



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **178036**

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/62, 15/12, C 07 K 19/00, 14/435,
C 12 N 1/20

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	881942	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	04.05.88	søknadsnummer	
(24) Løpedag	04.05.88	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	07.11.88	(30) Prioritet	05.05.87, DE, 3714866
(44) Utlegningsdato	02.10.95		

(71) Patentsøker	Hoechst AG, D-65926 Frankfurt am Main, DE
(72) Oppfinner	Klaus-Peter Koller, Bad Soden am Taunus, DE Günther Johannes Riess, Frankfurt am Main, DE
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for fremstilling av fusjonsproteiner, genstruktur, vektorer streptomycetceller og fusjonsproteinene

(56) **Anførte publikasjoner** NO 880952

(57) **Sammendrag** Tendamistatgenet kan benyttes for konstruksjon av genfusjoner, og med disse fusjonsproteiner bli uttrykt og utskilt i streptomycet -vertceller. Tendamistatandelen kan bli modifisert, spesielt forkortet C-terminalt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av fusjonsproteiner, vektor, streptomycetceller og fusjonsproteinene.

5 I europeisk patentsøknad med offentlighetsnummer (EP-A) 0 161 629, henholdsvis i det sydafrikanske patentskrift 85/3672, er det kjent at man kan benytte tendamistatkodende DNA, for å få et polypeptid, spesielt tendamistat, til å bli skilt ut av streptomycetceller. Dette DNA kan tilslutt bli
10 utvunnet fra hver tendamistatproduserende stamme, fortrinnsvis blir et ifølge eksempel 3 i det tyske utlegningsskrift 3 331 860 inneholdende DNA, satt inn.

I patentsøknad 88 09 52 (angående den tyske patentmelding P
15 37 07 150.5 fra 6. mars 1987) ble det foreslått en fremgangsmåte for utskilling av fusjonsproteiner fra streptomyceter, som er kjennetegnet ved at den setter inn de kodende sekvensene for det ønskede proteinet i det eventuelt modifiserte tendamistatgenet og at det rekombinante genet
20 uttrykkes i en streptomycetcelle. Her blir altså tendamistatstrukturgenet benyttet som "bærer" for et annet gen, som medfører at man oppnår fusjonsproteiner, hvor en aminosyresekvens til et annet protein er innenfor tendamistatamino-syresekvensen. Ved kjemisk eller enzymatisk spalting av
25 disse fusjonsproteinene for å frigjøre de andre proteinene, får man dermed to delsekvenser av tendamistatene. Den tidligere ovenfornevnte søknaden vedrører også tendamistatderivater, som også kan innbefatte de som har tydelig forkortede aminosyrekjeder. Slike derivater kan reagere
30 reversibelt med den spesifikke reseptoren i form av en konkurrerende hemmemekanisme.

Det ble nå oppdaget at fremmede proteiner i streptomyceter også kan bli fremstilt ved at man konstruerer genet for
35 fusjonsproteinene på en slik måte at strukturgenet for det ønskede proteinet, ved 3'-enden (av den kodende tråden) av eventuelt modifiserte tendamistatgener, blir koblet.

Modifikasjon av tendamistatgenene kan spesielt innbefatte en forkorting av 3'-enden.

Tendamistatkodende DNA er gjengitt i EP-A 0 161 629 (i denne
5 som DNA-sekvens C og i tillegg som tabell 1). I dette
strukturgenet finnes det flere spaltningssteder for restriksjonsenzymmer som kan bli benyttet for å modifisere den kodede aminosyrerekkefølgen. Egnede spaltningssteder for BstEII er i området av triplettene 31 og 32, StuI i området til triplettene 43 og 44 og Sau3A i området til triplettene 52 og 53.
10 Ved innsetting av riktig linker kan man på disse stedene sette inn en eller flere aminosyrer i tillegg, og DNA-segmenter mellom disse spaltningssetene kan bli eliminert eller forkortede aminosyresekvenser kan bli kodet ved å sette
15 inn stoppkodoner. Man kan dermed sette inn bestemte aminosyrer, bytte ut eller eliminere noen ved bruk av setespesifikk mutagenese. Man tilveiebringer dermed proteiner, som utviser α -amylaseinhibitorvirkning, eller bare proteiner uten denne virkningen, som enda reagerer med den riktige reseptoren.

20 Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for fremstilling av følgende fusjonsproteiner bestående av tendamistat ifølge tabell 1 og proinsulin forbundet med en aminosyre-spacer,

25 (Asp1 til Gly43 fra tab. 1)-Pro-Ser-Leu-Gly-Leu44 til Leu 74 fra tab. 1)-proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK3a,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin-(Leu44 til Leu74);

30 kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK31,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK310,

35 (Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Asn-Phe-Ala-Arg-Proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK32,

(Asp1 til Leu74)-Phe-Asn-Ala-Met-Ala-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Proinsulin,

5 kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK400, kjennetegnet ved at man kobler strukturgenet for proinsulin C-terminalt til det eventuelt modifiserte tendamistatgenet ifølge tabell 1, tilveiebringer ekspresjon av denne genstrukturen i en streptomycet-vertscelle og isolerer det utskilte fusjonsproteinet fra supernatanten, og anvender dette for fremstilling av de eventuelt modifiserte tendamistat og/eller 10 fusjonspartnerne.

Genstruktur derav kjennetegnet ved at den innbefatter det eventuelt modifiserte tendamistat-genet, og at det C-terminalt er koblet et strukturgen for et proinsulin, er også 15 beskrevet.

Oppfinnelsen vedrører også en vektor som er kjennetegnet ved at den inneholder en genstruktur ifølge krav 3 eller 4 og er i stand til å uttrykke det gitte genet. Videre er en 20 streptomycetcelle som er kjennetegnet ved at den inneholder pTH1, pTF10, pTF2 og pGF1 og er i stand til å uttrykke det gitte genet, beskrevet. Oppfinnelsen vedrører også fusjonsproteiner som er kjennetegnet ved at de blir fremstilt ved hjelp av ovennevnte fremgangsmåte.

25 Foretrukne utføringer av oppfinnelsen vil i det følgende bli nærmere forklart og er i patentkravene definert.

I figurene 1 til 4 er noen plasmidkonstruksjoner ifølge 30 oppfinnelsen ført opp.

Fig. 1 viser fremstilling av hybridplasmidene pKK310, som koder for et fusjonsprotein, hvori en flerleddet sekvens på syv aminosyrer følger etter en del av aminosyresekvensen for 35 tendamistat og hvor aminosyresekvensen for ape-proinsulin følger deretter.

Fig. 2 viser overføring av plasmidene pKK310 til ekspresjonsplasmid pTF1.

Fig. 3 viser konstruksjonen av plasmidene pRS10, hvori polylinkeren til pUC18 følger etter en del av tendamistatgenene, og overføring av dette plasmidet til ekspresjonsplasmid pTF10. "mcs" betyr polylinkerregionen (multippelkloningssete) til pUC18.

Fig. 4 viser til slutt konstruksjonen av plasmidene pKK400, som koder for et fusjonsprotein, hvori en flerleddet sekvens bestående av 11 aminosyrer følger etter den samme aminosyresekvensen til tendamistat og hvor aminosyresekvensen til apeproinsulin følger deretter, og overføring av dette plasmidet til ekspresjonsplasmid pGF1.

Figurene er ikke tegnet i riktig målestokk.

Fordelene ifølge oppfinnelsen innbefatter at fusjonsproteinene som blir eksportert ut av cellen lett kan bli isolert ut av kulturfiltratet. Isoleringen kan bli utført ved bruk av kjent fremgangsmåte, fortrinnsvis ved adsorpsjons- eller ionebyttekromatografi og/eller gelfiltrering.

Frigjøring av de ønskede fremmede proteinene (fusjonspartnere) ved enzymatiske eller kjemiske spaltinger utføres ved bruk av kjente fremgangsmåter.

Innenfor dette fagområdet avhenger spaltingen av aminosyresekvensen til de ønskede proteinene. I mange tilfeller er det hensiktsmessig å sette inn et bindeledd, eventuelt en flerleddet sekvens, i spaltningssetet mellom tendamistatsekvensen og aminosyresekvensen til de ønskede proteinene. Når det ønskede proteinet f.eks. ikke inneholder metionin, kan bindeleddet inneholde met, hvorpå det er mulig å utføre en kjemisk spalting med klor eller bromcyan. Hvis det i bindeleddet er cystein i karboksyterminus eller hvis

bindeleddet står for cys, så kan man utføre en enzymatisk cysteinspesifikk spalting eller en kjemisk spalting, f.eks. etter spesifikk S-cyanylering. Hvis det i karboksyterminus til den flerleddede sekvensen står tryptofan, eller hvis
5 bindeleddet står for Trp, kan man utføre en kjemisk spalting med N-bromsuksinimid.

Ønskede proteiner som ikke inneholder Asp-Pro i aminosyre-sekvensen og som er tilstrekkelig syrestabile, kan som
10 fusjonsproteinet med denne flerleddede sekvensen bli spaltet proteolytisk ved bruk av kjente fremgangsmåter. På denne måten tilveiebringer man proteiner som inneholder henholdsvis N-terminal prolin eller C-terminal asparginsyre. På denne måten kan dermed også modifiserte proteiner bli fremstilt.

15 Asp-Pro-bindingen kan gjøres enda mere syrelabil når den flerleddede sekvensen (Asp)_n-Pro innbefatter henholdsvis Glu-(Asp)_n-Pro, hvor n er 1 til 3.

20 Forslag til enzymatisk spalting er også kjente, hvor modifiserte enzymer med forbedret spesifisitet kan bli satt inn (jfr. C.S. Craik et al., Science 228 (1985) 291-297). Hvis det ønskede eukariote peptidet er proinsulin så velger man en hensiktsmessig peptidsekvens som har en trypsin
25 avspaltbar aminosyre (Arg, Lys) festet til den N-terminale aminosyren (Phe) på proinsulin, f.eks. Ala-Ser-Met.

Innholder det ønskede proteinet ikke aminosyresekvensen

30 Ile-Glu-Gly-Arg,

kan fusjonsproteinet med den passende flerleddede sekvensen bli spaltet med faktor Xa (EP-A 0 025 190 og 0 161 973).

35 Isolering av spalteproduktet avhenger av egenskapene til disse proteinene. Med hensyn på isolering av tendamistat og

derivatene derav kan man henwise til den siterte litteraturen i det tyske utleggsskrift 3 331 860.

I de følgende eksemplene vil oppfinnelsen bli nærmere forklart. Hvis ikke noe annet er angitt, står prosentantvisningen for vekt.

Eksemplene blir forklart ved bruk av de samme tallene som på figurene. I figurene er ikke plasmidene og genfragmentene tegnet opp i riktig målestokk; spesielt er målestokken til polylinkersekvensene ikke riktige.

Eksempel 1

Som utgangsmateriale benyttes plasmid pKAI650, som er beskrevet i tysk utleggsskrift 3 536 182 og henholdsvis i EP-A 0 218 204. Dette plasmidet er også tilgjengelig ved det i det tyske utleggsskrift 3 331 860 beskrevne plasmid pKAI1 ved isolering av de 650 bp HincII-SstI-fragmentene og kloning i plasmid pUC19 som er åpnet med dette enzymet. I dette plasmid blir de enkeltvise HindIII-spaltingssetene fjernet (ved spaltning med dette enzymet, og utfylling av den overhengende enden og ligering) slik at plasmid pKAI650a (1) blir tilveiebragt.

2 µg DNA som er renset ved CsCl-gradientsentrifugering fra (1) blir fullstendig spaltet ifølge forhandlerne i løpet av 2 timer i en 50 µl reaksjonsoppløsning med StuI og enzymet blir fjernet ved fenolekstrahering. Linearisert DNA blir fjernet med etanol, igjen oppløst og tilsatt en ligeringsblanding, hvor man i tillegg tilsetter 0,1 µg reaksjonspartner av den kjemisk syntetiserte, 5'-ende fosforylerte, dobbelttrådede oligonukleotider (2)

HindIII

5'	C C C A A G C T T G G G	3'	(2)
3'	G G G T T C G A A C C C	5'	

Etter transformering av ligeringsblandingen i E.coli JM 109 blir slike kloner isolert, som inneholder det rekombinante plasmid pKK3a (3). Det isolerte plasmid-DNA er kjennetegnet ved et spaltingssete for restriksjonsenzymet HindIII, som dermed tillater karakterisering ved restriksjonsanalyse. pKK3a (3) er 12 basepar større enn pKAI650a (1) og tilveiebringer en nukleotidsekvens, hvorpå aminosyresekvensen som følger derav er utvidet med 4 aminosyrer:

10		42	43					(44)	
		Glu	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	
	5'	GAA	GG C	CCA	AGC	TTG	GG C	CTG	3'
	3'	CTT	CC G	GGT	TCG	AAC	CC G	GAC	5'

15

HindIII

Deretter tjener plasmid pYE24 som utgangsmateriale (4). Dette plasmidet blir tilveiebragt ved at vektor pUC8 blir åpnet med EcoRI og HindIII og at man i dette lineæriserte plasmidet ligerer inn ape-proinsulingenet (tabell 2; iflg. Wetekam et al., Gene 19 (1982) 179-183).

2 µg av plasmidene pYE24 (4) blir behandlet med restriksjonsenzymene EcoRI og HindIII, og ape-proinsulingenet blir isolert ved elektroeluering og blir etter rensing og konsentrering ved etanolfelling ligert med den syntetiske DNA-linken (5)

30	5'	AGC	TTG	ATG	GCG		3'	
	3'		AC	TAC	CGC	TTA A	5'	(5)
		(HindIII)				(EcoRI)		

Ligeringsprodukt (6) blir deretter satt inn i plasmid pKK3a (3) som er blitt åpnet med HindIII, hvorved plasmid pKK31 (7) blir tilveiebragt. Ved denne konstruksjonen blir under

35

	43								B 1
5	Gly	Pro	Ser	Leu	Met	Ala	Asn	Ser	Phe
	GGC	CCA	AGC	TTG	ATG	GCG	AAT	TCT	TTT
	CCG	GGT	TCG	<u>AAC</u>	TAC	<u>CGC</u>	<u>TTA</u>	<u>AGA</u>	AAA
		HindIII				EcoRI			

I plasmid (7) befinner proinsulinsekvensen seg innenfor tendamistatgenet. For å overføre dette plasmidet i et plasmid ifølge oppfinnelsen, blir (7) spaltet med SphI og SalI) og fragment (8) blir isolert. Vektor pUC19 blir åpnet med SphI og SalI og det lineæriserte plasmid blir med fragment (8) ligert. Det slik tilveiebragte plasmid pKK310 (9) koder for et fusjonsprotein, hvorpå bare proinsulinsekvensen følger etter den forkortede tendamistatsekvensen og den foranstående innsatte linker.

25 **Eksempel 2**

30 Ekspresjonsvektor pIJ702 (11) (som kan kjøpes fra John Innes
Foundation, Norwich, England) blir åpnet med SphI og SstI og
det lineæriserte plasmid (12) blir ligert med fragment (10).
Etter transformering av stammen streptomyces lividans TK 24
(John Innes Foundation) blir de ønskede klonene tilveiebragt
35 ved seleksjon for resistens til tiostrepton. Plasmid-DNA fra
tiostreptonresistente kloner blir isolert og verifisert ved
restriksjonsanalyse. Plasmid som har den ønskede orientering

av genene får betegnelsen pTF1 (13). Kloner, som inneholder dette rekombinante plasmidet utskiller et protein med en molekylvekt på 16 kD i kulturmediumet. Dette proteinet reagerer med insulin-antistoffer i "Immunoblot" positiv (jfr. eksempel 5).

Konstruksjonen av pTF1 (13) er beskrevet i figur 2.

Eksempel 3

Både plasmid pKK3a (3) på den ene siden og vektor pUC18 på den andre siden, blir begge åpnet med HindIII og deretter ligert sammen. E. coli-stamme JM 109 blir transformert med ligeringsblandingen, hvor de riktige koloniene i nærvær av isopropyl- β -tiogalaktopyranosid (IPTG) og 5-brom-4-klor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) tilveiebringer ufarvede kolonier. Det tilveiebragte rekombinante plasmid pRS1 (14) blir isolert ved bruk av kjente fremgangsmåter. Ved spaltning av 1 μ g av plasmidene med restriksjonsenzym SstI og etterfølgende religering blir pUC18-andelen helt til polylinkersekvensen (mcs) og likeledes resten av tendamistatgenene deletert. Man tilveiebringer plasmid pRS10 (15).

Plasmid (15) egner seg på grunn av polylinkerandelen for kloning av forskjellige strukturgener, hvorved plasmid blir tilveiebragt som koder for de passende fusjonsproteinene med den forkortede tendamistatsekvensen.

Hvis man spalter pRS10 (15) med SphI og SstI og isolerer det lille fragmentet, kan man ligere denne analog eksempel 2 i ekspresjonsvektor pIJ702. Man tilveiebringer dermed ekspresjonsvektor pTF10 (16), som på grunn av polylinkerandelene tillater mange forskjellige konstruksjoner.

Konstruksjon av pTF10 (16) er beskrevet i figur 3.

Eksempel 4

Man åpner plasmid pYE24 (4) med EcoRI og setter inn linker

```

5          5' AAT TCA AGC TTG          3'
          3'      GT TCG AAC TTA A    5'
          (EcoRI) Hind III (EcoRI)

```

og slik tilveiebringes plasmid pYE241. Ved spalting med HindIII og ligering med pKK3a (3) som er spaltet med HindIII tilveiebringer man analog som i eksempel 1 plasmid pKK32. Denne koder for et fusjonsprotein, hvor tendamistatsekvensen er knyttet til proinsulinsekvensen via den flerleddede sekvensen:

```

15      Gly  Pro  Ser  Leu  Asn  Phe  Ala  Arg
      GGC  CCA  AGC  TTG  AAT  TCT  GCA  AGA  TTT
      CCG  GGT  TCG  AAC  TTA  AGA  CGT  TCT  AAA

```

Analog til eksempel 1 blir pKK32 spaltet med SphI og SstI og det ca. 650 bp store fragmentet i pUC19, som også er åpnet med disse enzymene, blir klonet om. Det resulterende plasmid pKK320 (9) svarer til plasmid pKK310 (9) helt til den foranstående flerleddede sekvensen (da de ved den linkerinnførte sekvensen er skjøvet fremover ved "Fettdruck").

Analog til eksempel 2 blir SstI-SphI-fragmentet med det rekombinante genet fra pKK320 klonet om i pIJ702, hvorved ekspresjonsplasmid pTF2 blir tilveiebragt. I S. lividans TK 24 blir et 16 kd fusjonsprotein uttrykt og utskilt, som også reagerer med insulinantistoff (jfr. eksempel 5).

På grunn av likheten til konstruksjonen av pTF2 med pTF1 (13), figurene 1 og 2, har man ikke utført en tegnet beskrivelse.

Eksempel 5

pKK310 (9) blir delvis spaltet med EcoRI, slik at bare en av de to EcoRI-spaltesetene blir åpnet. Etter innfylling av den overhengende enden ved bruk av klenowpolymerase blir plasmidet religert og verifisert ved restriksjonsanalyse. Det ønskede plasmidet som har fått fjernet EcoRI-setet i enden av proinsulingenet har fått betegnelsen pKK310a (17). Denne inneholder dermed et enkelt restriksjonssete for EcoRI i linkregionen mellom det forkortede tendamistatgenet og proinsulingenet.

For å konstruere et plasmid som koder for et fusjonsprotein som inneholder hele sekvensen til tendamistat blir det ført inn et enkelt spaltesete for KpnI ved siden av kodonene for aminosyren 68/69 i den tendamistatkodende DNA-sekvensen (tabell 1). Deretter blir det isolerte DNA fra pKAI650 av (1) spaltet med Sst og SphI og det 650 bp store fragmentet blir klonet om i RF-DNA til fagen M13mp18 som nettopp er blitt spaltet med de to enzymene og enkelttrådet DNA blir fremstilt ved bruk av kjent fremgangsmåte. 1 µg av dette ssDNA blir satt inn sammen med 0,1 µg av mutagenet "Primere"

5' C GAG GTA CCG GGC GT 3'

ved "site directed mutagenesis" (M.J. Zoller u. J. Smith, Nucleic Acid Res. 10 (1982) 6487-6500).

Fra den isolerte M13-klonen med det muterte genet som lar seg selekttere gjennom det tilsatte KpnI-spaltesetet og baseutbyttingen (C mot G i den tredje posisjonen til kodonene for Arg⁶⁸) blir verifisert ved sekvensering. Nukleotidutbyttet medfører dermed ingen forandring av aminosyresekvensen, men fører inn det ønskede nye enkelte spaltesetet i tendamistatstrukturen.

12

66	67	68	69	70
His	Ala	Arg	Tyr	Leu
CAC	GCC	CGC	TAC	CTC
GTC	CGG	GCC	ATC	GAG

KpnI

Den muterte sekvensen blir ett SstI-SphI-spaltning fra M13mp18-RF-DNA i plasmid pUC19 omklonet, hvorved plasmid pKAI651 (18) blir tilveiebragt.

Som en kontroll blir det 650 bp SstI-SphI-innskuddet fra (18) tilsvarende eksempel 2 satt inn i plasmid pIJ702, hvorved plasmid pAX651 blir tilveiebragt. Etter transformasjon av disse plasmidene i streptomyces lividans TK 24 oppnår man samme ekspresjonsgrad for tendamistat som i plasmid pAX650 som inneholder uforandret tendamistatgen (tysk utleggsskrift 3 536 182, fig. 3).

For fremstilling av plasmider ifølge oppfinnelsen for et fusjonsprotein med hele aminosyresekvensen til tendamistat blir plasmid pKAI651 (18) spaltet med SphI og KpnI og det lille fragmentet med linker (19)

69	70	71	72	73	74	
(Tyr)Leu	Ala	Arg	Cys	Leu	Phe	Asn Ala Met Ala Thr Gly 3'
5'	CTC	GCT	CGC	TGC	CTT	TTC AAT GCG ATG GCG ACC GGG
3'	C	ATG	GAG	CGA	GCG	ACG ACG GAA AAG TTA CGC TAC CGG TGG CCC TTA A 5'
	(KpnI)					(EcoRI)

(19)

og med SphI og EcoRI åpent plasmid pKK310a (17) ligert.

E.coli JM 109 blir transformert med ligeringsblandingen, og plasmid-DNA blir isolert og riktig fusjon blir verifisert ved DNA-sekvensering. Plasmidet med den riktige sekvensen blir betegnet pKK400 (20).

Linker (19) koder ikke bare for resten av aminosyrene til tendamistat, men også for en del av en "Spacer" som skiller tendamistat og proinsulingenet fra hverandre og innbefatter også med 5'-enden til genene, se tabell 2 - kodonene for de følgende 11 aminosyrene:

Phe-Asn-Ala-Met-Ala-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg

Fusjonsproteinet inneholder dermed i denne "Spacer" blant andre aminosyrene metonin og arginin, som tillater spalting med halogencyan og henholdsvis trypsin.

Fra plasmid pKK400 (20) blir det etter dobbeltspalting med SstI og SphI det omtrent 1090 bp innskuddet isolert og DNA blir ligert med plasmid pIJ702 (12) som er blitt åpnet med de samme enzymene. Dette resulterer i plasmid pGF1 (21). Ligeringsblandingen blir transformert inn i *S. lividans* TK 24 og plasmid-DNA blir isolert ved tiostrepton-resistente transformanter som tyder på tendamistataktivitet. Alle positive kloner inneholder det 1090 bp store SstI-SphI-innskuddet fra pGF1.

Konstruksjonen av pGF1 (21) er fremstilt i figur 4.

Tendamistat-aktiviteten blir formidlet ved platetesten som er beskrevet i EP-A1 0 161 629 i eksempel 3 og likeledes i det tyske utleggsskrift 3 536 182, eksempel 2.

Ekspresjon av pGF1-kodede funksjonsproteiner kan vises ved bruk av kjente fremgangsmåter. Hvis man inkuberer den transformerte stammen *S. lividans* TK 24 fire dager ved 28°C i rørekolber og deretter avskiller mycelet fra kulturopløsningen ved sentrifugering, kan man bevise fusjonsprotein i den klare oppløsningen som følger:

10 til 100 µl oppløsning blir satt til 20 til 200 µl 15%-ig trikloreddiksyre, og det utfelte proteinet blir anrikt ved

sentrifugering, vasket og tatt opp i SDS-holdig probebuffer (U. Laemmli, Nature 227 (1970) 680-685). Etter 2 minutters inkubasjon ved 90°C adskilles proteinene ved elektroforese på en 10- til 17%-ig SDS-polyakrylamidgel. Ved å tilveiebringe et protein med molekylvekt på 19 kD, som dermed er i det ventede molekylvektsområdet for fusjonsproteinet bestående av tendamistat og proinsulin. Fusjonsproteinet reagerer både med antistoffer mot tendamistat og også med antistoffer mot insulin.

10

15

20

25

30

35

TABELL 1

DNA-sekvens (kodende kjede) og aminosyresekvensen til
tendamistat

5

5'-GAC ACC ACC GTC ⁵TCC GAG CCC GCA CCC ¹⁰TCC TGC GTG
NH₂-Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Ala Pro Ser Cys Val

10

ACG CTC ¹⁵TAC CAG AGC TGG CGG ²⁰TAC TCA CAG GCC GAC
Thr Leu Tyr Gln Ser Trp Arg Tyr Ser Gln Ala Asp

15

²⁵AAC GGC TGT GCC GAG ³⁰ACG GTG ACC GTG AAG ³⁵GTC GTC
Asn Gly Cys Ala Glu Thr Val Thr Val Lys Val Val

TAC GAG GAC ⁴⁰GAC ACC GAA GGC CTG ⁴⁵TGC TAC GCC GTC
Tyr Glu Asp Asp Thr Glu Gly Leu Cys Tyr Ala Val

20

GCA ⁵⁰CCG GGC CAG ATC ACC ⁵⁵ACC GTC GGC GAC GGC ⁶⁰TAC
Ala Pro Gly Gln Ile Thr Thr Val Gly Asp Gly Tyr

ATC GGC TCG CAC ⁶⁵GGC CAC GCG CGC TAC ⁷⁰CTG GCT CGC
Ile Gly Ser His Gly His Ala Arg Tyr Leu Ala Arg

25

TGC CTT TAG-3'
Cys Leu Stp

30

35

178036

16

TABELL 2

5' AAT TCT GCA AGA
3' GA CGT TCT
(Asn)Ser Ala Arg
(EcoRI)

B 1

TTT GTG AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCC CAC CTA GTG GAA GCT CTC
AAA CAC TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGG GTG GAT CAC CTT CGA GAG
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

TAC CTG GTG TGC GGG GAG CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC
ATG GAC CAC ACG CCC CTC GCT CCG AAG AAG ATG TGT GGG TTC TGG
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr

C 1

CGC CGG GAG GCA GAG GAC CCT CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC
GCG GCC CTC CGT CTC CTG GGA GTC CAC CCC GTC CAC CTC GAC CCG
Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly

GGG GGC CCT GGC GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCG CTG GAG GGG
CCC CCG GGA CCG CGT CCG TCG GAC GTC GGG AAC CGC GAC CTC CCC
Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly

A 1

TCC CTG CAG AAG CGC GGC ATC GTG GAG CAG TGC TGC ACC AGC ATC
AGG GAC GTC TTC GCG CCG TAG CAC CTC GTC ACG ACG/TGG TCG TAG
Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile

TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TAA TAG TCG ACC
ACG AGG GAG ATG GTC GAC CTC TTG ATG ACG TTG ATT ATC AGC TGG
Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

Sall

TGC AGC CA 3'
ACG TCG GTT CGA 5'
PstI (HindIII)

B 1, C 1 og A 1 betegner begynnelsen på B-, C- og A-kjeden til apeproinsulin.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av følgende fusjonsproteiner
bestående av tendamistat ifølge tabell 1 og proinsulin
forbundet med en aminosyre-spacer,

(Asp1 til Gly43 fra tab. 1)-Pro-Ser-Leu-Gly-Leu44 til Leu 74
fra tab. 1)-proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK3a,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin-
(Leu44 til Leu74);

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK31,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK310,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Asn-Phe-Ala-Arg-Proinsulin;

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK32,

(Asp1 til Leu74)-Phe-Asn-Ala-Met-Ala-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-
Proinsulin,

kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK400, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at man kobler struktorgenet for
proinsulin C-terminalt til det eventuelt modifiserte
tendamistatgenet ifølge tabell 1, tilveiebringer ekspresjon
av denne genstrukturen i en streptomycet-vertscelle og
isolerer det utskilte fusjonsproteinet fra supernatanten, og
anvender dette for fremstilling av de eventuelt modifiserte
tendamistat og/eller fusjonspartnerne.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at tendamistat-genet er forkortet ved 3'-enden.

3.

Genstruktur ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den innbefatter det eventuelt modifiserte tendami-
stat-genet, og at det C-terminalt er koblet et struktorgen
5 for et proinsulin.

4.

Genstruktur ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t
v e d at tendamistatgenet er forkortet ved 3'-enden.

5.

Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inne-
holder en genstruktur ifølge krav 3 eller 4 og er i stand til
å uttrykke det gitte genet.

6.

Streptomycetcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at
den inneholder pTH1, pTF10, pTF2 og pGF1 og er i stand til å
uttrykke det gitte genet.

7.

Fusjonsprotein, bestående av tendamistat ifølge tabell 1 og
proinsulin forbundet med en aminosyre-spacer,
(Asp1 til Gly43 fra tab. 1)-Pro-Ser-Leu-Gly-Leu44 til Leu 74
25 fra tab. 1)-proinsulin;
kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK3a,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin-
(Leu44 til Leu74);

30 kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK31,

(Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Met-Ala-Asn-Ser-Proinsulin;
kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK310,

35 (Asp1 til Gly43)-Pro-Ser-Leu-Asn-Phe-Ala-Arg-Proinsulin;
kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK32,

(Asp1 til Leu74)-Phe-Asn-Ala-Met-Ala-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Proinsulin,

5 kodet av gensekvens inneholdt i plasmid pKK400, k a r a k-
t e r i s e r t v e d at de blir fremstilt ved hjelp av
en fremgangsmåte ifølge krav 1.

10

15

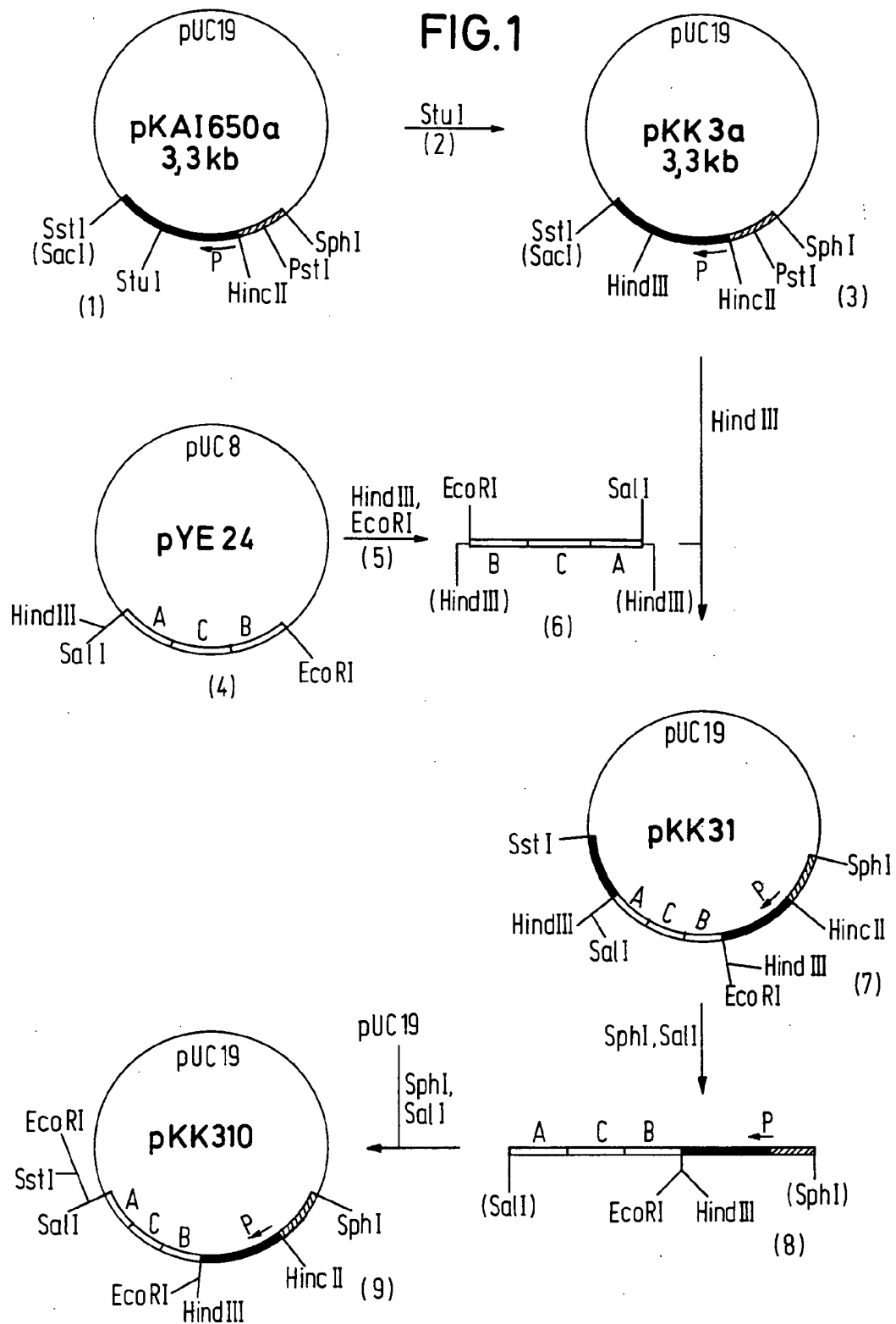
20

25

30

35

FIG. 1



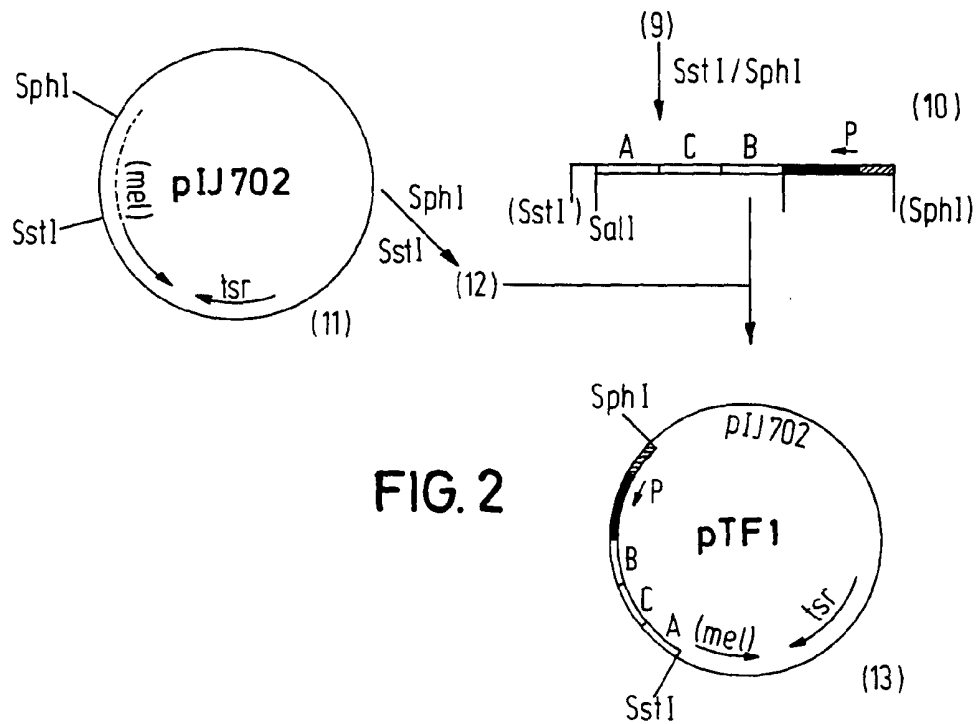


FIG. 2

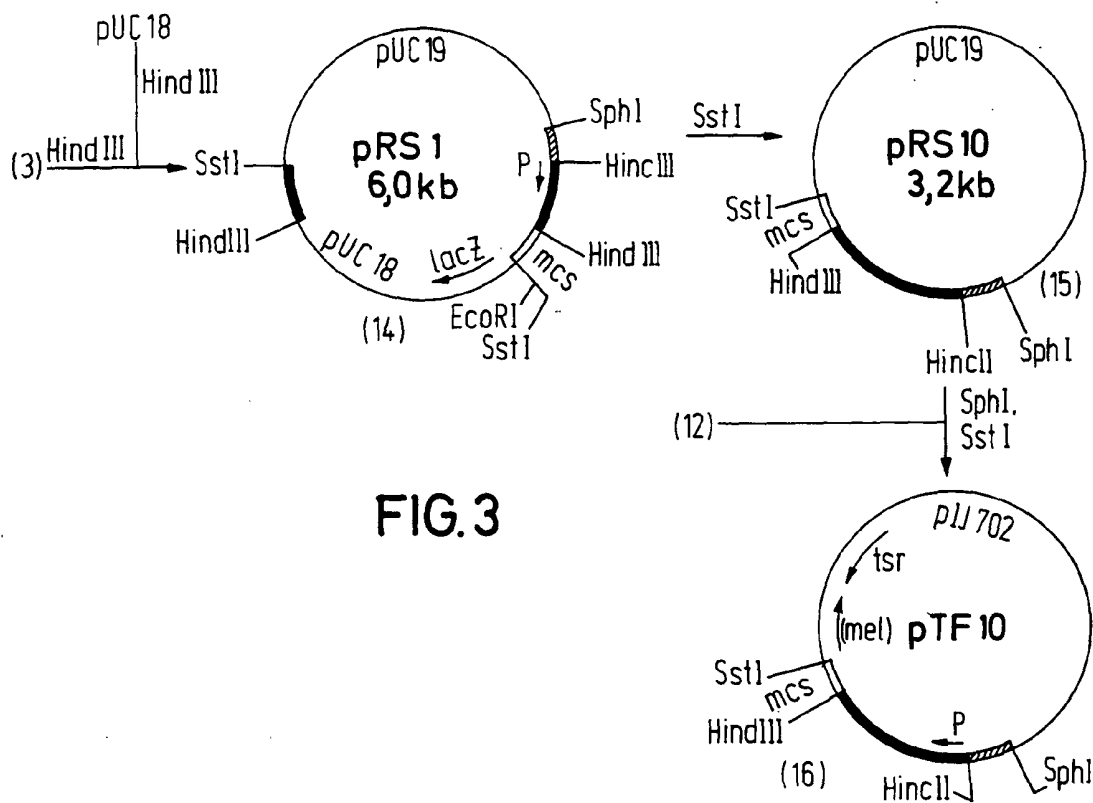


FIG. 3

FIG. 4

