



F1000100995B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 100995 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 31.03.98

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12N 15/81, 15/67, 1/19 // C 12N 15/17

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 886008

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 28.12.88

(24) Alkupäivä - Löpdag 28.12.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 01.07.89

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

30.12.87 US 139682 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Tekamp-Olson, Patricia, 1426 43rd Avenue, San Francisco, CA 94122, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Ruska & Co Oy, Runeberginkatu 5, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Hiivan alfa-faktoriekspressiojärjestelmä
Alfa-faktorexpressionssystem för jäst

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Gene, vol. 54, 1987, p. 175-184, The Embo Journal, vol. 6, 1987, p. 3455-3463

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Saadaan aikaan hiivan alfa-faktoriekspressiojärjestelmä, joka käsittää katkaistun ohjaajasekvenssin, joka sisältää alfa-faktorisignaaliptidin ja yhden glykosylointipaikan, joka on liitetty käsittelypaikalla ei-hiivaproteiinia koodaavaan sekvenssiin.

Det åstadskoms ett alfa-faktorexpressionssystem för jäst innefattande en avbruten styrsekvens, som innehåller en alfa-faktorsignalpeptid och ett glykocyleringsställe, som har anslutits på behandlingsstället till en sekvens som kodar icke-jästprotein.

Hiivan alfa-faktoriekspressiojärjestelmä

- 5 Tämän keksinnön kohteena on rekombinanttiproteiinien valmistus hiivassa. Etenkin tämän keksinnön kohteena on parannettu alfa-faktoriekspressiojärjestelmä, joka huolehtii heterologisten proteiinien erittymisestä hiivaisäntäsoluista.
- 10 Kurjan et al. (1982) Cell 30: 933 - 943 ovat selittäneet hiivan alfa-faktoriesiastegeeniä koodaavan geenin ensimmäistä kloonausta ja sekvenssointia. Kurjan et al., US-patentti n:o 4,546,082, ovat selittäneet myös tämän geenin kloonausta ja ehdottaneet, että alfa-faktoriohjaajasekvenssiä voidaan käyttää heterologisten proteiinien erityksen ohjaamiseksi
- 15 hiivassa. Patentissa ei ole kuitenkaan mitään tietoja, jotka osoittaisivat, että patentin haltijat ovat koskaan käyttäneet onnistuneesti alfa-faktoriohjaajaa heterologisen proteiinin ilmaisemiseksi ja erittämiseksi hiivassa.
- 20 EPO-julkaisussa n:o 116,201 selitetään alfa-faktoriohjaajan ensimmäistä onnistunutta sovellutusta heterologisen proteiinin, epidermaalisen kasvutekijän ekspresion ja erittymisen ohjaamiseksi transformoidusta hiivasta. Tämän julkaisun jälkeen on esitetty useita raportteja, jotka koskevat heterologisten proteiinien ekspressiota hiivassa käyttämällä alfa-
- 25 faktoriohjaajaa. Ks. esim. Elliott et al. (1983), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80: 7080 - 7084; Bitter et al. (1984), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81: 5330 - 5334; Smith et al. (1985), Science 229: 1219 - 1229; EPO-julkaisut n:ot 114,695, 123,228, 123,294, 123,544, 128,773 ja 206,783. Ks. myös Brake
- 30 et al., Protein Transport and Secretion, s. 103 (J. M. Getting, julk. 1984).
- 35 Yllä mainittujen raporttien ekspressiojärjestelmissä valmistetaan täysipituinen alfa-faktoriohjaaja, joka on liitetty

heterologiseen proteiiniin. Vaikka yllä mainituissa julkaisuissa osoitetaan, että alfa-faktoriekspressiojärjestelmä on yleisesti käyttökelpoinen, yleensä ei ole ennakoitavissa ennen kokeen suorittamista, onko erityinen heterologinen proteiini onnistuneesti erittynyt, käsitelty ja biologisesti aktiivinen. Ks. esim. EPO 206,783, supra (= yllä mainittu), s. 2 - 5; Rothblatt et al. (1987) EMBO J. 6: 3455 - 3463; V. L. MacKay, "Secretion of Heterologous Proteins in Yeast" (painossa).

On esitetty useita raportteja, jotka perustuvat julkaisemattomiin tietoihin, siitä, että deletiot alfa-faktoriohjaajan "pro"-alueelta (signaalipeptidin ja ensimmäisen välioson välistä) vähentävät olennaisesti ei-hiivaproteiinin määrää, joka eritetään hiivan avulla, joka on transformoitu heterologisilla rakenteilla. Sidu et al. (1987), Gene 54: 175 - 184, ovat esittäneet, että hiivahappofosfataasia (PHO5) eritetään väliaineeseen, joka on peräisin heterologisesta rakenteesta, käyttämällä sekä täysipituista alfa-faktoriohjaajaa että katkaistua alfa-faktoriohjaajaa, mutta ilmaisutasot ovat 3 - 4 kertaa pienempiä kuin PHO5-geenille sen homologisen ohjaajan valvonnassa. On myös esitetty, että deletiot preproalfa-faktoriesiastegeenissä alentavat olennaisesti luontaisen alfa-faktori-peptidin erittymistä. Ks. esim. V. L. MacKay, supra; Rothblatt et al., supra.

Tästä syystä on olemassa tarve parantaa alfa-faktoriekspressiojärjestelmää, etenkin sen soveltamiseksi ei-hiivaproteiineihin, joita ei valmisteta tehokkaasti nykyisillä alfa-faktori ekspressiorakenteilla.

Nyt on yllättävästi havaittu, että alfa-faktoriohjaajasekvenssin katkaistu muoto voi ohjata tehokkaasti heterologisten polypeptidien ekspressiota ja erittymistä hiivassa. Etenkin yllättävä oli se havainto, että katkaistut alfa-faktoriohjaajasekvenssit voivat parantaa olennaisesti täl-

laisten heterologisten proteiinien ekspression tehokkuutta suhteessa ekspressiojärjestelmiin, joissa käytetään täysipituista α -faktoriohjaajaa, s.o. heterologisten proteiinien oikean N-päätteen käsittely, erittymisen korkeammat tasot, jolloin molekyylien suurempi prosenttimäärä on biologisesti aktiivinen jne. Nämä tulokset ovat erityisen yllättäviä raporttien kannalta, joissa esitetään, että deleetio alfa-faktoriesiasteen ohjaajasekvenssistä alentaa aktiivisen alfa-faktorin erittymisen tasoja.

Tämä keksintö saa siten aikaan vaihtoehtoisia alfa-faktoriin perustuvia ekspressiorakenteita, joita voidaan käyttää etenkin heterologisten polypeptidien ilmaisemiseksi, jotka joko ilmaistaan tehottomasti täysipituuisilla alfa-faktoriohjaajarakenteilla tai joita ei ilmaista ollenkaan tällaisilla täysipituuisilla rakenteilla.

Tämän keksinnön eräs suoritustyyppi on kohdistettu hiivasoluun, joka käsittää DNA-rakenteen, joka saa aikaan ei-hiiva-proteiinin ekspression ja erittymisen, jolloin tämä DNA-rakenne käsittää koodaussekvenssin hiivalla tunnistettujen transskription aloitus- ja päätössekvenssien valvonnassa, jolloin esiastepolypeptidiä koodaava koodaussekvenssi koostuu ohjaajasekvenssistä ja ei-hiiva-proteiinista, joka on liitetty käsittelypaikalla, joka saa aikaan ei-hiiva-proteiinin lohkaisun esiastepolypeptidistä, jolloin ohjaajasekvenssi on pituudeltaan n. 25 - n. 50 esiastepolypeptidin N-terminaalista tähdettä ja käsittää hiivan alfa-faktoriesiasteen signaalipeptidin ja yhden ainoan glykosylointipaikan.

Tämän keksinnön eräs toinen suoritustyyppi kohdistuu kaksisäikeiseen DNA-molekyyliin, joka käsittää alueen, joka koodaa esiastepolypeptidiä, joka voidaan erittää hiivaisännän toimesta, jolloin alueen rakenne on toisen DNA-säikeen suhteen seuraava:

5'-AF-CHO-X_n-S-Gene*-3'

jossa AF koodaa hiivan alfa-faktorisignaali-peptidiä, CHO koodaa glykosylointipaikkaa, X_n koodaa pituudeltaan n aminohappoa käsittävää polypeptidiä, joka ei sisällä glykosylointipaikkaa tai käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun in vivo hiivalla, n on kokonaisluku 0 - n. 30, Gene* koodaa ei-hiiva-proteiiniä ja S koodaa käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun.

Tämän keksinnön kohteena ovat myös menetelmät yllä mainittujen solujen ja DNA-rakenteiden käyttämiseksi rekombinanttiproteiinien tuottamiseksi samoin kuin yllä mainituilla menetelmillä valmistettujen rekombinanttiproteiinien koostumukset. Muita suoritusmuotoja selviää helposti alän ammattihenkilölle.

Kuv. 1 on vuokaavio, joka esittää pYBCA5:n rakennetta ja esimerkissä I käytetyn synteettisen proinsuliinigeenin nukleotidi- ja aminohapposekvenssejä. Rakenteessa käytetyt erilaiset synteettiset oligonukleotidit on merkitty mustilla pisteillä. Sekvenssin yläpuolella olevat nuolet osoittavat B-, C- ja A-proinsuliiniketjujen alun ja lopun. Laatikot merkitsevät kaksiemäksisiä käsittelypaikkoja.

Kuv. 2 esittää synteettisen oligonukleotidin nukleotidi- ja aminohapposekvenssiä, joka koodaa muunnettua alfa-faktori-ohjaajaa ja proinsuliinigeenin ensimmäisiä 13 aminohappoa, joita käytetään esimerkin I mukaisen pYGAI3:n muodostamiseksi. Muunnetulla alfa-faktori-ohjaajalla on ollut glykosylointipaikat, jotka on poistettu muuttamalla Asn_{23,57,67}:n koodonit Gln:n (merkitty laatikolla) koodaamiseksi. Nuolet merkitsevät KEX2-endopeptidaasipaikkaa ja ihmisperäisen proinsuliinin N-päätettä koodaavan sekvenssin välistä liitosta.

Kuv. 3 esittää fragmentin pYGAI3 synteettistä geeniä, joka koodaa proinsuliinianalogia, jolloin KEX2-endopeptidaasi-

paikka on korvannut C-peptidin (merkitty laatikkoon). Esimerkissä II esitetyn synteettisen 133 emäsparin fragmentti on määritetty pystysuorilla ja vaakasuorilla viivoilla nukleotidisekvenssin läpi.

Kuv. 4 on hiivan sukkulavektorin (shuttle vector) pAB24 restriktiokartta.

Kuv. 5 esittää synteettisen geenin DNA-sekvenssiä, joka koodaa esimerkissä III esitettyä IGF1:tä.

Kuv. 6 esittää pYLUIGF1-55:n, esimerkissä III esitetyn ekspressiovektorin restriktiokarttaa, joka koodaa IGF1:tä katkaistun alfa-faktoriohjaajan valvonnassa.

Kuv. 7 on pYLUIGF1-24:n, esimerkissä III esitetyn ekspressiovektorin restriktiokartta, joka koodaa IGF1:tä kolme glykosylointipaikkaa sisältävän täysipituisen alfa-faktoriohjaajan valvonnassa.

Tämän keksinnön käytännön toteutuksessa käytetään, mikäli toisin ei ole mainittu, tavanomaista molekyylibiologiaa, mikrobiologiaa ja yhdistelmä-DNA-tekniikkoja alan tason puitteissa. Tällaiset tekniikat on selitetty täydellisesti kirjallisuudessa. Ks. esim. Maniatis, Fritsch & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning*, osat I & II (D. N. Glover, julk. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, julk. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, julk. 1984); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Tämän keksinnön selityksessä käytetään seuraavaa terminologiaa alla esitettyjen määritelmien mukaisesti:

"Replikoni" on geneettinen elementti (esim. plasmidi, kosmidi, kromosomi, virus), joka toimii DNA-replikaation autonomo-

misena yksikkönä in vivo, s.o. pystyy replikoitumaan omassa valvonnassaan.

"Vektori" on replikoni, kuten plasmidi, fagi tai kosmidi, johon toinen DNA-segmentti voidaan liittää kiinnitetyn segmentin replikaation suorittamiseksi.

"Kaksisäikeinen DNA-molekyyli" on deoksiribonukleotidien (adeniinin, tymidiinin tai sytosiinin) polymeerinen muoto sen normaalissa, kaksisäikeisessä kierteessä. Tämä käsite koskee ainoastaan molekyylin primaarista ja sekundaarista rakennetta eikä se rajoita sitä mihinkään erityiseen tertiäariseen muotoon. Siten tämä käsittää kaksisäikeisen DNA:n, joka tavataan mm. lineaarisissa DNA-molekyyleissä (esim. restriktiöfragmenteissa), viruksissa, plasmideissa ja kromosomeissa. Puhuttaessa erityisen kaksisäikeisen DNA-molekyylin rakenteesta tässä selitetään sekvenssejä normaalin tavan mukaisesti ilmoittaen ainoastaan sekvenssi 5' - 3' suunnassa DNA:n ei-transkriboitua säiettä pitkin, s.o. säiettä pitkin, jossa on erityisestä koodaussekvenssistä muodostetun mRNA:n suhteen homologinen sekvenssi.

DNA:n "koodaussekvenssi" on DNA-sekvenssi, joka voidaan transkriboida ja siirtää polypeptidin in vivo sijoittamalla sopivien säätelysekvenssien valvonnassa. Koodaussekvenssin rajat on määritetty translaation käynnistyskodonilla ja ne sisältävät tämän 5' (amino) -päänteessä ja translaation päätöskodonilla ja ne sisältävät tämän 3' (karboksi) -päänteessä. Koodaussekvenssi voi sisältää prokaryoottisia DNA-sekvenssejä, viraalisia DNA-sekvenssejä, cDNA- tai genomiDNA-sekvenssejä, jotka ovat peräisin eukaryoottisista lähteistä (esim. nisäkkäistä) ja jopa synteettisiä DNA-sekvenssejä rajoittamatta sitä kuitenkaan näihin.

"Hiivalla tunnistetut transkription aloitus- ja päätössekvenssit" koskevat DNA:n säätelyalueita, jotka sivuavat

koodaussekvenssiä ja vastaavat mRNA:n transkriptiosta hiivassa, joka on homologinen koodaussekvenssin suhteen, joka voidaan siirtää koodaussekvenssillä koodattuun polypeptidiin. Transkription aloitussekvenssit sisältävät hiivan aktivaattorisekvenssejä, jotka ovat DNA:n säätelysekvenssejä, jotka pystyvät sitomaan hiivan RNA-polymeraasin solussa ja aloittamaan myötävirtaan (3'-suunta) olevan koodaussekvenssin transkription. Tämän keksinnön määrittämiseksi aktivaattorisekvenssi on sidottu (ja se sulkee pois)

3'-päätessään koodaussekvenssin translaation käynnistyskodonilla ja se ulottuu vastavirtaan (5'-suunta), niin että se sisältää minimimäärän nukleotidejä tai elementtejä, jotka tarvitaan transkription aloittamiseksi tasoilla, jotka ovat havaittavissa nollavaikutuksen yläpuolella.

Aktivaattorisekvenssissä havaitaan transkription aloituspaikka (sopivasti määritetty kartoittamalla nukleaasilla S1) samoin kuin proteiinin sitomisaloja (konsensussekvenssejä), jotka vastaavat hiivan RNA-polymeraasin sitomisesta. Tässä keksinnössä käytettäviä aktivaattoreita ovat villi alfa-faktoriaktivaattori samoin kuin muut hiivan aktivaattorit. Erittäin edullisia aktivaattoreita ovat aktivaattorit, joita tarvitaan entsyymien kanssa glykolyttisellä tiellä, esim. fosfoglukoisomeraari, fosfofruktokinaasi, fosfotriooisiomeraasi, fosfoglukomutaasi, enolaasi, palorypähappokinaasi, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi, alkoholidehydrogenaasi samoin kuin näiden aktivaattoreiden hybridit. Ks. esim. EPO-julkaisut n:ot 120,551, 164,556. Transkription aloitussekvenssit voivat sisältää myös muita säätelyalueita, jotka vastaavat aktivaattorin säätelystä tai parantamisesta. Vastaavalla tavalla transkription päättäjasekvenssi, joka sijaitsee 3'-suunnassa translaation pysäytyskodonin suhteen, voi olla joko villi alfa-faktorin transkription päätössekvenssi tai jokin muu hiivalla tunnistettu päätössekvenssi, kuten sellaiset, jotka ovat peräisin yllä mainittujen glykolyttisten entsyymien geneistä.

Koodaussekvenssi on transkription aloitus- ja päätössekvenssien "valvonnassa" silloin, kun RNA-polymeraasi sitoo transkription aloitussekvenssin ja siirtää koodaussekvenssin mRNA:han, joka päättyy transkription päätössekvenssissä, ja mRNA siirretään sitten polypeptidiin, jota koodataan koodaussekvenssillä (esim. "ekspressio"). Tämän keksinnön mukaisilla koodaussekvensseillä koodattu esiastepolypeptidi "eritetään" silloin, kun vähintään osa (tavallisesti ei-hiivaproteiini ohjaajasekvenssin poissaollessa) siirretään solun ulkopuolelle, jolloin se löydetään solun kasvuvälialueissa. Tavallisesti ainoastaan osa esiaste proteiinista myötävirtaan ohjaajasekvenssistä eritetään ja tämä myötävirtaan oleva osa voidaan myös alistaa lisäkäsittelyyn erittymisen aikana, kuten proteolyttiseen lohkaisuun, glykosylointiin, taittamiseen (folding), disulfididoksen muodostamiseen jne.

Solu on "transformoitu" eksogeenisellä (ulkosyntyisellä) DNA:lla, kun tällainen eksogeeninen DNA on ohjattu soluseinämän sisäpuolelle. Eksogeeninen DNA voi olla integroitu tai sitten ei (kovalenttisesti liitetty) kromosomaaliseen DNA:han, joka muodostaa solun genomin. Eksogeeninen DNA voidaan säilyttää ekstrakromosomaalisesti replikonissa, kuten plasmidissa. Kun eksogeeninen DNA on integroitu kromosomiin, tytärsolut perivät sen kromosomireplikaation kautta. Solua, joka on transformoitu eksogeenisellä DNA:lla, joka on integroitu kromosomiin, kutsutaan "stabiilisti" transformoiduksi soluksi. "Klooni" tai "kloonipopulaatio" on solujen populaatio, joka on johdettu yhdestä ainoasta solusta tai yhteisestä kantaisästä (ancestor) mitoosilla.

Kaksi DNA-sekvenssiä ovat "olennaisesti homologisia", kun vähintään n. 60 % (edullisesti vähintään n. 75 % ja etenkin vähintään n. 90 %) nukleotideistä sopivat yhteen molekyylien määrättyllä pituudella. Sekvenssit, jotka ovat olennaisesti homologisia, voidaan tunnistaa Southern-

hybridisaatiokokeessa tälle erityiselle järjestelmälle vallittujen rajojen olosuhteissa. Sopivien hybridisaatioolosuhteiden määrittäminen on selvää alan ammattihenkilölle. Ks. esim. Maniatis et al., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

DNA-molekyylin "heterologinen alue" on DNA:n tunnistettavissa oleva segmentti suuremmissa DNA-molekyylissä, jota ei löydetä suuremman molekyylin yhteydessä luonnossa. Siten, kun heterologinen alue koodaan nisäkkään proteiinia, heterologista aluetta sivuaa tavallisesti DNA, joka ei sivua nisäkkään DNA-sekvenssiä lähdeorganismin genomissa. Eräs toinen esimerkki heterologisesta koodaussekvenssistä on rakenne, jossa itse koodaussekvenssiä ei löydetä luonnossa (esim. cDNA, jossa genomisen koodaussekvenssi sisältää introneja, tai synteettiset sekvenssit, joissa on organismeista poikkeavia kodoneja, jotka koodaavat samaa tai erilaista proteiinia). Alleeliset muunnokset tai luonnossa esiintyvät mutationaaliset tapahtumat eivät saa aikaan tässä käytettyä DNA:n "heterologista" aluetta.

Tässä käytettynä "hiiva" sisältää askosporogeeniset hiivat (Endomycetales), basidiosporogeeniset hiivat ja vaillinaissieniin (Blastomycetes) kuuluvat hiivat. Askosporogeeniset hiivat on jaettu kahdeksi heimoksi, nimittäin Spermophthoraceae ja Saccharomycetaceae. Viimeksi mainittu koostuu neljästä alaheimosta, nimittäin Schizosaccharomycoideae (esim. suku Schizosaccharomyces), Nadsonioideae, Lipomycoideae ja Saccharomycoideae (esim. suvut Pichia, Kluyveromyces ja Saccharomyces). Basidiosporogeeniset hiivat sisältävät suvut Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus, Filobasidium ja Filobasidiella. Vaillinaissieniin (Fungi imperfecti) kuuluvat hiivat on jaettu kahdeksi heimoksi, nimittäin Sporobolomycetaceae (esim. suvut Sporobolomyces, Bullera) ja Cryptococcaceae (esim. suku Candida). Erittäin mielenkiintoisia ovat Saccharomyces-lajit S. cerevisiae, S. carlsber-

gensis, S. diastaticus, S. douglasii, S. kluyveri, S. nor-
bensis ja S. oviformis. Suvussa Kluyveromyces erittäin mie-
lenkiintoinen laji on K. lactis. Koska hiivan luokittelu voi
muuttua tulevaisuudessa, hiiva määritetään julkaisun *Biology*
and Activities of Yeast mukaisesti (F. A. Skinner, S. M.
Passmore & R. R. Davenport, julk. 1980) (Soc. App. Bacteri-
ol. Symp. Series n:o 9). Tämän lisäksi alan ammattihenkilöt
tuntevat oletettavasti hiivan biologian ja hiivagenetiikan
manipuloinnin. Ks. esim. *Biochemistry and Genetics of Yeast*
(M. Bacila, B. L. Horecker & A. O. M. Stoppani, julk. 1978);
The Yeasts (A. H. Rose & J. S. Harrison, julk., 2. painos,
1987); *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*
(Strathern et al., julk. 1981). Edellä olevien viitejulkai-
sujen selitykset on liitetty tähän viitteenä.

Tässä keksinnössä käytetään katkaistuja ohjaajasekvenssejä
hiivan alfa-faktorigeenistä. alfa-faktori on oligopeptidin
liittävä feromoni, joka on pituudeltaan n. 13 tähdettä ja
joka on valmistettu suuresta esiastepolypeptidistä, joka on
pituudeltaan n. 100 - 200 tähdettä (tavallisesti n. 120 -
160) (prepro-alfa-faktori). Esiaste koostuu hydrofobisesta
"signaalisekvenssistä", joka sisältää n. 20 tähdettä (esim.
n. 19 - 23, tavallisesti n. 20 - 22), jota seuraa ylimääräi-
nen ohjaaja-alue, jossa on n. 60 hydrofiilistä tähdettä
("pro"alue), ja joka liitetään sitten useiksi valmiin fero-
monisekvenssin tandem-toistoiksi (tavallisesti n. 2 - 6),
jotka on erotettu lyhyillä oligopeptidivälialueilla
(tavallisesti n. 6 - 8 tähdettä), jotka huolehtivat
proteolyyttisestä käsittelystä valmiiksi feromoniksi.

Kirjallisuudessa on esitetty erilaisten prepro-alfa-faktori-
geenien kloonauksia. Ks. esim. Kurjan et al., US-patentti n:o
4,546,082; Singh et al. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11: 4049 -
4063; yhteisomistuksessa oleva US-patenttihakemus n:o
078,551, jätetty 28.7.1987 (vastaa FI-hakemusta 883541),
joiden selitykset on otettu tähän viitteeksi. Lisäksi DNA-

sekvenssit, jotka koodaavat prepro-alfa-faktorigeeniä, voidaan tunnistaa hybridisoimalla koettimilla tunnetuista prepro-alfa-faktorisekvensseistä. Ks. esim. Brake et al. (1983) *Molec. & Cell Biol.* 3: 1440 - 1450. alfa-faktori voi olla myös puhdistettu hiivalajista, sekvenssoitu ja koettimia suunniteltu kloonaamaan prepro-alfa-faktorigeeniä. Ks. esim. McCullough et al. (1979) *J. Bacteriol.* 138: 146 - 154; Sato et al. (1981) *Agric. Biol. Chem.* 44: 1451 - 1453; Singh et al. (1983), supra. On myös määritetty, että alfa-faktoriohjaajasekvenssi, joka on peräisin yhdestä hiivalajista, voi olla toiminnallinen toisessa hiivalajissa. Ks. esim. USSN 078,551, supra. Siten tämän keksinnön tehtävänä ei ole ainoastaan hiivasta peräisin olevien alfa-faktoriohjaajasekvenssien käyttö yleensä, vaan tällaisten ohjaajasekvenssien käyttö heterologisissa hiivalajeissa. Yksinkertaisuuden vuoksi keksintöä selitetään *S. cerevisiae*'sta peräisin olevan prepro-alfa-faktorigeenin MFal muodossa. Ks. esim. Kurjan et al., US-patentti n:o 4,546,083; Singh et al. (1983), supra.

Tässä keksinnössä käytetään kimeerisiä DNA-rakenteita, jotka koodaavat hybridiesiastepolypeptidejä, jotka koostuvat ohjaajasekvenssistä ja ei-hiiva-polypeptidistä. Tämän keksinnön tarkoituksia varten ohjaajasekvenssi-DNA määritellään alkavaksi esiastepolypeptidin N-terminaalisisä käynnistyskodonissa (metioniini) ulottuen kodoniin, joka koodaa viimeistä aminohappotähdettä ennen käsittelypaikkaa, joka tulee ohjaajasekvenssin ja ei-hiiva-proteiinia koodaavan sekvenssin väliin. Tämän keksinnön mukainen ohjaajasekvenssi koostuu hiivan alfa-faktoriohjaajasekvenssin katkaistusta muodosta, joka on pituudeltaan tavallisesti n. 25 - n. 50 aminohappotähdettä. Siten tämän keksinnön mukainen ohjaajasekvenssi on n. 30 aminohappotähdettä lyhyempi kuin tavomainen täysipituinen alfa-faktoriohjaaja. MFal esimerkiksi sisältää ohjaajasekvenssin, jossa on 83 aminohappotähdettä, joita seuraa heksapeptidi-väliosasekvenssi, joka voidaan

lohkaista hiivan käsittelyentsyymeillä. Tehtäessä deleetioita ohjaajasekvenssistä on tärkeää, että vähintään yksi glykosylointipaikka (-Asn-Y-Thr/Ser-) jätetään tehokkaan erittymisen aikaansaamiseksi.

On myös tarpeen, että ohjaaja pidättää funktionaalisen alfa-faktorisignaalisekvenssin. Kuten yllä on esitetty, signaali-peptidi on tavallisesti pituudeltaan n. 20 aminohappoa ja ominaispiirteinä on hydrofobinen ydin. Ks. esim. von Heijne, (1984) J. Mol. Biol. 173: 243 - 251. Kaikki tänä päivänä tutkitut prepro-alfa-faktorisekvenssit koodaavat hydrofobisen peptidiä, joka on pituudeltaan n. 20 tähdettä. Vaikka esiastepolypeptidin ohjaamiseksi erittymistielle tarvittavan signaali-peptidin tarkkaa pituutta ei ole määritelty, se tarvitsee tavallisesti n. 19 - n. 23 tähdettä, jolloin tarvittava minimisekvenssi voidaan helposti määrittää testaamalla deleetiomutantteja.

Siten viitaten MFal:iin tällä keksinnöllä tarkastellaan deleetioita, jotka sisältävät n. 30 - 60 tähdettä, tavallisesti n. 33 - n. 58 tähdettä ja etenkin n. 48 - 58 tähdettä. Nämä deleetiot tapahtuvat yleensä tähteiden 26 ja 83 välisellä alueella. On edullista, että deleetiot sisältävät glykosylointipaikat tähteissä 57 - 59 ja 67 - 69. Poistetut alfa-faktoriohjaajasekvenssit voidaan korvata osittain haluttaessa ei-alfa-faktoriohjaajasekvensseillä. Sekvenssien tulisi yleensä koodata hydrofiilisiä aminohappotähteitä, niiden ei tulisi koodata glykosylointi- tai käsittelypaikkoja ja mieluummin ne tulisi valita siten, että säilytetään ohjaajan koko pituutena korkeintaan n. 50 tähdettä, edullisesti n. 23 - 40 tähdettä ja etenkin n. 25 - 35 tähdettä.

Kuten yllä esitettiin, tämän keksinnön mukaisessa ohjaajasekvenssissä on välittömästi 3'-suunnassa käsittelypaikka, joka mahdollistaa ohjaajan lohkaisun ei-hiiva-proteiinisekvenssistä, johon se on liitetty esiastepolypeptidissä. Tässä

keksinnössä käytetty käsittelypaikka on määritetty kodoneiksi, jotka rajaavat minimimäärän aminohappoja, jotka tunnustetaan spesifisesti lohkaisun suhteen valitulla menetelmällä (esim. kemiallisella, entsyymaattisella jne.). Alalla tunnetaan erilaisia käsittelypaikkoja mukaanlukien sellaiset, jotka ovat aktiivisia sekä in vivo että in vitro. Esimerkiksi käsittelypaikka voi huolehtia in vitro-käsittelystä koodaamalla proteolyyttisen entsyymin lohkaisupaikkaa, joka ei esiinny hiivaisännässä. Talteenotettu esiastepolypeptidi voitaisiin sitten käsitellä entsyymillä ei-hiiva-proteiinin lohkaistuksi esiasteesta. Eräs toinen in vitro-käsittelypaikka on metioniinikodoni, joka voidaan lohkaista post-ekspressiökäsittelyllä syaanibromidilla. Ks. esim. US-patentti n:o 4,366,246.

In vivo-käsittelypaikkoja voidaan valita mistä tahansa peptidisignaaleista, jotka tunnustetaan hiivan proteolyyttisellä entsyymillä, joka saa aikaan halutun ei-hiiva-proteiinisekvenssin ekspression. Etenkin edullisia käsittelypaikkoja ovat niiden entsyymien käsittelypaikat, jotka ovat osallisia luontaisen prepro-alfa-faktorin käsittelyssä. Esimerkiksi dipeptidyyliaminopeptidaasi A (DPAPaasi A) poistaa terminaaliset -X-Ala-sekvenssit, joissa X on Glu tai Asp. Ks. esim. Julius et al. (1983) Cell 32: 839 - 852. KEX2-geenillä koodattu endopeptidaasi lohkaistaa emäksisiä dipeptidejä, jotka koostuvat Lys- ja Arg-tähteistä, s.o. Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys ja Lys-Lys. Fuller et al., Microbiology 1986, s. 273 - 278 (1986). Hiivassa alfa-faktoriesiaste lohkaistetaan ensin KEX2-endopeptidaasilla ja sitten N-päätteet säädetään DPAPaasi A:lla valmiin alfa-faktoriferomonin aikaansaamiseksi. Koska nähdään, että viimeksi mainittu proteolyttinen prosessi on melko rajoittava vaihe, on edullista eliminoida DPAPaasi A:n signaalit siten, että käsittelypaikka koostuu ainoastaan KEX2-endopeptidaasin signaalista. Tällaisessa suoritusmuodossa ohjaajasekvenssi liitetään tästä syystä ei-hiiva-proteiinisekvenssiin KEX2-endopeptidaasin

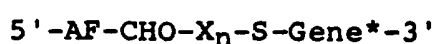
kaksiemäksisen peptidin tunnistuspaikalla, kuten Lys-Arg tai Arg-Arg.

Tämän keksinnön mukaisen esiaste-polypeptidin karboksi-terminaalinen osa on ei-hiiva-proteiini. Tätä osaa koodaava DNA-sekvenssi määritetään tässä siten, että se alkaa ensimmäisellä kodonilla myötävirtaan (3'-suunnassa) käsittelypaikan viimeisestä kodonista ulottuen translaation pysäytyskodoniin, joka määrittää esiaste-polypeptidin karboksi-terminaalin. Tämän DNA-sekvenssin katsotaan koodaavan "ei-hiiva-proteiinia", kun se koko sekvenssissään rajaa polypeptidin, joka ei ole olennaisesti homologinen polypeptidin suhteen, joka ilmaistaan hiivalla. Yleensä edullisia ei-hiiva-proteiineja ovat nisäkkäiden proteiinisekvenssit (mukaanlukien niiden analogit; s.o. "muteiinit", fragmentit jne.). Tässä määriteltynä ei-hiiva-proteiinit voivat tästä syystä sisältää fuusioproteiinin, joka koostuu nisäkkään ja hiivan sekvensseistä, samoin kuin valmiin nisäkkään proteiinin "pro"muodot.

Ei-hiiva-proteiineja koodaavat DNA-sekvenssit voivat olla sekvenssejä, jotka on kloonattu ei-hiiva-organismista, tai ne voivat olla synteettisiä sekvenssejä, jotka on tavallisesti valmistettu käyttämällä hiivalle edullisia kodoneja. Tavallisesti ei-hiiva-proteiinit ovat pituudeltaan vähintään n. 8 aminohappoa ja ne voivat sisältää polypeptidejä, jotka ovat n. 100.000 daltonia tai enemmän. Tavallisesti ei-hiiva-polypeptidisekvenssi on alle n. 300.000 daltonia ja tavallisimmin alle n. 150.000 daltonia. Eriyisen mielenkiintoisia ovat polypeptidit, jotka ovat n. 5.000 - n. 150.000 daltonia, etenkin n. 5.000 - n. 100.000 daltonia. Esimerkkeinä mielenkiintoisista ei-hiiva-proteiineista mainittakoon hormonit ja tekijät, kuten kasvuhormoni, somatomeidiinit, epidermaalinen kasvutekijä, luteinisoiva hormoni, kilpirauhasta stimuloiva hormoni, oksitosiini, insuliini, vasopressiini, reniini, kalsitoniini, follikkelia stimuloiva hormoni, prolaktii-

ni, erytropoietiini, pesäkkeitä stimuloivat tekijät, lymfo-kiinit, kuten interleukiini-2, globiinit, immunoglobuliinit, interferonit (esim. a, b tai q), entsyymit, b-endorfiini, enkefaliini, dynorfiini, insuulinin kaltaiset kasvutekijät jne.

Tämän keksinnön eräessä edullisessa suoritusmuodossa DNA-rakenteilla, jotka koodaavat yllä esitettyjä esiaste-polypeptidejä, on seuraava rakenne:



jossa AF koodaa hiivan alfa-faktorisignaali-peptidiä, CHO koodaa glykosylointipaikkaa, X_n koodaa pituudeltaan n aminohapon olevaa polypeptidiä, joka ei sisällä glykosylointipaikkaa tai käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun in vivo isäntähiivalla, n on kokonaisluku 0 - n. 30, Gene* koodaa ei-hiiva-proteiinia ja S koodaa käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun.

AF:llä koodattu signaali-peptidi on sama yllä esitetty alfa-faktorisignaali-peptidi. Se on pituudeltaan n. 20 tähdettä (esim. n. 19 - 23) ja se on riittävän pituinen esiastepolypeptidin ohjaamiseksi hiivan erittymistielle. Tarkka minimi- tai maksimipituus voidaan määrittää erityiselle alfa-faktorille analysoimalla joukko deleetiorakenteita.

CHO:lla määritetty DNA-sekvenssi koodaa glykosylointipaikkaa. Se on yleensä pituudeltaan 9 nukleotidiä mukaanlukien aminohappojen Asn-Y-Y' kolme kodonia, jolloin Y on mikä tahansa aminohappotähde ja Y' on Thr tai Ser.

X_n koodaa, mikäli läsnä, esimerkiksi alfa-faktoriohjaajan osia, joita ei ole poistettu tai jotka eivät ole erillisiä aminohapposekvenssejä. Yleensä X_n on pituudeltaan maksimaa-

lisesti n. 30 aminohappotähdettä, edullisesti maksimaalisesti n. 20 tähdettä ja etenkin maksimaalisesti n. 10 tähdettä. Vaikka ei ole tarpeen, että X_n koodaa mitään polypeptidejä (s.o., $n = 0$), voi olla toivottavaa saada aikaan hiukan tilaa glykosylointipaikan CHO ja käsittelypaikan S väliin siinä tapauksessa, että hiilihydraattiadditiot glykosylointipaikassa estävät steerisesti aineen pääsyn, joka lohkaisee käsittelypaikat. Tällaisessa tapauksessa n on tavallisesti vähintään n. 1, etenkin vähintään n. 2 ja etenkin vähintään 3.

On edullista, jos X_n , mikäli se on läsnä, ei sisällä mitään funktionaalisia glykosylointipaikkoja tai käsittelypaikkoja, jotka tunnistetaan ja lohkaistaan hiivaisännällä. Edelleen poikettaessa alfa-faktoriohjaajassa havaituista sekvensseistä on edullista valita hydrofiilisiä aminohappotähteitä. On mahdollista, että X_n vaikuttaa ei-hiiva-proteiinin ekspresion ja erittymisen tehokkuuteen. X_n :n sopivan pituuden valinta ekspresion optimoimiseksi voidaan suorittaa analysoimalla erikokoisia rakenteita.

Gene*:llä koodattu ei-hiiva-proteiini ja S:llä koodattu käsittelypaikka on selitetty yllä.

Tämän keksinnön mukaiset DNA-rakenteet pidetään tavallisesti replikonissa, joka pystyy säilyttämään ne stabiilisti isännässä, etenkin hiivaisännässä. Replikonit, tavallisesti plasmidit sisältävät yhden tai useamman replikaatiojärjestelmän, edullisesti kaksi replikaatiojärjestelmää, jotka mahdollistavat replikonin ylläpitämisen sekä hiivaisännässä ekspressiota varten että prokaryoottisessa isännässä kloonauksia varten. Esimerkkeinä tällaisista isäntä-bakteerisukulavektoreista mainittakoon YPp24 (Botstein et al. (1979) Gene 8: 17 - 24), pCl/1 (Brake et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642 - 4646) ja YRp17 (Stnichomb et al. (1982) J. Mol. Biol. 158: 157). Edelleen plasmidieks-

pressiovektori voi olla suuren tai pienen kopiomäärän plasmidi, jolloin kopiomäärä on yleensä n. 1 - n. 200. Suuren kopiomäärän hiivavektoreilla yhdessä ainoassa isännässä on yleensä vähintään 10, etenkin vähintään 20 ja tavallisesti korkeintaan n. 150 kopiota. Riippuen valitusta ei-hiiva-proteiinista joko suuren tai pienen kopiomäärän vektori voi olla toivottava riippuen vektorin ja vieraan proteiinin vaikutuksesta isäntään. Ks. esim. Brake et al., supra. Tämän keksinnön mukaiset DNA-rakenteet voidaan myös integroida isäntägenomiin integrointivektorilla. Alalla tunnetaan esimerkkejä tällaisista vektoreista. Ks. esim. Botstein et al., supra.

Sopivan hiiva- ja muiden mikro-organismi-isäntien valinta tämän keksinnön käytännön toteutusta varten on alan tason puitteissa. Valittaessa hiivaisäntiä ekspressiota varten sopivia isäntiä voivat olla sellaiset, joilla on mm. hyvä eritys-kyky, alhainen proteolyttinen aktiivisuus ja yleisrakenne. Hiiva ja muut mikro-organismit ovat yleisesti saatavilla useista lähteistä, esim. Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, California ja American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Menetelmät eksogeenisen DNA:n ohjaamiseksi hiivaisäntään ovat hyvin tunnettuja alalla. On olemassa useita tapoja hii-
van transformoimiseksi. Esimerkiksi on esitetty sferoplas-
titransformaatiota (esim. Hinnen et al. (1978) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 75: 1919 - 1933, ja Stinchcomb et al., EPO-
julkaisu n:o 45,573). Transformantit kasvatetaan sopivassa
ravintoväliaineessa ja säilytetään tarvittaessa selektiivi-
sessä paineessa endogeenisen DNA:n pidättämisen varmistami-
seksi. Milloin ekspressio on indusoitavissa, isäntähiivan
kasvu voidaan sallia suuritiheyksisten solujen tuottamiseksi
ja ekspressio indusoidaan. Erittynyt, käsitelty ei-hiiva-
proteiini voidaan kerätä tavanomaisella tavalla ja puhdistaa

kromatografialla, elektroforeesilla, dialyysillä, liuotinliuotin-uutolla tai vastaavalla.

Esimerkkejä

Seuraavat esimerkit ovat ainoastaan havainnollistavia eikä niiden tarkoituksena ole rajoittaa keksinnön piiriä. Uskotaan, että lähtöaineina käytettyjen biologisten materiaalien talletus ei ole tarpeen tämän keksinnön käytännön toteuttamista varten, koska joko samanlaisia tai ekvivalenttisia materiaaleja on yleisesti saatavilla.

I

Seuraavassa esimerkissä verrataan ilmaisun ja erittymisen tasoja, jotka saadaan modifioiduilla alfa-faktorirakenteilla, joita käytetään ihmisperäisen proinsuliinin ilmaisemiseksi. Kolmessa rakenteessa käytetään täysipituisia alfa-faktoriohjaajia, yhdessä on alfa-faktoriohjaaja, jossa on kolme luontaista glykosylointipaikkaa, yhdessä kaikki kolme glykosylointipaikkaa on eliminoitu, ja yhdessä kaikki paikat on poistettu lukuunottamatta yhtä asemassa Asn₂₃.

A. pYGAI1

Tämä plasmidi koodaa alfa-faktoriohjaajaa (Brake et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642 - 4646; EPO-julkaisu n:o 116,201), joka on liitetty ihmisperäiseen proinsuliiniin. Proinsuliinia koodataan synteettisellä geenillä, joka on valmistettu hiivalle edullisilla kodoneilla (kuv. 1). alfa-faktoriohjaajasekvenssi, synteettinen proinsuliinigeeni ja alfa-faktori-päätössekvenssi ovat pYBCA5:stä, jonka rakenne on esitetty kuviossa 1. Transkriptio välitetään 404 emäsparin BamHINcoI GAPDH-aktivaattorifragmentilla. Travis et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 4384

- 4389. 1206 emäsparin BamHI-ekspressiokasetti, joka koostui GAPDH-aktivaattorista, proinsuliiniin liitettyä alfa-faktoriohjaajaa koodaavasta sekvenssistä ja alfa-faktori-terminaattorista, kloonattiin hiivan sukkulavektorin pAB24 (alla) tai pCl/1 erikoiseen BamHI-paikkaan siten, että GAPDH-aktivaattorisekvenssi oli lähinnä vektorin Sali-paikkaa plasmidien pYGAI1-AB24 tai vast. pYGAI1-Cl/1 tuottamiseksi. 1206 emäsparin BamHI-ekspressiokasetti alakloonattiin myös pBR322:n johdannaisen erikoiseen BamHI-paikkaan (pBR322 (WEcoRI-Sali)BamHI, Travis et al. supra). Tätä plasmidia kutsuttiin pGAI1:ksi.

Plasmidi pAB24 (kuv. 4) on hiivan sukkulavektori, joka sisältää täydellisen 2m-sekvenssin (Broach, Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Vol., 1, s. 445 (1981)) ja pBR322-sekvenssit. Se sisältää myös hiivan URA3-geenin, joka on johdettu plasmidista YEp24 (Botstein et al. (1979) Gene 8: 17) ja hiivan LEU2d-geenin, joka on johdettu plasmidista pCl/1. (EPO-julkaisu n:o 116,201). Plasmidi pAB24 muodostettiin sulattamalla YEp24 EcoRI:llä ja liittämällä uudelleen vektori osittaisten 2m sekvenssien poistamiseksi. Muodostunut plasmidi YEp24WRI linearisoitiin sulattamalla ClaI:llä ja liitettiin täydellisellä 2m plasmidilla, joka oli linearisoitu ClaI:llä. Muodostunut plasmidi pCBou sulatettiin sitten XbaI:llä ja 8605 emäsparin vektorifragmentti geelieristettiin. Tämä eristetty XbaI-fragmentti liitettiin 4460 emäsparin XbaI-fragmentilla, joka sisälsi pCl/1:stä eristetyn LEU2d-geenin, jonka suuntaus oli samassa suunnassa kuin URA3-geenin.

B. pYGAI3

Plasmidi pYGAI3 poikkeaa pYGAI1:stä siinä, että se koodaa modifioitua alfa-faktoriohjaajaa, jossa Asn:n kodonit tähteissä 23, 57 ja 67 on muutettu Gln:n koodaamiseksi, jolloin eliminoidaan kaikki kolme N-liitetyn glykosyloinnin signaalia.

Tällä plasmidilla koodattu alfa-faktoriohjaaja ja proinsuliinin N-terminaalien 13 aminohappoa muodostettiin liittämällä synteettiset oligonukleotidit 294 emäsparin fragmentin muodostamiseksi, jossa on 5' NcoI-uloke (overhang) ja 3' HindIII-uloke, joiden sekvenssi on esitetty kuviossa 2. Sopivien oligonukleotidien sekvenssiä vaihdettiin synteessin aikana, niin että kodonit, jotka spesifioivat Asn:n luonnollisen alfa-faktoriohjaajan asemassa 23, 57 ja 67, spesifioivat nyt Gln:n samoissa asemassa. Proinsuliinin N-terminaalien 13 aminohappoa spesifioiva DNA-sekvenssi oli identtinen pYGAI1:ssä olevan kanssa. 294 emäsparin synteettinen DNA (NcoI-HindIII) -fragmentti laitettiin pGAI1:n ja pYGAI1-C1/1:n verrattavissa olevan fragmentin tilalle, jotka tuottivat plasmidit pGAI1 ja vast. pYGAI3.

C. pYGAI8

Plasmidi pYGAI8 sisältää DNA:n, joka koodaa alfa-faktoriohjaajan, joka eliminoi kaksi kolmesta glykosylointipaikasta. Asn_{57,67} on modifioitu Gln_{57,67}:ksi. Muodostuneessa plasmidissa on ainoastaan yksi ainoa glykosylointipaikka asemassa Asn₂₃. pYGAI8 valmistettiin seuraavasti.

Ensiksi 5'-fragmentti eristettiin pGAI1:n ekspressiokasetista leikkaamalla HpaII:llä ja sitten BamHI:llä ja sitten geelieristämällä 504 emäsparin fragmentti, joka sisälsi GAPDH-aktivaattorin ja sekvenssin, joka koodaa alfa-faktoriohjaajan tähteitä 1 - 33. Seuraavaksi glykosylointipaikkoja vaille olevaa alfa-faktoriohjaajaa koodaava plasmidi pYGAI3 leikattiin myös peräkkäin HpaII:llä ja BamHI:llä ja eristettiin 702 emäsparin fragmentti, joka sisälsi sekvenssit, jotka koodaavat modifioituja alfa-faktoriohjaajatähteitä 34 - 83, LysArg-käsittelypaikkaa, proinsuliinisekvenssiä ja alfa-faktoriterminaatiosekvenssiä. Tämä fragmentti liitettiin sitten 504 emäsparin fragmenttiin, joka oli peräisin pGAI1:stä, leikattiin BamHI:llä ja eristettiin 1206 emäsparin fragmentti.

Yllä oleva 1,2 ke:n BamHI-fragmentti, joka sisälsi täydellisen GAPDH-aktivaattori/alfa-faktoriohjaja/proinsuliini/alfa-faktoriterminaattori-ekspressiokasetin, liitettiin sitten BamHI-leikattuun ja fosfataasi-käsiteltyyn pBR322(WEcoRI-SalI)BamHI:hin, jolloin saatiin plasmidi pGAI8, joka kloonattiin E. coliin.

pGAI8:sta 1,2 ke:n ekspressiokasetti poistettiin leikkamalla BamHI:llä ja sitten fragmentti geelieristettiin. Se liitettiin BamHI-leikattuun ja fosfataasi-käsiteltyyn hiivan sukkulavektoriin pAB24. Ekspressiokasetin sovitus oli pBR322-sekvenssien erikoisessa BamHI-paikassa sellainen, että GAPDH-aktivaattori oli lähinnä vektorin erikoista SalI-paikkaa. Tämä plasmidi oli pYGAI8.

D. pYGAI7

Plasmidi pYGAI7 sisältää DNA:n, joka koodaa katkaistua alfa-faktoriohjaajaa ja ihmisperäisen proinsuliinin synteettistä geeniä. alfa-faktoriohjaaja on katkaistu siten, että se koodaa ainoastaan alfa-faktoriohjaajan aminohapot 1 - 35 ja tästä syystä se sisältää yhden ainoan glykosylointipaikan asemassa Asn₂₃. Tämä hiivan ekspressiovektori muodostettiin seuraavasti.

Ensiksi pGAI1 leikattiin HindIII:lla. Seuraavan rakenteen omaava HpaII-HindIII-liittäjä lisättiin:

5'-CGGCTAAAAGATTTCGTTAACCAACACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGA
CGATTTTCTAAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGA-5'

Liittäjän lisäyksen jälkeen linearisoitu plasmidi leikattiin BamHI:llä ja 558 emäsparin HpaII-BamHI-fragmentti geelieristettiin. Tämä fragmentti sisältää kodonit alfa-faktoriohjaajan tähteille 34 - 35, joka on liitetty suoraan Lys-Arg-kä-

sittelypaikkaan ja proinsuliinisekvenssin. Ei ole mitään häiritseviä sekvenssejä alfa-faktoriohjaajan tähteen 35 kodonin ja suoraan proinsuliinisekvenssin vieressä olevan käsittelypaikan välissä.

Seuraavaksi pGAI1 leikattiin HpaII:llä ja BamHI:llä ja 504 emäsparin fragmentti geelieristettiin. Tämä fragmentti sisältää GAPDH-aktivaattorin ja nukleotidit, jotka koodaavat alfa-faktoriohjaajan aminohappoja 1 - 33, 3'-päättä, joka päättyy HpaII-ulokkeeseen, joka on komplementaarinen yllä esitetyn 558 emäsparin HpaII-BamHI-fragmentin 5'-pään suhteen. Nämä kaksi fragmenttia liitettiin yhteen ja leikattiin BamHI:llä, jolloin saatiin ekspressiokasetti, joka sisälsi GAPDH-aktivaattorin, sekvenssit, jotka koodaavat modifioitua alfa-faktoriohjaajaa, joka sisältää tähteet 1 - 35, jotka on liitetty suoraan Lys-Arg-käsittelypaikkaan, proinsuliinigeenin ja alfa-faktoriterminaattorin. Kasetti liitettiin sitten pBR322(WEcoRI-SalI)BamHI:n BamHI-paikkaan, kuten yllä on esitetty, jolloin saatiin plasmidi pGAI7 ja kloonattiin E. coliin.

pGAI7 leikattiin sitten BamHI:llä ja 1062 emäsparin ekspressiokasetti geelieristettiin. Ekspressiokasetti liitettiin sitten pAB24:n BamHI-paikkaan, jolloin saatiin plasmidi pYGAI7.

E. Vertailuesimerkkejä

Plasmidi pYGAI1-C1/1, pYGAI3, pYGAI1-AB24, pYGAI7 ja pYGAI8 transformoitiin Saccharomyces cerevisiae-kantaan AB103.1 (Mata, leu2-3,112, ura3-52, his4-580, pep4-3[cir⁰]) olennaisesti julkaisussa Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929 - 1933 esitetyllä tavalla. pYGAI1-C1/1:n ja pYGAI3:n transformantit valittiin leusiini-prototrofiaa varten, muiden plasmidien transformantit valittiin ura-prototrofiaa varten.

Taulukossa I esitetyissä arvoissa verrataan proinsuliinin erittymistä, joka on välitetty luonnollisella alfa-faktoriohjaajalla (pUGAI1-C1/1) tai alfa-faktoriohjaajalla, jossa on Gln, joka on Asn:n tilalla asemissa 23, 57 ja 67 (pYGAI3). Istuteviljelyjä (0,2 ml yksilöllistä transformanttia) kasvatettiin 48 tunnin ajan synteettisessä täydellisessä väliaineessa, josta puuttui leusiini (SD-leu; Sherman et al., *Methods in Yeast Genetics*, s. 62, Gold Spring Harbor Laboratory, 1982) ja laimennettiin 20-kertaiseksi samaan väliaineeseen. Viljelyjä kasvatettiin 48 - 72 tunnin ajan, viljelysupernatantit valmistettiin linkoamalla ja ne analysoitiin immunoreaktiivisen ristireagoivan insuliinin kaltaisen materiaalin (ILM) suhteen kilpailuradioimmunoanalyysissä ^{125}I leimatulla insuliinilla. Kuten taulukosta 1 voidaan nähdä, näiden kolmen glykosylointipaikan eliminointi alfa-faktori ohjaajasta saa aikaan sen, että insuliinin kaltaista materiaalia ei erity olennaisesti ollenkaan verrattuna luonnollisella alfa-faktoriohjaajalla välitettyyn.

Taulukossa 2 esitetyissä arvoissa verrataan pGYAI1-pAB24:n (täysipituisen luontaisen alfa-faktoriohjaajan), pYGAI8:n (täysipituisen, ainoastaan yhden glykosylointipaikan asemassa Asn₂₃ sisältävän alfa-faktoriohjaajan) ja pYGAI7:n (katkaistun, ainoastaan yhden ainoan glykosylointipaikan asemassa Asn₂₃ sisältävän alfa-faktoriohjaajan) transformanteja niiden kyvyn suhteen erittää insuliinin kaltaista materiaalia. Esitettyjen transformanttien (0,2 ml) istuteviljelyst, joita oli kasvatettu SD-Leu:ssa 48 tunnin ajan 30°C:ssa, pelletoitettiin linkoamalla, pestiin ja laimennettiin 20-...50-kertaiseksi ura⁻-väliaineeseen. Tämä väliaine sisältää 0,67 % hiivatyypiemästä, 1 % meripihkahappoa, 0,35 % NaOH:ta, 0,5 % kasaminohappoja, 2 % glukoosia, 0,005 % adeniinia, 0,01 % tryptofaania ja 0,02 % treoniinia. Viljelyjä kasvatettiin 30°C:ssa 48 - 72 tunnin ajan ja viljelysupernatantit valmistettiin ja analysoitiin yllä esitetyllä tavalla. Taulukossa 2 esitetyt arvot osoittavat, että

transformantit, joissa oli rakenne, jossa käytetään katkaistua alfa-faktoriohjaajaa, joka sisälsi yhden glykosylointi-paikan asemassa Asn₂₃, erittivät yleensä enemmän immunoreak-tiivista insuliinin kaltaista materiaalia kuin transforman-tit, joissa oli täysipituisen luontaisen alfa-faktoriohjaa-jan sisältävä rakenne. Transformantit, joissa oli rakenne, joka sisälsi täysipituisen alfa-faktoriohjaajan, jossa oli sama ainoa glykosylointipaikka (Asn₂₃), erittivät paljon vä-hemmän ristireagoivaa insuliinimateriaalia kuin transforman-tit, joissa oli täysipituinen luontainen a-faktoriohjaaja tai katkaistu alfa-faktoriohjaaja.

Taulukko 1. alfa-faktoriohjaajan glykosylointipaikkojen eli-minoinnin vaikutus insuliinin kaltaisen materiaalin eritty-miseen

<u>Transformantti</u>	OD ₆₅₀	<u>ILM¹</u>	
		mg/ml	mg/ml, OD ₆₅₀
AB103.1[pyGAI1-C1/1]-1	5.9	.24	.04
-2	5.9	.24	.04
-3	2.1	.08	.04
AB103.1[pyGAI3]			
-1	ND	.003	-
-2	ND	.007	-

1) Ristireaktiivinen insuliinin kaltainen materiaali (ILM) määritettynä kilpailuradioimmunoanalyysillä ¹²⁵I-leimatulla insuliinilla ja insuliinistandardeilla. Arvot on esitetty ILM:nä, joka erittyi viljelyn ml:a kohden, ja joissakin ta-pauksissa ILM:nä, joka erittyi ml:a kohden normalisoituna viljelysolutiheyteen, jonka absorbanssi oli aallonpituudessa 650 nm = 1.

Taulukko 2. Katkaistun tai täysipituisen, yhden glykosylointipaikan asemassa Asn₂₃ sisältävän alfa-faktoriohjaajan vaikutus insuliinin kaltaisen materiaalin erittymiseen

Transformantti	Testi numero ¹	ILM ²					
		mg/ml			mg/ml OD ₆₅₀		
		Määrä	Keski-arvo	Vakio- poikkeama	Määrä	Keski-arvo	Vakio- poikkeama
AB103.1 [PYGAI1-AB24]	7	.22-.55	.37	.12	.02-.04	.026	.01
AB103.1 [PYGAI7]	8	.38-1.0	.62	.24	.03-.06	.043	.01
AB103.1 [PYGAI8]	8	.03-.18	.09	.05	.003-.01	.007	.003

- 1) Kolmen itsenäisen transformantin minimimäärä testattiin.
- 2) Eritetty ristireaktiivinen insuliinin kaltainen materiaali (ILM) määritettiin kilpailuradioimmunoanalyysillä ¹²⁵Ileimatulla insuliinilla ja insuliinistandardeilla. Arvot on esitetty ILM:nä, joka erittyi viljelyn ml:a kohden, ja ILM:nä, joka erittyi ml:a kohden normalisoituna viljelysolu- tiheyteen, jonka absorbanssi oli aallonpituudessa 650 nm = 1.

II

Tämä esimerkki vertaa täysipituisen alfa-faktoriohjaajarakenteen ekspressiota, joka säilyttää kaikki glykosylointipaikat, ekspressiorakenteeseen, jossa on katkaistu alfa-faktori sekvenssi, joka sisältää ainoastaan yhden ainoan glykosylointipaikan asemassa Asn₂₃. Tässä esimerkissä käytetty ei-hiiva-proteiini on ihmisperäistä proinsuliinianalogia, jossa yhdistävä "C"-peptidi on korvattu hiivan KEX2-endopeptidaasilohkaisupaikalla.

A. pYGAIC3

Plasmidi pGAIC3 valmistettiin korvaamalla pGAI1:n 231 emäsparin HindIII-SalI-fragmentti, joka koodaa B-ketjun aminohappoja 14 - 30, C-peptidiä, A-ketjua ja 2 translaation pysäytyskodonia, 132 emäsparin synteettisellä HindIII-SalI-geenifragmentilla (esitetty kuviossa 3), joka koodaa B-ketjun aminohappoja 14 - 30, Lys-Arg-KEX2-endopeptidaasilohkaisu- paikkaa, A-ketjua ja translaation pysäytyskodoneja. Plasmidi pYGAIC3 valmistettiin pGAIC3:sta seuraavalla tavalla.

Plasmidi pGAIC3 sulatettiin BamHI:llä ja 1107 emäsparin BamHI-ekspressiokasetti, joka sisälsi GAPDH-aktivaattorin, proinsuliinianalogiin liitettyä alfa-faktoriohjaajaa koodavan sekvenssin ja alfa-faktorin transkription terminaattorin, eristettiin ja liitettiin BamHI:llä sulatettuun ja fosfataasikäsiteltyyn pAB24:ään ja sitten kloonattiin E. coliin. Saatiin plasmidi pYGAIC3, jossa ekspressiokasetti suuntautui siten, että GAPDH-aktivaattori oli lähinnä vektorin erikoista SalI-paikkaa.

B. pYaf_L7C3

Plasmidi pYaf_L7C3 sisältää DNA:n, joka koodaa yllä esitettyä pYGAI7:n katkaistua alfa-faktoriohjaajaa, joka on liitetty proinsuliinianalogin sekvenssiin, joka on samoin esitetty yllä (pYGAIC3). Tämä plasmidi muodostettiin seuraavalla tavalla.

Ensiksi pGAIC3 leikattiin HindIII:lla ja SalI:llä ja 132 emäsparin fragmentti geelieristettiin. Tämä fragmentti sisältää sekvenssit, jotka koodaavat proinsuliinianalogin kaikkia kodoneja lukuunottamatta 12 ensimmäistä kodonia. Se liitettiin geelieristettyyn 4640 emäsparin fragmenttiin HindIII- ja SalI-sulatetusta pGAI7:stä plasmidin paf_L7C3:n tuottamiseksi. Tämä plasmidi kloonattiin E. coliin ja sitten

se leikattiin BamHI:llä ja 1062 emäsparin fragmentti geelie-ristettiin. Tämä ekspressiokasetti sisältää pGAI7:n katkaisu-
tun alfa-faktoriohjaajarakenteen, jolloin proinsuliiniana-
logi oli normaalin proinsuliinisekvenssin tilalla. Ekspres-
siokasetti liitettiin sitten pAB24:n BamHI-paikkaan, kuten
yllä on esitetty, pYaf_L7C3:n tuottamiseksi.

Vertailuekspressio

Ekspressiotasot määritettiin pYGAI3:lle ja pYaf_L7C3:lle
kahdessa S. cerevisiaen kannassa. Kanta AB103.1 on esitetty
esimerkissä I. Kanta AB110-4 on Saccharomyces cerevisiaen
kannan AB110 (Mata, leu2, ura3-52, pep4-3, his4-580[cir^o])
johdannainen, jossa deleetio oli manipuloitu pep4-geeniin.
Nämä kannat transformoitiin yllä esitetyllä tavalla plasmii-
deilla pYGAI3 ja pYaf_L7C3 ja ura-prototrofit valittiin.
Istuteviljelyjä kasvatettiin SD-leu:ssa (Sherman et al.,
supra) 30°C:ssa 24 - 48 tunnin ajan, sitten ne pelletoitettiin
linkoamalla, pestiin ja laimennettiin 20-kertaiseksi ura⁻
väliaineeseen. Soluvapaa vakioitu viljelyväliaine valmis-
tettiin linkoamalla analyysiä varten insuliinin kilpailura-
dioimmunoanalyysissä.

Tulokset on esitetty taulukossa 3. Kuten voidaan nähdä, kat-
kaistu alfa-faktorirakenne välittää immunoreaktiivisen
proinsuliinin lisääntyntä erittymistä verrattuna luonnol-
liseen alfa-faktoriohjaajasekvenssiin.

Taulukko 3. ILM:n erityis proinsuliinianalogirakenteesta välitettynä katkaistulla alfa-faktoriohjaajalla tai luonnollisella alfa-faktoriohjaajalla

<u>Transformantti</u>	Testi numero ¹	<u>ILM²</u>					
		mg/ml			mg/ml, OD ₆₅₀		
		Määrä	Keski- arvo	Vakio- poikkeama	Määrä	Keski- arvo	Vakio- poikkeama
AB103.1 [pYGAIC3]	6	1-2.75	1.66	.65	.11-.20	.14	.04
AB103.1 [pYaf _L 7C3]	6	1.5-6.63	4.46	2.15	.14-.60	.40	.19
AB110.4 [pYGAIC3]	3	1.15-1.4	1.28	.13	.10-.12	.11	.01
AB110.4 [pYaf _L 7C3]	3	2.15-4.12	3.46	1.14	.19-.38	.31	.10

- 1) Kolmen itsenäisen transformantin minimimäärä testattiin.
- 2) Eritetty ristireaktiivinen insuliinin kaltainen materiaali (ILM) määritettiin kilpailuradioimmunoanalyysillä ¹²⁵Ileimatulla insuliinilla ja insuliinistandardeilla. Tulokset on esitetty ILM:n määrinä/ml viljelyä ja määränä, joka eritettiin ml:a kohden normalisoituna solutiheyteen, jonka absorbanssi oli aallonpituudessa 650 nm = 1.

III

Tämä esimerkki esittää katkaistun alfa-faktoriekspressiovektorin rakennetta, joka välittää aktiivisen insuliinin kaltaisen kasvutekijä-1:n lisääntyneitä ekspressiotasoja.

Ensiksi valmistettiin DNA-sekvenssi, joka koodaa katkaistua alfa-faktoriohjaajaa ja IGF1:n koodaussekvenssiä. Synteettinen sekvenssi valmistettiin standardimenetelmillä käyttämällä Applied Biosystems 380A DNA-synteetikonetta valmistajan

ohjeiden mukaisesti. Valmistettiin 14 DNA-sekvenssiä, joiden pituus oli 22 - 57 emästä, puhdistettiin PAGE:lla ja fosforyloitiin yksilöllisesti T4-kinaasilla ATP:n läsnäollessa. Sekvenssit lämpökäsiteltiin sitten ja liitettiin standardimenetelmillä.

Synteettisen geenin sekvenssi on esitetty kuviossa 5. Puhdistettu synteettinen geenifragmentti kloonattiin NcoI/SalI:llä sulatettuun pBS100:aan (esitetty alla). Muodostunut plasmidi oli pBS100 Taf_L IGF₁.

Plasmidi pBS100 sisältää hiivan ekspressiokasetin, joka on kloonattu pBR322-johdannaiseen pAB12. Ekspressiokasetti sisältää hybridi-ADH-2/GAPDH-aktivaattorin ja GAPDH-terminaattorin, joka sivuaa ei-olennaista geenisegmenttiä. ADH-2/GADPH-aktivaattori on 1200 emäsparin BamHI-NcoI-fragmentti, joka on eristetty pJS103:sta (ks. alla), ja GAPDH-terminaattori on 900 emäsparin SalI-BamHI-fragmentti, joka on eristetty plasmidista pPAG1 (EPO-julkaisu n:o 164,556). Plasmidi pBS100 sisältää myös ei-olennaisen fragmentin NcoI- ja SalIpaikkojen välissä, joka on korvattu kiinnostavilla geenifragmenteilla. Ekspressiokasetti voidaan poistaa pBS100:sta sulattamalla BamHI:llä ja kloonata hiivan sukkulavektoreihin sen ohjaamiseksi hiivasoluihin.

Plasmid pJS103, joka sisältää yllä käytetyn hybridi-ADH-2/-GAPDH-aktivaattorin, muodostettiin seuraavalla tavalla. Aktivaattorin ADH-2-osa muodostettiin leikkaamalla plasmidi, joka sisälsi villin ADH2-geenin plasmidista pADR2 (Beier et al. (1982) Nature 300: 724 - 728) restriktioentsyymillä EcoR5, joka leikkaa asemassa +66 ATG-käynnistyskodonin suhteen samoin kuin kahdessa muussa kohdassa pADR2:ssa ADH2alueen ulkopuolella. Saatu vektorifragmentin ja kahden pienemmän fragmentin seos saatettiin reagoimaan Bal31-eksonukleaasin kanssa n. 300 emäsparin poistamiseksi. Synteettiset XhoI-liittäjät liitettiin Bal31-käsiteltyyn DNA:han.

Muodostuva DNA-liittäjävektorifragmentti (n. 5 ke) erotettiin liittäjistä pylväskromatografiolla, leikattiin restriktioentsyymillä XhoI, liitettiin uudelleen ja käytettiin E. colin transformoimiseksi ampicilliiniresistentiksi. XhoI-liittäjän asemat määritettiin DNA-sekvenssoinnilla. Yksi plasmidi, joka sisälsi XhoI-liittäjän ADH2-geenin 5'-suunnan ei-transkriboidulla alueella (asema -232 ATG:stä), leikattiin restriktioentsyymillä XhoI, käsiteltiin nukleaasilla S1 ja käsiteltiin tämän jälkeen restriktioentsyymillä EcoRI lineaarisen vektorimolekyylin tuottamiseksi, jossa oli 1 tylppä pää XhoI-liittäjän paikassa ja yksi EcoRI-pää. Aktivaattorin GAPDH-osa muodostettiin leikkaamalla plasmidi pPGAP (EPO-julkaisu n:o 164,556) entsyymeillä BamHI ja EcoRI ja eristämällä tämän jälkeen 0,4 ke:n DNA-fragmentti. Tämä puhdistettu fragmentti sulatettiin sitten täysin entsyymillä AluI ja n. 200 emäsparin fragmentti eristettiin. Tämä GAPDH-aktivaattorifragmentti liitettiin ADH-2-fragmenttiin, joka oli läsnä yllä esitettyssä lineaarisessa vektorissa, jolloin saatiin plasmidi pJS103.

BamHI-fragmentti eristettiin sitten pBS100 Taf_L IGF1:stä. Tämä fragmentti sisältää ADH2/GAPDH-aktivaattorin, katkaisu-alfa-faktoriohjaajan (AA 1-25, 81-83), LysArg-käsittelypaikan, IGF1:n koodaussekvenssin ja GAPDH-terminaattorisekvenssin. Tämä BamHI-fragmentti kloonattiin sitten pAB24:ään, joka oli edellä sulatettu BamHI:llä. Positiivinen kloonin välittiin ja vaikka sitä aluksi kutsuttiin plasmidiksi 18.5, sille annettiin tämän jälkeen nimitys pYLUIGF1-55 (ks. kuv. 6).

Toinen ekspressiovektori, pYLUIGF1-24, valmistettiin myös vastaavilla menetelmillä. Restriktiokartta on esitetty kuviossa 7. Tämä vektori on samanlainen kuin pYLUIGF1-55, paitsi, että siinä on täysipituinen alfa-faktoriohjaaja, joka ohjaa erittymistä kolmella glykosylointipaikalla (vert. esim. I.A.) ja alfa-faktoriterminaattorilla.

Hiivakanta AB110 (EPO-julkaisu n:o 164,556) transformoitiin pYLUIGF1-55:llä ja pYLUIGF1-24:llä tavanomaisilla sferoplastimenetelmillä (Hinnet et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1919 - 1933) ja verrattiin ekspressiota.

IGF1:n ekspressio AB110 (pYLUIGF1-55):stä ja AB110 (pYLUIGF1-55):stä on ei-konstitutiivinen. IGF1:n ekspression induktio saatiin aikaan muodostamalla glukosin alhainen konsentraatio kasvuväliaineessa. Vakio-olosuhteissa tärypuloviljelyt (25 ml) käyttävät täysin hyväksi väliaineen glukosin 18 - 24 tunnissa inokulaation jälkeen. Siten 25 ml:n AB110 (pYLUIGF1-22)- ja AB110 (pXLUIGF1-23)-viljelyjä kasvatettiin vakio-olosuhteissa 72 tunnin ajan. Supernatanttinäytteet otettiin 49 ja 72 tunnin kuluttua inokulaation jälkeen ja analysoitiin IGF1:n biologisen aktiivisuuden (RRA) ja immunoreaktiivisuuden (RIA) suhteen anti-IGF1-vastaaineiden kanssa. Kuten voidaan nähdä, pYLUIGF1-55, jossa on katkaistu alfa-faktoriohjaaja, eritti proteiinia, josta olennaisesti suurempi fraktio oli biologisesti aktiivinen. Vaikkakin pYLUIGF1-24 eritti enemmän proteiinia, joka osoitti reaktiivisuutta IGF1-vastaaineiden kanssa, suhteellisen pieni määrä tästä proteiinista oli biologisesti aktiivista.

Tulokset on esitetty taulukossa 4. Radioreseptoriansalyysi (RRA) mittaa IGF-1:n kykyä sitoutua reseptoriinsa. Tämä on rekombinanttipolypeptidin biologisen aktiivisuuden mitta, koska uskotaan, että IGF-1 kohdistaa koko aktiivisuutensa reseptoriinsa kautta. Reseptoriansalyysi on esitetty julkaisussa Marshall et al. (1974) J. Clin. Endocrinol. Metab. 19: 283 - 292. Radioimmunoanalyysi (RIA) on kilpaileva analyysi, joka mittaa proteiinin määrän, joka on antigeneettisesti ristireaktiivinen luontaisen IGF-1:n kanssa, oli se sitten biologisesti aktiivinen tai ei. Analyysi on esitetty julkaisussa Zapf et al. (1981) J. Clin. Invest. 68: 1321 - 1330.

Taulukko 4. Katkaistulla alfa-faktoriohjaajalla tai luonnollisella alfa-faktoriohjaajalla välitetyn IGF1:n erittyminen

<u>Transformantti</u> <u>72 h</u>	<u>49 h</u>			
	<u>RRA</u> ¹	<u>RIA</u> ²	<u>RRA</u>	<u>RIA</u>
AB110 (pYLUIGF1-55)	1.0	14	1.3	14
AB110 (pYLUIFG1-24)	1.3	54	2.7	66

1) mg/ml

2) mg/ml

Biologisten materiaalien talletus

Seuraavat ekspressiovektorit talletettiin laitokseen American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA ja säilytetään Budapestin sopimuksen sopimusehdoilla. Talletuksen saantinumerot ja talletuksen päivämäärät on esitetty alla.

<u>Talletettu materiaali</u>	<u>ATCC-numero</u>	<u>Talletuspäivä</u>
<u>E. coli</u> (pYGAI7)	67597	12/29/87
<u>E. coli</u> (pYaf _L 7C3)	67596	12/29/87
<u>E. coli</u> (pYLUIGFI-55)	67595	12/29/87

Nämä talletukset on järjestetty alan ammattihenkilöiden käyttöön. Nämä talletukset eivät tarkoita sitä, että tällaisia talletuksia tarvitaan tämän keksinnön toteuttamiseksi käytännössä, eivätkä sitä, että samanarvoiset suoritusmuodot eivät ole alan tasolla tämän selityksen kannalta. Näiden talletusten julkinen käytettävyys ei merkitse lisenssin myöntämistä valmistaa, käyttää tai myydä talletettuja materiaaleja tällä tai millään muullakaan patentilla. Talletettujen materiaalien nukleinihapposekvenssit on otettu tähän selitykseen viitteenä ja ne ovat ohjaavia, mikäli ristiriidassa tässä esitettyjen sekvenssien kanssa.

Vaikkakin edellä olevaa keksintöä on selitetty joissakin yksityiskohdissa havainnollistamistarkoituksessa, on selvää, että alan ammattihenkilöt voivat tehdä muutoksia ja muunnelmia oheisten patenttivaatimusten puitteissa.

Patenttivaatimukset

1. Hiivasolu, joka käsittää DNA-rakenteen, joka saa aikaan ei-hiivaproteiinin ekspression ja erittymisen, jolloin tämä DNA-rakenne käsittää koodaussekvenssin hiivassa tunnistettujen transkription aloitus- ja päätösekvenssien valvonnassa, jolloin koodaussekvenssi koodaa esiastepolypeptidiä, joka käsittää ohjaajasekvenssin ja ei-hiivaproteiinin, jotka on liitetty käsittelypaikalla, joka saa aikaan ei-hiivaproteiinin lohkaisun esiastepolypeptidistä, **tunnettu** siitä, että ohjaajasekvenssi on pituudeltaan n. 25 - n. 50 N-terminaalista esiastepolypeptidin tähdettä ja käsittää hiivan alfa-faktoriesiasteen signaalipeptidin ja yhden ainoan glykosylointi-paikan.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että ei-hiivaproteiinina on nisäkkään proteiini.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että nisäkkään proteiinina on ihmisperäisen insuliinin esiaste.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että ihmisperäisen insuliinin esiasteena on ihmisperäinen proinsuliini.
5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että ihmisperäisin insuliinin esiaste käsittää insuliini-a-ketjun ja insuliini-b-ketjun, jotka on liitetty hiivassa tunnistetulla käsittelypaikalla, joka lohkaistaan *in vivo*.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että käsittelypaikka lohkaistaan *Saccharomyces*'in KEX2-geenituotteella.
7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että nisäkkään proteiinina on insuliinin kaltainen kasvutekijä I.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että hiivasolu on *Saccharomyces*-suvusta.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että hiivasoluna on *S. cerevisiae*.
- 5 10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen solu, **tunnettu** siitä, että hiivan alfa-faktoriesiasteena on *S. cerevisiae* MF α 1.
11. Kaksisäikeinen DNA-molekyyli, joka käsittää alueen, joka koodaa esiastepolypeptidiä, joka voidaan erittää hiivaisännän toimesta, jolloin alueen rakenne on toisen DNA-säikeen suhteen seuraava:
- 10 5'-AF-CHO-Xn-S-Gene*-3'
- jossa AF koodaa hiivan alfa-faktorisignaali-peptidiä; CHO koodaa glykosylointipaikkaa; Xn koodaa pituudeltaan n aminohappoa käsittävää polypeptidiä, joka ei sisällä glykosylointipaikkaa tai käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun *in vivo* hiivalla; n on kokonaisluku 0 - n. 30; jolloin alueella AF-CHO-Xn on vain yksi hiivan alfa-faktorin esiasteen glykosylointipaikka; Gene* koodaa ei-hiiva-proteiinia ja S koodaa käsittelypaikkaa, joka saa aikaan esiastepolypeptidin lohkaisun.
- 15 20
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että AF koodaa pituudeltaan n. 19 - 23 aminohappoa käsittävää polypeptidiä.
- 25
13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että n on kokonaislukuna n. 0 - n. 20.
14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu**
- 30 siitä, että n on kokonaislukuna n. 0 - n. 10.
15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että n on kokonaislukuna n. 3 - n. 10.
- 35 16. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että hiivaisäntänä on *Saccharomyces*.
17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että hiivan alfa-faktorisignaali-peptidinä on Saccha-

romyces-signaalipeptidi.

18. Patenttivaatimuksen 11 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että S koodaa hiivaisännän *in vivo* tunnistamaa käsittelypaikkaa.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että S koodaa dipeptidiä, jonka KEX2-endopeptidaasi tunnistaa.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että dipeptidinä on 5'-Lys-Arg-3' tai 5'Arg-Arg-3'.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se käsittää replikonin.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että esiastepolypeptidiä koodaava alue on hiivassa tunnistettujen transkription aloitus- ja päätössekvenssien valvonnassa ja replikonina on hiivareplikoni.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että replikonina on plasmidi.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että replikonina on kromosomi.

Patentkrav

1. Jästcell omfattande en DNA-struktur vilken åstadkommer expression och utsöndring av ett icke-jästprotein, varvid nämnda DNA-struktur omfattar en kodsekvens kontrollerad av jästidentifierade initierings- och termineringssekvenser, varvid kodsekvensen kodar en prekursorpolypeptid vilken omfattar en ledsekvens samt nämnda icke-jästprotein, vilket är infogat vid ett ingreppsställe som åstadkommer spjälkning av icke-jästproteinet från prekursorpolypeptiden, **kännetecknad** därav att ledsekvensen utgör ca 25 - ca 50 N-terminala rester av nämnda prekursorpolypeptid, samt omfattar signalpeptiden för en jäst-alfa-faktorprekursor och ett enda gly-

kosyleringsställe.

2. Cell enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att icke-jästproteinet är ett däggdjursprotein.
- 5
3. Cell enligt patentkrav 2, **kännetecknad** av att däggdjursproteinet är en prekursor för humaninsulin.
4. Cell enligt patentkrav 3, **kännetecknad** av att prekursorerna för humaninsulin är humant proinsulin.
- 10
5. Cell enligt patentkrav 3, **kännetecknad** av att prekursorerna för humaninsulin omfattar insulinets a-kedja och insulinets b-kedja, infogade vid ett jästidentifierat ingreppsställe vilket spjälks *in vivo*.
- 15
6. Cell enligt patentkrav 5, **kännetecknad** av att ingreppsstället spjälks av *Saccharomyces*' genprodukt KEX2.
7. Cell enligt patentkrav 2, **kännetecknad** av att däggdjursproteinet är den insulinlika tillväxtfaktorn I.
- 20
8. Cell enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att jästcellen är från släktet *Saccharomyces*.
- 25
9. Cell enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av att jästcellen är *S. cerevisiae*.
10. Cell enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av att jästens alfa-faktorprekursor är *S. cerevisiae* MF α 1.
- 30
11. Tvåsträngad DNA-molekyl omfattande ett område vilket kodar en prekursorpolypeptid vilken kan utsöndras av en jästvärd, varvid nämnda område i avseende å den ena strängen har strukturen
- 35
- 5'-AF-CHO-Xn-S-Gene*-3'
- vari AF kodar en jäst-alfa-faktorsignalpeptid; CHO kodar ett glykosyleringsställe; Xn kodar en n aminosyror lång polypeptid vilken inte innehåller ett glykosyleringsställe eller ett

- ingreppsställe vilket åstadkommer spjälkning av prekursorpolypeptiden *in vivo*; n är ett heltal 0 - ca 30; varvid sekvensen AF-CHO-Xn innehåller bara ett glykosyleringsställe för jäst-alfa-faktor prekursor; Gene* kodar ett icke-jästprotein och S kodar ett ingreppsställe vilket åstadkommer spjälkning av prekursorpolypeptiden.
- 5
12. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att AF kodar en polypeptid omfattande ca 19 - 23 aminosyror.
- 10
13. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att n är ett heltal från ca 0 - ca 20.
14. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att n är ett heltal från ca 0 - ca 10.
- 15
15. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att n är ett heltal från ca 3 - ca 10.
- 20
16. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att jästvärden är en *Saccharomyces*.
17. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att jäst-alfa-faktorsignalpeptiden är en *Saccharomyces*-signalpeptid.
- 25
18. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att S kodar ett ingreppsställe vilket värdjästen identifierar *in vivo*.
- 30
19. DNA-molekyl enligt patentkrav 18, **kännetecknad** därav att S kodar en dipeptid identifierad av KEX2-endopeptidas.
20. DNA-molekyl enligt patentkrav 19, **kännetecknad** därav att dipeptiden är 5'-Lys-Arg-3' eller 5'-Arg-Arg-3'.
- 35
21. DNA-molekyl enligt patentkrav 11, **kännetecknad** därav att den omfattar en replikon.

22. DNA-molekyl enligt patentkrav 21, **kännetecknad** därav att området vilket kodar prekursorpolypeptiden kontrolleras av jästidentifierade sekvenser för initiering och terminering av transkription och replikonen är en jästreplikon.

5

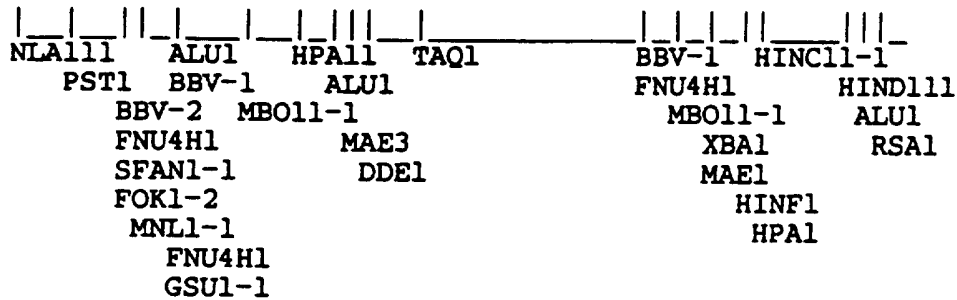
23. DNA-molekyl enligt patentkrav 22, **kännetecknad** därav att replikonen är en plasmid.

10

24. DNA-molekyl enligt patentkrav 22, **kännetecknad** därav att replikonen är en kromosom.

pYGAI3:n synteettisen geenifragmentin sekvenssi

pYGAI3



MetArgPheProSerIlePheThrAlaValLeuPheAlaAlaSerSerAlaLeuAlaAla
 CATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
 TACTCTAAAGGAAGTTAAAAATGACGTCAAATAAGCGTCTAGGAGGCGTAATCGACGA

1 NLA111, 24 PST1, 38 BBV FNU4H1, 41 SFAN1, 42 FOK1, 45 MNL1
 , 55 ALU1, 56 BBV FNU4H1, 60 GSU1,

62 ProValGlnThrThrThrGluAspGluThrAlaGlnIleProAlaGluAlaValIleGly
 CCAGTCCAACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
 GGTCAGGTTTGATGTTGTCTTCTACTTTGCCGTGTTAAGGCCGACTTCGACAGTAGCCA

80 MBO11, 101 HPA11, 109 ALU1, 120 MAE3,

122 TyrLeuAspLeuGluGlyAspPheAspValAlaValLeuProPheSerGlnSerThrAsn
 TACTTAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAAAGCACAAAT
 ATGAATCTAAATCTTCCCCTAAAGCTACAACGACAAAACGGTAAAAGGTTTCGTGTTTA

124 DDE1, 144 TAQ1,

182 AsnGlyLeuLeuPheIleGlnThrThrIleAlaSerIleAlaAlaLysGluGluGlyVal
 AACGGGTTATTGTTTATACAACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
 TTGCCCAATAACAAATATGTTTGATGATAACGGTTCGTAACGACGATTTCTTCTCCCAT

221 BBV FNU4H1, 230 MBO11,

242 SerLeuAspLysArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeu
 TCTCTAGATAAAAGATTCGTTAACCAACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGAGCTTTG
 AGAGATCTATTTTCTAAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGTAAC

244 XBA1, 245 MAE1, 255 HINF1, 260 HINC11 HPA1, 294 HIND111,
 295 ALU1, 301 RSA1,

302 Tyr
 TACTT
 ATGAA

FIG. 2

PYGAIC3:n synteettisen geenifragmentin sekvenssi

PYGAIC3



1 GluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrLysArg
 GAGCTTTGTACTTGGTTTGGTGAAGAGGTTCTTCTACACTCCAAGACTAAGAGA
 CTTGGAAACATGAACCAACACCACCTTCTCCAAGAAGATGTGAGGTTTCTGATTTCTCT

2 HIND3, 3 ALU1, 9 RSA1,

61 GlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCys
 GGTATTGTGAACAATGTTGTACTTCTATTTGTTCTTTGTACCCAATTGGAAAACACTACTGT
 CCATAACAACCTGTTACAACATGAAGATAAACRAAGAAACATGGTTAACCTTTTGATGACA

80 RSA1, 99 RSA1,

121 AsnOC AM
 AACTAATAGCGTCCGTCGAC
 TTGATATCCAGCAGCTG

134 SAL1,

181

FIG. 3

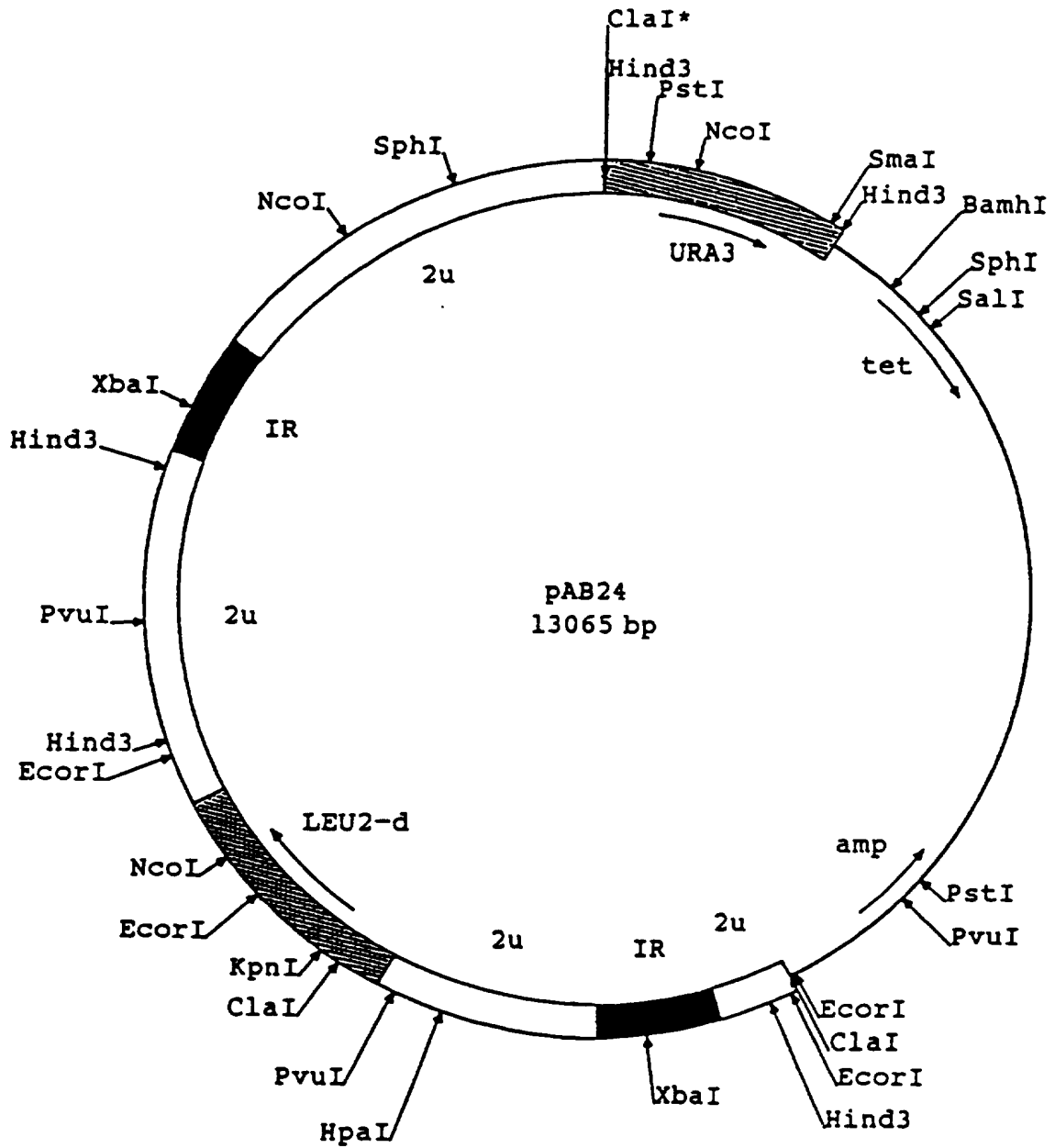


FIG. 4

TαF_L IGF1

MET 122 245 ASNTHRHRSER
CATGAGATTTCCTTCAATTTTACAGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACATACATCT
TCTAAAGGAAGTTAAATAATGTCGTCAAAAATAAAGCGTCGPAGGAGCGTAATCGACGAGGTCAGTTGTGATGTAGA 947

I₂

449

LEUASPLYSARG 347
CTAGATAAAAAGAGGTCAGAAAACCTTGTGGTGTGAATTGGTTCGATGCTTTGCCAAATTCGTTTGTGGTGACAGAGGTT
GATCTATTTTCTCCAGGCTTTTGGAAACACACCACCGACTTAACCAGCTACGAAACGTTAAGCAACACCCACTGTCTCCAA 1049

647

550

TCTACTTCAACAAGCCAAACCGGTTACGGTTCTTCTTCTAGAAGAGCCCAACAAACCGGTAATCGTTGACGAAATGTTGTTTT
AGATGAAGTGTTCGGTTGGCCAAATGCCAAGAAGATCTTCTCGGGGTGTTGGCCATAGCAACTGCTTACAACAAA 1251

748

I₂

CAGATCTTGTGACTTGAGAAGATTGGAAATGTACTGTGCTCCATTGAAGCCAGCTAAGTCTGCTTGATAAG
GTC TAGAACACTGAAC TCTTCTAACCTTTACATGACACGAGGTAAC TCGGTCGATTCAGACGGAAC TATTTCAGCT 1422

FIG. 5

pYLUIGF1-55

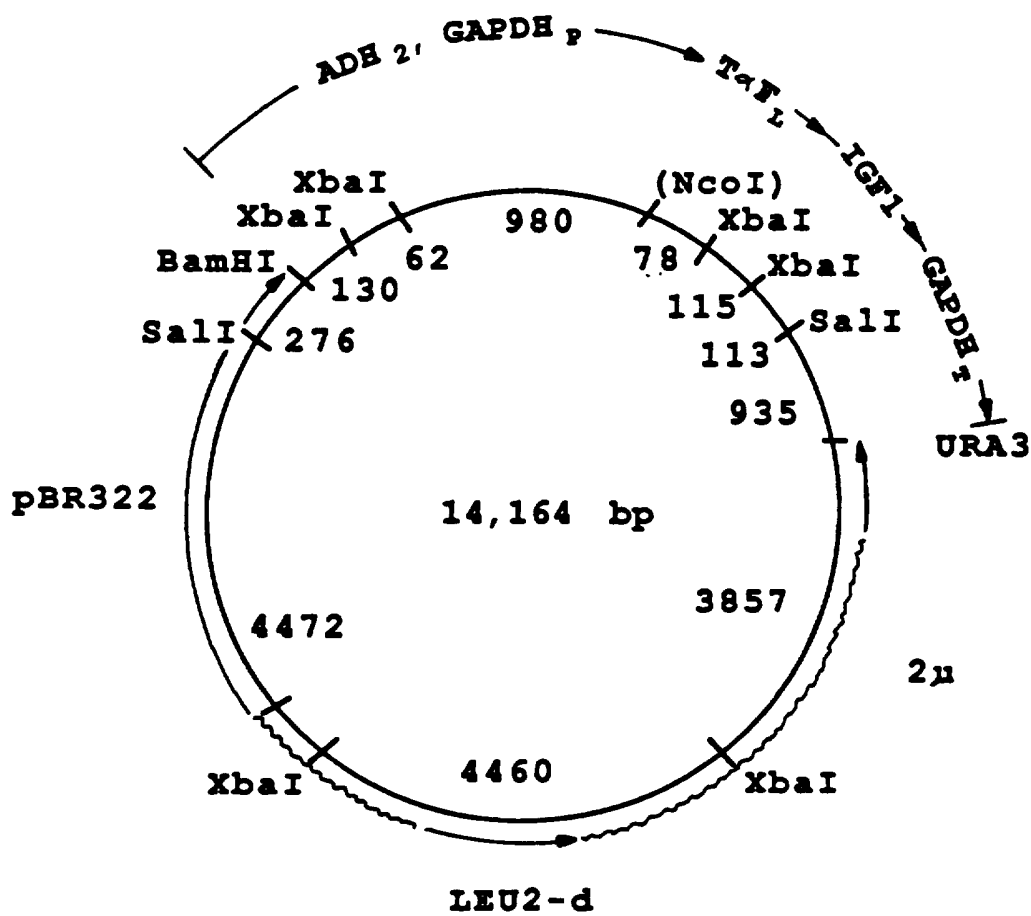


FIG. 6

