatsworth, CA) valmistajan työohjeen mukaan.

Ihmis-FSH-reseptorin ekspressioon voidaan käyttää mitä hyvänsä sopivaa nisäkässoluekspressiovektoria. Välttämättömiä vektoriplasmidikomponentteja ovat mm. seuraavat: eukariotinen promoottori kuten hiiri-metallotioneiini I (MMT-I)-promoottori, Rous Sarcoma Virus -promoottori tai ihmisapinan virus 40:n varhainen tai myöhäinen promoottori ihmis-FSH-reseptori-mRNA:n transkription ohjaamiseksi; merkkigeeni kuten neomysiiniresistenssigeeni (Neo), dihydrofolaattireduk-

taasi(DHFR)-geeni tai usean lääkkeen resistenssin geeni (MDR) transfektoitujen solujen valintaan; polyadenylointisignaali (poly A), kuten SV40 varhainen polyadenylointialue reseptori-RNA-transkriptin 3'-pään käsittelyä varten; ja bakteriaalinen replikaationaloitus- ja antibioottiresistenssigeeni, kuten pBR322 ori- ja ampisilliiniresistenssigeeni, mahdollistamaan vektoriplasmidin kasvu ja lisääminen sopivassa E. coli -kannassa. Joillain solulinjoilla voi olla tärkeää sisällyttää introni alueelle, joka käännetään ihmis-FSH-reseptoria koodittavaksi mRNA:ksi. On edullista sijoittaa introni promoottorin ja ihmis-FSH-reseptori-cDNA-insertion väliin, sijoittaen se siten ihmis-FSH-reseptori-RNA-transkriptin kääntämättömälle 5'-alueelle. Voidaan käyttää mitä hyvänsä sopivaa intronia. Kokeissamme käytetty introni oli 2 ke:n XbaI/PstI-osa intronista A ihmis-glykoproteiini α -alaysikkögeenistä (Fiddes, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1981) 13). Ekspressiovektoreissa se insertoitiin MMT-1-promoottorialueen ja ihmis-FSH-reseptori-cDNA-fragmentin väliin. Katkaistussa intronissa säilyi endogeeninen liitosakseptori, mutta liitoksenluovuttaja toimitettiin synteettisellä oligonukleotidilla.

Kuviossa 3 esitetään kaavio ihmis-FSH-reseptoriekspressiovektorista, jota käytettiin CHO-solutransfektioihin, pD α HFSHRX (ihmis-FSH-reseptori CLH3AXSV2DHFRh α IVS:ssä), ja kuviossa 4 esitetään kaavio ihmis-FSH-reseptoriekspressiovektorista, jota käytettiin transfektoimaan stabiilisti Y1-soluja, pN α HFSHRX (ihmis-FSH-reseptori CLH3AXSV2NEOh α IVS:ssä). MMT-I-geenisekvenssit (nukleotidinumero 4542 - 7514 kuviossa 3, nukleotidinumero 5192 - 8164 kuviossa 4), jotka sisältävät promoottorialueen, ovat samat kuin ne, jotka esitetään ylävirtaan XhoI-kohdasta CLH3X:n konstruktiossa (Reddy, DNA 6 (1987) 461). Ihmis-glykoproteiini α -alaysikön geenin introni A-fragmentti, joka kuvataan edeltävässä luvussa, sijaitsee nukleotidinumero 7514 ja 9514 välissä kuviossa 3, ja nukleotidinumero 8164 ja 10164 välissä kuviossa 4. XhoI-kohdasta alavirtaan MMT-I-intronit ja polyadenylointisignaali-

sekvenssit poistettiin ja korvattiin SV40 varhaisella polyadenylointialueella (nukleotidinumerot 11614 - 11857 kuviossa 3, nukleotidinumerot 12264 - 12508 kuviossa 4). pML-alue (Lusky, Nature 293 (1981) 79) sisältää bakteriaalisen replikaationaloitus- ja ampisilliiniresistenssigeenin pBR322:sta (nukleotidinumerot 1925 - 4542 kuviossa 3, nukleotidinumerot 2575 - 5192 kuviossa 4). DHFR-geenitranskriptioyksikkö (nukleotidinumerot 1 - 1925 kuviossa 3), joka sisältää hiiri-DHFR-cDNA- ja SV40 varhaisen alueen promoottori-, pienen T-introni- ja varhaisen alueen polyadenylointisekvenssit, vastaa PvuII/BamHI-fragmenttia pSV2DHFR:ssä (Subramani, Mol. Cell. Biol. 1 (1981) 854). PvuII-kohta muutettiin BamHI-kohdaksi ennen fragmentin insertoimista ekspressiovektoriplasmidiin. Neo-geenitranskriptioyksikkö (nukleotidinumerot 1 - 2575 kuviossa 4) koottiin korvaamalla DHFR-cDNA (nukleotidinumerot 342 - 1077 kuviossa 3) 1385 emäsparin HindIII/SmaI-fragmentilla pSV2-neo:sta (Southern, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) 327). SmaI-kohta muutettiin BamHI-kohdaksi ennen fragmentin insertoimista ekspressiovektoriplasmidiin.

Plasmidia pNohFSHRX voidaan käyttää useimpien jatkuvien nisäkässolulinjojen transfektointiin, ja talletettiin kansainväliseen ATCC-talletuslaitokseen 19.11.1991, tulonumerolla ATCC68833. Talletus tehtiin kansainvälisen Budapestin sopimuksen kaikkien vaatimusten mukaisesti. Plasmidi pDohFSHRX soveltuu parhaiten transfektoimaan solulinjoja, joista puuttuu dihydrofolaattireduktaasi (DHFR)-aktiivisuus.

Ammattimiehet voivat käyttää DNA-kloonausta ja yhdistelmä-DNA-tekniikoita modifioimaan ihmis-FSH-reseptorin DNA-ekspressiokonstruktiota niin, että kooditetaan FSH:ta sitovia fragmentteja. Nämä modifioidut DNA-fragmentit voidaan insertoida ekspressiovektoreihin kuten tässä kuvattuihin ja käyttää transfektoimaan nisäkässoluja kehittämään linjoja, jotka erittävät ihmis-FSH-reseptorin liukoisia FSH:ta sitovia fragmentteja, kuten aminotermiinalista solunulkoista aluetta tai sen FSH:ta sitovaa fragmenttia.

Esimerkki 3

Funktionaalista ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovaa fragmenttia tai mutanttia stabiilisti ekspressoivien nisäkässolulinjojen kehittäminen

- 5 Sopivia nisäkässolulinjoja yhdistelmä-DNA-ihmis-FSH:n ja sen johdannaisten ekspressointia varten ovat mm. kiinanhamsterin munasarja (CHO), hiiren adenokarsinoma Y1, rotan aivolisäkkeen GH3, ihmisen rintakarsinoma MCF7 ja ihmisen alkion mu-
nuainen 293. Tässä esimerkissä kuvataan Y1- ja CHO-solujen
10 käyttö.

Y1-solut ovat klonaalista, steroidia erittävää solukantaa, joka on aloitettu hiiren lisämunuaiskuoren kasvaimesta (Yasumura, Cancer Res. 26 (1966) 529-536). Nämä solut saatiin ATCC-solupankista (ATCC CCL 79) ja ylläpidettiin viljelmässä
15 kasvattamalla Ham'in F10-väliaineessa, jota oli täydennetty 15 %:lla hevosen seerumia (HS), 2,5 %:lla FBS:ää ja 1 %:lla L-glutamiinia (Y1-kasvatusväliaine).

CHO-DUKX-solut ovat kiinanhamsterin munasarjasolujen klonaalista mutanttia, josta puuttuu dihydrofolaattireduktaasiaktiivisuus (Urlaub G. ja Chasin, L.A. PNAS 77 (1980) 4216-4220). Soluja pidettiin minimaalisessa välttämättömässä väliaineessa α (MEM- α), jota oli täydennetty 10 %:lla FBS:ää ja 1 %:lla L-glutamiinia (CHO-kasvatusväliaine).

25 Kaikki solukasvatukset suoritettiin 37 °C:ssa 5-prosenttiossa CO₂:ssa, kosteutetussa ilmakehässä.

Kalsiumfosfaattitransfektiot

Käytetty transfektioprotokolla oli muunnelma julkaistusta menetelmästä (Graham, Virology 52 (1973) 456). Noin 24 tuntia ennen transfektointia solut siirrostettiin halkaisijaltaan
30 100 mm:n maljoihin tiheydellä 7×10^5 solua/malja (CHO-DUKX) tai 1×10^6 solua/malja (Y1). Transfektointeja varten 10 μ g

vektoriplasmidi-DNA:ta (pD α HFSHRX CHO-DUKX-soluilla, pN α HFSHRX Y1-soluilla) lisättiin 0,5 ml:aan transfektointipuskuria. Transfektointipuskuri valmistettiin yhdistämällä 4 g NaCl, 0,185 g KCl, 0,05 g Na₂HPO₄, 0,5 g dekstroosia ja 5 2,5 g HEPES'iä steriilissä tislatussa vedessä ja säätämällä tilavuus 500 ml:ksi ja pH-arvo 7,5:een. DNA-transfektointipuskuriseokseen lisättiin 31 μ l 2 M CaCl₂:ta. Liuosta sekoitettiin käyttämällä pyörresekoitinta ja annettiin seistä huoneenlämpötilassa 45 min ajan DNA-sakan muodostumisen sallimiseksi. DNA-sakka päälystettiin solujen päälle kasvatusväliaineen poistamisen jälkeen. 20 min huoneenlämpötilassa olon jälkeen lisättiin 5 ml sopivaa kasvatusväliainetta ja soluja kasvatettiin 6 tunnin ajan. Väliaine poistettiin ja soluja shokkikäsiteltiin 3,5 min ajan 3 - 4 ml:ssa transfektointipuskuria, joka sisälsi 15 % glyserolia. Solut huuhdottiin 15 kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ennen kuin lisättiin 10 ml kasvatusväliainetta. Noin 48 tuntia transfektion jälkeen CHO-DUKX-soluja alikasvatettiin 1:10-jakamissuhteella, ja lisättiin valintaväliainetta. Y1-solut saivat kasvaa 20 72 tunnin ajan transfektion jälkeen ennen alikasvatusta 1:5-jakamissuhteessa valintaväliaineessa. CHO-DUKX-solujen valintaväliaine koostui MEM- α :sta ilman ribonukleosideja ja deoksiribonukleosideja täydennettynä 10 %:lla dialysoitua FBS:ää, 1 %:lla L-glutamiinia ja 0,02 μ M:lla metotreksaattia 25 (MTX). Y1-solujen valintaväliaine koostui Y1-kasvatusväliaineesta, jossa oli 80 μ g/ml G418:aa. MTX-resistentit CHO-DUKX-solukoloniat ja G418-resistentit Y1-solukoloniat muodostuivat noin 2 - 3 viikon kuluttua, ja ne poimittiin yksitellen ja kasvatettiin kunnes soluluvut olivat riittävät kryosäilytystä ja hormonivasteisuuden suhteen testausta varten. 30

Ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH-reseptorin bioaktiivisuuden osoitus stabiilisti transfektoiduissa CHO-soluissa

Jotta määritettäisiin, voisiko yhdistelmä-DNA-tekniikkalia valmistettu ihmis-FSH-reseptori-cDNA-konstruktio tuottaa proteiinia, joka olisi biologisesti toimintakykyistä stabiilisti 35

transfektoiduissa CHO-soluissa, MTX-resistenttejä CHO-solukolonioita käsiteltiin ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:lla ja mitattiin solunsisäiset cAMP-tasot. cAMP-määrittystä varten soluja alikasvatettiin 12-kaivoisilla levyillä tiheyteen $2,5 \times 10^4$ solua/kaivo CHO-soluvalintaväliaineessa. Kun oli kasvatettu 72 tuntia, jokainen kaivo pestiin 1,5 ml:lla lämmintä kasvatusväliainetta. Jokaiseen pestyyn kaivoon lisättiin 300 μ l seerumitonta kasvatusväliainetta, joka sisälsi 0,1 mM 3-isobutyryli-1-metyyliksantiinia (Sigma). Kun oli kasvatettu 15 min, jokaisessa kaivossa olevaan väliaineeseen lisättiin ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:ta niin, että lopullinen konsentraatio oli noin 335 ng (2413 mIU)/ml. Kun oli kasvatettu 30 min, määrittys lopetettiin alistamalla solut neljälle nopealle pakastus/sulatus-syklille. 50 μ l:n erä kutakin solulysaattia siirrettiin 1,5 ml:n putkeen proteiinipitoisuuden määrittystä varten. Jokaiseen jäljellä olevaan lysaattinäytteeseen lisättiin kylmää etanolia (300 μ l) ennen siirtämistä erillisiin 1,5 ml:n putkiin. Kaikkia lysaattinäytteitä sentrifugoitiin solujäänteen poistamiseksi 15 min ajan nopeudella $13\ 000 \times g$. Liukoisen proteiinin kokonaispitoisuuden määrittäminen suoritettiin proteiinimäärittysreagenssipakkauksella, joka ostettiin yhtiöstä Bio-Rad (luettelonumero 500-0002), käyttäen valmistajan toimittamaa protokollaa. Etanolilla käsitellyt lysaattinäytteet pakastekuivattiin 5 - 100 μ l:n erissä, ja suspendoitiin uudelleen 100 μ l:aan määrittyspuskuria, joka toimitettiin Dupont/NEN Medical Products cAMP -määrittysreagenssipakkauksessa (luettelonumero NEK-033). Uudelleen suspendoitujen lysaattinäytteiden cAMP-pitoisuus määritettiin käyttämällä "asetyloitu radioimmunomäärittys"-protokollaa, joka oli toimitettu reagenssipakkauksen mukana. Näytteitä ei laimennettu määrittystä varten. Pääosassa ihmisen FSH-reseptorilla transfektoituja CHO-solulinjoja mitattiin FSH-stimuloinnin jälkeen korkeammat solunsisäiset cAMP-tasot kuin kontrolleissa (käsittelemättömät CHO-DUKX-solut ja CHO-DUKX-solut, jotka oli transfektoitu CLH3AXSV2DHFRh α IVS:llä). Kes-

kimääräinen vaste oli noin 16-kertainen kontrolleihin verrattuna.

Eräs ei-klonaalinen solulinja, CHO_HFSHR4Q-13, valittiin hormoniannosvasteanalyysiin. Käytetty menettelytapa oli sama
5 kuin edeltävässä luvussa paitsi, että solut käsiteltiin joko ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:lla tai LH:lla konsentraatioissa alueella 0 - 10 000 mIU/ml. Kukin annos analysoitiin kolmella rinnakkaisnäytteellä. Muodostuneen solunsisäisen cAMP:n määrä ilmaistiin yksikössä nmol/mg liukoista proteiinia ja kuvattiin FSH- tai LH-konsentraation funktiona annos/vaste-käyrien
10 muodostamiseksi. FSH- ja LH-annos/vaste-käyrät esitetään kuviossa 5. Tulokset osoittavat, että CHO_HFSHR4Q-13 CHO -solulinjalla oli kyllästettävissä oleva solunsisäisen cAMP:n kasvu vasteena FSH-stimulaatiolle, muttei vasteena LH-stimulaatiolle. Puolimaksimaalinen FSH-stimulaatio (ED₅₀) tapahtui
15 annoksella 144 mIU/ml FSH. Sen vuoksi ihmis-FSH-reseptori-cDNA:ta voidaan käyttää tuottamaan biologisesti toimintakykyistä ihmis-FSH-reseptoriproteiinia CHO-soluissa, mahdollistaen sen, että solut välittävät spesifisen cAMP-vasteen
20 FSH:ta eikä LH:ta kohtaan.

CHO_HFSHR4Q-13-linjan, tai samanlaisen, ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovia fragmentteja tai mutantteja tuottavan linjan ihmis-FSH-reseptoripitoisuutta voidaan kasvattaa alistamalla solut vaiheittaisille MTX-konsentraation kohotuksille. Tämä aiheuttaa DHFR-cDNA-kopioluvun kasvun yhdessä liitettyjen sekvenssien kanssa, jotka sisältävät ihmis-FSH-reseptori-cDNA:ta, lisäten kooditettujen proteiinien synteesiä epäsuorasti. Tämä voidaan suorittaa, mikäli välttämätöntä, biomäärityksen herkkyyden lisäämiseksi. Niisäkässoluja, jotka ekspressoivat korkeita ihmis-FSH-reseptorin tai sen FSH:ta sitovien fragmenttien tai mutanttien tasoja, voidaan käyttää myös valmistettaessa suuria määriä ihmis-FSH-reseptoriproteiinia käytettäväksi ei-terapeuttisina aineina tai reseptoriradioimmunomäärityksissä.

CHOHFSHR4Q-13-linjaa tai samanlaista linjaa voidaan myös käyttää FSH:ta tai FSH-tyyppisiä aineita sisältävien farmaseuttisten valmisteiden in vitro -bioaktiivisuuden määrittämisessä. cAMP-vaste-elementtiin voidaan liittää toimintakykyisesti reportterigeeni kuten lusiferaasi, ja cAMP-tasojen kohoamiset voidaan mitata epäsuorasti ei-radioaktiivisella menetelmällä kuten bioluminenssilla FSH-bioaktiivisuuden mitan aikaansaamiseksi.

CHOHFSHR4Q-13-linja talletettiin kansainväliseen ATCC-tal-
10 tuslaitokseen 19.11.1991, tulonumerolla ATCC CRL 10921. Tal-
letus tehtiin kansainvälisen Budapestin sopimuksen kaikkien
vaatimusten mukaisesti.

Yhdistelmä-DNA-ihmis-FSH-reseptorin bioaktiivisuuden osoitus
stabiilisti transfektoiduissa hiiren lisämunuaisen Y1-soluis-
15 sa

Jotta osoitettaisiin, voiko yhdistelmä-DNA-tekniikalla val-
mistettu ihmis-FSH-reseptori-cDNA-konstruktio tuottaa prote-
iinia, joka olisi biologisesti toimintakykyistä stabiilisti
transfektoiduissa Y1-soluissa, G418-resistenttejä Y1-soluko-
20 lonioita käsiteltiin ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:llä, ja kasva-
tusväliaineista analysoitiin progesteronipitoisuus. Proges-
teronimäärittystä varten solut alikloonattiin 6-kaivoisiin le-
vyihin (kaivon halkaisija 35 mm) tiheydellä 4×10^5 so-
lua/kaivo Y1-soluvalintaväliaineessa. Kun oli kasvatettu 2
25 päivää, Y1-soluvalintaväliaine poistettiin ja korvattiin 3
ml:lla Ham'in F10-väliainetta, joka oli täydennetty 5 %:lla
hevosen seerumia, 0,8 %:lla naudan sikiön seerumia, 1 %:lla
L-glutamiinia ja 80 µg:lla/ml G418:aa. Kun oli inkuboitu 1
päivä, väliaine poistettiin ja solut pestiin kahdesti 2
30 ml:lla Ham'in F10-väliainetta, jota oli täydennetty 1
mg:lla/ml naudanseerumialbumiinia (fraktio V), 1 %:lla L-
glutamiinia ja 80 µg:lla/ml G418:aa (määrittäjäväliaine). Tähän
aikaan keskimääräinen solulukku/kaivo arvioitiin kullakin so-
lulinjalla poistamalla ja laskemalla soluja kolmesta testi-

kaivosta. Sitten soluja kasvatettiin 4 tuntia 1 ml:n kanssa määritysväliainetta, joka sisälsi 100 mIU/ml ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:ta. Inkuboinnin jälkeen kasvatusmaljat sijoitettiin jäihin samalla kun kasvatusväliaine jokaisesta kaivosta

5 siirrettiin erillisiin lasisiin 12 X 75 koeputkiin. Kasvatusväliaineita sisältävät putket sijoitettiin kiehuvaan veteen 10 minuutiksi, sitten sentrifugoitiin 4 °C:ssa nopeudella 1 100 X g. Supernatantit siirrettiin puhtaisiin lasisiin 12 X 75 koeputkiin ja varastoitiin -20 °C:ssa yön yli. Progesteronitasot mitattiin käyttämällä Serono Diagnostics Progesterone MAIA:aa, tuotenumero 12274, jota myy yhtiö Ciba Corning, Medfield, MA. Määritys suoritettiin valmistajan varustamien ohjeiden mukaan paitsi, että kasvatusväliainenäytteet ja progesteroni standardikäyrää varten laimennettiin reagenssipakkauksessa toimitetun laimennuspuskurin sijasta fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, joka sisälsi 0,1 % naudanseerumialbumiinia ja 0,6 % natriumatsidia. Progesteroni standardikäyrää varten saatiin yhtiöstä Cal Biochem (luettelonumero 5341), ja laimennettiin ennen käyttöä konsentraatioon 15

15 µg/ml 100-prosenttista etanolia. Kantaliuosta säilytettiin -70 °C:ssa. Progesteronistandardikäyrälaimennosten lopulliset konsentraatiot olivat samat kuin määritysreagenssipakkauksessa suositellut. Laimennetut progesteronistandardit olivat 4 °C:ssa stabiileja yhden viikon.

25 Useat FSH:lla käsitellyt Y1-linjat, jotka oli transfektoitu stabiilisti ihmis-FSH-reseptorilla, erittivät kasvaneita progesteronitasoja suhteessa kontrolleihin (sama linja, jota ei käsitelty FSH:lla, transfektoimattomat Y1-solut, Y1-solut, jotka oli transfektoitu CLH3AXSV2NEO α IVS:llä). Hormonian-

30 nos/vaste-analyyseihiin valittiin yksi ei-klonaalinen linja, Y1HFSHR4-38. Käytetty menettelytapa oli sama kuin kuvattiin edeltävässä luvussa paitsi, että solut käsiteltiin FSH-konsentraatioiden alueella, 0 - 100 mIU/ml. Kullkin annos suoritettiin rinnakkaiskoe. FSH:lla stimuloitujen Y1-solujen tuot-

35 tama progesteronimäärä normalisoitiin tasoon 1×10^6 solua ja

kuvattiin FSH-konsentraation funktiona annos/vaste-käyrän muodostamiseksi. Annos/vaste-käyrä esitetään kuviossa 6. Tässä erityisessä kokeessa havaittiin 25-kertainen progesteroniaktiivisuuden kasvu annoksella 20 mIU/ml ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH:ta. Lineaarinen alue oli 2,5 - 20 mIU/ml FSH ja ED₅₀ oli 6,4 mIU/ml FSH:ta. Nämä tulokset osoittavat, että ihmis-yhdistelmä-DNA-FSH-reseptorilla stabiilisti transfektoiduilla Y1-soluilla havaittiin FSH-annoksesta riippuvat progesteronieritystasot. Sen vuoksi ihmis-FSH-reseptori on toiminnallisesti aktiivinen hiiren lisämunuaisen Y1-soluissa ekspressoitaessa.

Solupopulaatioita, jotka ovat peräisin CHO_HFSHR4Q-13- tai Y1HFSHR4-38-solulinjoista tai samanlaisista solulinjoista, voidaan käyttää kehitettäessä herkkiä in vitro -biomäärityksiä FSH:ta ja FSH-tyyppisiä aineita varten. Muut in vitro -FSH-biomääritykset, joita nykyisin käytetään, kuten munarakkulasoluaromataasibiomääritys ja Sertoli-soluaromataasibiomääritys, vaativat primääristen soluviljelmien perustamista rotista aina kun määrittäminen suoritetaan. Uusilla Y1-solu- ja CHO-solubiomäärityksillä käytetään stabiilisti transformoituja jatkuvia solulinjoja. Tämän mahdollistaa in vitro -biomääritysmenetelmien toteuttamisen, jotka menetelmät ovat nykyisiin menetelmiin verrattuina ylivoimaiset yksinkertaisuuden, tarkkuuden ja vastaavuuden suhteen.

SEKVENSSILUETTELO

SEKVENSSIN ID.NRO 1 TIEDOT:

SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:

- (A) PITUUS: 2179
 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 (C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
 (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: cDNA - mRNA

ALKUPERÄINEN LÄHDE:

- (A) ORGANISMI: Homo sapiens
 (F) KUDOSTYYPPI: kives

VÄLITÖN LÄHDE:

- (A) KIRJASTO: λgt11 cDNA-kirjasto, ClonTech #HL1010b
 (B) KLOONI: pFHSR11-11, pFHSR15-6

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: proteiinikoodialue
 (B) SIJAINTI: 75 - 2159

SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1:

TGTGGAGCTT CTGAGATCTG TGGAGGTTTT TCTCTGCAAA TGCAGGAAGA AATCAGGTGG	60
ATGGATGCAT AATT ATG GCC CTG CTC CTG GTC TCT TTG CTG GCA TTC CTG	110
Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala Phe Leu	
-15 -10	
AGC TTG GGC TCA GGA TGT CAT CAT CGG ATC TGT CAC TGC TCT AAC AGG	158
Ser Leu Gly Ser Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg	
-5 1 5 10	
GTT TTT CTC TGC CAA GAG AGC AAG GTG ACA GAG ATT CCT TCT GAC CTC	206
Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp Leu	
15 20 25	
CCG AGG AAT GCC ATT GAA CTG AGG TTT GTC CTC ACC AAG CTT CGA GTC	254
Pro Arg Asn Ala Ile Glu Leu Arg Phe Val Leu Thr Lys Leu Arg Val	
30 35 40	
ATC CAA AAA GGT GCA TTT TCA GGA TTT GGG GAC CTG GAG AAA ATA GAG	302
Ile Gln Lys Gly Ala Phe Ser Gly Phe Gly Asp Leu Glu Lys Ile Glu	
45 50 55	
ATC TCT CAG AAT GAT GTC TTG GAG GTG ATA GAG GCA GAT GTG TTC TCC	350
Ile Ser Gln Asn Asp Val Leu Glu Val Ile Glu Ala Asp Val Phe Ser	
60 65 70 75	
AAC CTT CCC AAA TTA CAT GAA ATT AGA ATT GAA AAG GCC AAC AAC CTG	398
Asn Leu Pro Lys Leu His Glu Ile Arg Ile Glu Lys Ala Asn Asn Leu	
80 85 90	

CTC	TAC	ATC	AAC	CCT	GAG	GCC	TTC	CAG	AAC	CTT	CCC	AAC	CTT	CAA	TAT	446
Leu	Tyr	Ile	Asn	Pro	Glu	Ala	Phe	Gln	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Gln	Tyr	
			95					100					105			
CTG	TTA	ATA	TCC	AAC	ACA	GGT	ATT	AAG	CAC	CTT	CCA	GAT	GTT	CAC	AAG	494
Leu	Leu	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Lys	His	Leu	Pro	Asp	Val	His	Lys	
		110					115					120				
ATT	CAT	TCT	CTC	CAA	AAA	GTT	TTA	CTT	GAC	ATT	CAA	GAT	AAC	ATA	AAC	542
Ile	His	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Gln	Asp	Asn	Ile	Asn	
	125					130					135					
ATC	CAC	ACA	ATT	GAA	AGA	AAT	TCT	TTC	GTG	GGG	CTG	AGC	TTT	GAA	AGT	590
Ile	His	Thr	Ile	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Phe	Glu	Ser	
	140				145					150					155	
GTG	ATT	CTA	TGG	CTG	AAT	AAG	AAT	GGG	ATT	CAA	GAA	ATA	CAC	AAC	TGT	638
Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Asn	Lys	Asn	Gly	Ile	Gln	Glu	Ile	His	Asn	Cys	
			160					165						170		
GCA	TTC	AAT	GGA	ACC	CAA	CTA	GAT	GAG	CTG	AAT	CTA	AGC	GAT	AAT	AAT	686
Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Leu	Asn	Leu	Ser	Asp	Asn	Asn	
			175					180					185			
AAT	TTA	GAA	GAA	TTG	CCT	AAT	GAT	GTT	TTC	CAC	GGA	GCC	TCT	GGA	CCA	734
Asn	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Asn	Asp	Val	Phe	His	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	
		190					195					200				
GTC	ATT	CTA	GAT	ATT	TCA	AGA	ACA	AGG	ATC	CAT	TCC	CTG	CCT	AGC	TAT	782
Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	His	Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	
	205					210					215					
GGC	TTA	GAA	AAT	CTT	AAG	AAG	CTG	AGG	GCC	AGG	TCG	ACT	TAC	AAC	TTA	830
Gly	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Asn	Leu	
	220				225				230						235	
AAA	AAG	CTG	CCT	ACT	CTG	GAA	AAG	CTT	GTC	GCC	CTC	ATG	GAA	GCC	AGC	878
Lys	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Glu	Ala	Ser	
				240					245					250		
CTC	ACC	TAT	CCC	AGC	CAT	TGC	TGT	GCC	TTT	GCA	AAC	TGG	AGA	CGG	CAA	926
Leu	Thr	Tyr	Pro	Ser	His	Cys	Cys	Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Arg	Arg	Gln	
			255					260					265			
ATC	TCT	GAG	CTT	CAT	CCA	ATT	TGC	AAC	AAA	TCT	ATT	TTA	AGG	CAA	GAA	974
Ile	Ser	Glu	Leu	His	Pro	Ile	Cys	Asn	Lys	Ser	Ile	Leu	Arg	Gln	Glu	
		270					275					280				
GTT	GAT	TAT	ATG	ACT	CAG	ACT	AGG	GGT	CAG	AGA	TCC	TCT	CTG	GCA	GAA	1022
Val	Asp	Tyr	Met	Thr	Gln	Thr	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Glu	
	285					290					295					
GAC	AAT	GAG	TCC	AGC	TAC	AGC	AGA	GGA	TTT	GAC	ATG	ACG	TAC	ACT	GAG	1070
Asp	Asn	Glu	Ser	Ser	Tyr	Ser	Arg	Gly	Phe	Asp	Met	Thr	Tyr	Thr	Glu	
					305					310					315	

TTT GAC TAT GAC TTA TGC AAT GAA GTG GTT GAC GTG ACC TGC TCC CCT	1118
Phe Asp Tyr Asp Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro	
320 325 330	
AAG CCA GAT GCA TTC AAC CCA TGT GAA GAT ATC ATG GGG TAC AAC ATC	1166
Lys Pro Asp Ala Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile	
335 340 345	
CTC AGA GTC CTG ATA TGG TTT ATC AGC ATC CTG GCC ATC ACT GGG AAC	1214
Leu Arg Val Leu Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn	
350 355 360	
ATC ATA GTG CTA GTG ATC CTA ACT ACC AGC CAA TAT AAA CTC ACA GTC	1262
Ile Ile Val Leu Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val	
365 370 375	
CCC AGG TTC CTT ATG TGC AAC CTG GCC TTT GCT GAT CTC TGC ATT GGA	1310
Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly	
380 385 390 395	
ATC TAC CTG CTG CTC ATT GCA TCA GTT GAT ATC CAT ACC AAG AGC CAA	1358
Ile Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln	
400 405 410 415	
TAT CAC AAC TAT GCC ATT GAC TGG CAA ACT GGG GCA GGC TGT GAT GCT	1406
Tyr His Asn Tyr Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala	
415 420 425	
GCT GGC TTT TTC ACT GTC TTT GCC AGT GAG CTG TCA GTC TAC ACT CTG	1454
Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu	
430 435 440	
ACA GCT ATC ACC TTG GAA AGA TGG CAT ACC ATC ACG CAT GCC ATG CAG	1502
Thr Ala Ile Thr Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln	
445 450 455	
CTG GAC TGC AAG GTG CAG CTC CGC CAT GCT GCC AGT GTC ATG GTG ATG	1550
Leu Asp Cys Lys Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met	
460 465 470 475	
GGC TGG ATT TTT GCT TTT GCA GCT GCC CTC TTT CCC ATC TTT GGC ATC	1598
Gly Trp Ile Phe Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile	
480 485 490	
AGC AGC TAC ATG AAG GTG AGC ATC TGC CTG CCC ATG GAT ATT GAC AGC	1646
Ser Ser Tyr Met Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser	
495 500 505	
CCT TTG TCA CAG CTG TAT GTC ATG TCC CTC CTT GTG CTC AAT GTC CTG	1694
Pro Leu Ser Gln Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu	
510 515 520	
GCC TTT GTG GTC ATC TGT GGC TGC TAT ATC CAC ATC TAC CTC ACA GTG	1742
Ala Phe Val Val Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val	
525 530 535	

CGG AAC CCC AAC ATC GTG TCC TCC TCT AGT GAC ACC AGG ATC GCC AAG 1790
 Arg Asn Pro Asn Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys
 540 545 550 555

CGC ATG GCC ATG CTC ATC TTC ACT GAC TTC CTC TGC ATG GCA CCC ATT 1838
 Arg Met Ala Met Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile
 560 565 570

TCT TTC TTT GCC ATT TCT GCC TCC CTC AAG GTG CCC CTC ATC ACT GTG 1886
 Ser Phe Phe Ala Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val
 575 580 585

TCC AAA GCA AAG ATT CTG CTG GTT CTG TTT CAC CCC ATC AAC TCC TGT 1934
 Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys
 590 595 600

GCC AAC CCC TTC CTC TAT GCC ATC TTT ACC AAA AAC TTT CGC AGA GAT 1982
 Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp
 605 610 615

TTC TTC ATT CTG CTG AGC AAG TGT GGC TGC TAT GAA ATG CAA GCC CAA 2030
 Phe Phe Ile Leu Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln
 620 625 630 635

ATT TAT AGG ACA GAA ACT TCA TCC ACT GTC CAC AAC ACC CAT CCA AGG 2078
 Ile Tyr Arg Thr Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg
 640 645 650

AAT GGC CAC TGC TCT TCA GCT CCC AGA GTC ACC AAT GGT TCC ACT TAC 2126
 Asn Gly His Cys Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr
 655 660 665

ATA CTT GTC CCT CTA AGT CAT TTA GCC CAA AAC TAAAACACAA TGTGAAAATG 2179
 Ile Leu Val Pro Leu Ser His Leu Ala Gln Asn
 670 675

SEKVENSSIN ID.NRO 2 TIEDOT:

SEKVENSSIN TUNTOMERKIT:

(A) PITUUS: 695

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

PIIRTEET:

(A) NIMI/AVAINSANA: oletettu aminotermiinalinen solunulkoi-
nen alue

(B) SIJAINTI: 1 - 349

(C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden dimeeristen
glykoproteiinireseptorin solunulkoisten alueiden kanssa,
hydrofiilinen

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: transmembraaninen alue
- (B) SIJAINTI: 350 - 613
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue I
- (B) SIJAINTI: 350 - 370
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue II
- (B) SIJAINTI: 382 - 404
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue III
- (B) SIJAINTI: 427 - 448
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue IV
- (B) SIJAINTI: 469 - 491
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue V
- (B) SIJAINTI: 512 - 533
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue VI
- (B) SIJAINTI: 557 - 580
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu transmembraaninen alue VII
- (B) SIJAINTI: 592 - 613
- (C) TUNNISTUSMENETELMÄ: samalla lailla muiden G-proteiiniin liittyneiden reseptoritransmembraanialueiden kanssa, hydrofobinen, pituus noin 20 - 23 aminohappoa

PIIRTEET:

- (A) NIMI/AVAINSANA: oletettu karboksiterminaalinen solunsisäinen alue
- (B) SIJAINTI: 614 - 678

His Pro Ile Cys Asn Lys Ser Ile Leu Arg Gln Glu Val Asp Tyr Met
 275 280 285
 Thr Gln Thr Arg Gly Gln Arg Ser Ser Leu Ala Glu Asp Asn Glu Ser
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Arg Gly Phe Asp Met Thr Tyr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp
 305 310 315
 Leu Cys Asn Glu Val Val Asp Val Thr Cys Ser Pro Lys Pro Asp Ala
 320 325 330 335
 Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu
 340 345 350
 Ile Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu
 355 360 365
 Val Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val Pro Arg Phe Leu
 370 375 380
 Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly Ile Tyr Leu Leu
 385 390 395
 Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln Tyr His Asn Tyr
 400 405 410 415
 Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala Ala Gly Phe Phe
 420 425 430
 Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu Thr Ala Ile Thr
 435 440 445
 Leu Glu Arg Trp His Thr Ile Thr His Ala Met Gln Leu Asp Cys Lys
 450 455 460
 Val Gln Leu Arg His Ala Ala Ser Val Met Val Met Gly Trp Ile Phe
 465 470 475
 Ala Phe Ala Ala Ala Leu Phe Pro Ile Phe Gly Ile Ser Ser Tyr Met
 480 485 490 495
 Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gln
 500 505 510
 Leu Tyr Val Met Ser Leu Leu Val Leu Asn Val Leu Ala Phe Val Val
 515 520 525
 Ile Cys Gly Cys Tyr Ile His Ile Tyr Leu Thr Val Arg Asn Pro Asn
 530 535 540
 Ile Val Ser Ser Ser Ser Asp Thr Arg Ile Ala Lys Arg Met Ala Met
 545 550 555
 Leu Ile Phe Thr Asp Phe Leu Cys Met Ala Pro Ile Ser Phe Phe Ala
 560 565 570 575

Ile Ser Ala Ser Leu Lys Val Pro Leu Ile Thr Val Ser Lys Ala Lys
580 585 590

Ile Leu Leu Val Leu Phe His Pro Ile Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe
595 600 605

Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Asn Phe Arg Arg Asp Phe Phe Ile Leu
610 615 620

Leu Ser Lys Cys Gly Cys Tyr Glu Met Gln Ala Gln Ile Tyr Arg Thr
625 630 635

Glu Thr Ser Ser Thr Val His Asn Thr His Pro Arg Asn Gly His Cys
640 645 650 655

Ser Ser Ala Pro Arg Val Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Ile Leu Val Pro
660 665 670

Leu Ser His Leu Ala Gln Asn
675



Patenttivaatimukset

1. Oleellisen puhtas ihmisen follikkeliä stimuloiva hormoni(FSH)-reseptori tai sen fragmentti tai mutantti ei-terapeutttiseen käyttöön, **tunnettu** siitä, että se sitoo FSH:ta ja
5 että se käsittää sekvenssissä nro 2 esitetyn aminohapposekvenssin 1 - 678.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen FSH-reseptori, **tunnettu** siitä, että solulima-alue on poistettu.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen FSH-reseptori, **tunnettu**
10 siitä, että transmembraaninen alue on poistettu.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen FSH-reseptori, **tunnettu** siitä, että se käsittää sekvenssissä nro 2 esitetyn aminohapposekvenssin 1 - 349 tai sen oleellisen osan, jolla on oleellisesti samat FSH:ta sitovat ominaispiirteet.
- 15 5. Eristetty DNA ei-terapeutttiseen käyttöön, **tunnettu** siitä, että se koodittaa ihmis-FSH-reseptoria tai sen fragmenttia tai mutanttia, joka sitoo FSH:ta, ja että se käsittää sekvenssissä nro 1 esitetyn nukleotidisekvenssin.
- 20 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että nukleotidisekvenssi, joka koodittaa FSH-reseptorin solulima-aluetta, on poistettu.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että nukleotidisekvenssi, joka koodittaa FSH-reseptorin transmembraanista aluetta, on poistettu.
- 25 8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen eristetty DNA, **tunnettu** siitä, että se käsittää nukleotidisekvenssin, joka koodittaa sekvenssissä nro 2 esitettyä aminohapposekvenssiä 1 - 349 tai sen oleellista osaa, jolla on oleellisesti samat FSH:ta sitovat ominaispiirteet.

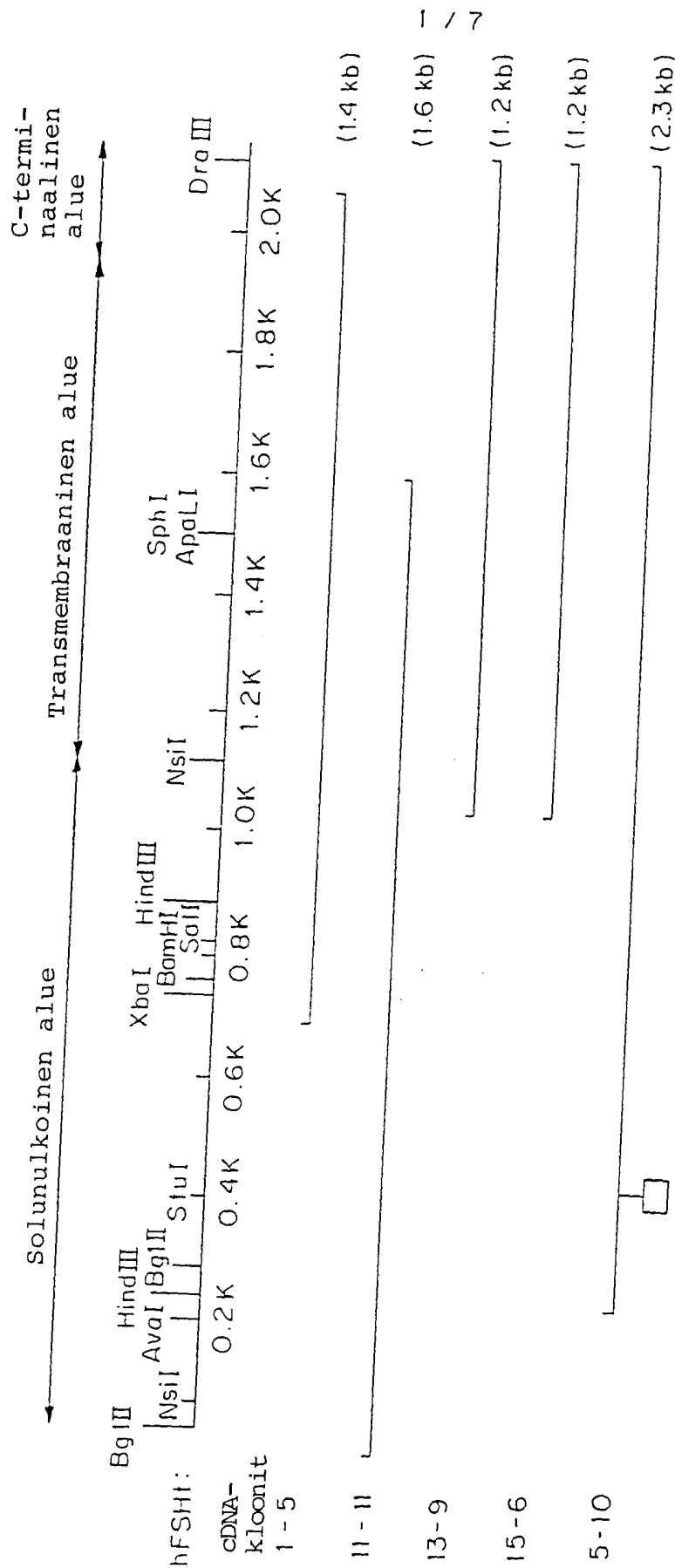
9. Yhdistelmä-DNA-ekspressiovektori, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 5, 6, 7 tai 8 mukaista DNA:ta.
10. Solu, **tunnettu** siitä, että se on transfektoitu patenttivaatimuksen 9 mukaisella ekspressiovektorilla.
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että se on nisäkässolu.
12. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen ihmis-FSH-reseptorin tai sen FSH:ta sitovan fragmentin tai mutantin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan patenttivaatimuksen 10 mukaista solua ravintoväliaineessa ja otetaan reseptori talteen siitä.
13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solu on nisäkässolu.
14. Koostumus ei-terapeuttiseen käyttöön, **tunnettu** siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaista ihmisen FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovaa fragmenttia tai mutanttia.
15. Parannus menetelmään ihmis-FSH:n määrittämiseksi FSH-reseptoria käyttämällä, **tunnettu** siitä, että mainittu FSH-reseptori on minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaista oleellisen puhdasta ihmis-FSH-reseptoria tai sen FSH:ta sitovaa fragmenttia tai mutanttia.
16. Menetelmä näytteen määrittämiseksi aineiden suhteen, joilla on FSH-bioaktiivisuutta, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan yhdistelmä-DNA-solulinjaa mainitun näytteen läsnä ollessa, kun mainittu yhdistelmä-DNA-solulinja soveltuu ekspressoimaan minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-4 mukaista ihmis-FSH-reseptoria ja tuottamaan mitattavan biologisen vasteen FSH:n läsnä ollessa, ja mitataan mikä hyvänsä tällainen biologinen vaste.

Patentkrav

1. Väsentligt ren human folikelstimulerande hormon(FSH)-receptor eller fragment eller mutant därav, för icke-terapeutiskt bruk, **kännetecknad** av att den binder FSH och att den
5 innefattar den i sekvens nr 2 presenterade aminosyrasekvensen 1 - 678.
2. FSH-receptor enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att cytosolområdet har avlägsnats.
3. FSH-receptor enligt patentkrav 2, **kännetecknad** av att det
10 transmembrana området har avlägsnats.
4. FSH-receptor enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den innefattar den i sekvens nr 2 presenterade aminosyrasekvensen 1 - 349 eller en väsentlig del därav, som har väsentligen samma FSH-bindande karakteristik.
- 15 5. Isolerat DNA för icke-terapeutiskt bruk, **kännetecknat** av att det kodar för human FSH-receptor eller fragment eller mutant därav som binder FSH, och att den innefattar den i sekvens nr 1 presenterade nukleotidsekvensen.
6. Isolerat DNA enligt patentkrav 5, **kännetecknat** av att
20 nukleotidsekvensen som kodar för FSH-receptorns cytosolområde har avlägsnats.
7. Isolerat DNA enligt patentkrav 6, **kännetecknat** av att nukleotidsekvensen som kodar för FSH-receptorns transmembrana område har avlägsnats.
- 25 8. Isolerat DNA enligt patentkrav 5, **kännetecknat** av att den innefattar en nukleotidsekvens som kodar för den i sekvens nr 2 presenterade aminosyrasekvensen 1 - 349 eller en väsentlig del därav, som har väsentligen samma FSH-bindande karakteristik.

9. Rekombinant-DNA-expressionsvektor, **kännetecknad** av att den innefattar DNA enligt patentkrav 5, 6, 7 eller 8.
10. Cell, **kännetecknad** av att den är transfekterad med en expressionsvektor enligt patentkrav 9.
- 5 11. Cell enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att den är en däggdjurscell.
12. Förfarande för framställning av en human FSH-receptor eller fragment eller mutant därav som binder FSH, enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att man odlar
10 en cell enligt patentkrav 10 i ett näringsmedium och tillvaratar receptorn ur detta.
13. Förfarande enligt patentkrav 12, **kännetecknat** av att cellen är en däggdjurscell.
14. Komposition för icke-terapeutiskt bruk, **kännetecknad** av
15 att den innefattar en human FSH-receptor eller fragment eller mutant därav som binder FSH, enligt vilket som helst av patentkraven 1-4.
15. Förbättring av förfarandet för bestämning av humant FSH medelst användning av en FSH-receptor, **kännetecknad** av att
20 nämnda FSH-receptor utgörs av en väsentligen ren human FSH-receptor eller fragment eller mutant därav som binder FSH, enligt vilket som helst av patentkraven 1-4.
16. Förfarande för att i ett prov bestämma det på ämnen vilka uppvisar FSH-bioaktivitet, **kännetecknat** av att man odlar
25 en rekombinant-DNA-cellinje i närvaro av nämnda prov, då nämnda rekombinant-DNA-cellinje lämpar sig till att uttrycka en human FSH-receptor enligt vilket som helst av patentkraven 1-4, och till att åstadkomma en omfattande biologisk respons i närvaro av FSH, och att man uppmäter vilken som helst sådan
30 biologisk respons.

FIG. 1



Kartta-avain:

(N.N kb) Inerttioiden koko agaroosigelelektroforeesilla arvioituna



0,25 kilomeksen insertio, luultavasti introni tai intronin osa

FIG. 2A

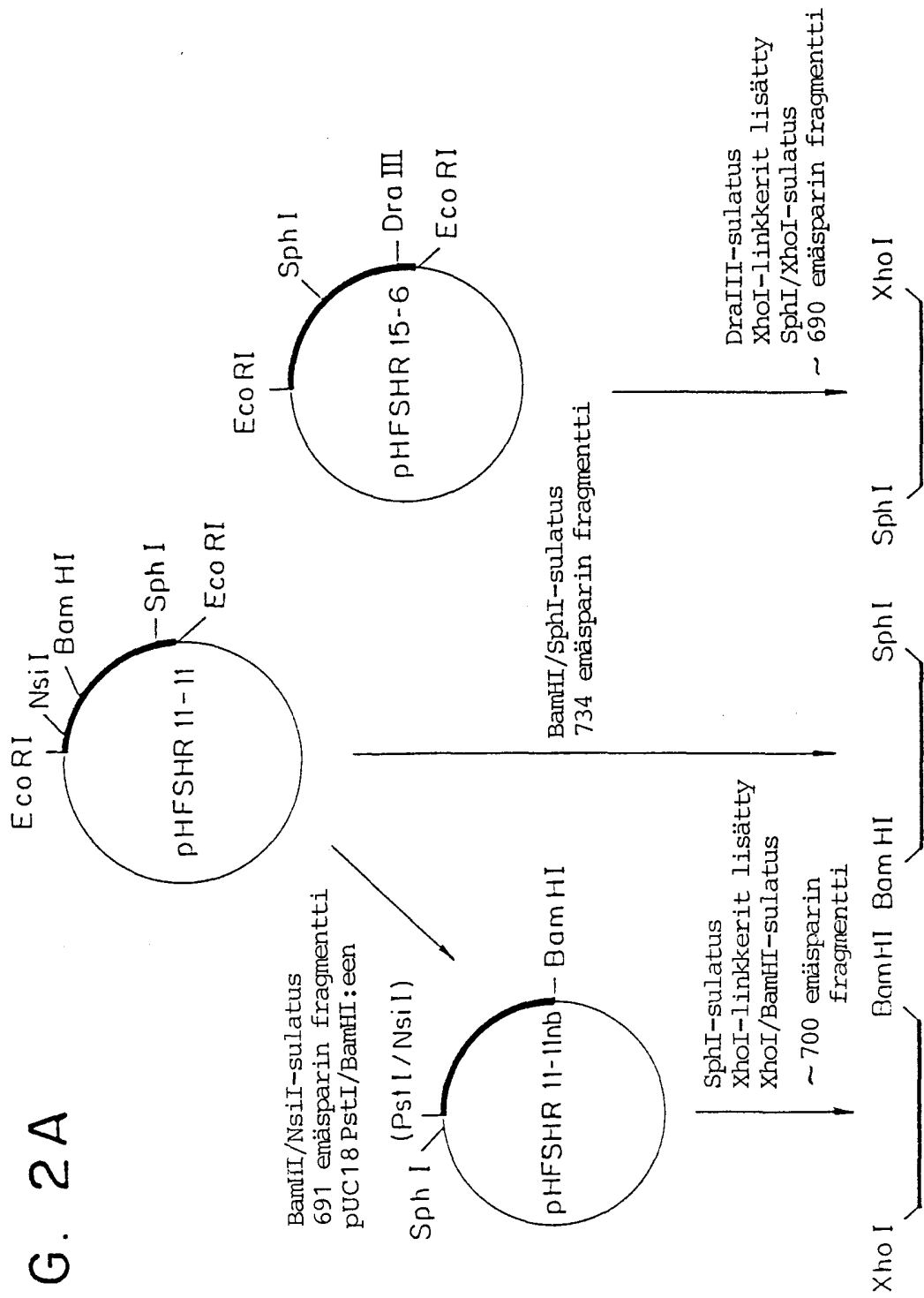


FIG. 2B

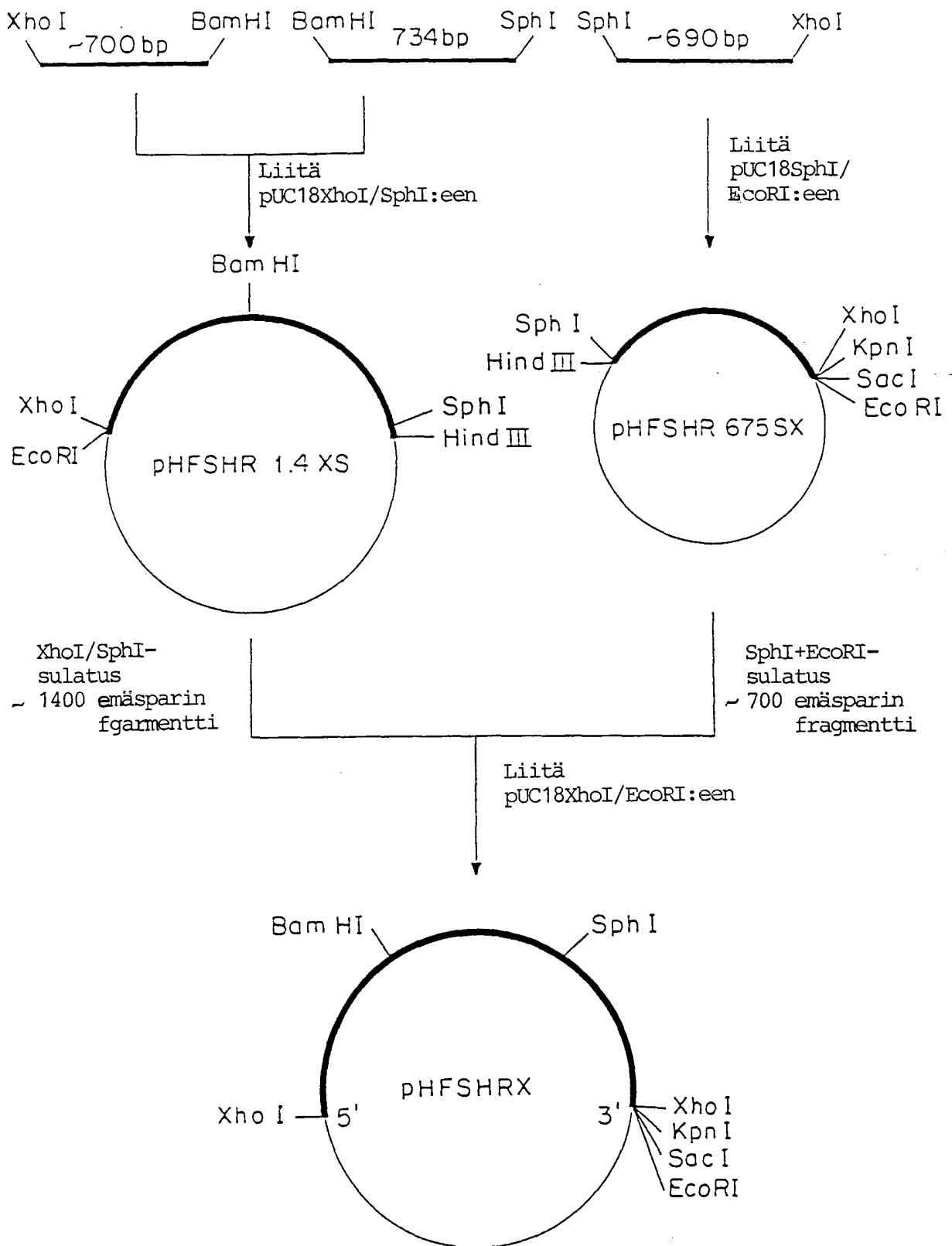


FIG. 3

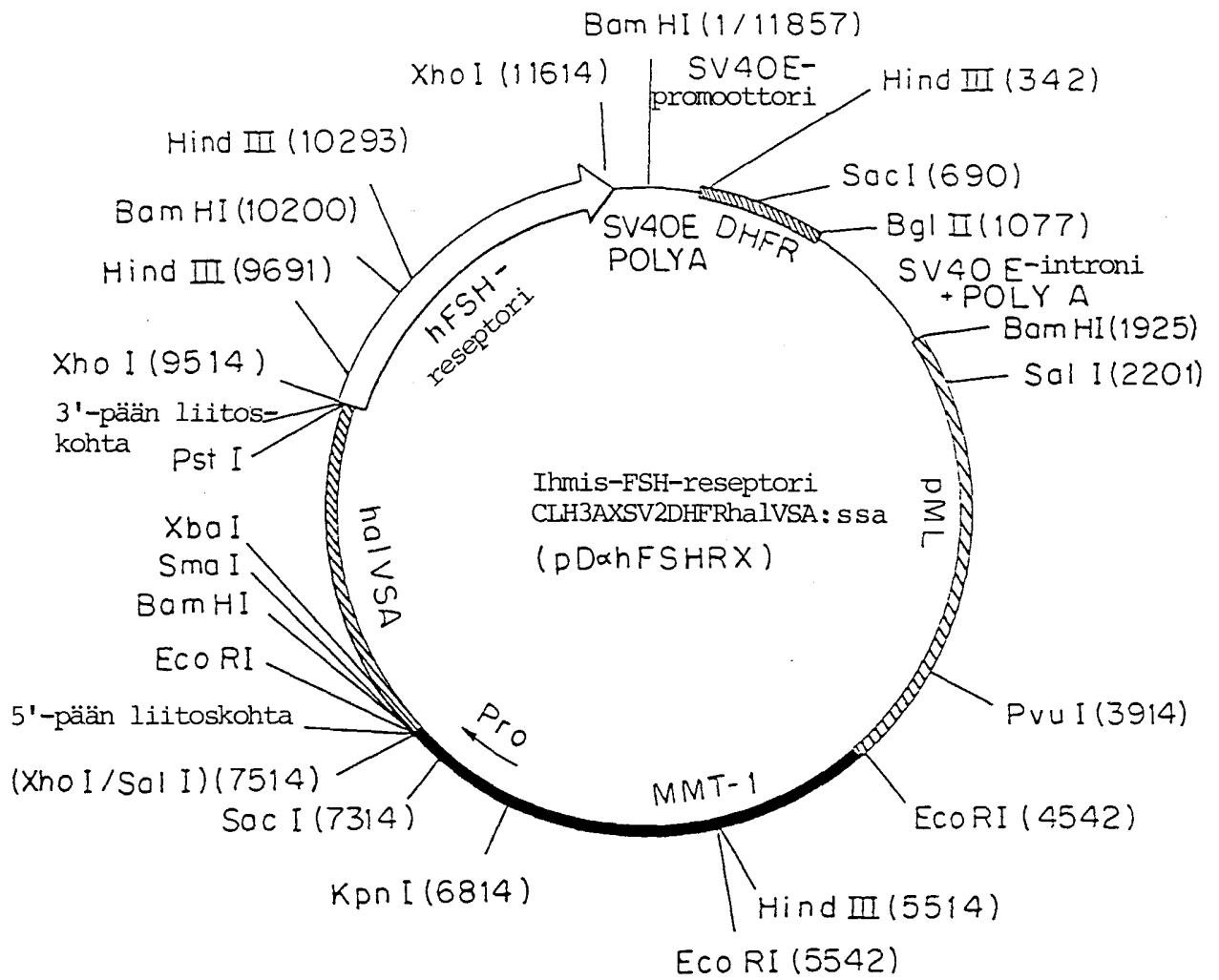
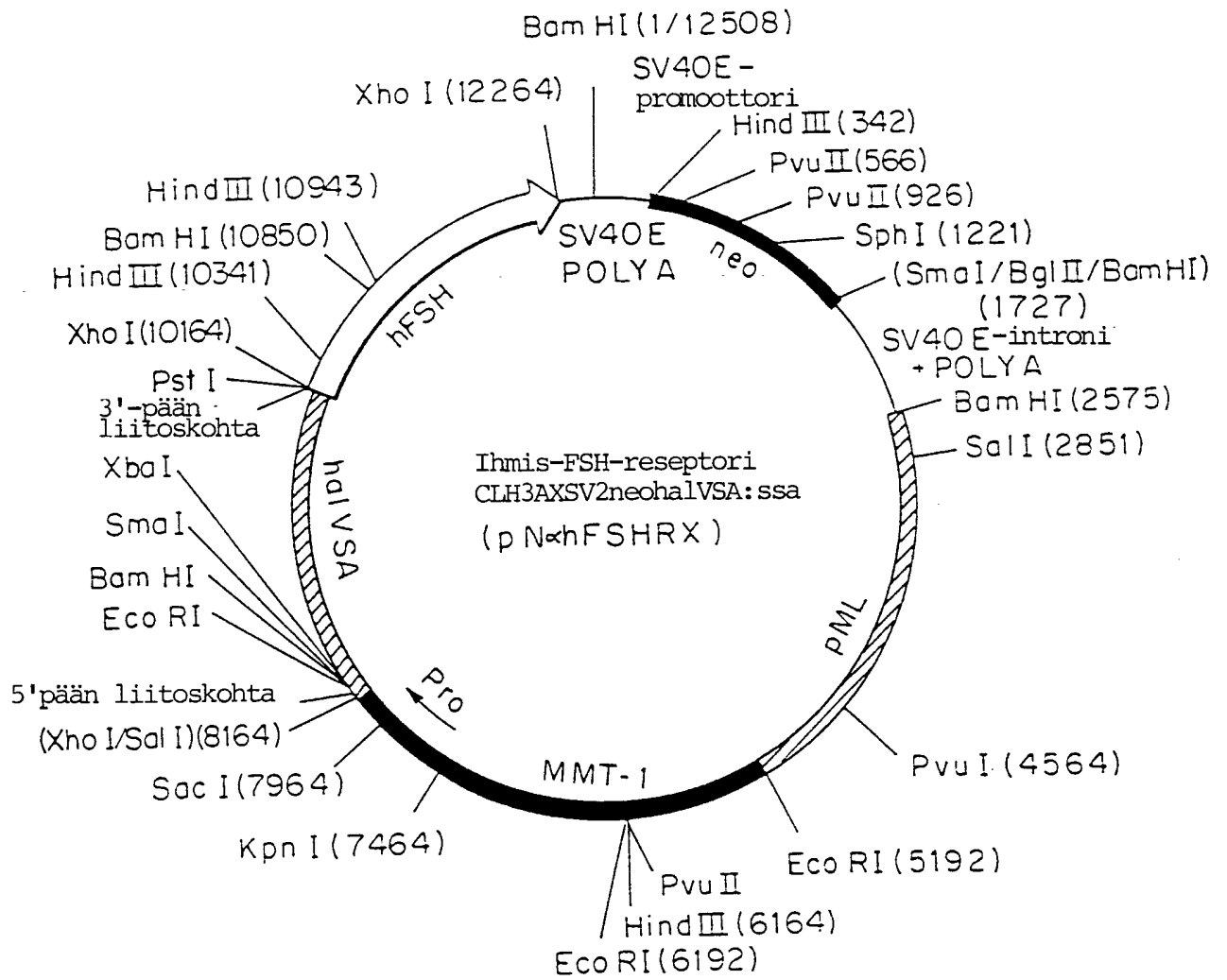
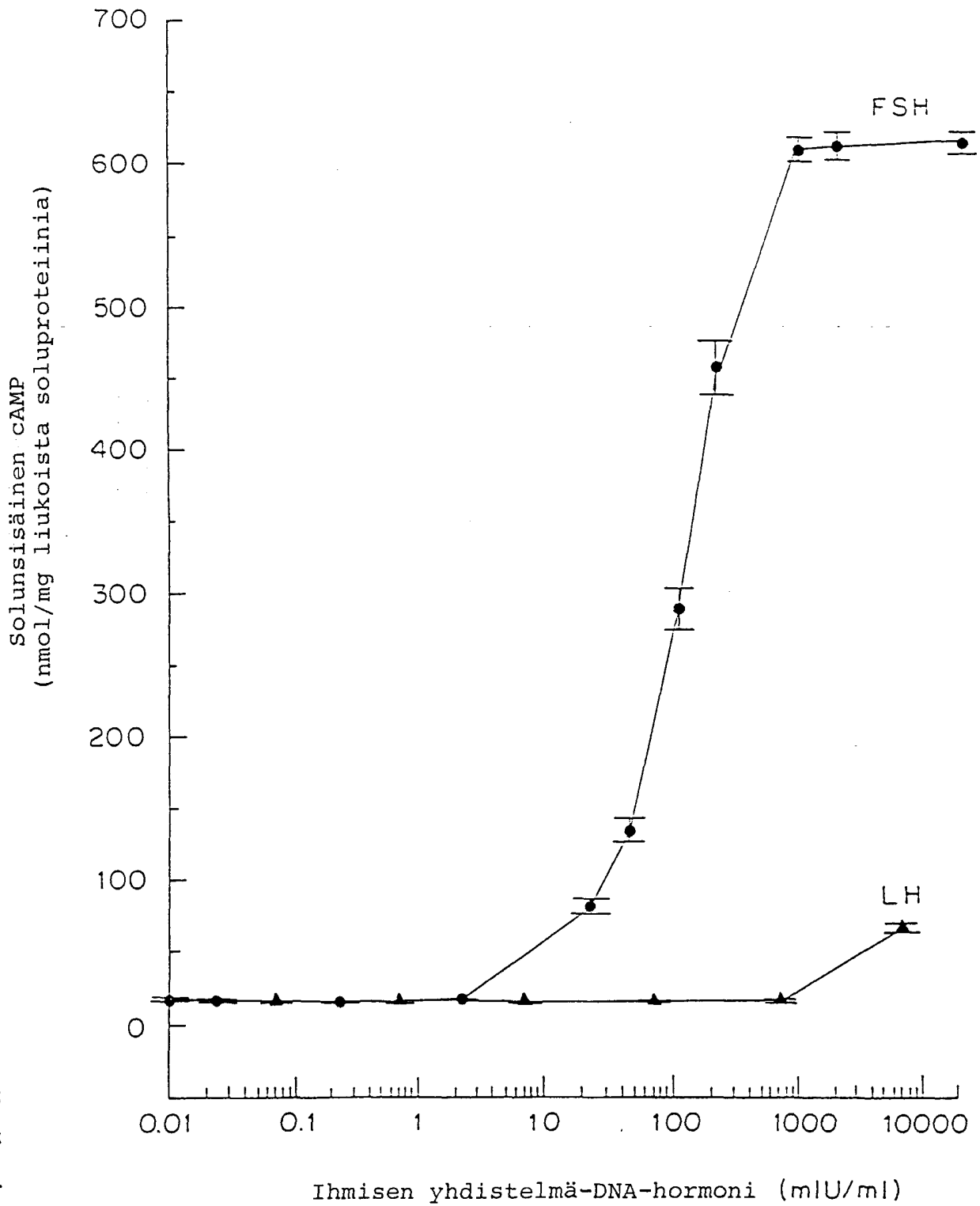


FIG. 4



6 / 7

FIG. 5



7 / 7

FIG. 6

