



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: 3723/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 11. 29.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/621,656 1990. 11. 30. US

(40) A közzététel napja: 1993. 04. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1999. 03. 29.

(11) Lajstromszám:

215 947 B

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/18

C 07 K 14/00

(72) Feltalálók:

Chaleff, Deborah Tardy, Mercer, New Jersey (US)
Fischer, Meir, Rehovot (IL)
Lebens, Michael Richard, Jeruzsálem (IL)

(73) Szabadalmasok:

American Cyanamid Co., Stamford, Connecticut
(US)
Bio-Technology General Co., New York, New
York (US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) Eljárás alfa-hélix 1, vagy alfa-hélix 1 és alfa-hélix 3 régiójukban módosított szomatotropinok előállítására

KIVONAT

A találmány szerinti helyirányított mutagén eljárással előállított szomatotropin-analógok a natív szomatotropin α -hélix 1 régiójában kettős mutációt tartalmaznak, vagy az α -hélix 1 régió kívül az α -hélix 3 régióban is tartalmaznak egyszeres mutációt, és kívánt esetben a

natív aminosavszekvencia egyéb részében is tartalmaznak megváltozott aminosavakat. A kapott analógok stabilak, így nyújtott hatású készítményekben alkalmazhatók, ugyanakkor megtartják a natív szomatotropin biológiai aktivitását.

A találmány olyan új szomatotropin-analógok előállítására vonatkozik, amelyek csak α -hélix 1 régiójukban vagy α -hélix 3 régiójukban is más aminosav(ak)at tartalmaznak, mint a természetes szomatotropinok.

Exogén szomatotropin-adagolással különféle állatfajták, különösen a haszonállatok, például sertés, de bizonyos halfajták fejlődése is jelentősen fokozható. Az állatállomány e fokozott fejlődését rendszerint az izomtömeg-gyarapodás fokozódása jellemzi, a zsír egyidejű csökkenésével, amelynek következtében az állatok nagyobbak és soványabbak lesznek. Az exogén szomatotropinnal kezelt állatok takarmányhasznosítása is jelentősen fokozódik, ami a tömeggyarapodás növekedéséből és ezzel egyidejűleg a takarmányfogyasztás csökkenéséből adódik.

A szomatotropin exogén adagolása különféle módokon valósítható meg, például naponta injekciózással. Bizonyos esetekben azonban másféle adagolási módok előnyösek. Bizonyos állatok kezelésére célszerű lehet például egy beültetett eszköz, amely meghatározott időtartamon keresztül biztosítja a szomatotropin nyújtott felszabadulását. Az adagolás még előnyösebb módja olyan implantált eszközzel valósítható meg, amely meghatározott időtartamon keresztül nyújt lassú hatóanyag-felszabadulást. Az ilyen eszköz igen nagy mennyiségű szomatotropint tartalmazhat, igen nagy koncentrációban (mintegy 500 mg/ml). Az ilyen adagolási módhoz olyan szomatotropin-molekula szükséges, amelynek nagy az oldhatósága, és kevésbé hajlamos oldhatatlan, biológiai-lag inaktív aggregátumok képzésére.

A szomatotropinok négy α -hélixet tartalmaznak, amelyek együtt α -hélixköteget alkotnak. Ezek aminosavszekvenciáit is ismertették különböző fajok esetén [Abdel-Meguid és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6434–6437 (1987)]. A feltételezések szerint a fenti szerkezet magjában lévő aminosav-oldalláncok apolárosak, hidrofóbok és tömör elrendeződésűek, ezáltal megakadályozzák egy poláros oldószer (például víz vagy sóoldat) bejutását a köteg közepébe. A marha-szomatotropin esetében – amely elsődleges szekvenciáját tekintve a sertés-szomatotropinhoz hasonló – az α -hélix 3 hidrofób felületét (tyr₁₁₀–leu₁₂₇ aminosavmaradékok) 1 mg/ml-t meghaladó proteinkoncentrációnak kitéve előtérbe kerül az „asszociatív intermedierek” kialakulása, amely az aggregátumképződésben feltételezetten a magkialakulásnak egyik lépése [Brems és munkatársai, Biochemistry 25, 6539–6543 (1986); és Brems, Biochemistry 27, 4541–4546 (1988)]. Ezek az asszociatív intermedierek az egyes szomatotropin molekulákból származó α -hélixek multimer szerkezetet eredményező réteges burkolat elrendeződését képviselhetik, amelyben a fenti hélix hidrofób felületei a vizes környezettől elzárnak. Az asszociatív intermedierek kialakulása α -hélix 3-tartalmú proteinfragmens feleslegének hozzáadásával megakadályozható [Brems és munkatársai, Biochemistry 25, 6539–6543 (1986)]. Továbbá, a fenti hélix hidrofób felületének növelése a 112-es helyzetű lizin leucinra való cseréjével erősen fokozza az asszociatív intermedierek kialakulásának tendenciáját [Brems, Biochemistry 27, 4541–4546 (1988)].

A találmány célja a natív szomatotropinnal jobban oldódó szomatotropinok előállítása volt, amelyek ugyanakkor oldatban stabilak, tehát nyújtott hatású készítményekben biológiai aktivitásukat megtartják. A kitűzött feladatot a találmány értelmében az α -hélix 1 régióban végrehajtott helyirányított mutációval oldottuk meg.

Az α -hélix 1 régióba bevezetett mutációk mellett kívánt esetben az α -hélix 3 régióba is bevezethetünk helyirányított mutációt, hogy oldatban in vitro stabilabb szomatotropinokat nyerjünk. A mutagenézis helye mind a hidrofób, mind a hidrofil felület lehet. Ismert ugyanis, hogy a marha-szomatotropin α -hélix 3 régiójában újabban végrehajtott helyirányított mutációk a mutáns szomatotropint expresszáló transzgén egerek növekedésgátlását eredményezték, amiből arra lehet következtetni, hogy az α -hélix 3 régió a biológiai aktivitás szempontjából fontos régió [Chen W. Y. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5061–5065 (1990)].

Ezenkívül kívánt esetben az α -hélix 1 régióban vagy az α -hélix 1 és α -hélix 3 régióban létrehozott mutációkat további mutációval kombinálhatjuk úgy, hogy a szomatotropin kis hurokjában lévő kettő, és nagy hurokjában lévő kettő, összesen négy ciszteinmaradék közül legalább egyet más aminosavmaradékkal helyettesítünk. Például a 183. és 191. helyzetű ciszteineket kódoló kodonok kettős mutációját hajtjuk végre, amikor is a cisztein kodonját az alanin vagy glutaminsav kodonjával helyettesítjük, hogy a kitűzött célnak megfelelő, azaz jobban oldódó, oldatban stabilabb, tehát nyújtott hatású készítményekben jobban alkalmazható sertés-szomatotropint nyerjünk. A 183. és 191. helyzetben végrehajtott kettős mutációkat ismerteti az EP 355 460 számú szabadalmi leírás. Az itt ismertetett mutációk alkalmazásával fokozott oldhatóságú (stabilitású) szomatotropinok állíthatók elő, amelyek ezáltal a nyújtott hatóanyag-felszabadulás szempontjából jobb tulajdonságokkal rendelkeznek. A sertés-szomatotropin különösen hasznos nyújtott hatóanyag-felszabadulást biztosító formában, ezért ez a szomatotropin áll az érdeklődés középpontjában.

A találmány szerinti mutációk különösen hasznos példája az I122L mutáció, amelyben az α -hélix 122. helyzetében lévő izoleucint leucinnal helyettesítjük. A 183. és 191. helyzetben végrehajtott mutációkkal kombinálva, amikor is a ciszteineket alaninnal helyettesítjük, jelentős növekedést érünk el a protein egyetlen triptofánmaradékának átmeneti hőmérsékletében. Az átmeneti hőmérséklet a protein hőstabilitásának mértéke. Az egyik legelőnyösebb mutációval fokozott oldatstabilitást érünk el akkor, ha az I122L mutációt olyan mutációkkal kombináljuk, amikor a ciszteinkodonokat a 183. és 191. helyzetben glutaminsav-kodonokkal helyettesítjük. Egy másik előnyös mutációval úgy érünk el fokozott oldatstabilitást, hogy az α -hélix 1-ben végrehajtott kettős A6TS11R vagy P8TS11R kettős mutációt olyan mutációkkal kombináljuk, amelyekben az aminosavszekvencia 183. és 191. helyzetében lévő ciszteinmaradékok kodonjait glutaminsav-kodonokra cseréljük.

Az ábrákat az alábbiakban ismertetjük.

1. ábra: Rekombináns sertés-szomatotropin (rpST) DNS restrikciós térképe

A széles, megszakítás nélküli vonal a rpST DNS aminosav kódoló régióját jelenti; a keskeny vonal jelenti az 5'- és 3'-végen a nem kódoló DNS-szekvenciát. A helyirányított mutagenézisnek alávetett rpST-gén régiókat beszámoltuk és megjelöltük a restrikciós térképen, 1 jelenti az α -hélix 1-et kódoló DNS-t, 2 az α -hélix 2-t kódoló DNS-t, 3 az α -hélix 3-at kódoló DNS-t és 4 a 183. és 191. helyzetben (kis hurokban) lévő ciszteint kódoló DNS-t. A térkép feletti betűk jelölik a különféle restrikciós endonukleázok hasítási helyeinek elhelyezkedését,

RI jelentése EcoRI, N jelentése NdeI,
B jelentése BssHII, S jelentése SacI,
X jelentése XbaI, Sm jelentése SmaI és
H jelentése HindIII.

2. ábra: pEFF-902 plazmid szerkezete és restrikciós térképe

Ez a plazmid tartalmazza a pBR322 replikációs origót (Ori) és ampicillinrezisztencia gént, P_L promotert, a lambda-bakteriofágból a cII riboszóma-kötőhelyet és a cI represszorgént, az *E. coli* *rrnB* operonból a T_1T_2 transzkripció terminátort, egy 60 bázispárból álló, promoterek nélküli szekvenciát a *deo* regulátor régióból és az rpST gént, amelynek rövidítése pGH. A megfelelő restrikciós helyeket megjelöltük. Az rpST-t tartalmazó DNS-t ebből a plazmidból vágjuk ki EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel végzett kezeléssel, és pGEM3z (f+) mutagén vektorba klónozzuk az alábbiakban ismertetett módon.

3. ábra: pGHGEM3Z szerkezete és részleges restrikciós térképe

Ez a fagmid tartalmazza az f1 DNS replikációs origót, a pBR322 replikációs origót (Ori) és ampicillinrezisztencia gént, az SP6 és T7 promotereket, a lambda-bakteriofágból a lacZ gén cII riboszóma-kötőhelyet és az rpST gént, amelynek rövidítése rpGH. Egyszálú fagmid DNS-t alkalmazunk templátként a helyirányított mutagenézisben az alábbiakban ismertetett módon.

4. ábra: pROpST bakteriális expressziós vektor alkalmazása rekombináns sertés-szomatotropinok előállítására baktériumokban (*E. coli*)

A cII riboszóma-kötőhely az EcoRI és NdeI restrikciós helyek között helyezkedik el. Az rpST translációs iniciálódó kodonja az NdeI helybe van beágyazva. Az expressziót a P_L promotor segíti elő.

5. ábra: YEp352-pST-I122L élesztő expressziós plazmid szerkezete

Ez a plazmid a YEp352 származéka, és az I122L mutációt tartalmazza, amelynek expresszióját a *S. cerevisiae*-ből származó, indukálható GAL1/GAL10 promotor segíti elő. A 3' nem transzlatált DNS az élesztő STE génből származik.

A 2 μ m-es elem segíti a plazmidreplikációt élesztőben, és az URA3 szelektív markert szolgáltat a transzformáns kiválasztására élesztőben. A plazmid tartalmazza a pBR322 replikációs origót (nincs bejelölve), és az ampicillinrezisztencia gént is.

6. ábra: Rekombináns sertés-szomatotropin aminosav-szekvenciája és a kódoló DNS-szekvencia.

A találmány tárgya tehát eljárás a sertésszomatotropin-molekula α -hélix 1 régiójában kettős mutációt és kívánt esetben α -hélix 3 régiójában egyes mutációt tartalmazó szomatotropinok előállítására. A találmány szerinti eljárással előállított sertés-szomatotropin stabilabb (oldhatóbb), mint a szomatotropin natív formája, és biológiai aktivitását megtartja, ha a szomatotropint nyújtott hatóanyag-leadású készítménnyé alakítjuk. A találmány szerinti eljárással előállított szomatotropin előnyösen sertés-szomatotropin, de lehet humán-, marha-, juh-, kecske-, ló-, hal- és szárnyas-szomatotropin is. Szomatotropin alatt minden olyan szomatotropint értünk, amely a natív szomatotropin-molekula egyéb részeiben aminosavdeléciót, -addíciót vagy -cserét tartalmaz. Ilyenek például a módosított (szubsztituált vagy eliminált ciszteinek) vagy derivatizált szomatotropinok, amelyekben a ciszteinmaradékok közül 1–4 az alábbi aminosavakból származó maradék(ok)kal van(nak) helyettesítve: arginin, lizin, aszparaginsav, glutaminsav, aszparagin, glutamin, hisztidin, alanin, glicin, izoleucin, leucin, valin, fenilalanin, triptofán, tirozin, metionin, szerin, treonin vagy prolin; vagy amelyekben mind a négy cisztein ciszteinsavvá van alakítva.

A találmány egyik célja tehát olyan új szomatotropinok előállítása volt, amelyek oldhatóbbak, mint a molekula natív formája, és így biológiailag hatásosak, ha gyógyászati készítménnyé, előnyösen nyújtott hatóanyag-leadású készítménnyé alakítjuk. A fenti célokat önmagában ismert helyirányított mutációs technikák alkalmazásával oldottuk meg. A találmány fenti és további céljai a leírás következő részeiből világosan kitűnnek.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott plazmidok, DNS-szekvenciák és mikroorganizmusok az American Cyanamid Company törzsgyűjteményében (Princeton, New Jersey), és a Budapesti Szerződés értelmében az American Type Culture Collection-ben (ATCC) (Rockville, Maryland 20952, USA) is letétbe vannak helyezve, ha azt másként nem jelezzük.

Az alábbi DNS-eket 1988. augusztus 23-án helyeztük letétbe az ATCC-ben: pGEMpST-SX (ATCC 40482), pRO211 (ATCC 40483) és pEFF-902 (ATCC 40484). Szakemberek számára nyilvánvaló, hogy ezek a DNS-ek bármely megfelelő expressziós rendszerbe beépíthetők a találmány szerinti szomatotropinok vagy mutánsaik előállítására.

A találmány szerinti új állati szomatotropinok egy részét expresszáló *E. coli* K12 baktériumtörzseket szintén 1988. augusztus 23-án helyeztük letétbe az ATCC-ben. Ezek a baktériumtörzsek az alábbiak: *E. coli* 1655 (ATCC 67762), 1655/pROpSTA34 (ATCC 67763) 1655/pROpSTE34 (ATCC 67764) k655/pROpST (ATCC 67765), 4200 (ATCC 67766), 4200/pROpSTA34

(ATCC 67767), 4200/pOpSTE34 (ATCC 67768), 420/pOpST (ATCC 67769), 4255 (ATCC 67770), 4255/pOpSTA34 (ATCC 67771), 4255/pOpSTE34 (ATCC 67772), 4255/pOpST (ATCC 67773) és 4300 (ATCC 67774).

Az alábbi *E. coli* K12 törzseket szintén letétbe helyeztük az ATCC-nél 1990. szeptember 21-én: pOpST-SXE-Q21HH22R (ATCC 68410), pOpST-SXE-G121A (ATCC 68411), pOpST-SXE-A6TS11R (ATCC 68412), pOpST-SXA-S81, 87L+I122L (ATCC 68413), pOpST-SXA-S81, 87L (ATCC 68414), pOpST-SXA-L82, 84Q+L115K (ATCC 68415), pOpST-SXA-L82, 84Q (ATCC 68416), pOpST-SXE-I122L (ATCC 68417), pOpST-SXE-I122L (ATCC 68418), pST-SX (ATCC 68419), pOpST-SXA-L118E (ATCC 68420), pOpST-SXA-E119LQ123L (ATCC 68421), pOpST-SXA-I122E (ATCC 68422), pOpST-SXA-M126A (ATCC 68423) és pOpST-SXE-A6TS11R+I122L (ATCC 68424).

A találmány szerinti eljárásban az állati szomatotropinokat helyirányított mutagenézissel állítjuk elő, de más módon is előállíthatjuk ezeket, például a peptidek és/vagy proteinek kémiai szintézisével. A DNS klónozott szegmensében lévő DNS-szekvencia megváltoztatásához egy meghatározott helyen a jelenleg alkalmazott technikák szerint elő kell állítani ennek a DNS-nek az egyszálú formáját. Az egyszálú DNS-t egy szintetikus oligonukleotidhoz kapcsoljuk, amely ennek a DNS-nek egy részével komplementer, azzal az eltéréssel, hogy az oligonukleotidban van hibás párosítású régió is. A nem odaillő régió rendszerint az oligonukleotid központi részében helyezkedik el. Bizonyos esetekben az oligonukleotid tartalmaz egy restriktív endonukleáz-felismerőhelyet is a mutáció helyén vagy annak közelében. A kapcsolt elegyet ezután kettős szálúvá alakítjuk és *E. coli* DNS-polimeráz I nagy fragmense és dezoxinukleotidtrifoszfát hozzáadásával, T4 DNS-ligáz és adenzin-5'-foszfát jelenlétében kovalensen zárjuk. A kettős szálú DNS-t ezután megfelelő *E. coli* törzsbe transzformáljuk, amely a DNS hibás párosítású régióját kijavítja és a DNS-t replikálja.

Két klónpopulációt kapunk. Attól függően, hogy a javító (repair) szintézisben melyik szál szerepel templátként, a klón vagy a vad típust vagy a megváltozott (mutáns) szekvenciát tartalmazza. Az oligonukleotid szekvenciájának megfelelő mutánsszekvenciát tartalmazó klónokat a radioaktívan jelzett oligonukleotidokkal való hibridizálással szelektáljuk. Az oligonukleotid és a vad típusú szekvencia közötti hibás párosodás következtében a radioaktívan jelzett oligonukleotidok stabilabban kötődnek a mutáns szekvenciát tartalmazó klónokhoz. Ezért megfelelő hőmérsékleten végzett inkubálás segítségével a vad típusú és a mutáns klónok megkülönböztethetők. Abban az esetben, ha az oligonukleotid egy restriktív endonukleáz hasítási helyet is tartalmaz, a vizsgált klónokat olyan endonukleázzal emésztve, amelyet ez a hely felismer, kiválaszthatjuk azokat a kló-

nokat, amelyek a mutáns szekvenciát tartalmazzák, ami újabb eszközt jelent a vad típusú és mutáns klónok megkülönböztetésére. Az azonosított klónokban bekövetkezett változásokat ezután az érintett régiók DNS-szekvenálásával erősíthetjük meg.

A kívánt mutáció(ka)t tartalmazó plazmidklónok restriktív fragmenseit ezután standard szubklonozási eljárásokkal expressziós plazmidokká alakítjuk, amelyek alkalmasak a mutáns géntermék expresszáására vagy baktériumban vagy élesztőben (de mindkettőben nem).

A találmány szerinti eljárással előállított módosított rekombináns szomatotropinok képviselőjeként a rekombináns sertés-szomatotropint (rpST), valamint az ennek előállítására szolgáló eljárást ismertetjük részletesen az alábbiakban, természetesen a korlátozás szándéka nélkül. Az ismertetés referenciaként tartalmaz olyan részeket is, amelyek nem tartoznak az oltalmi körbe.

A rekombináns sertés-szomatotropin aminosavszekvenciája és a kódoló DNS-szekvencia a 6. ábrán látható.

A legelőnyösebb rekombináns sertés-szomatotropin 193 aminosavat tartalmazó polipeptid, amelyben az aminoterminális úgy van módosítva, hogy 3 további aminosavat (met, asp, gln) tartalmaz, és a hipofízis eredetű sertés-szomatotropin bizonyos érett formáiban megtalálható első aminosav (ala) hiányzik. A találmány szerinti eljárással módosítható azonban a 191 aminosavból álló pST, valamint ennek egyéb származékai, például az NH₂-végen végrehajtott delécióval vagy addícióval és/vagy a COOH-végen végrehajtott delécióval és/vagy addícióval nyert szomatotropinok is.

Rekombináns pST: NH₂-met-asp-gln-phe-pro-ala-185 aminosav-ala-phe-COOH
hipofízis pST: NH₂-ala-phe-pro-ala-185 aminosav-ala-phe-COOH

Ez a módosítás tisztán két aminosavval való növekedést jelent a rekombináns pST proteinben, és az EP 355460 számú szabadalmi leírásban van ismertetve. A rekombináns sertés-szomatotropin mutagén származékainak elnevezésére alkalmazott számozási rendszer tükrözi ezt a növekedést, és szakember számára könnyen alkalmazható.

pGEMpST-SX DNS előállítás

Az összes mutagenézis-reakcióban templát-DNS-ként használt egyszálú pGEMpST-SX DNS-t pGHGEM3Z DNS-ből állítjuk elő helyirányított mutagenézissel.

pGHGEM3Z

A sertés-szomatotropin (rpST) gént pGEM-3z (f+) fagmidban klónozva pGHGEM3Z-t kapunk az alábbi általános eljárás szerint. A sertés-szomatotropin (rpST) gént tartalmazó pGHGEM3Z DNS-fragmenst a pEFF-902 bakteriális expressziós plazmidból izoláljuk, EcoRI és HindIII restriktív enzimekkel végzett hasítással (1. ábra). Az rpST-gént tartalmazó fragmenst ezután agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. A kettős szálú pGEM-3z (f+) fagmid-DNS-t EcoRI és HindIII restriktív enzimekkel emésztjük, borjúból EcoRI lúgos foszfáttal kezeljük és a nagy fragmenst agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. A két tisztított fragmenst ezután összekeverjük és T4 DNS-ligázzal ligáljuk. Az elegyet baktériumokba transzformálva számos telepet kapunk.

A plazmid DNS-t standard lúgos lizálással állítjuk elő és szerkezetét megfelelő restriktions enzimekkel végzett emésztéssel határozzuk meg. A kívánt fragmenst tartalmazó klónt izoláljuk és pGHGEM3Z-nek nevezzük.

pGEMpST-SX

Ezzel a mutációval célunk olyan rpST DNS-szekvencia előállítása volt, amelyben az Ó-hélix 2 régiót kódoló DNS-szekvencia az 5'-oldalon (a DNS kódoló régiójának 225–230. helyzete) egy SacI restriktions helyel, és a 3'-oldalon (285–290. helyzet) egy XbaI restriktions helyel kapcsolódik. A DNS-szekvencia eme változásai nem változtatják meg az rpST protein aminosavszekvenciáját. A fenti restriktions endonukleáz hasítási helyek jelenléte egy „hélix 2 kazetta”-t hoz létre, ezáltal az Ó-hélix 2-t kódoló DNS-ben bekövetkezett mutációk kényelmesen és gyorsan kombinálhatók az Ó-hélix 3-at kódoló DNS megfelelő mutációival. A pGEMpST-SX szerkesztését az alábbiakban ismertetjük.

A szintetikus SacI293 és XbaI353 oligonukleotidok DNS-szekvenciája az 1. táblázatban található. A mutagenézis szubsztrátja az egyszálú pGHGEM3Z DNS, amelyet tisztított fágból állítunk elő standard eljárásokkal. 2000 ng fenti DNS-t 100 ng SacI293 és 100 ng XbaI353 oligonukleotiddal elegyítünk, amelyeket 5'-végükön adenozin-5'-trifoszfáttal és T4 polinukleotidkinázzal foszforileztünk. Az elegyet 10 µl végtérfogóban tartalmazza az 1x illesztő puffer (1x illesztő puffer összetétele: 75 mmol/l KCl és 5 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0). Az elegyet 65 °C-on 7 percen keresztül melegítjük,

majd 10 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ez az eljárás lehetővé teszi azt, hogy az oligonukleotidok az egyszálú szubsztrát (templát) DNS-hez illeszkedjenek. A hozzáillesztett molekulákat betöltjük és kovalensen zárt, kettős szálú DNS-sé alakítjuk 22 µl H₂O, 1 µl 20 mmol/l koncentrációjú ATP, 2 egység T4 DNS-ligáz és 2 egység DNS-polimeráz I nagy fragmens [az egységek definíciója a New England Biolabs katalógusban (1989) található], 2 µl 20×dNTP (a négy dezoxiribonukleotid-5'-trifoszfát elegye, az egyes komponensek koncentrációja 2 mmol/l) és 4 µl 10×„betöltő” puffer (1×betöltőpuffer összetétele: 27,5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 15 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l DTT). Az elegyet szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáljuk, majd a reakcióelegy felét ismert módon HB101 kompetens sejtekbe visszük. 37 °C-on egy éjszakán keresztül tartó inkubálás után láthatóvá válnak az egyes telepek. 24 telepből ismert eljárással plazmid DNS-t állítunk elő, és külön-külön SacI és XbaI restriktions enzimmel emésztjük. Azokat a plazmid DNS-eket, amelyek mindkét restriktions helyet tartalmazzák – ami azt jelenti, hogy mind a SacI293, mind az XbaI353 oligonukleotid beépült az rpST génbe – HB101 kompetens sejtekbe való bevezetéssel a fent leírtak szerint tovább tisztítjuk. A plazmid DNS-t preparáljuk és a plazmid DNS-ben az egyes restriktions helyek jelenlétének igazolására külön-külön SacI-gyel és XbaI-gyel emésztjük, majd az rpST DNS megfelelő régióinak DNS-szekvenciaanalízisével megerősítjük az eredményt.

1. táblázat: Mutagén oligonukleotidok

Név	Szekvencia (5'–3')	Mutáció
SacI293	GACGTGGAGCTCCTGCGCTTCTCG	hélix 2 kazetta
XbaI353	CAGTTCCTCTCTAGAGTCTTCACC	hélix 2 kazetta
S81L	TGCGCTTCTTGCTGCTGC	S81, 87L
S87L	TCATCCAGTTGTGGCTCG	S81, 87L
Q8082	TGCGCTTCTCGCAGCTGCAGAT CCAGTCGTGG	L82,84Q
Q8082D	TTCTCGCAGCTGCAGATGCAGT	L82, 84Q detektálási próba
K113	CTACGAGAAGAAGAAGGACCTG	L115K
E116	GCTGAAGGACGAGGAGGAGGGC	L118E
K113E115	GTCTACGAGAAGAAGAAGGACG AGGAGGAGGGCAT	L115KL118E
K113E116D	AGAAGAAGAAGGACGAGGAGGA	K113E116 próba
E116K120	AAGCTGAAGGACGAGGAGGAGG GCAAGCAGGCCCTGATG	L118E1122K
E120	GGAGGAGGGCGAGCAGGCCCTG	I112E
L120–3	GGAGGAGGGCCTGCAGGCCCTG	I122L
A124–2	CAGGCCCTGGCACGGGAGCTGG	M126A
E113EHD0116	CGCGTCTACGAGAAGGAGAAGGAC (GC) A (GC)GAGGAGGGCATCCAG	L115E
E113D	CGTCTACGAGAAGGAGAAGGAC	L115E konstrukciós próba
L115A	CTACGAGAAGGCGAAGGACCTG	
L118A	GCTGAAGGACGCGGAGGAGGGC	

1. táblázat (folytatás)

Név	Szekvencia (5'–3')	Mutáció
L118TK	CTGAAGGACA (CA) AGAGGAGGGCAT	L118K
L118T	CTGAAGGACACTGAGGAGGGC	L118T
L117, 121	GAAGGACCTGCTGGAGGGCAT CCTGGCCCTGATG	E119LQ123L
Leu117121D	CCTGCTGGAGGGCATCCTGGCC	E119LQ123L próba
K114R/AccI	GACCGCGTATACGAGCGTCTGAAGGA	K114R
G121A/XmnI	CTGGAGGAAGCTATTCAAGGCCCTG	G121A
K116R/BglII	AGAAGCTGCGAGATCTGGAGGA	K116R
A14D/HindIII	CCTTGTCAGCTTATTTGACAACGCCG	A14D
A6T	TCAATTCCCAACCATGC	A6T
S11RA14D/Sal	ATGCCCTTGAGTCGACTAT TTGACAACGCC	S11RA14D
G21HH22R/ClaI	CCGGGCCCATCGATTGCACCAA	Q21HH22R
PvuII634	AGAAGGCAGAGCTGCTGTCCAC	I122L _{PCR}

Mutációk előállítása az α -hélix 1 vagy 3 régióban

A pGEMpST–SX-ben lévő rpST gén mutagenézisét az alábbiak szerint végezzük. A mutagenézis célja olyan rpST-molekula előállítása, amely kevésbé hajlamos aggregálódásra nagy (>100 mg/ml) proteinkoncentrációk esetén. A célzott hely az α -hélix 3 régió hidrofób felülete, a 112–129. aminosavmaradékokat tartalmazó szakasz, amely feltételezetten kritikus az aggregálódási reakció kiváltásában [Brems és munkatársai, Biochemistry 25, 6539–6543 (1986)]. Mivel az általunk alkalmazott rpST gén az aminoterminalison két további aminosav-kodont is tartalmaz, az aminosavmaradékok száma összesen 193, szemben a hipofízis eredetű marha- és sertés-szomatotropinban talált 191 aminosavmaradékkal. A 112–129. maradékok a marha-szomatotropin 110–127. maradékaiknak felelnek meg [Abdel-Meguid és munkatársai, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 6434–6437 (1987)]. A mutagenézis egyéb célzott régiói a molekulában az α -hélix 3 hidrofób felülete és az α -hélix 1 6–11. aminosav maradéka. A kombinált mutánsokat több lépésben kivitelezett mutagenézissel, vagy a megfelelő régiók szubklónozásával állítjuk elő. Az alábbiakban ismertetjük az L118E mutáció végrehajtására szolgáló alapeljárást, és példaszerűen ismertetjük a többi mutáció létrehozását is. Az alapeljárás különféle módosításait a megfelelő példákban adjuk meg.

Az egyszálú pGEMpST–SX szubsztrát DNS-t ugyanúgy állítjuk elő, mint a pGHGEM3Z-t. Az L118E mutáció létrehozásában alkalmazott szintetikus mutagén oligonukleotidot – amelynek DNS-szekvenciáját (E116) az 1. táblázat tartalmazza – az 5'-végen foszforilezzük, a SacI293-ra ismertetett módon. Az illesztési és betöltési reakciót is ugyanúgy hajtjuk végre, mint ahogy azt a pGHGEM3Z SacI293 mutagenézisére leírtuk. Miután a reakcióelegy felét HB101 kompetens sejtekbe bevittük és egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, a kapott telepeket nitro-cellulóz-szűrőkre visszük át és standard módszerekkel elvégezzük a hibridizálást. Az 5'-végen

τ -³²P-ATP-vel és polinukleotid-kinázzal radioaktívan jelzett E116 oligonukleotidokat a mutáció detektálására is használjuk. A hibridizálást egy éjszakán keresztül 37 °C-on végezzük, 5×SSC-ben (1×SSC összetétele: 0,15 mol/l nátrium-klorid, 0,015 mol/l nátrium-citrát, pH 7,0), 1×Denhardt-oldat [0,02 vegyes% Ficoll, 0,02 vegyes% marhaszérum-albumin és 0,02 vegyes% poli(vinil-pirrolidon)], 150 µg/ml élesztő-tRNS és a radioaktívan jelzett próba jelenlétében.

A hibridizálás befejezése után a szűrőket legalább 30 percen keresztül 37 °C-on 5×SSC-vel, majd kétszer 30 percen keresztül TAC-vel [TAC összetétele: 3 mol/tetrametil-ammónium-klorid, 50 mmol/l trisz(hidroximetil)-amino-metán pH 8,0, 1 mmol/l EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), 0,1 vegyes% nátrium-dodecilszulfát] mossuk a kívánt hőmérsékleten. Az utóbbi mosás inkubációs hőmérséklete meghatározza a specifikitást, mivel az E116 oligonukleotid csak a teljesen komplementer klónokkal marad hibridizálva. Az E116 oligonukleotidok esetén a hőmérséklet 59,0 °C. Röntgenfilmes előhívással csak azok a klónok válnak láthatóvá, amelyek az E116-tal teljesen komplementerek. Az így kapott több pozitív klónból preparáljuk a plazmid-DNS-t, újra HB101 sejtekbe visszük, és a fent ismertetett módon újra alávetjük a szűrővizsgálatnak. A második szűrővizsgálat után pozitívnak bizonyult több klónból preparáljuk a plazmid DNS-t, és szekvenciáját DNS-szekvenciaanalízissel meghatározzuk; ily módon egyértelműen azonosítjuk az L118E mutációt tartalmazó DNS-eket. A fenti mutációt hordozó plazmidot pGEMpST–SX–L118E-nek nevezzük.

Az L118E mutációt tartalmazó rpST gén klónokat kétféle expressziós vektorba, a pROpST–SX és pROpST–SXA vektorba transzformáljuk az alább ismertetett módon. Ezzel az a célunk, hogy a SacI és XbaI restrikciós helyekkel rendelkező α -hélix 2 kazettát tartalmazó rpST gént az rpST gén E. coliban való expresszálására alkalmas plazmidvektorba beépítsük. Másik

célunk az volt, hogy a találmány szerinti mutációkat az rpST két különböző genetikai hordozójába is beépítsük. Az egyik természetes (vad) típus, mivel a 183. és 191. helyzetű ciszteinmaradékok közül mindkettőt tartalmazza. A másik rpST gén alanint kódol cisztein helyett ugyanezekben a helyzetekben, és az EP 255 460 számú szabadalmi leírásban ismertetik. A pROpSTA34 plazmid (4. ábra) a pRO211 expressziós plazmidba klónozva tartalmaz egy EcoRI/HindIII fragmenst. Ez az EcoRI/HindIII fragmens egy mutáns rpST gént hordoz, amelyben a 183. és 191. helyzetű ciszteinek kodonjai ezekben a helyzetekben az alanin kodonjára vannak kicserélve. Így ez a gén ala,ala mutációkat hordoz. A pROpSTA34 plazmidot egyik reakcióelegyben EcoRI-gyel és HindIII-mal, másik reakcióelegyben EcoRI-gyel és SmaI-gyel emésztjük. A vektort tartalmazó nagy fragmenst mindkét reakcióelegyből agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. Az α -hélix 2 kazettát egyébként vad típusú rpST génben tartalmazó pROpST-SX plazmidot a pGEMpST-SX-ből származó, tisztított EcoRI/HindIII fragmens ligálásával állítjuk elő. A ligációs elegyet N99cI baktériumtörzsbe visszük be. Ebben a törzsben a λP_L promotor által hajtott rpST-expressziót a vad típusú λ represszor jelenléte gátolja. A kívánt szerkezetű plazmidklónokat a megfelelő restrikciós enzimekkel végzett emésztéssel azonosítjuk. A α -hélix 2 kazettát mutáns rpST génben tartalmazó pROpST-SXA plazmidot a pROpSTA34-ből tisztított EcoRI/SmaI vektor fragmens és a pMEGpST-SX-ből tisztított EcoRI/SmaI fragmens ligálásával állítjuk elő. A ligációs elegyet N99cI baktériumtörzsbe vezetjük és a kapott plazmidklónokat a megfelelő restrikciós enzimekkel emésztve azonosítjuk a kívánt plazmidklónokat.

Az L118E mutációt pROpST-SX és pROpST-SXA expressziós plazmidokba visszük be oly módon, hogy a pGEMpST-SX-L118E DNS-t egyrészt EcoRI-gyel és HindIII-mal, másrészt EcoRI-gyel és SmaI-gyel hasítjuk. Az egyes reakcióelegyekből származó, rpST-t hordozó kis fragmensek tartalmazzzák az L118E mutációt, ezeket agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. A pROpST-SX plazmidot EcoRI-gyel és HindIII-mal hasítjuk, és a vektort hordozó nagy fragmenst agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. Ezt a fragmenst a pGEMpST-SX-L118E-ből nyert, tisztított EcoRI/HindIII fragmenssel ligálva kapjuk a pROpST-SX-L118E plazmidot. A ligációs elegyet hőmérséklet-érzékeny λ represszort tartalmazó 4300 expressziós törzsbe transzformáljuk. Ezekben a törzsekben az rpST expressziója a hőmérséklettől függ. 42 °C-on a λ represszor inaktív, így a λP_L promotor általi expresszió végbemehet. A pROpST-SX-L118E plazmidot hordozó baktériumtelepeket 42 °C-on rpST proteint termelő képességük alapján azonosítjuk (amely hőmérsékleten a λ represszor nem működik). A pROpST-SXA plazmidot mind az EcoRI, mind az SmaI restrikciós enzimmel emésztjük, és a vektor nagy fragmensét agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk. Ezt a fragmenst a pGEMpST-SX-L118E-ből nyert, tisztított EcoRI/SmaI fragmenssel ligáljuk. A ligációs elegyet 4300 expressziós törzsbe transzformáljuk és a pROpST-SXA-L118E

plazmidot hordozó baktériumtelepeket 42 °C-on rpST proteint termelő képességük alapján azonosítjuk.

1. példa

- 5 *Hidrofób aminosavak helyettesítése az α -hélix 3 régióban a hélixet stabilizáló hidrofíl aminosavakkal, mutagén oligonukleotidok alkalmazásával*

Ezek a mutációk az alábbiak: L118E, L115K, L115K-L118E és L118EI122K. A fenti mutációkat pontosan az L118E mutációra ismertett alapeljárással hozzuk létre. A fenti mutációkat hordozó plazmidok jelölése az alábbi:

- 10 pGEMpST-SX-L118E, pGEMpST-SX-L115K,
15 pGEMpST-SX-L115KL118E és
pGEMpST-SX-L118EI122K.

Az rpST-ben az L115K mutációt az L118E mutációval kapcsolatban ismertett módon hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy a K113 mutagén oligonukleotidot (lásd 1. táblázat) használjuk mind a mutagén, mind a hibridizációs reakcióban. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg a rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 115. helyzetben CTG-ről AAG-re cserélődik, ami lizint kódol.

25 Az rpST-ben az L115KL118E mutációt az L118E mutációval kapcsolatban ismertett módon hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy a K113E116 mutagén oligonukleotidot (lásd 1. táblázat) használjuk a mutagén reakcióban, és a K113E116D oligonukleotidot (lásd 1. táblázat) a hibridizációs reakcióban. A K113E116 oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 115. helyzetben CTG-ről AAG-re cserélődik, ami lizint kódol, és a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről GAG-re cserélődik, ami glutaminsavat kódol. Ez az oligonukleotid így kettős mutációt eredményez az rpST DNS-szekvenciában.

30 Az rpST-ben az L118EI122K mutációt az L118E mutációval kapcsolatban ismertett módon hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy az E116I120 mutagén oligonukleotidot (lásd 1. táblázat) használjuk a hibridizációs reakciókban. Az E116K120 oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről GAG-re cserélődik, ami glutaminsavat kódol, és az izoleucin kodonja a 120. helyzetben ATC-ről AAG-re cserélődik, ami lizint kódol. Ez az oligonukleotid így kettős mutációt eredményez az rpST DNS-szekvenciában.

2. példa

- 50 *Hidrofób aminosavak helyettesítése az α -hélix 3 régióban hidrofíl aminosavakkal, mutagén oligonukleotidok alkalmazásával*

Ezek a mutációk az alábbiak: I122E, L118T, L118K és L115E. A fenti mutációkat hordozó plazmidok jelölése az alábbi: pGEMpST-SX-I122E, pGEMpST-SX-L118T, pGEMpST-SX-L118K és pGEMpST-SX-L115E. A fenti mutációkat pontosan az L118E mutációra ismertett alapeljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy a mutagén és hibridizációs reakciókban a megfelelő oligonukleotidokat alkal-

mazzuk, amelyek szekvenciáját az 1. táblázatban ismertetjük.

Az I122E mutációt az E120 mutagén oligonukleotid (1. táblázat) alkalmazásával hozzuk létre. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy az izoleucin kodonja a 122. helyzetben ATC-ről GAG-re cserélődik, ami glutaminsavat kódol. Az E120 oligonukleotidot radioaktívan jelzett detektálási próbaként is alkalmazzuk a hibridizációs reakcióban, amely egyébként minden szempontból azonos az L118E-vel kapcsolatban leírtakkal, azzal az eltéréssel, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk.

Az L118T mutációt pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs reakcióban L118T oligonukleotidot (1. táblázat) használunk. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről ATC-re cserélődik, ami treonint kódol. A kívánt mutációt tartalmazó plazmidokat a mutációt nem hordozó plazmidoktól úgy különböztetjük meg, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk.

Az L115E mutációt pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy a mutagén reakcióban E113EHDQ116 mutagén oligonukleotidot (1. táblázat), a hibridizációs reakcióban E113D oligonukleotidot (1. táblázat) használunk. Az E113EHDQ116 oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 115. helyzetben CTG-ről GAG-re változik, ami glutaminsavat kódol, és a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről glutaminsavat kódoló GAG-ra, aszparaginsavat kódoló GAC-re, hisztidint kódoló CAC-re vagy glutamint kódoló CAG-re változik. A 118. helyzetben bekövetkezett különféle mutációs változások annak következtében jönnek létre, hogy a mutagén oligonukleotid az oligonukleotid szintézise során keletkezett négy oligonukleotid elegye. Az E113D radioaktívan jelzett próbával hibridizáló plazmidklónok DNS-szekvenciájának meghatározása azt mutatja, hogy ezek tartalmazzák az L115E mutációt, de egyetlen plazmid sem hordozza a 118. helyzet négy lehetséges mutációjának egyikét sem. Így ez a mutációs eljárás egyetlen mutációt eredményez a 115. helyzetben.

Az L118K mutációt pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy mutagén oligonukleotidként L118K oligonukleotidot (1. táblázat) használunk. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről a lizint kódoló AAG-re vagy a treonint kódoló CAG-re cserélődik. A 118. helyzet különféle mutációs lehetőségei azért jöhetnek létre, mert a mutagén oligonukleotid az oligonukleotid szintézise során keletkezett két oligonukleotid elegye. Az L118TK radioaktívan jelzett próbával hibridizáló plazmidklónok DNS-szekvenciájának meghatározása azt mutatja, hogy ezek tartalmazzák az L115K mutációt, de egyetlen plazmid sem hordozza a 118. helyzet

másik lehetséges mutációját, az L118T-t. Így ez a mutációs eljárás egyetlen mutációt eredményez a 118. helyzetben.

3. példa

Hidrofil aminosavak helyettesítése az α -hélix régióban hidrofób aminosavakkal, mutagén oligonukleotid alkalmazásával

Ebbe a mutációs csoportba egyetlen kettős mutáns tartozik, az E119LQ123K. A fenti mutációt hordozó plazmid – amelynek szerkezetét DNS-szekvenálással megerősítettük – a pGEMpST–SX–E119LQ123L jelölésű plazmid. A fenti kettős mutációt hordozó rpST gént az L118E mutációra leírtakkal azonos módon hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy az L117, 121 mutagén oligonukleotidot (1. táblázat) alkalmazzuk. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a glutaminsav kodonja a 119. helyzetben GAG-ről CTG-re cserélődik, ami leucint kódol, és a glutamin kodonja a 123. helyzetben CAG-ről CTG-re cserélődik, ami leucint kódol. A mutagén reakcióban ezt az oligonukleotidot alkalmazzuk, míg a hibridizációs reakciókban radioaktívan jelzett próbaként a Leu117121D oligonukleotidot használjuk, amelynek szekvenciáját szintén az 1. táblázat tartalmazza.

A fenti mutáció előidézésére ugyanazokat az eljárásokat alkalmazzuk, mint amelyeket az L118E-vel kapcsolatban fent ismertettünk, azzal az eltéréssel, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket a mutációt hordozó plazmidok azonosítására TAC pufferrel 58 °C-on inkubáljuk.

4. példa

Az α -hélix 3 nagy oldalláncú apoláros aminosavjainak helyettesítése kis oldalláncú apoláros aminosavakkal

Ezek a mutációk az alábbiak: L115A, L118A és M126A. A fenti mutációkat hordozó plazmidok jelölése az alábbi:

pGEMpST–SX–L115A,
pGEMpST–SX–L118A, pGEMpST–SX–M126A.

A fenti mutációkat pontosan az L118E mutációra ismertetett alapeljárással hozzuk létre, eltekintve az alkalmazott mutagén oligonukleotidoktól, és adott esetben a TAC-vel végzett mosás hőmérsékletétől.

Az L115A mutáció létrehozására alkalmazott L115A szintetikus mutagén oligonukleotid szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 115. helyzetben CTG-ről az alanint kódoló GCG-re cserélődik. Az L115A oligonukleotidot a hibridizációs reakciókban radioaktívan jelzett próbaként is alkalmazzuk. A kívánt mutációt hordozó plazmidokat úgy különböztetjük meg a mutációt nem hordozó plazmidoktól, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk.

Az L118A mutációt pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban L118A oligonukleotidot alkalmazunk mutagén nukleotidként, amelynek szekvenciáját az 1. táblázat tar-

talmazza. Az L118A oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a leucin kodonja a 118. helyzetben CTG-ről az alanint kódoló GCG-re cserélődik. A kívánt mutációt hordozó plazmidokat úgy különböztetjük meg a mutációt nem hordozó plazmidoktól, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST–SX–L118A plazmidnak jelöljük.

Az M126A mutációt pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban A124–2 oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, amelynek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Az A124-2 oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a metionin kodonja a 126. helyzetben ATG-ről az alanint kódoló GCA-ra cserélődik. A kívánt mutációt hordozó plazmidokat úgy különböztetjük meg a mutációt nem hordozó plazmidoktól, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST–SX–M126A plazmidnak jelöljük.

5. példa

A 122-es helyzetű izoleucin helyettesítése leucinnal

Ezek a mutációk az alábbiak: I122L, I122LL118A és I122LM126A. A fenti mutációkat hordozó plazmidok jelölése az alábbi:

pGEMpST–SX–I122L,

pGEMpST–SX–L122LL118A és

pGEMpST–SX–I122LM126A.

A fenti mutációkat pontosan az L118E mutációra ismertetett alapeljárással hozzuk létre, eltekintve az alkalmazott mutagén oligonukleotidoktól, és adott esetben a TAC-vel végzett mosás hőmérsékletétől.

Az I122L mutáció létrehozására alkalmazott L120-3 szintetikus mutagén oligonukleotid szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy az izoleucin kodonja a 122. helyzetben ATC-ről a leucint kódoló CTG-re cserélődik. Az L120-3 oligonukleotidot a hibridizációs reakciókban radioaktívan jelzett próbaként is alkalmazzuk. A kívánt mutációt hordozó plazmidokat úgy különböztetjük meg a mutációt nem hordozó plazmidoktól, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 56 °C-on inkubáljuk.

Az I122LL118A mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban L118A oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, és a mutagenézisre templát DNS-ként pGEMpST–SX–I122L-t alkalmazunk. A templát DNS-t a pGEMpST–pST–SX DNS-re leírtak szerint állítjuk elő. A mutációt hordozó plazmidokat a nitro-cellulóz-szűrők TAC pufferben, 56 °C-on végzett inkubálásával detektáljuk. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szer-

kezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST–SX–L118AI122L plazmidnak jelöljük.

Az I122LM126A mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban A124-2 oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, és a mutagenézisre templát DNS-ként pGEMpST–SX–I122L-t alkalmazunk. A templát DNS-t a pGEMpST–pST–SX DNS-re leírtak szerint állítjuk elő. A mutációt hordozó plazmidokat a nitro-cellulóz-szűrők TAC pufferben, 56 °C-on végzett inkubálásával detektáljuk. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST–SX–I122LM126A plazmidnak jelöljük.

6. példa

Aminosavmaradékok helyettesítése az α-hélix 3 hidrofíl felületén

Ezek a mutációk az alábbiak: G121A, K114R és K116R. A fenti mutációkat hordozó plazmidok jelölése az alábbi:

pGEMpST–SX–G121A, pGEMpST–SX–K114R és pGEMpST–SX–K116R.

A fenti mutációkat pontosan az L118E mutációra ismertetett alapeljárással hozzuk létre, eltekintve az alkalmazott mutagén oligonukleotidoktól, és adott esetben a TAC-vel végzett mosás hőmérsékletétől.

A G121A mutáció létrehozására alkalmazott G121A/XmnI szintetikus mutagén oligonukleotid szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a glicin kodonja a 121. helyzetben GGC-ről az alanint kódoló GCT-re cserélődik. Ez az oligonukleotid abban is különbözik az rpST DNS szekvenciától, hogy egy XmnI restrikciós felismerési helyet (5'-GAAGCTATTC-3') is bevisz az rpST DNS szekvenciába. A G121A mutációtól eltekintve a többi nukleotidcseré nem eredményez változást az rpST protein aminosavszekvenciájában. A G121A/XmnI oligonukleotidot a hibridizációs reakciókban radioaktívan jelzett próbaként is alkalmazzuk, a hibridizálást egyébként a fent ismertetett módon hajtjuk végre. A kívánt mutációt hordozó plazmidok detektálására a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 57,5 °C-on inkubáljuk, és az XmnI hely megszerzése szempontjából vizsgáljuk, amely a mutagén oligonukleotidokban jelen van, és így a G121A mutáció plazmidban való jelenlétének kimutatására alkalmas. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST–SX–G121A plazmidnak jelöljük.

A K114R mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban K114R/AccI oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, amelynek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. A K114R/AccI oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a lizin kodonja a 114. helyzetben AAG-ről az arginint kódoló CGT-re cserélődik. Ez az

oligonukleotid abban is különbözik az rpST DNS szekvenciától, hogy egy AccI restrikciós felismerési helyet (5'-GTATAC-3') is bevisz az rpST DNS szekvenciába. A K114R mutációtól eltekintve a többi nukleotidcseré nem eredményez változást az rpST protein aminosavszekvenciájában. A G121A-hoz hasonlóan a kívánt mutációt hordozó plazmidok detektálására a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 57,5 °C-on inkubáljuk, és az új AccI hely megszerzése szempontjából vizsgáljuk, amely a mutagén oligonukleotidokban jelen van, és így a K114R mutáció plazmidban való jelenlétének kimutatására alkalmas. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST-SX-K114R plazmidnak jelöljük.

A K116R mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs/szűrő reakcióban K116R/BglII oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, amelynek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. A K116R/BglII oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a lizin kodonja a 116. helyzetben AAG-ről az arginint kódoló CGA-re cserélődik. Ez az oligonukleotid abban is különbözik az rpST DNS szekvenciától, hogy egy BglII restrikciós felismerési helyet (5'-AGATCT-3') is bevisz az rpST DNS szekvenciába, a 342–347. helyzetbe. A K116R mutációtól eltekintve a többi nukleotidcseré nem eredményez változást az rpST protein aminosavszekvenciájában. A G121A-hoz hasonlóan a kívánt mutációt hordozó plazmidok detektálására a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 57,5 °C-on inkubáljuk, és az új BglII hely megszerzése szempontjából vizsgáljuk, amely a mutagén oligonukleotidokban jelen van, és így a K116R mutáció plazmidban való jelenlétének kimutatására alkalmas. A fenti mutációt hordozó plazmidot – amelynek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – pGEMpST-SX-K116R plazmidnak jelöljük.

7. példa

Hidrofób aminosavak helyettesítése az α -hélix 1 régióban vagy annak közelében hidrofíl aminosavakkal, mutagén oligonukleotidok alkalmazásával

A fenti mutációk célja az rpST aminoterminális részében található hidrofób aminosavmaradékok helyettesítése olyan hidrofíl aminosavmaradékokkal, amelyek a humán növekedési hormonban hasonló relatív helyzetben vannak jelen.

Az rpST fenti mutációi az alábbiak: Q21HH22R kettős mutáció, S11RA14D kettős mutáció, illetve A6T és A14D szimpla mutációk. A fenti mutációkat hordozó plazmidokat – amelyek szerkezetét DNS-szekvenciaanalízissel megerősítettük – p G E M p S T - S X - Q 2 1 H H 2 2 R , pGEMpST-SX-S11RA14D, pGEMpST-SX-A6T és pGEMpST-SX-A14D plazmidnak jelöljük.

A fenti mutációkat az L118E mutációra leírtakkal azonos módon hozzuk létre, eltekintve az alkalmazott

mutagén oligonukleotidoktól, a nitro-cellulóz-szűrők TAC pufferben való inkubálásának hőmérsékletétől és a pozitív, mutációt hordozó plazmidok kimutatására szolgáló szűrővizsgálatban az adott esetben alkalmazott restrikciós endonukleázos emésztésétől.

A Q21HH22R kettős mutáció létrehozására alkalmazott Q21HH22R/ClaI szintetikus mutagén oligonukleotid szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez az oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a glutamin kodonja a 21. helyzetben CAG-ről a hisztidint kódoló CAT-re, és a hisztidin kodonja a 22. helyzetben CAC-ről az arginint kódoló CGA-ra cserélődik. A fenti mutánsokba be van ágyazva egy ClaI restrikciós endonukleáz hasítási hely (5'-ATCGAT-3') is, amely az egyetlen ilyen hely az rpST génben. A Q21HH22R/ClaI oligonukleotidot a hibridizációs reakciókban radioaktívan jelzett próbaként is alkalmazzuk, a hibridizálást egyébként a fent ismertetett módon hajtjuk végre. A fenti mutáns egyébként minden tekintetben az E118E előállítására ismertetett módon hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy a szűrőket TAC pufferben 56 °C-on mossuk. A mutációt hordozó klónok kimutatására a klónokat a ClaI hely megszerzése szempontjából vizsgáljuk, amely a mutagén oligonukleotidban jelen van, és így a Q21HH22R kettős mutáció plazmid klónban való jelenlétének kimutatására alkalmas.

Az A6T mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre, azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs reakciókban A6T oligonukleotidot alkalmazunk mutagén oligonukleotidként, amelynek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. Az A6T oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST szekvenciáját, hogy az alanin kodonja a 6. helyzetben GCC-ről treonint kódoló ACC-re cserélődik. A hibridizálást követően a baktériumot tartalmazó nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 52 °C-on mossuk.

A S11RA14D mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre azzal az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs reakciókban S11RA14D/SalI mutagén oligonukleotidot alkalmazunk, és a nitro-cellulóz-szűrőket TAC pufferben 64 °C-on mossuk. Az S11RA14D/SalI oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy a szerin kodonja a 11. helyzetben AGC-ről az arginint kódoló CGA-ra, és az alanin kodonja a 14. helyzetben GCC-ről az aszparaginsavat kódoló GAC-re cserélődik. Ez az oligonukleotid abban is különbözik az rpST DNS szekvenciától, hogy egy SalI restrikciós felismerési helyet (5'-GTCGAC-3') is bevisz az rpST DNS szekvencia 29–34. helyzetébe. Az S11R és A14D mutációktól eltekintve a további nukleotidcserék nem okoznak változást az rpST protein aminosavszekvenciájában. A mutációt vélhetően hordozó klónokat az új SalI restrikciós hely megszerzése szempontjából vizsgáljuk, ami a mutagén oligonukleotidban jelen van, és így az S11RA14D kettős mutáció plazmid klónban való jelenlétének kimutatására alkalmas.

Az A14D mutációt az rpST génben pontosan az L118E mutációra ismertetett eljárással hozzuk létre az az eltéréssel, hogy mind a mutagén, mind a hibridizációs reakciókban A14D/HindIII mutagén oligonukleotidot alkalmazunk. Az A14D/HindIII oligonukleotid annyiban változtatja meg az rpST gén szekvenciáját, hogy az alanin kodonja a 14. helyzetben GCC-ről az aszparaginsavat kódoló GAC-re cserélődik. Ez az oligonukleotid abban is különbözik az rpST DNS szekvenciától, hogy egy HindIII restrikciós felismerési helyet (5'-AAGCTT-3') is bevisz az rpST DNS szekvencia 30–35. helyzetébe. Az A14D mutációtól eltekintve a további nukleotidcserék nem okoznak változást az rpST protein aminosavszekvenciájában. A vélhetően mutációt hordozó klónokat úgy mutatjuk ki, hogy a nitro-cellulóz-szűrőket TAC-ben 62 °C-on inkubáljuk és az új HindIII restrikciós hely megszerzése szempontjából is vizsgáljuk, ami a mutagén oligonukleotidban jelen van, és így az A14D mutáció plazmid klónban való jelenlétének kimutatására alkalmas.

8. példa

pST mutációk bevitele megfelelő bakteriális expressziós plazmidokba

A megváltozott (mutációt hordozó) klónokat a pRO211 bakteriális expressziós plazmidban (173280 számú európai szabadalmi bejelentésben ismertetett plazmid) rekonstruáljuk, amelyeket pROpST, pROpSTA34 és pROpSTE34 plazmidnak jelölünk.

A pROpST plazmid pST DNS-t tartalmaz a pRO211 expressziós vektorba klónozza, és ciszteinkodont tartalmaz a 183. és 191. helyzetben; a pROpSTA34 alaninkodont és a pROpSTE34 glutaminkodont tartalmaz ugyan-ezen helyzetekben.

A pGEMpST mutánsklónokat EcoRI-gyel és SmaI-gyel emésztjük és a pST mutációt hordozó kis fragmenst izoláljuk. A pROpSTA34 DNS-t hasonló módon kezeljük, és a vektort tartalmazó nagy DNS-fragmenst izoláljuk. Az így kapott tisztított fragmenseket T4 DNS-ligázal összekötjük és megfelelő baktériumtörzsbe (például 4300-ba) transzformáljuk. Ez a törzs tartalmaz egy hőmérsékletérzékeny λ represszort (cI^{857}), így a λP_L promotor általi expresszió 30 °C-on gátolt, de 42 °C-on végbemehet, mivel ezen a hőmérsékleten a represszor inaktíválódik. A mutáns pGEMpST DNS-fragmensek bevitelét a pROpSTE34 DNS-be pontosan a pROpSTA34-re leírt módon végezzük. A mutáns pGEMpST DNS-fragmensek bevitelét a pROpST DNS-be szintén a pROpSTA34-re leírt módon végezzük, azzal az eltéréssel, hogy mind a pGEMpST, mind a pROpSTA34 plazmidot EcoRI-gyel és HindIII-mal hasítjuk. A 2. táblázat tartalmazza azokat a bakteriális expressziós plazmidokat, amelyekbe a mutáns pST géneket bevittük. Az A6T, S11RA14D és Q21HH22R pST mutánsokat egy pROpSTE34 származékba visszük be, a pROpSTE34-re ismertetett módon. Ez a származék a pRO-pSTE34T₁T₂, egy körülbelül 1 kb HindIII fragmenst tartalmaz a pST-t kódoló DNS 3'-végén, ami az E. coli rmb operon (riboszomális RNS B operon) T₁T₂ transzkripció terminátorát tartalmazza.

2. táblázat

Expressziós vektorok aminosavkomponensei a 183. és 191. helyzetben

Mutáció	183. és 191. helyzetben kódolt aminosav		
	cisztein	alanin	glutaminsav
I122L	+	+	+
L115K	+	+	+
L118E	+	+	
L115KL118E	+	+	
L118E1122K	+	+	
L115E		+	
I122E	+	+	
L118T		+	
L118K		+	
E119LQ123L	+	+	
L115A	+	+	
L118A	+	+	
M126A	+	+	
L118A1122L		+	
I1221M126A	+	+	+
S81, 87L		+	
L82, 84Q		+	
S81, 87L + E119LQ123L		+	

2. táblázat (folytatás)

Mutáció	183. és 191. helyzetben kódolt aminosav		
	cisztein	alanin	glutaminsav
S81, 87L + I122L		+	
S81, 87L + M126A		+	
L82, 84Q + L115K		+	
A14D			
A6T			+ *
S11RA14D			+ *
Q21HH22R			+ *
A6TS11R			+ *
A6TS11R + I122L			+
P8TS11R + I122L			+
P8TS11R			+

* az E. coli *rrnB* operon T_1T_2 transzkripció terminátor szekvenciáját is tartalmazza.

9. példa

A6T11R + E34 és P8TS11R + E34 Ó-hélix

1 kombinációs mutánsok előállítása

Az A6TS11R kettős mutációt (amelyben a 6. helyzetű alanin treoninnal, és a 11. helyzetű szerin argininnel van helyettesítve) a 355460 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett E34 mutációval (amelyben a 183. és 191. helyzetű ciszteinkodonokat glutaminsav-kodonok helyettesítik) kombináljuk. A kapott rpST gén ezért az rpST DNS-nek mind az aminoterminálist (A6TS11R), mind a karboxilterminálist kódoló régiójában (E34) tartalmaz mutációkat. A kapott plazmidot pROpSTE–A6TS11R-nek jelöljük. A pML/pGH14-ből származó, megváltoztatott rpST-t tartalmazó kis EcoRI/SmaI fragmenst – amely az A6TS11R mutációt tartalmazza – a pROpSTE– T_1T_2 nagy EcoRI/SmaI fragmensével kapcsoljuk össze. Az utóbbi plazmid a pST expressziós plazmid, amely az rpST-t kódoló DNS 3'-végén egy erős transzkripció terminátort is tartalmaz az E. coli *rrnB* operonból (T_1T_2).

Egy másik kettős mutációt, a P8TS11R-t (amelyben a 8. helyzetű prolin kodonja treoninkodonra, és a 11. helyzetű szerin kodonja argininkodonnal van helyettesítve) a 355460 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett E34 mutációval (amelyben a 183. és 191. helyzetű ciszteinkodonokat glutaminsav-kodonok helyettesítik) kombináljuk. A kapott rpST gén ezért az rpST DNS-nek mind az aminoterminálist (P8TS11R), mind a karboxilterminálist kódoló régiójában (E34) tartalmaz mutációkat. A kapott plazmidot pROpSTE–P8TS11R-nek jelöljük. A pROpSTE–P8TS11R előállítására ugyanazt a stratégiát alkalmazzuk, mint a pROpSTE–A6TS11R esetében, azzal az eltéréssel, hogy a p8TS11R kettős mutációt tartalmazó pML/pGH18 plazmidot alkalmazzuk megváltoztatott rpST DNS forrásként.

A6TS11R + I122L + E34 és P8TS11R + I122L + E34 mutációk

A fent ismertetett I122L Ó-hélix 3 mutációt mindkét, A6TS11R és P8TS11R Ó-hélix 1 mutációval és az

E34 mutációval is kombináljuk. A kapott plazmidok jelölése: pROpST–SXE–A6TS11R+I122L, illetve pML/pGH18–SXE–I122L.

25 A pROpST–SXE–A6TS11R+I122L plazmid előállítására az I122L-t tartalmazó kis BssHII/HindIII fragmenst a pROpSTE–A6TS11R-ből tisztított nagy BssHII/HindIII fragmenssel kapcsoljuk össze. A kapott plazmid tartalmazza a SacI és XbaI restrikciós helyekkel definiált α -hélix 2 kazettát, amely restrikciós helyek az α -hélix 2-t kódoló DNS 5'- és 3'-végét határolják a fent ismertetett módon, de nem tartalmaz T_1T_2 transzkripció terminátort.

30 A pML/pGH18–SXE–I122L plazmidot a fentiek szerint állítjuk elő azzal az eltéréssel, hogy a nagy fragmens forrásként a P8TS11R kettős mutációt hordozó pML/pGH18 plazmidot alkalmazzuk. Az így kapott plazmidmutáns nem tartalmaz T_1T_2 transzkripció terminátort, viszont tartalmazza az α -hélix 2 kazettát.

10. példa

A módosított, rekombináns szomatotropinok stabilitási profilja

A stabilitási profil meghatározását az alábbiak szerint végezzük. A rekombináns (állati) szomatotropinból koncentrált, 100 mg/ml koncentrációjú oldatot készítünk foszfáttal pufferolt sóoldattal (pH 7,4), amelynek összetétele: 3,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3,55 g Na_2HPO_4 , 9,50 g NaCl, 1000 ml desztillált vízben oldva. Az oldatot Millipore[®] steril Millex-0,22 μm szűrőegységen átszűrjük és 0,1 ml alikvotokat kémcsövekbe mérünk. A kémcsöveket 43 °C-os termosztátba helyezzük és meghatározott időpontokban onnan kivesszük. A kémcső tartalmát ekkor foszfáttal pufferolt sóoldattal hígítjuk. A felülúszóban HPLC-eljárással meghatározzuk a monomer- és dimertartalmat. Tömegmérleget készítünk. A csapadékképződést feljegyezzük. Az eredményeket a kiindulási koncentrációkkal összehasonlítjuk és megállapítjuk a stabilitási profilt.

A pH 7,4 értéken kisebb oldhatóságú szomatotropin-származékok oldását kevésbé előnyös pH-n (pH 4–10) is elvégezzük, vagy szuszpenzióként értékeljük ki.

A módosított rpST proteinek oldatban mutatott stabilitásának vizsgálati eredményeit a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat
Mutáns rpST proteinek oldhatósága in vitro

Mutáció	Oldhatóság (%)	Inkubációs idő 43 °C-on (nap)
A34	32	14
I122L+A34	44	14
E34	70,0 (3) 67	14 17
I122L+E34	62,0 (2) 66,3 (3)	14 17
A6TS11R+E34	68,5 (2)	14
P8TS11R+E34	62	14
A6TS11R+I122L+E34	36	14
P8TS11R+I122L+E34	2	14
L118K+A34	0	3
E119LQ123L+A34	0	3
L115A+A34	0	3
L118A+A34	10	7
M126A+A34	18	3
L118A1122L+A34	2	7
I122LM126A+A34	22 (2)	19
S81, 87L+A34	0	3
S81, 87L+E119LQ123L+A34	0	7
S81, 87L+I122L+A34	8	7
S81, 87L+M126A+A34	0	3

$$\text{Oldhatóság} = \frac{\text{oldatban maradt anyag}}{\text{összes oldott anyag}} \times 100 (\%)$$

(lásd 14. példa). Ha egynél több meghatározást végzünk, az átlagos oldhatóságot tüntetjük fel, és az egymástól függetlenül végzett meghatározások számát zárójelben megadjuk. Az rpST mutánsok vagy A34-, vagy E34-alapúak. Az A34 rpST a 183. és 191. helyzetben alanint tartalmaz cisztein helyett, míg az E34 rpST a 183. és 191. helyzetben glutaminsavat tartalmaz cisztein helyett.

11. példa

Rekombináns (állati) szomatotropin-származékokkal kezelt állatok fejlődésének vizsgálata hipox patkányokon

A találmány szerinti rekombináns állati szomatotropinok hatását az állatok fejlődésének serkentésére hipofízisirtott (hipox, RRA) patkányon vizs-

gáljuk. A hipofízisirtott patkányban nem termelődik saját szomatotropin, és érzékeny a beinjektált szomatotropinra. A növekedési választ 10 napon keresztül mérjük, és az eredményeket a 4. táblázatban ismertetjük, a minden egyes vizsgálatban pozitív kontrollként alkalmazott rpST biológiai aktivitásának %-ában.

12. példa

Máj-radioreceptor-vizsgálat a megváltoztatott, rekombináns szomatotropin szomatotropin-receptorokhoz való kötődésének vizsgálatára, in vitro

In vitro radioreceptor-vizsgálatot alkalmaztunk a találmány szerinti rekombináns szomatotropinok ¹²⁵I-rpST-vel folytatott versengésének kimutatására a tisztított májmembránok szomatotropin-receptor kötőhelyeiért. A fenti vizsgálatok eredményeit az 4. táblázatban közöljük.

4. táblázat
Hipox patkányon mért biológiai adatok és az *rpST* mutáns proteinek hőstabilitása

Mutáció	RRA ^a	RRA ^b	T _m (°C)
A34	112,8	173,5	n. v.
I122L+A34	97,4	225,8	79
E34	90,52(5)	51,4(7)	62,0(6)
I122L+E34	66,66(5)	80,28(5)	62,67(5)
L115K	0,3	1,2	>83
L115K+E34	0,8	0,9	79
L118K	1,8	43,9	36
E119LQ123L	3,8	80,2	49
L115A	88,6	163	50
L118A	64(3)	49,5	57
M126A	100	122	55
L118AII122L	38,9	57,9	56
II122LM126A	66,25 (2)	82,55(2)	63
S81, 87L	46,9	194	40
S81, 87L+E119LQ123L	40,4	177,9	38
S81, 87L+II122L	71,3	165	47
S81, 87L+M126A	79,7	186	47
L82, 84Q	9,7(2)	3,4	n. v.
K114R+E34	121,3	53,2	62
A6TS11R+E34	80,7(4)	135,0(4)	64,0(4)
P8TS11R+E34	129,7	78,5	65
A6TS11R+II122L+E34	116,7	112,8	61
P8TS11R+II122L+E34	127,9	89,3	64

RRA^a a hipox patkányon mért eredményeket a pozitív kontrollként alkalmazott standard *rpST* aktivitásának %-ában adjuk meg

RRA^b a máj-radioreceptor-vizsgálat eredményeit a standard *rpST* aktivitásának %-ában adjuk meg

n. v. nem határoztuk meg

Ha egynél több vizsgálatot végeztünk, az átlagot adjuk meg, és a meghatározások számát zárójelben feltüntettük.

13. példa

I122L+E34 mutáns rpST-vel végzett nitrogénmérleg-kísérletek

Az I122L mutációt hordozó *rpST* protein biológiai aktivitásának in vivo kiértékelésére nitrogénmérleg-kísérletet végeztünk a 355460 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett módon. *pST* szubkután adagolása fejlődésben lévő sertéseknek növeli a testben, főleg az izmokban lerakódott protein mennyiségét. Nitrogénmérleg-vizsgálat alkalmazásával mérhető az állatban lerakódott protein mennyiségének változása. Mivel a protein meghatározott mennyiségű nitrogént tartalmaz, az elfogyasztott táplálék és a szervezetből kiürült anyagok nitrogéntartalmának meghatározásával pontosan kiszámítható a lerakódott protein mennyisége. Így a nitro-

génmérleg a visszatartott (lerakódott) protein mennyiségét adja meg a táplálékkal elfogyasztott nitrogén és a vizelettel és széklettel kiürült nitrogén mennyiségének különbségeként. A nitrogénvisszatartást legpontosabban mint a visszatartott nitrogén mennyiségét adhatjuk meg, a megemésztett nitrogén (elfogyasztott nitrogén mínusz székletben lévő nitrogén) mennyiségének százalékában. Ebben a vizsgálatban a 183. és 191. helyzetű ciszteinek, vagy az *rpST* L122L mutáns glutaminsavval van helyettesítve. A fenti analízis eredményei a megváltoztatott *rpST* molekula teljes biológiai aktivitását bizonyítják az *rpST* kontrollhoz viszonyítva.

14. példa

Hőstabilitás meghatározása fluoreszcenciás spektroszkópia alkalmazásával

A megváltozott *rpST* protein hőstabilitását úgy határozhatjuk meg, hogy mérjük az intrinszc triptofán fluoreszcenciát a hőmérséklet függvényében. Az *rpST* molekula egyetlen triptofánmaradékot tartalmaz, amelynek intrinszc fluoreszcenciája natív állapotban szigorúan kioltódik. A hőmérséklet növelése vagy a pH csökkentése a fluoreszcencia jellegzetes növekedését okozza, ami feltehetőleg a szerkezet felbomlásá-

nak következtében jön létre, legalábbis az egyébként betemetett triptofánmaradék közvetlen közelében. A fluoreszcenciát a növekvő hőmérséklet függvényében ábrázolva szigmoid görbe formájában „olvadási profil”-t kapunk, amelyben a fluoreszcencia rejtve marad egy bizonyos hőmérsékletig, ami az adott rpST-re jellemző érték. Ezután a fluoreszcencia egy meglehetősen szűk hőmérséklet-tartományban élesen növekedik. A fenti fluoreszcencia-növekedés középpontjához tartozó hőmérsékletet (átmeneti hőmérséklet) T_m -nek jelöljük, és ez jellemző a protein hőstabilitására. A találmány szerinti rpST T_m -jét Burger és munkatársai módszerével határozzuk meg [Burger H. G., Edelhoch H. és Condliffe P. G., *Endocrinology* 78, 98–102 (1966)], azzal az eltéréssel, hogy a gerjesztett hullámhosszként 295 nm-t alkalmazunk és az emissziós fluoreszcenciát 355 nm kizáró szűrő alkalmazásával olvassuk le. A találmány szerinti rpST T_m értékeit a 4. táblázat tartalmazza. Ezen adatok szerint az I122L T_m -je erősen, 79 °C-ra növekszik.

15. példa

I122L mutáció létrehozása polimeráz láncreakció módszerrel

Az I122L mutációt helyirányított mutagenézissel visszük be az rpST génbe, a Sarkar és Sommer által ismertett polimeráz láncreakciós módszer alkalmazásával [Sarkar és Sommer, *Biotechniques* 8, 404–407 (1990)]. A három alkalmazott oligonukleotid primer, a SacI293, L120–3 és PvuII634 oligonukleotid szerkezete az 1. táblázatban látható. Templátként a pGEMpST–SX plazmidból származó rpST gént tartalmazó EcoRI/HindIII fragmenst használjuk. 15 polimeráz láncreakció ciklust (továbbiakban PRC) hajtunk végre 1 ng rpST DNS-templáton, 1–1 $\mu\text{mol/l}$ L120–3 és PvuII634 oligonukleotid primerrel, dNTP-ekkel és Tag oligonukleotid polimerázzal a gyártó előírásai szerint. A reakció eredményeként L122L mutációt tartalmazó 227 bp DNS-fragmenst kapunk. Ezt a fragmenst agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk és PRC primerként használjuk a SacI293 oligonukleotid-primerrel és az rpST-t tartalmazó EcoRI/HindIII templátfragmenssel kombinálva, egy újabb 15 ciklusból álló PRC-ben. A kapott, 361 bp fragmentumot SacI és PvuII restrikciós endonukleázokkal hasítjuk, agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk és gélen tisztított, nagy SacI/PvuII pGEMpST–SX DNS-fragmenshez ligáljuk. A ligációs elegyet HB101 kompetens sejtekbe transzformáljuk. A kapott transzformánsok plazmid DNS-ét az I122L mutáció jelenléte szempontjából vizsgáljuk, pontosan az L118E esetben ismertett módon, azzal az eltéréssel, hogy radioaktívan jelzett hibridizációs próbaként L120-3 oligonukleotidot használunk, és a szűrővizsgálatot csak egyszer végezzük el. Az I122L mutáció jelenlétét és a PRC reakciókkal bevezetett további mutációk hiányát DNS-szekvenanciaanalízissel erősítjük meg. A fenti mutációt hordozó plazmidot pGEMpST–SX–I122L_{PRC}-nek jelöljük.

16. példa

I122L rpST mutáció létrehozása élesztőben expresszáható plazmidban

Az I122L mutációt hordozó rpST gén *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombában való expresszáására az rpST-t kódoló DNS-t élesztőből származó promoterhez kell működőképesen kötni. A pOpST–SXE–I122L-ből származó, rpST-t hordozó kis NdeI/HindIII fragmens végeit a DNS polimeráz I nagy Klenow-fragmensével való kezeléssel tesszük „ragadóssá”, miután a plazmidot NdeI-gyel és HindIII-mal hasítottuk. Ezt a fragmenst gélelektroforézissel tisztítjuk, és az YEp352-2-plazmid nagy SalI/SphI fragmensével kapcsoljuk. Az utóbbi fragmens végeit S1 nukleázos kezeléssel tesszük „tompává”. Ez a plazmid YEp352-származék, amely úgy van módosítva, hogy tartalmazza a divergens GAL1/GAL10 promotert [Johnston és Davis, *Molecular and Cellular Biology* 4, 1440–1448 (1984)], és az STE7 génből származó nem transzlatált 3'-régión [Teague és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7371–7375 (1986)] is. A kapott plazmidot YEp352–pST–I122L plazmidnak (5. ábra) jelöljük.

A fenti mutáns rpST élesztőben való expresszáására a fenti plazmiddal transzformált élesztősejteket uracil nélküli szintetikus komplett tápközegben tenyésztjük, amely egyetlen szénforrásként galaktózt tartalmaz [Sherman F., Fink G. R. és Hicks J. B., „Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 163–168. oldal (1986)], 30 °C-on, néhány órán keresztül, annyi ideig, hogy maximális rpST gén indukciót és rpST termelést érjünk el. Gazdasejtként minden olyan élesztősejt alkalmazható, amely az URA3 génben mutációt hordoz, előnyösen olyan élesztősejtet alkalmazunk, amely nem termel proteázt és GAL+, ilyen például a BJ5457 (MAT α pep4⁺: HIS3 prb1- δ trp1 ura3-52 leu2- δ his3- δ lys2-801 can1 GAL+ genotípus). Ezt a törzset BJ5457 számon helyeztük letétbe a Yeast Genetic Stock Center-ben (University of California).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás natív szomatotropinnál jobban oldódó, ugyanakkor nyújtott hatású készítményekben biológiai aktivitását megtartó sertés-szomatotropin előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a sertés-szomatotropin alfa-hélix 1 régiójában A6TS11R vagy P8TS11R kettős mutációt hozunk létre.
2. Eljárás natív szomatotropinnál jobban oldódó, ugyanakkor nyújtott hatású készítményekben biológiai aktivitását megtartó sertés-szomatotropin előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a sertés-szomatotropin alfa-hélix 3 régiójában I122L egyszeres mutációt, és alfa-hélix 1 régiójában A6TS11R vagy P8TS11R kettős mutációt hozunk létre.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sertés-szomatotropin kis hurokjában lévő kettő, és nagy hurokjában lévő kettő, összesen négy ciszteinmaradék közül legalább egyet arginin, lizin, asz-

paraginsav, glutaminsav, aszparagin, glutamin, hisztidin, alanin, glicin, izoleucin, leucin, valin, fenil-alanin, triptofán, tirozin, metionin, szerin, treonin és prolin közül egymástól függetlenül választott aminosavmaradékkal helyettesítünk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy helyettesítő aminosavmaradékként glutaminsavat vagy alanint alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 183. és 191. helyzetben lévő ciszteinmaradékot helyettesítjük glutaminsav-maradékkal.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy sertés-szomatotropin kis hurokjában lévő kettő, és nagy hurokjában lévő kettő, összesen négy ciszteinmaradék közül legalább egyet arginin, lizin, aszparaginsav, glutaminsav, aszparagin, glutamin, hisztidin, alanin, gli-

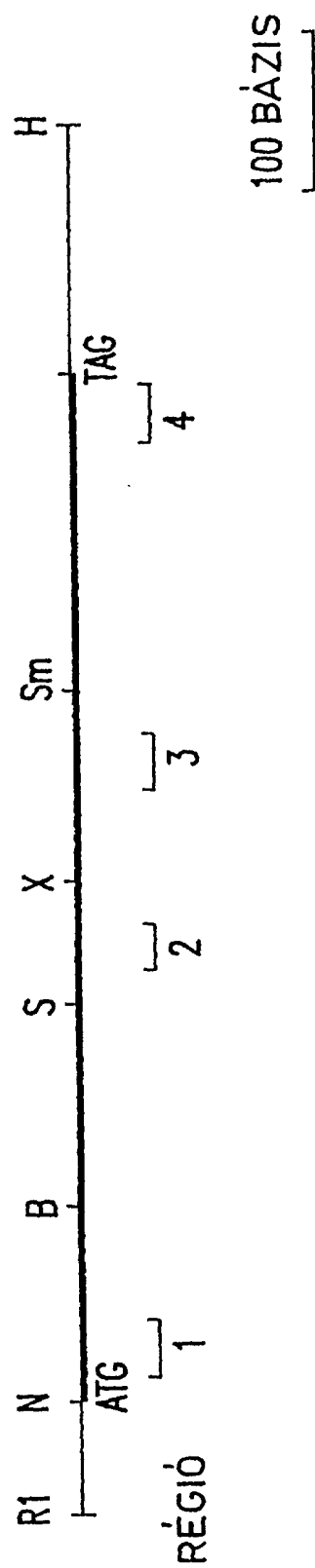
cin, izoleucin, leucin, valin, fenil-alanin, triptofán, tirozin, metionin, szerin, treonin és prolin közül egymástól függetlenül választott aminosavmaradékkal helyettesítünk.

5 7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy helyettesítő aminosavmaradékként glutaminsavat vagy alanint alkalmazunk.

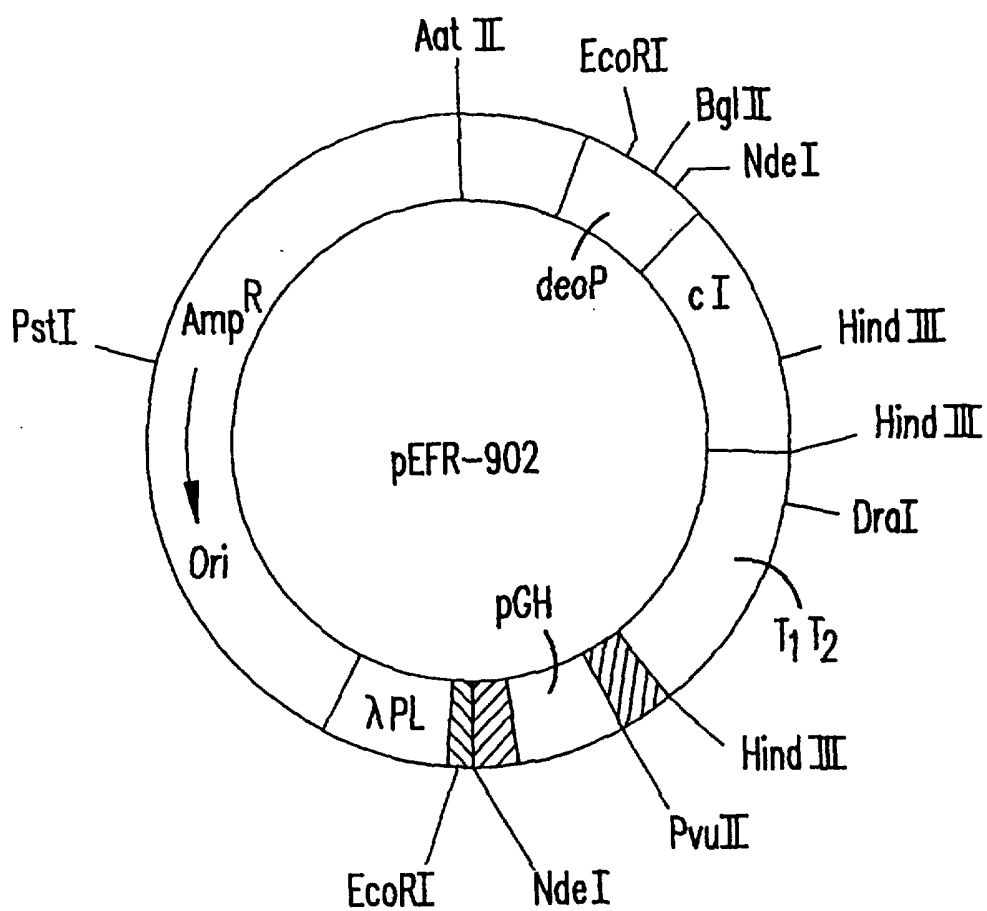
8. Az 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a 183. és 191. helyzetben lévő ciszteinmaradékot helyettesítjük glutaminsav-maradékkal.

10 9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy met-asp-gln-dez(ala) sertés-szomatotropinban hozzuk létre a megfelelő mutációkat.

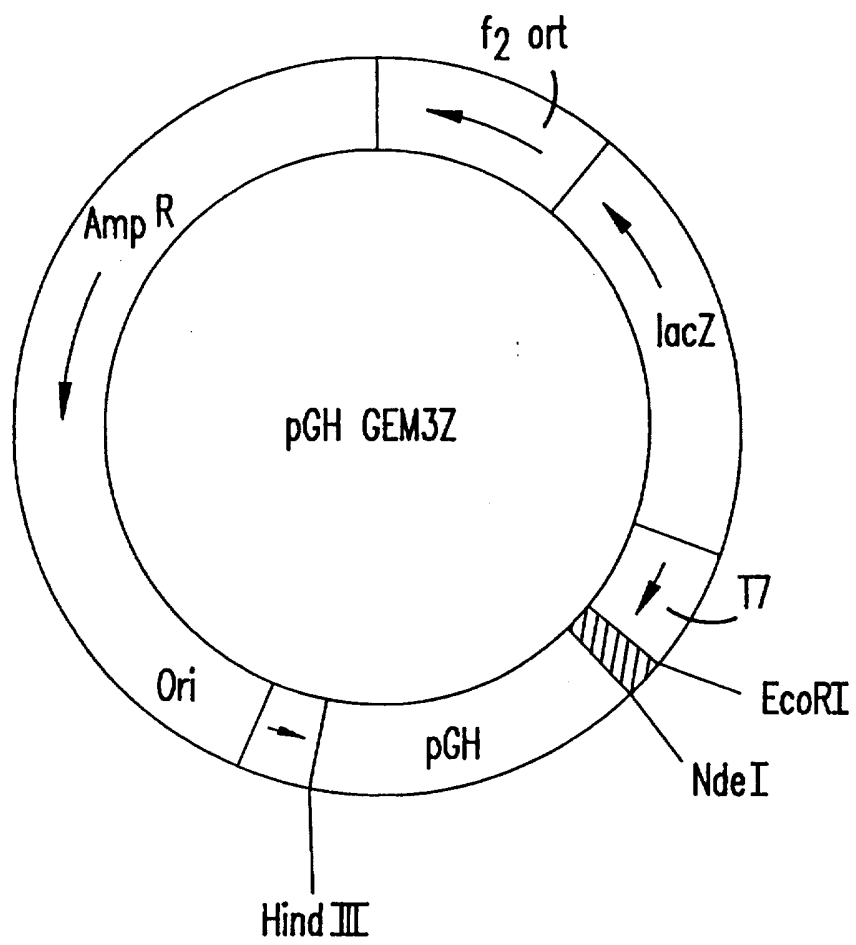
15 10. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy met-asp-gln-dez(ala) sertés-szomatotropinban hozzuk létre a megfelelő mutációkat.



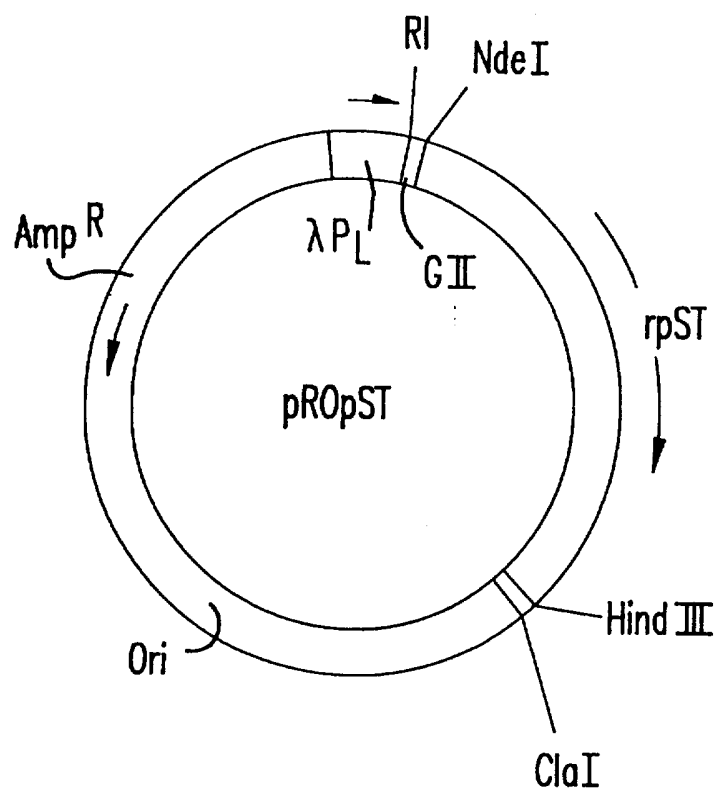
1. ábra



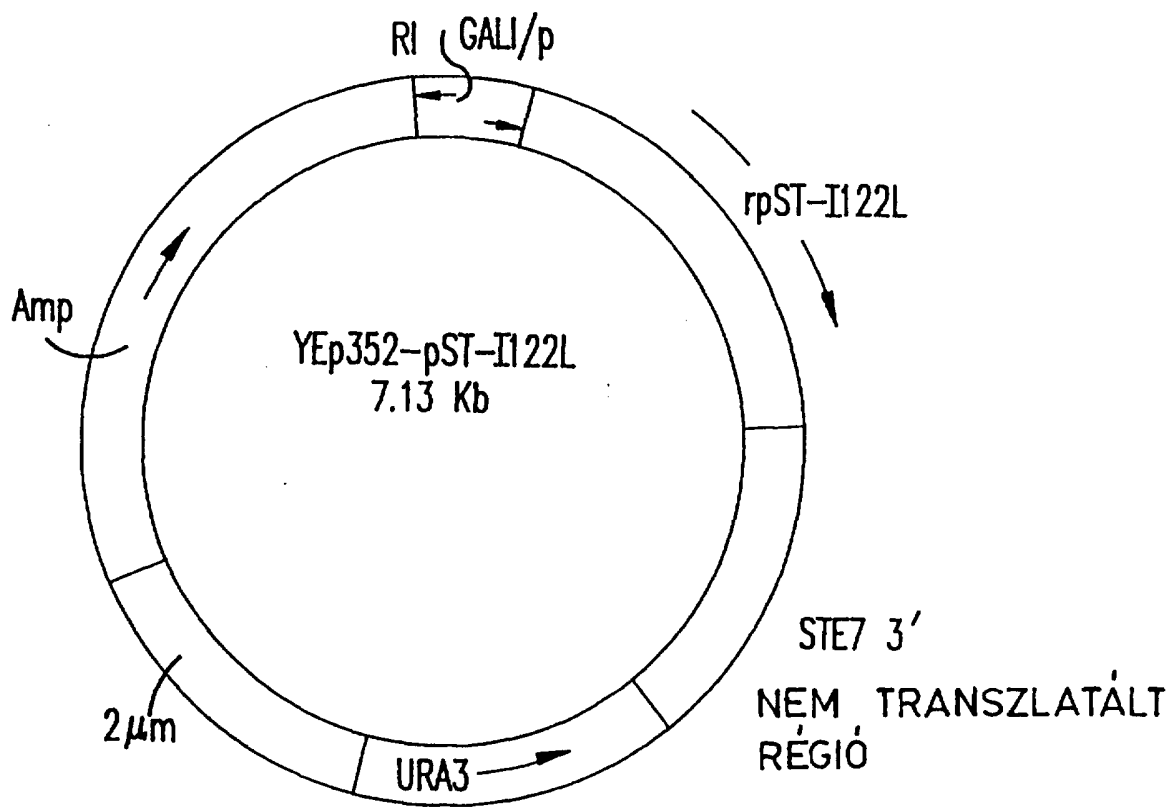
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra

ATG GAT CAA TTC CCA GCC ATG CCC TTG TCC AGC CTA TTT GCC AAC	45
Met Asp Gln Phe Pro Ala Met Pro Leu Ser Ser Leu Phe Ala Asn	
1 5 10 15	
GCC GTG CTC CGG GCC CAG CAC CTG CAC CAA CTG GCT GCC GAC ACC	90
Ala Val Leu Arg Ala Gln His Leu His Gln Leu Ala Ala Asp Thr	
20 25 30	
TAC AAG GAG TTT GAG CGC GCC TAC ATC CCG GAG GGA CAG AGG TAC	135
Tyr Lys Glu Phe Glu Arg Ala Tyr Ile Pro Glu Gly Gln Arg Tyr	
35 30 35	
TCC ATC CAG AAC GCC CAG GCT GCC TTC TGC TTC TCG GAG ACC ATC	180
Ser Ile Gln Asn Ala Gln Ala Ala Phe Cys Phe Ser Glu Thr Ile	
50 55 60	
CCG GCC CCC ACG GGC AAG GAC GAG GCC CAG CAG AGA TCG GAC GTG	225
Pro Ala Pro Thr Gly Lys Asp Glu Ala Gln Gln Arg Ser Asp Val	
65 70 75	
GAG CTG CTG CGC TTC TCG CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTC GGG	270
Glu Leu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Gly	
80 85 90	
CCC GTG CAG TTC CTC AGC AGG GTC TTC ACC AAC AGC CTG GTG TTT	315
Pro Val Gln Phe Leu Ser Arg Val Phe Thr Asn Ser Leu Val Phe	
95 100 105	
GGC ACC TCA GAC CGC GTC TAC GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAG	360
Gly Thr Ser Asp Arg Val Tyr Glu Lys Leu Lys Asp Leu Glu Glu	
110 115 120	
GGC ATC CAG GCC CTG ATG CGG GAG CTG GAG GAT GGC AGC CCC CGG	405
Gly Ile Gln Ala Leu Met Arg Glu Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg	
125 130 135	
GCA GGA CAG ATC CTC AAG CAA ACC TAC GAC AAA TTT GAC ACA AAC	450
Ala Gly Gln Ile Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Lys Phe Asp Thr Asn	
140 145 150	
TTG CGC AGT GAT GAC GCG CTG CTT AAG AAC TAC GGG CTG CTC TCC	495
Leu Arg Ser Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Ser	
155 160 165	
TGC TTC AAG AAG GAC CTG CAC AAG GCT GAG ACA TAC CTG CGG GTC	540
Cys Phe Lys Lys Asp Leu His Lys Ala Glu Thr Tyr Leu Arg Val	
170 175 180	
ATG AAG TGT CGC CGC TTC GTG GAG AGC AGC TGT GCC TTC	579
Met Lys Cys Arg Arg Phe Val Glu Ser Ser Cys Ala Phe	
185 190	

6. ábra