



F10000982198



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meldelat 12 05 1997

98219

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

C 07K 14/47, C 12N 9/48, 15/58, 1/16, 9/72

SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	881713
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.04.88
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.04.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	16.10.88
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
15.04.87 GB 8709081 P	16.06.87 GB 8714059 P
04.12.87 IE 3299/87 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Ciba-Geigy AG, Klybeckstrasse 141, 4002 Basel, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Meyhack, Bernd, Höhenweg 9, 4312 Magden, Switzerland, (CH)
2. Heim, Jutta, Rankackerweg 18, 4133 Pratteln, Switzerland, (CH)
3. Bürgi, Rolf, Bläsiring 140, 4057 Basel, Switzerland, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä urokinaasityyppisen plasminogeenin aktivaattorin tuottamiseksi
Förfarande för produktion av en plasminogenaktivator av urokinastyp

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:	4084	DSM
	4290	DSM
	4294	DSM
	4295	DSM
	4414	DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 875324 (C 07K 15/06), EP A 37687 (C 12N 15/00), EP A 92182 (C 12N 15/00),
EP A 200451 (C 12N 9/72), EP A 210279 (C 12N 9/72)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Uusia urokinaasityyppisiä ihmisen plasminogeenin aktivaattoreita tuotetaan hiivasoluilla, jotka ovat transformoituneet yhdistelmävektorilla, joka sisältää mainittua ihmisen plasminogeenin aktivaattoria koodittavan DNA-sekvenssin. Keksintö tarjoaa myös uusia yhdistelmävektoreita, tällaisilla yhdistelmävektoreilla transformoituneita hiivaisäntiä ja menetelmiä näiden valmistamiseksi.

Nya människoplasminogenaktivatorer av urokinastyp produceras med jästceller, vilka är transformerade med en hybridvektor, som innehåller en DNA-sekvens, som kodar för den nämnda människoplasminogenaktivatorn. Uppfinningen avser också nya hybridvektorer, med sådana hybridvektorer transformerade jästvärdar och förfaranden för framställning därav.

Menetelmä urokinaasityyppisen plasminogeenin aktivaattorin tuottamiseksi

Keksintö koskee uutta menetelmää proteiinien, tarkemmin sanottuna urokinaasityyppisten seriiniproteaasien tuottamiseksi. Mainittuun menetelmään sisältyy geeniteknologialla aikaansaatuja hiivakantojen käyttö. Edelleen keksintö koskee uusia urokinaasityyppisiä proteiineja, tällaisia proteiineja koodittavia DNA-sekvenssejä, tällaisen DNA-sekvenssin sisältäviä yhdistelmävektoreita, mainittuja geeniteknologisesti aikaansaatuja hiivakantoja ja menetelmiä mainittujen DNA-sekvenssien, yhdistelmävektorien ja hiivakantojen tuottamiseksi.

Urokinaasiplasminogeenin aktivaattori eli urokinaasityyppinen plasminogeenin aktivaattori (käytetään jäljempänä lyhennettä "u-PA") on seriiniproteaasi, joka proteolyyttisen katkaisun avulla aktivoi plasminogeenin plasmiiniksi. Plasmiini on voimakas proteaasi, joka kykenee hajottamaan veritulppeiden fibriiniverkon liukoiseksi hajoamistuotteiksi.

u-PA eristettiin ensimmäiseksi ihmisen virtsasta, mutta viljeltyjen munuaissolujen ja eräiden kasvainsolulinjojen tiedetään myös erittävän sitä. Sitä valmistuu ensin yksiketjuisena molekyylinä (käytetään jäljempänä lyhennettä "scu-PA") ja se voidaan proteolyttisesti plasmiinin vaikutuksesta muuntaa kaksiketjuiseen muotoon (käytetään jäljempänä lyhennettä "tcu-PA"), jossa kyseiset kaksi ketjua ovat kiinni toisissaan disulfidisillan välityksellä. u-PA:ssa on ainut glykosyloitumiskohta Asn302:ssa.

Koska scu-PA:lla on vain vajavaista amidolyyttistä aktiivisuutta molekyylipainoltaan pieniä synteettisiä substraatteja kohtaan, sitä pidettiin viime aikoihin asti aktiivisen tcu-PA-entsyymin varsinaisena proteolyttisesti inaktiivisena prekursorina. Uudemmat tulokset ovat kuitenkin osoittaneet, että scu-PA aktivoi

plasminogeenia tehokkaasti plasmiiniksi, ja että sillä on huomattavasti suurempi selektiivisyys fibriinin suhteen kuin tcu-PA:lla (ks. H.R. Lijnen et al., J. Biol. Chem. 261, 1253 (1986)). scu-PA:n yllättävän fibrinolyyttisen aktiivisuuden ja tulppaspesifisyyden mekanismeja on tutkittu (Lijnen et al., supra; D. Collen et al., J. Biol. Chem. 261, 1259 (1986)). On osoitettu, että scu-PA ei ole inaktiivinen tsymogeeni, vaan aktivoi plasminogeenin muuttumatta ensin tcu-PA:ksi. tcu-PA:sta poiketen inhiboi tähän mennessä tuntematon plasman komponentti kompetitiivisesti scu-PA:ta, johon inhiboitumiseen on fibriinillä tai fibriinin fragmenteilla, so. hyytymällä, käänteinen vaikutus. Kiertäessään veressä ei scu-PA näin ollen in vivo-olosuhteissa aktivoi plasminogeenia. Sen fibrinolyyttinen aktiivisuus säilyy kohdistuakseen rajoitetusti oikeaan kohteeseen. Sitä vastoin tcu-PA kykenee aktivoimaan plasminogeenin missä tahansa verenkierron kohdassa, mistä on seurauksena ei-toivottuja sivuvaikutuksia, kuten verenvuotoja. Nämä ominaisuudet tekevät scu-PA:sta etusijalle asetettavan urokinaasityypin plasminogeenin aktivaattorin.

Geeniteknologian keinoin on nyt mahdollista tuottaa proteiineja, kuten scu-PA:ta, teollisessa mittakaavassa. Kirjallisuudessa on kuvattu geeniteknologisia menetelmiä scu-PA:n tuottamiseksi sillä perusteella, että perimän u-PA-DNA:n (A. Riccio et al., Nucleic Acids Research 13, 2759 (1985)) ja u-PA-cDNA:n (W.E. Holmes et al., Biotechnology 3, 923 (1985)) rakenne tunnetaan. Niinpä ilmentyminen E. colissa on saatu tapahtumaan seuraavien julkaisujen mukaisesti: W.E. Holmes et al. (supra), P. Jacobs et al., (DNA 4, 139 (1985)), M.E. Winkler et al. (Biochemistry 25, 4041 (1986)), M. Nagai et al. (Gene 36, 183 (1985)), sekä belgialainen patenttijulkaisu no. 900 826, japanilainen patenttijulkaisu no. 61 181 377 ja eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu no. 92 182. scu-PA:n ilmentämistä eläinsoluissa on selostettu euroop-

palaisissa patenttihakemusjulkaisuissa no. 92 182 ja 154 272. Kaikkiin näihin ennestään tunnettuihin menetelmiin liittyy vakavia haittoja. On osoittautunut vaikeaksi kasvattaa eläinsoluja suuressa mittakaavassa, mikä kuitenkin on edellytys näiden solujen tuottamien proteiinien edulliselle ja taloudelliselle tuotannolle. Eläinsolujen generaatioaika on huomattavasti pitempi kuin mikro-organismien, mikä vaatii pitempää fermentointiaikaa, jotta saavutetaan riittävän korkea solutiheys. Lisäksi eläinsoluja viljeltäessä saavutettava solutiheys on huomattavasti alhaisempi kuin mikro-organismeja suuressa mittakaavassa viljeltäessä yleensä saavutettu solutiheys. Lisäksi kantojen parantaminen on vaikeampaa kuin mikro-organismeilla. Toisaalta *E. coli*ssa tuotetuista proteiinivalmisteista löytyy usein kontaminoivia endotoksiineja. Nämä pitää poistaa kalliilla ja aikaavievillä puhdistuksilla. *E. coli*in tuottamat proteiinit ovat aina glykosyloitumattomia, koska *E. coli*lla ei ole sellaista entsyymijärjestelmää, jonka avulla hiilihydraattiketju liittyy proteiinimolekyylin tiettyihin kohtiin. Näin ollen geeniteknologialla *E. coli*ssa tuotettu scu-PA on glykosyloitumatonta, toisin kuin luontainen scu-PA. Kirjallisuudessa on mainittu, että *E. coli*in tuottama scu-PA esiintyy amorfisena liukenemattomana polymeerinä johtuen disulfidisiltojen epätäydellisestä sijainnista rivissä sekä proteiinin väärästä laskostumisesta. Näin ollen vaaditaan biologisesti aktiivisen proteiinin aikaansaamiseksi vähintään yksi lisälaskostusvaihe, jossa tarvitaan suuria määriä liuotinta (M.E. Winkler et al., supra).

Kun otetaan huomioon ennestään tunnettujen menetelmien haitat, on olemassa jatkuva tarve paremmille menetelmille, joilla voitaisiin tuottaa biologisesti aktiivista scu-PA:ta suuressa mittakaavassa. Esillä oleva keksintö tarjoaa tällaisia menetelmiä.

Nyt on yllättäen havaittu, että *S. cerevisiae*-hiivasolut, jotka ovat transformoituneet yhdistelmävektoreilla, joka sisältää ihmisen u-PA:ta koodittavan sekvenssin liitettyinä *S. cerevisiae*in geenin signaalisekvenssin,

tuottavat scu-PA:ta, jonka biologinen aktiivisuus vastaa luontaisen scu-PA:n biologista aktiivisuutta, ja joka on hiivan spesifisesti glykosyloima. Huomattakoon, että hiivan scu-PA on täysin aktiivista ilman mitään in vitro-uudelleenlaskostuksia.

Näin ollen esillä oleva keksintö koskee menetelmää ihmisen yksiketjuisen urokinaasityyppisen plasminogeenin aktivaattorin tuottamiseksi siten, että sopivissa ravinneolosuhteissa viljellään *S. cerevisiae*-hiivakantaa, joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, joka sisältää *S. cerevisiae*en ilmentymisensäätelysekvenssin, DNA-jakson, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaali-peptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria ja joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-jakson, joka sisältää *S. cerevisiae*en geenin transkriptionlopetussignaali, ja mainittu urokinaasityyppinen plasminogeenin aktivaattori eristetään.

Termi "kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria koodittava DNA-sekvenssi" on tarkoitettu kattamaan kaikki ne u-PA:n alleelliset muodot, joiden tiedetään esiintyvän ihmisen perimässä, tai jotka voidaan eristää siitä. Näistä DNA-sekvensseistä puuttuvat kaikki mahdolliset pre- ja/tai prosekvenssit.

Termin "scu-PA-proteiinit", missä tahansa sitä edellä tai jäljempänä onkin käytetty, tarkoitetaan kattavan scu-PA:n.

Erityisesti keksintö koskee menetelmää kaavan I mukaisten scu-PA-proteiinien tuottamiseksi

Ser Asn Glu Leu His Gln Val

Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn
Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe
Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu
Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met
Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln
Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu Gly
Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp
Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met

Val His Asp Cys Ala Asp Gly X₁ X₂ Pro Ser Ser Pro Pro Glu
 Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Y₁ Y₂
 Y₃ Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
 Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr
 Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala
 Thr His Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val
 Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met
 Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala
 Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg
 Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr
 Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser
 Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Z₁ Ser Z₂ Asp Tyr Leu
 Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys Leu Ile Ser His
 Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr
 Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg
 Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu
 Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro
 Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

jossa kaavassa kumpikin ryhmistä X₁ ja X₂ voi olla Lys, Y₁ on Arg, Y₂ on Phe, Y₃ on Lys, Z₁ on Asn, joka on hiivaspesifisesti glykosyloitunut, ja Z₂ on Thr.

Keksinnönmukaisia transformoituneita hiivakantoja kasvatetaan nestemäisessä ravinnealustassa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja.

Voidaan käyttää erilaisia hiililähteitä. Esimerkkejä etusijalle asetettavista hiililähteistä ovat assimiloituvat hiilihydraatit, kuten glukoosi, maltoosi, mannitoli tai laktoosi, tai asetaatit, kuten natriumasetaatti, joita voidaan käyttää joko yksin tai sopivina seoksina. Sopivia typpilähteitä ovat esimerkiksi aminohapot, kuten kasaminohapot, peptidit ja proteiinit ja niiden hajoamistuotteet, kuten tryptoni, peptoni ja lihauutteet, ja

edelleen hiivauute, mallasuute, maissinliuotusvesi sekä ammoniumsuolat, kuten ammoniumkloridi, -sulfaatti tai -nitraatti, joita voidaan käyttää joko yksin tai sopivina seoksina. Käytettäviksi sopivia epäorgaanisia suoloja ovat esimerkiksi natriumin, kaliumin, magnesiumin ja kalsiumin sulfaatit, kloridit, fosfaatit ja karbonaatit. Ravinnealusta voi lisäksi sisältää kasvua edistäviä aineita. Kasvua edistäviä aineita ovat esimerkiksi hivenaineet, kuten rauta, sinkki, mangaani tms., tai yksittäiset aminohapot.

Hiivasolut, joissa on konstitutiivisen promoottorin (esim. ADHI, GAPDH) sisältävä yhdistelmäplasmidi, ilmentävät mainittuun promoottoriin liitettyä u-PA-geeniä ilman indusointia. Jos u-PA-geeni on säädeltävissä olevan promoottorin (esim. PGK tai PHO5) ohjauksessa, pitää kasvualustaan koostumusta säätää, jotta saavutetaan mRNA-transkripteja maksimaalisina määrinä, eli käytettäessä PHO5-promoottoria, pitää kasvualustan sisältää epäorgaanista fosfaattia pienenä konsentraationa, jotta tämä promoottori kytkeytyy päälle.

Kasvatus suoritetaan tavanomaisia menetelmiä käyttäen. Kasvatusolosuhteet, kuten lämpötila, alustan pH ja fermentointiaika, valitaan niin, että scu-PA-proteiinija valmistuu maksimaaliset määrät. Valittua hiivakan-
taa kasvatetaan mieluummin aerobisissa olosuhteissa pinnanalaisviljelminä ravistelemalla tai sekoittamalla lämpötilassa, joka on välillä noin 25 - 35^oC, mielellään noin 28^oC:ssa, ja alueella 4 - 7 olevassa pH-arvossa, mielellään pH-arvossa noin 5, noin 20 - 50 tunnin ajan, mutta mielellään siihen asti, kunnes saavutetaan scu-PA-proteiinien maksimaalinen saanto.

Tuotettu scu-PA-proteiini voi kertyä hiivasolujen sisään tai erittyä periplasmiseen tilaan. Jos scu-PA-proteiini on kertynyt solujen sisään, on ensimmäinen vaihe scu-PA-proteiinin talteenotossa sen vapauttaminen solun sisältä. Useimmissa menetelmissä solunseinä poistetaan ensin suorittamalla entsymaattinen hajotus glukosidaaseilla (infra). Sitten näin sadut sferoplastit käsitellään pinta-aktiivisella aineella, kuten Triton^R X-100:lla. Vaihtoehtoisesti voidaan solujen rikkomiseen käyttää mekaanisia voimia, kuten leikkausvoimia

(esimerkiksi X-puristinta tai ranskalaista puristinta) tai ravistelua lasihelmien kanssa. Saatu seos rikastetaan scu-PA-proteiinin suhteen tavanomaisilla menetelmillä, kuten poistamalla suurin osa ei-proteiinimateriaalista polyetyleenimiinikäsittelyllä ja saostamalla proteiinit ammoniumsulfaatilla ja suorittamalla geelielektroforeesi, dialyysi, kromatografinen käsittely, kuten esimerkiksi ioninvaihtokromatografia, ekskluusiokromatografia, HPLC tai käänteisfaasi-HPLC, erotus molekyylikoon mukaan sopivassa Sephadex^R-pylväässä tms. Esipuhdistetun tuotteen lopullinen puhdistuminen saadaan aikaan esimerkiksi affiniteettikromatografialla, esimerkiksi vasta-aineaffiniteettikromatografialla ja erityisesti affiniteettikromatografialla monoklonaalisia vasta-ainetia käyttäen, jolloin käytetään alalla tunnetuilla menetelmillä liukenemattomaan matriisiin kiinnitettyä monoklonaalista vasta-ainetta, tms. menetelmillä. Kaikkiin puhdistusvaiheissa käytettyihin puskuriliuoksiin on edullista lisätä pinta-aktiivista ainetta, kuten Triton X-100^R:ää tai Tween 80^R:tä, jotta saadaan estetyksi scu-PA-proteiinin adsorptio astian pintoihin ja parannetuksi stabiilisuutta. Pinta-aktiivista ainetta voidaan lisätä niin, että sen lopulliseksi pitoisuudeksi tulee 0,01 - 1 %.

Jos hiivasolu erittää scu-PA-proteiinin periplasmiseen tilaan, voidaan käyttää yksinkertaistettua menetelmää: Proteiini otetaan talteen ilman solun rikkomista siten, että solunseinä poistetaan entsymaattisesti tai suoritetaan solunseiniä vahingoittava käsittely kemiallisilla aineilla, esimerkiksi tiolireagensseilla tai EDTA:lla, niin, että tuotettu scu-PA-proteiini vapautuu. Jos scu-PA-proteiini erittyy kasvualustaan, se voidaan ottaa suoraan talteen siitä.

Riippuen käytetystä isäntäkannasta sekä puhdistusmenetelmistä, voivat esillä olevan keksinnön mukaiset scu-PA-proteiinit olla kontaminoituneita pienillä määrillä vastaavaa kaksiketjuista muotoa johtuen isäntäsolujen vapauttamasta proteolyyttisestä aktiivisuudesta. Kaksiketjuisen muodon erottaminen halutusta yksiketjuisesta

muodosta (scu-PA) voidaan suorittaa alalla tunnetuilla menetelmillä, kuten suorittamalla kromatografia bentsimidiini-Sepharose^R:lla (ks. M.E. Winkler et al., Biochemistry 25, 4041 (1986)).

Yllättäen eroavat keksinnönmukaisesti tuotetut scu-PA-proteiinit *E. colista* saadusta scu-PA:sta siinä, että niillä on ihmisen luontaisen scu-PA:n biologinen aktiivisuus ilman, että tarvitsisi suorittaa uudelleenlaskostus, ja siinä, että ne ovat hiivan spesifisesti glykosyloimia Asn302:ssa. Hiivan spesifisesti suorittamasta glykosyloinnista johtuen eroavat keksinnönmukaiset scu-PA-proteiinit myös viljellyistä tai transformoituneista eläinsoluista eristetyistä scu-PA:sta ja ovat näin ollen uusia.

Näin ollen keksintö koskee myös scu-PA:ta, jossa on hiivalle ominainen glykosyloituneisuus, ja erityisesti sellaisia, joissa on *Saccaromyces cerevisiae*lle ominainen glykosyloituneisuus.

Keksinnönmukaiset transformoituneet *S. cerevisiae*-hiivakannat voidaan valmistaa geeniteknologisin menetelmin seuraavien vaiheiden kautta:

- valmistetaan scu-PA:ta koodittava rakennegeeni,
- sijoitetaan näin saatu rakennegeeni sopivaan vektoriin,
- transformoidaan *S. cerevisiae* näin saadulla yhdistelmävektorilla, ja valitaan transformoituneet isännät transformoitumattomien joukosta.

u-PA:n cDNA:n ja perimän u-PA:n DNA:n nukleotidisekvenssit tunnetaan (W.E. Holmes et al., Biotechnology 3, 923 (1985); A. Riccio et al., Nucleic Acids Research 13, 2759 (1985)). Kun u-PA:n cDNA-sekvenssi ja perimän vastaava Dna-sekvenssi tunnetaan, voidaan u-PA:ta koodittava rakennegeeni valmistaa alalla tunnetuilla menetelmillä. Nämä DNA-sekvenssit voidaan valmistaa mm. eristämällä mRNA scu-PA:ta tuottavista ihmisen soluista, kuten ihmisen karsinoomasoluista tai ihmisen alkion munuaissoluista, valitsemalla haluttu mRNA-laji esim. hybridisoidulla sopivan DNA-koettimen kanssa, valmistamalla tuolle

mRNA:lle komplementaarinen yksisäikeinen DNA ja sen jälkeen siitä kaksisäikeinen komplementaarinen DNA (ds cDNA) tai eristämällä perimän DNA ihmisen soluista ja valitsemalla haluttu DNA sopivaa DNA-koetinta käyttäen ja tarvittaessa mutatoimalla näin saatu cDNA tai perimän DNA tai valmistamalla rakennegeeni kemiallisesti syntetisoidulla. Keksinnönmukaiset rakennegeenit valmistetaan mielellään mRNA-tietä käyttäen.

Näin ollen esillä olevan keksinnön mukaiset yhdistelmävektorit sisältävät hiivan ilmentymisensäätelysekvenssin, DNA-jakson, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaaliptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria, ja joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan geenin transkriptionlopetussignaali.

Hiivan ilmentymisensäätelysekvenssit johdetaan hiivan, erityisesti *Saccharomyces cerevisiae* perimän DNA:sta. scu-PA:n ilmentämiseen käytetään mielellään voimakkaasti ilmentyvän hiivageenin ilmentymisensäätelysekvenssiä. Näin ollen voidaan käyttää TRP1-geenin, ADHI- tai ADHII-geenin, happofosfataasigeenin (PHO5), enolaasigeenin, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasigeenin (GAPDH), 3-fosfoglyseraattikinaasigeenin (PGK), heksokinaasigeenin, pyruvaattidekarboksylaasigeenin, fosfofruktokinaasigeenin, glukoosi-6-fosfaatti-isomeraasigeenin, 3-fosfoglyseraattimutaasigeenin, pyruvaattikinaasigeenin, trioosifosfaatti-isomeraasigeenin, fosfogluukoosi-isomeraasigeenin tai glukokinaasigeenin promoottoria tai α - tai α -tekijää koodittavan hiivan pariteluferomonigeenin promoottoria. On myös mahdollista käyttää yhdistelmäpromoottoireita, jotka koostuvat yhden hiivageenin ylävirran aktivointisekvensseistä (UAS) sekä toisen hiivageenin alavirran promoottorielementeistä, jotka sisältävät funktionaalisen TATA-jakson, jolloin esimerkkinä mainittakoon yhdistelmäpromoottori, joka sisältää hiivan PHO5-geenin UAS(:t) sekä GAPDH-geenin

alavirran elementit, joissa on mukana hiivan funktionaalinen TATA-jakso. Etusijalle asetettavat keksinnönmukaiset vektorit sisältävät promoottorin, johon liittyy transkription ohjattavuus. Tämänäyttöiset promoottorit, esimerkiksi PHO5-geenin promoottori ja PHO5-GAPDH-yhdistelmä-promoottori, voidaan kytkeä päälle tai pois päältä kasvatusolosuhteita muuttamalla. Esimerkiksi PHO5-promoottorin toiminta voidaan tukahduttaa, kun vain nostetaan ravinnealustan sisältämää epäorgaanisen fosfaatin pitoisuutta. Toinen edullinen keksinnönmukainen promoottori on GAPDH-geenin promoottori ja erityisesti sen funktionaaliset fragmentit, jotka alkavat välillä -550 - -180 olevista nukleotideista, erityisesti nukleotidista -540, -263 tai -198, ja päättyvät nukleotidiin -5 GAPDH-geenissä.

Signaali-peptidiä koodittava DNA-sekvenssi ("signaali-sekvenssi") on mielellään johdettu sellaisesta eukaryootin, esimerkiksi ihmisen tai hiivan, geenistä, joka koodittaa tavallisesti erittyvää polypeptidiä. Sopivia signaali-sekvenssejä ovat esimerkiksi ihmisen perimän DNA:sta saatava u-PA:n signaali-sekvenssi, hiivan signaali-sekvenssit, kuten hiivan invertaasigeenin, α -tekijägeenin, feromonipeptidaasigeenin (KEX1), "tappajatoksiinigeenin" jatukahdutettavissa olevan happofosfataasigeenin (PHO5) signaali- ja prepro-sekvenssit ja Aspergillus awamoriin glukoamylaasin signaali-sekvenssi. Vaihtoehtoisesti voidaan rakentaa yhdistelmäsignaali-sekvenssejä siten, että liitetään promoottoriin luontaisesti liittyvän geenin signaali-sekvenssin (jos sellainen on) osa u-PA:n signaali-sekvenssin osaan. Sellaiset yhdistelmät ovat edullisia, jotka mahdollistavat signaali-sekvenssin ja kypsän scu-PA:n aminohapposekvenssin välisen tarkan katkeamisen. Prekursorimolekyylien tarkkaa prosessointia helpottamaan voidaan rakenteisiinsisällyttää myös lisä-sekvenssejä, kuten pro- ja välikesekvenssejä, joissa saattaa olla spesifisiä prosessointisignaaleja, tai joista nämä spesifiset prosessointisignaalit saattavat

puuttua. Vaihtoehtoisesti voidaan aikaansaada yhdistelmä-proteiineja, jotka sisältävät sisäisiä prosessointisignaaleja, jotka mahdollistavat oikean kypsymisen in vivo tai in vitro. Prosessointisignaalit voivat sisältää esimerkiksi Lys-Arg-tähteen, jonka hiivan Golgi-kalvoissa sijaitseva endopeptidaasi tunnistaa. Etusijalla asetettavat keksinnönmukaiset signaalisekvenssit kuuluvat hiivan PHO5-geenille ja koodittavat seuraavan kaavan mukaista signaaliipeptidiä

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser
Leu Ala Asn Ala,

tai hiivan invertaasigeenille ja koodittavat seuraavan kaavan mukaista signaaliipeptidiä

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe
Ala Ala Lys Ile Ser Ala,

tai ihmisen u-PA-geenille ja koodittavat seuraavan kaavan mukaista signaaliipeptidiä

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu
Val Val Ser Asp Ser Lys Gly.

Hiivan transkriptionlopetussignaali sisältävä DNA-sekvenssi on mielellään sellainen hiivageenin 3'-reunasekvenssi, joka sisältää oikeat signaalit transkription lopettamiselle ja polyadenyloitumiselle. Sopivia 3'-reunasekvenssejä ovat esimerkiksi luontaisesti siihen geeniin kuuluvat, jota käytetään ilmentymisensäätelysekvenssiä. Etusijalle asetettavat reunasekvenssit ovat hiivan PHO5-geenille kuuluvia.

Keksinnönmukaiset yhdistelmäplasmidit sisältävät promoottorin, signaalisekvenssin, u-PA:ta koodittavan DNA-sekvenssin ja 3'-reunasekvenssien lisäksi lisä-DNA-sekvenssin(-sekvenssejä), joka(jotka) suorittaa(suorittavat) tärkeitä tehtäviä, esimerkiksi mainituilla yhdistelmäplasmideilla transformoituneiden solujen lisääntymisessä. Lisä-DNA-sekvenssi(-sekvenssit) voi(voivat) olla johdettu(johdettuja) prokaryoottisista ja/tai eukaryoottisista soluista ja sisältää kromosomaalisia ja/tai ekstra-kromosomaalisia DNA-sekvenssejä. Lisä-DNA-sekvenssit voi-

vat olla peräisin (tai koostua) esimerkiksi plasmidi-DNA:sta, kuten bakteeriperäisestä tai eukaryoottisesta plasmidi-DNA:sta, virus-DNA:sta ja/tai kromosomaalisesta DNA:sta, kuten bakteerin, hiivan tai korkeamman eukaryootin kromosomaalisesta DNA:sta. Etusijalle asetettavat yhdistelmäplasmidit sisältävät lisä-DNA-sekvenssejä, jotka on johdettu bakteeriplasmideista, erityisesti Escherichia colin plasmidista pBR322 tai pUC19:lle sukua olevista plasmideista, bakteriofagi λ :sta, hiivan 2 μ -plasmidista ja/tai hiivan kromosomaalisesta DNA:sta.

Keksinnönmukaisissa edullisissa yhdistelmäplasmideissa sisältävät lisä-DNA-sekvenssit hiivan replikoitumisen aloituskohdan ja valintamerkkigeenin hiivaa varten. Yhdistelmäplasmidit, jotka sisältävät hiivan replikoitumisen aloituskohdan, esimerkiksi autonomisesti replikoituvan segmentin (ars), pysyvät hiivasolussa yllä kromosominulkopuolisesti transformoitumisen jälkeen ja replikoituvat autonomisesti mitoosissa. Yhtä hyvin voidaan käyttää yhdistelmäplasmideja, jotka sisältävät hiivan 2 μ -plasmidi-DNA:lle homologisia sekvenssejä. Nämä yhdistelmäplasmidit uudelleenryhmittyvät solun sisäessä ennestään olevien hiivan 2 μ -plasmidien kanssa tai replikoituvat autonomisesti itse, jos replikoitumisen aloituskohta on läsnä. 2 μ -sekvenssit ovat erityisen sopivia suurella frekvenssillä transformoiviin plasmideihin ja tuottavat suuria kopiomääriä.

Mitä tulee hiivaan tarkoitettuun valintamerkkigeeniin, voidaan käyttää mitä tahansa merkkigeeniä, joka mahdollistaa transformanttien valinnan merkin fenotyyppisen ilmentymisen perusteella. Sopivia dominoivia merkkejä hiivalle ovat erityisesti antibioottiresistenssiä ilmentävät ja auksotrofisten hiivamutanttien tapauksessa geenit, jotka täydentävät isännän vajavuutta. Tällaiset geenit antavat esimerkiksi vastustuskyvyn G418-antibiootille tai hygromysiinille tai prototrofian auksotrofiselle hiivamutantille, esimerkiksi URA3-, LEU2-, HIS3- tai TRP1-geenin.

On edullista, jos keksinnönmukaisissa yhdistelmäplasmideissa läsnä olevat lisä-DNA-sekvenssit sisältävät

myös replikoitumisen aloituskohdan ja valintamerkkigeenin bakteeri-isäntää, erityisesti *Escherichia coli* varten. *E. coli* replikoitumisen aloituskohdan ja *E. coli* merkin läsnäoloon hiivan yhdistelmäplasmidissa liittyy hyödyllisiä seikkoja. Ensinnäkin, suuria määriä yhdistelmäplasmidi-DNA:ta voidaan saada kasvattamalla ja monistamalla *E. coli*ssa ja toiseksi, yhdistelmäplasmidien rakentaminen on edullista suorittaa *E. coli*ssa käyttämällä hyväksi *E. coli*in perustuvaa laajaa kloonausteknologiaa. *E. coli*in plasmidit, kuten pBR322 tms., sisältävät sekä *E. coli*in replikoitumisen aloituskohdan että *E. coli*in merkkigeenin, joka antaa vastustuskyvyn antibiooteille, esimerkiksi tetrasyklinille tai ampisilliinille, ja niitä voidaan edullisesti käyttää hiivan yhdistelmävektoreissa.

Lisä-DNA-sekvensseistä, jotka sisältävät esimerkiksi replikoitumisen aloituskohdat ja merkkigeenit hiiva- ja bakteeri-isäntää varten (ks. edellä), käytetään jäljempänä nimitystä "vektori-DNA", joka siis yhdessä hiivan promoottorin ja *scu*-PA-proteiinia koodittavan alueen kanssa muodostaa keksinnönmukaisen yhdistelmäplasmidin.

Esillä olevan keksinnön edullinen toteutustapa koskee yhdistelmäplasmideja, jotka kykenevät replikoitumaan autonomisesti hiivaisäntäkannassa, ja joissa on valintamerkki, ja mainitut yhdistelmäplasmidit sisältävät hiivan ilmentymisensäätelysekvenssin, DNA-jakson, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaalipeptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria tai sen mutanttia, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivageenin transkriptionlopetussignaalin, ja mainittu DNA-jakso on sijoitettu yhdessä transkriptionaloi- ja -lopetussignaalin kanssa ja kooditettujen luennanaloi- tussignaalin ja -lopetussignaalin kanssa mainittuun yhdistelmävektoriin mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin

ohjaukseen niin, että transformoituneessa hiivakannassa tapahtuu geenin ilmentyminen ja syntyy mainittua urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria tai sen mutanttia.

Esillä olevan keksinnön mukaiset yhdistelmävektorit valmistetaan alalla tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi liittämällä yhteen hiivan ilmentymisensäätelysekvenssi, DNA-jakso, joka koostuu signaaliptidiä koodittavasta alueesta ja u-PA:ta tai sen mutanttia koodittavasta DNA-sekvenssistä, ja hiivageenin 3'-reunasekvenssi ja vektori-DNA.

Yhdistelmäplasmidien valmistamiseen on edullista käyttää kartoitettua, rengasmaista vektori-DNA:ta, esimerkiksi bakteeriplasmidi-DNA:ta tms. (ks. edellä), jossa on vähintään yksi restriktiokohta, mielellään kaksi tai useampia restriktiokohtia. On edullista, jos vektori-DNA sisältää replikoitumisen aloituskohdat ja merkkigeenit hiivaisännälle ja/tai bakteeri-isännälle. Vektori-DNA katkaistaan sopivaa restriktioendonukleaasia käyttäen. Katkaistu DNA liitetään DNA-fagmenttiin(-fragmentteihin), joka(jotka) sisältää(sisältävät) hiivan ilmentymisensäätelysekvenssin, mainitun DNA-jakson ja mainitun DNA-sekvenssin, joka sisältää transkriptionlopetussignaalit. Ennen mainitun(mainittujen) DNA-fragmentin(-fragmenttien) liittämistä tai sen jälkeen (tai myös samanaikaisesti) on myös mahdollista tuoda mukaan replikoitumisen aloituskohdat ja/tai merkkigeenit hiiva- tai bakteeri-isäntää varten. Kaikissa tapauksissa valitaan katkaisu- ja liittämisolosuhteet niin, etteivät vektori-DNA:n oleelliset funktiot eikä säätelysekvenssin ilmentyminen häiriinny. Yhdistelmävektori voidaan rakentaa peräjälkeen liittämällä tai liittämällä yhteen kaksi DNA-jaksoa, jotka sisältävät kaikki tarvittavat sekvenssit.

DNA-jaksojen in vitro-yhteenliittämiseen voidaan käyttää erilaisia menetelmiä. Tasaiset päät (täydelli-

set emäsparit sisältävät DNA-kahdenteet), joita eräät restriktioendonukleaasit saavat aikaan, voidaan liittää suoraan yhteen T4 DNA-ligaasin avulla. Tavallisemmin DNA-jaksot liitetään yhteen yksisäikeisten kohesiivisten päidensä avulla ja suljetaan kovalenttisesti DNA-ligaasin, esimerkiksi T4 DNA-ligaasin, avulla. Yksisäikeiset "kohesiiviset päät" voidaan muodostaa katkaisemalla DNA toisentyypisillä endonukleaaseilla, jotka tuottavat porrastettuja päitä (DNA-kahdenteen kaksi säiettä katkeaa eri kohdista, jotka ovat muutaman nukleotidin päässä toisistaan). Yksisäikeisiä päitä voidaan myös muodostaa lisäämällä nukleotideja tasaisiin päihin tai porrastettuihin päihin käyttämällä terminaalista transferaasia ("homopolymeerihännitys") tai yksinkertaisesti vain syömällä tasapäisen DNA-jakson toista säiettä taaksepäin sopivan eksonukleaasin, kuten λ -eksonukleaasin, avulla. Vielä eräs tapa saada aikaan porrastettuja päitä on liittää tasapäiseen DNA-jaksoon kemiallisesti syntetisoitu kytkijä-DNA, joka sisältää porrastettuja päitä muodostavan endonukleaasin tunnistuskohdan, ja katkaista näin saatu DNA vastaavalla endonukleaasilla.

Keksinnönmukaisen yhdistelmävektorin komponentit, kuten hiivan promoottori, u-PA:n tai sen mutantin rakennegeeni signaalisekvenssi mukaanluettuna, transkriptionlopettaja, replikoitumissysteemi jne., liitetään yhteen määrättyssä järjestyksessä, jotta oikea toiminta voidaan taata. Komponentit liitetään yhteen yhteisten restriktiokohtien avulla tai käyttämällä synteettisiä kytkijämolekyylejä, jotta voidaan olla varmoja komponenttien oikeasta suunnasta ja järjestyksestä.

Keksinnönmukaiset transformoituneet hiivakannat valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla eli transformoimalla hiivakanta yhdistelmävektorilla, joka sisältää hiivan ilmentymisensäätelysekvenssin. DNA-jakso, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaaliptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuk-

sessä toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria tai sen mutanttia, joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivageenin transkriptionlopetussignaalit.

Sopivia hiivaisäntäorganismeja ovat erityisesti *Saccharomyces cerevisiae*-kannat.

Hiivasolujen transformointi suoritetaan alalla tunnetuilla menetelmillä. Transformointi voidaan suorittaa esimerkiksi julkaisussa Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978) kuvatulla menetelmällä. Tämä menetelmä voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jotka ovat seuraavat:

- (1) Poistetaan hiivan solunseinä tai sen osia.
- (2) "Paljaat" hiivasolut (sferoplastit) käsitellään transformoivalla DNA:lla PEG:n (polyetyleeniglykoli) ja Ca^{2+} -ionien läsnäollessa.
- (3) Solunseinä regeneroidaan ja transformoituneet solut valitaan kiinteässä agarkerroksessa.

Etusijalle asetettava menetelmä on seuraava:

- (1) Hiivan solunseinä poistetaan entsyymaattisesti käyttämällä erilaisia glukosidaasivalmisteita, kuten etanan suolinestettä (esim. Glusulase^R tai Helicase^R) tai mikro-organismeista saatuja enstymiseoksia (esim. Zymolase^R), osmoottisesti stabiloiduissa liuoksissa (esim. 1 M sorbitoli).

- (2) Hiivan sferoplastit aggregoituvat PEG:n läsnäollessa ja indusoituu sytoplasman kalvojen paikallisia fuusioita. "Fuusionkaltaisten" olosuhteiden aikaansaaminen on välttämätöntä ja monista hiivasoluista tulee diploidisia tai jopa triploidisia transformointiprosessin kuluessa. Rikastaminen transformanttien suhteen voidaan suorittaa menetelmillä, jotka mahdollistavat fuusioituneiden sferoplastien valinnan, eli transformoituneet solut voidaan helposti seuloa esiin ennalta valittujen fuusioitumistuotteiden joukosta.

(3) Koska solunseinättömät hiivasolut eivät jakaannu, pitää solunseinät regeneroida. Tämä regenerointi on edullista suorittaa peittämällä sferoplastit agariin. Sferoplastit voidaan esimerkiksi sekoittaa sulaan (noin 50°C) agariin. Kun liuos jäähdytetään hiivan kasvu- lämpötilaan (noin 30°C), saadaan kiinteä kerros. Tämä agarkerros estää elintärkeiden makromolekyylien nopean diffuusion ja menetyksen sferoplasteista ja mahdollistaa näin ollen solunseinän regeneroitumisen. Solunseinän regeneroituminen voidaan myös saavuttaa (vaikkakin pienemmällä teholla) maljaamalla sferoplastit ennalta muodostettujen agarkerrosten pinnalla.

Regenerointiagar on edullista valmistaa niin, että transformoituneiden solujen regenerointi ja valinta voidaan suorittaa samalla kertaa. Koska valintamerkkeinä käytetään yleensä sellaisia hiivageenejä, jotka koodittavat aminohapon biosynteesin reitin entsyymejä (supra), on regenerointi edullista suorittaa hiivan minimiravinne- agarissa. Jos hyvin suuria regeneroitumistehokkuuksia tarvitaan, on seuraava kaksivaiheinen menetelmä edullinen: (1) solunseinät regeneroidaan ravinnerikkaassa alustassa ja (2) transformoituneet solut valitaan maljaamalla solukerroksen jäljennös valinta-agarmaljassa.

Jos yhdistelmävektori ei sisällä mitään merkki-geeniä, voidaan transformiotuneet solut tunnistaa myös vaihtoehtoisilla menetelmillä. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi in situ-hybridisointi leimatun DNA-fragmentin kanssa, joka on homologinen yhdistelmävektorin sekvenssien kanssa (esim. Hinnen et al:n, supra, menetelmällä), in situ-immunomääritykset edellyttäen, että mukaan sisällytetyn geenin tuotteen vasta-ainetta on tarjolla, tai muut seulontamenetelmät, jotka mittaavat transformoivan(transformoivien) plasmidin(plasmidien) geenituotteita.

Vaihtoehtoisesti voidaan hiiva yhteistransformoida keksinnön mukaisella yhdistelmävektorilla ja toisella, hiivan merkkigeenin sisältävällä vektorilla. Jos näillä

kahdella eri vektorilla on samoja DNA-sekvenssejä (nämä voivat olla bakteeriperäisiä sekvenssejä), tapahtuu rekombinaatio ja seurauksena on fuusioitunut valintakelpoinen yhdistelmä molekyyli.

Keksinnön mukaisen yhdistelmäplasmidin sisältävien transformoituneiden hiivakantojen scu-PA:n tai sen mutanttien tuotantoa voidaan parantaa mutatoinnilla ja valinnalla käyttämällä alalla tunnettuja valintamenetelmiä. Mutatointi voidaan suorittaa esimerkiksi UV-säteilytyksellä tai sopivilla kemiallisilla aineilla. Erityisen edullista on saada aikaan proteaasivajaita mutantteja, erityisesti tällaisia hiivamutanteja, jotta vältetään tuotetun scu-PA:n tai sen mutanttien solujen sisällä tapahtuvalta proteolyytiseltä hajoamiselta. Sopivat mutantit voidaan valita ja eristää tavanomaisilla keinoilla.

Keksinnön mukaisesti valmistettavissa olevilla scu-PA-proteiineilla, erityisesti näillä uusilla scu-PA-proteiineilla, on arvokkaita farmakologisia ominaisuuksia. Niitä voidaan käyttää ihmisillä vastaavalla tavalla kuin ennestään tunnettuja plasminogeenin aktivaattoreita haluttaessa ehkäistä tai hoitaa trombooseja tai muita tiloja, joissa on toivottavaa saada aikaan paikallinen fibrinolyttinen tai proteolyttinen aktiivisuus plasminogeenin aktivoitumismekanismin kautta, joista tiloista mainittakoon arterioskleroosi, sydän- ja aivoinfarkti, laskimotromboosit, tromboembolia, leikkausten jälkeiset tromboosit, tromboflebiitti ja diabetekseen liittyvät verisuonisairaudet.

Keksinnön mukaisista proteiineista voidaan valmistaa farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät terapeuttisesti tehokkaan määrän vaikuttavaa ainetta (scu-PA) sekä orgaanisia tai epäorgaanisia, kiinteitä tai nestemäisiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, jotka soveltuvat parenteraaliseen, kuten intravenoosiin, antotapaan eivätkä ole haitallisessa vuorovaikutuksessa vaikuttavien aineosien kanssa.

tai epäorgaanisia, kiinteitä tai nestemäisiä farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantaja-aineita, jotka soveltuvat parenteraaliseen, kuten intravenoosiseen, antotapaan eivätkä ole haitallisessa vuorovaikutuksessa vaikuttavien aineosien kanssa.

Erityisesti infuusioliuokset, mielellään vesiliuokset tai -suspensiot, ovat sopivia ja ne on mahdollista valmistaa ennen käyttöä esimerkiksi lyofilisoiduista valmisteista, jotka sisältävät vaikuttavaa ainetta yksin tai kantaja-aineen, kuten mannitolin, laktoosin, glukosin, albumiinin tms., kanssa. Farmaseuttiset koostumukset voidaan steriloida ja niihin voidaan haluttaessa sekoittaa apuaineita, kuten esimerkiksi säilöntäaineita, stabilointiaineita, emulgointiaineita, liuotusaineita, puskurointiaineita ja/tai osmoottisen paineen säätöön suoloja, kuten natriumkloridia. Sterilointi voidaan suorittaa suodattimilla, joiden huokoskoko on pieni (halkaisija 0,45 μm tai pienempi), minkä jälkeen valmiste voidaan haluttaessa lyofilisoida. Steriilisyyden pysymistä varten voidaan myös lisätä antibiootteja. Esimerkiksi keksinnön mukainen scu-PA-proteiini formuloidaan steriloiduksi vesiliuokseksi, joka sisältää 5 % glukosia ja haluttaessa myös stabilointiaineita ja suoloja.

Farmaseuttiset koostumukset jaetaan annosyksikkömuotoihin, esimerkiksi ampulleihin, jotka sisältävät 1 - 2000 mg farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta annosyksikköä kohti ja noin 1 - 20 mg, mielellään noin 3 - 15 mg vaikuttavaa ainetta (scu-PA) annosyksikköä kohti.

Riippuen sairauden laadusta ja potilaan iästä ja tilasta, on noin 70 kg painavan potilaan hoidossa käytettävä vuorokausiannos alueella 20 - 150 mg, mielellään 45 - 100 mg, siis 24 tuntia kohti.

Menetelmässä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi esillä olevan keskinnön mukainen biologisesti aktiivinen proteiini sekoitetaan farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen.

Keksinnön mukaisia uusia proteiineja voidaan käyttää ihmiseen ennaltaehkäisevässä tai hoitotarkoituksessa.

Edelleen keksintö koskee uusia yhdistelmäplasmideja, mainituilla yhdistelmäplasmideilla transformoituneita hiivakantoja ja menetelmiä näiden tuottamiseksi.

Erityisesti keksintö koskee scu-PA-proteiineja, yhdistelmävektoreita, transformoituneita hiivaisäntiä ja menetelmiä näiden tuottamiseksi, kuten esimerkeissä on selostettu.

Seuraavassa kokeellisessa osassa selostetaan esillä olevan keksinnön eri toteutustapoja liitteenä olevien piirrosten avulla.

Kuva 1 esittää ihmisen u-PA-cDNA:n restriktioendonukleaasikarttaa.

Kuva 2 esittää ihmisen u-PA-cDNA:n nukleotidisekvenssiä ja siitä pääteltyä aminohapposekvenssiä. Kypsän proteiinin ensimmäinen aminohappo on alleviivattu.

Kuva 3 on kaavioesitys plasmidin pCS16 rakentamisesta.

Kuva 4 on kaavioesitys plasmidin pCS16/UPA rakentamisesta, joka plasmidi sisältää u-PA-cDNA:n.

Kuva 5 on kaavioesitys plasmidin pJDB207/PHO5-I-UPA rakentamisesta (lyhenteet: SS = signaalisekvenssi, t = transkription lopettaja, p = promoottori ja L = kytkijä).

Kuva 6 esittää GAPDH:n promoottorialueen DNA-sekvenssiä.

Kuva 7 on kaavioesitys plasmidin p31GAPDL-IT rakentamisesta.

Kuva 8 esittää tässä keksinnössä käytettyjä GAPDH-geenin promoottorielementtejä.

Kuva 9 on kaavioesitys plasmidin pJDB207/GAPDL-I-UPA rakentamisesta.

Kuva 10 on kaavioesitys plasmidin pJDB207/GAPDL-UPA rakentamisesta.

Kuva 11 ja kuva 12 esittävät plasmidin pDP38 rakentamista plasmidin pDP33 kautta.

Keksintöä valaistaan, mutta ei rajoiteta seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1: u-PA:n koodittavan alueen sisältävän plasmidin pCS16/UPA rakentaminen

A) Plasmidin pCS16. (ks. kuva 3) rakentaminen

Plasmidista pUN121 (B. Nilsson et al., Nucl. Acids. Res. 11, 8019 - 8030 (1983)) saatu 1,5 ke:n PstI-BamHI-fragmentti, joka sisältää lambda-fagin cI-geenin ja osan tetrasykliiniresistenssigeenistä, kloonataan PstI:llä ja BamHI:llä katkaistuun plasmidiin pUC18 (J. Norrander et al., Gene 26, 101 - 106 (1983)). Näin saatu klooni katkaistaan PstI:llä. Yli ulottuvat 3'-päätt poistetaan reaktiolla T4 DNA-polymeraasin kanssa (T. Maniatis et al., Molecular Cloning (1982), s. 395) ja tasaisiin päihin liitetään XhoI-kytkijät (5'-CCTGGAGG-3', Biolabs). Sitten suoritetaan katkaisu XhoI:llä ja yhteenliittäminen uudestaan renkaaksi. Erällä yhteenliittämisseosta transformoidaan Ca^{2+} -käsitelty E. coli HB101-solut. Yksittäisten ampisilliinille resistenttien pesäkkeiden DNA analysoidaan. Useista oikeista klooneista valitaan yksi ja sille annetaan nimeksi pCS16.

B) Plasmidin pCS16/UPA (ks. kuva 4) rakentaminen

Urokinaasin cDNA valmistetaan ihmisen Hep3-soluista saadusta mRNA:sta (ks. T. Maniatis et al., ss. 188 - 246, supra). Kun u-PA-cDNA:n 1,3 ke:n SmaI-BamHI-fragmentti ja 1 ke:n BamHI-EcoRI-fragmentti kloonataan plasmidin pUN121 SmaI- ja EcoRI-kohtiin (B. Nilsson

et al., Nucl. Acids. Res. 11, 8019 - 8030 (1983), saadaan plasmidi pcUK176. Kuvassa 1 on esitetty ihmisen u-PA-cDNA-liitännäisen restriktioendonukleaasikartta. u-PA-liitännäisen nukleotidisekvenssi ja siitä päätelty aminohapposekvenssi on esitetty kuvassa 2. u-PA-cDNA-liitännäinen alakloonataan plasmidiin pCS16. Alakloonattu cDNA ulottuu SmaI-kohdasta, joka on luetuksi tulematomalla 5'-alueella (kuva 1), PvuII-kohtaan, joka on nukleotidiasemissa 1439 - 1444 (kuva 2) luetuksi tulematomalla 3'-alueella.

15 µg plasmidia pcUK176 katkaistaan PvuII:lla. 379 ep:n PvuII-fragmentti erotetaan muista fragmenteista 1,5-prosenttisessä agarosigeelissä, joka on tehty Tris-boraatti-EDTA-puskuriin, pH 8,3. DNA elektroeluoidaan, puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografisesti (Whatman) ja saostetaan etanolilla. 1,2 µg yksisäikeistä XhoI-kytkijää (5'-CCTCGAGG-3') fosforyloidaan 5'-päästään, kuumentetaan 10 minuuttia 75°C:ssa ja annetaan emäspariutua itsensä kanssa huoneenlämpötilassa ja varastoidaan -20°C:ssa. 0,9 µg kinasoitua kaksisäikeistä XhoI-kytkijää liitetään 80-kertaisena molaarisena ylimääränä pcUK176:n 379 ep:n PvuII-fragmentin tasaisiin päihin (ks. edellä) 20 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs), reaktioajan ollessa 16 tuntia 15°C:ssa. Saatua seosta kuumentetaan 10 minuuttia 85°C:ssa. Ylimääräiset kytkijämolekyylit poistetaan saostamalla 0,54 tilavuudella isopropanolia siten, että läsnä on 10 mM EDTA ja 300 mM natriumasetaattia pH 6,0, saostusajan ollessa 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. DNA katkaistaan XhoI:llä ja BamHI:llä. 121 ep:n BamHI-XhoI-fragmentti eristetään 1,5-prosenttisessä agarosigeelissä, joka on tehty Tris-boraatti-EDTA-puskuriin, pH 8,3. 6 µg plasmidia pcUK176 katkaistaan SmaI:llä ja BamHI:llä. 1,3 ke:n SmaI-BamHI-fragmentti, joka sisältää surimman osan u-PA:ta koodittavasta sekvenssistä, eristetään. 6 µg plasmidia pCS16

katkaistaan SmaI:llä ja XhoI:llä. 2,7 ke:n vektorifragmentti eristetään. DNA-fragmentit elektroeluoidaan geelistä ja saostetaan etanolilla. 0,2 pmol 1,3 ke:n SmaI-BamHI-fragmenttia, 0,2 pmol 121 ep:n BamHI-XhoI-fragmenttia (nämä kaksi fragmenttia muodostavat täydellisen u-PA:ta koodittavan sekvenssin) ja 0,1 pmol 2,7 ke:n vektorifragmenttia liitetään yhteen 10 μ l:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia, 15°C:ssa. 1 μ l:n ja 3 μ l:n erät yhteenliittämiseosta lisätään 100 μ l:aan Ca²⁺:lla käsiteltyjä HB101-soluja. Transformointi suoritetaan julkaisussa A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,1929 (1978) kuvatulla tavalla. 12 ampisilliinille vastustuskykyistä pesäkettä kasvatetaan LB-alustassa, joka sisältää 100 mg/l ampisilliiniä. DNA eristetään menetelmällä Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981) ja analysoidaan suorittamalla restriktiokatkaisut EcoRI:llä, PvuII:lla ja XhoI:llä.

Vastaavalla tavalla alakloonataan plasmidiin pCS16 urokinaasi-cDNA, joka ulottuu SmaI-kohdasta (nukleotidi-asetat 1 - 6, kuva 2) PstI-kohtaan, joka on nukleotidiasemissa 1637 - 1642 (ks. kuva 2). Plasmidi pcUK176 katkaistaan PstI:llä. Porrastetut päät muunnetaan tasaisiksi reaktiolla T4 DNA-polymeraasin kanssa, kuten Maniatis et al. (supra, s. 395) ovat selostaneet. 1,2 ke:n DNA-fragmentit eristetään. Lisätään XhoI-kytkijät, kuten edellä on selostettu. DNA katkaistaan BamHI:llä ja XhoI:llä ja 315 ep:n BamHI-XhoI-fragmentti eristetään. 0,2 pmol tätä fragmenttia liitetään 1,3 ke:n SmaI-BamHI-fragmenttiin ja 2,7 ke:n vektorifragmenttiin (ks. edellä). Yhteenliittämisseoksella transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut. Plasmidi-DNA:lle, joka on saatu yhdestä odotetut restriktiofragmentit sisältävästä kloonista, annetaan nimeksi pCS16/UPA-13. Tämä plasmidi sisältää u-PA-cDNA-liitännäisen, joka ulottuu luetuksitulemattomalla 5'-alueella olevasta SmaI-kohdasta (kuva 1) PstI-

kohtaan, joka on nukleotidiasemassa 1641 (kuva 2) luetuksi-
tulemattomalla 3'-alueella. Ainoa ero plasmidiin
pCS16/UPA verrattuna on pitemmälle ulottuva luetuksi-
tulematon 3'-alue.

Esimerkki 2: Plasmidin p31RIT-12 rakentaminen, joka plas-
midi sisältää PHO5-promoottorin ja invertaasin signaali-
sekvenssin

A) Oligodeoksiribonukleotidien syntetisointi invertaa-
sin signaalsekvenssiä varten:

DNA-syntetisaattorilla (malli 380B, Applied Biosys-
tems) syntetisoidaan neljä oligodeoksiribonukleotidia:
I-1, I-2, I-3 ja I-4. Suojauksen poiston jälkeen synteet-
tiset fragmentit puhdistetaan 12-prosenttisessa polyakryy-
liamidigeelissä, joka sisältää 8 mol/l ureaa. Suolasta
vapaat, puhtaat oligodeoksiribonukleotidit saadaan käyttä-
mällä Sep. Pak'ia (Waters Associates). Nämä fragmentit
muodostavat invertaasin signaalsekvenssiä koodittavan
kahdenteen, joka sisältää hiivassa usein käytettyjä
kodoneja.

HindIII

EcoRI MetLeuLeuGlnAlaPheLeuPheLeuLeu

I-1 5' AATTCATGCTTTTGCAGCTTTTCCTTTTCCTTT 3'

I-2 3' GTACGAAAACGTTTCGAAAGGAAAAGGAAAACCGAC 5'

AlaGlyPheAlaAlaLysIleSerAla

I-3 5' GGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCTGCATCTTAGCGTC 3'

I-4 3' CAAAACGTCGGTTTTATAGACGTAGAATCGCAGAGCT 5'

HgaI
XhoI

B) Invertaasin signaalsekvenssin alakloonaus plasmidiin
p31

a) Vektorin valmistus.

1,5 µg plasmidia p31R/SS-TPA42 (eurooppalainen
patenttihakemusjulkaisu no. 143 081) katkaistaan 1 tunti
37°C:ssa 10 yksiköllä EcoRI:tä (Boehringer) 50 µl:ssa

liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 6 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl ja 6 mM merkaptoetanolia. Sitten lisätään 1 μ l 2,5 M NaCl-liuosta ja 10 yksikköä XhoI:tä (Boehringer) ja inkuboidaan 1 tunti 37°C:ssa. 4,2 ke:n vektori eristetään 0,8-prosenttisessa preparatiivisessa agarosigeelissä. Geeliviipale siirretään Micro Colloid-putkeen (Sartorius GmbH), peitetään 200 μ l:lla TE-puskuria ja elektroeluodaan (elektroforesoidaan 90 mA:n viralla 50 minuuttia). TE-liuos kerätään talteen ja saostetaan 2,5 tilavuudella absoluuttista etanolia sen jälkeen, kun on lisätty 0,1 tilavuutta 10 x TNE-puskuria. DNA-pelletti pestään kylmällä 80-prosenttisellä etanolilla ja kuivataan vakuuissa. DNA uudelleensuspendoidaan 6 μ l:aan TE-puskuria (40 pmol/ μ l).

b) Oligodeoksiribonukleotidien (I-1, I-2, I-3, I-4) emäspariutus, kinasointi ja liittäminen vektoriin

Liuosta, joka sisältää 10 pmol kutakin neljää deoksiribonukleotidia 10 μ l:ssa 0,5 M Tris.HCl-puskuria, pH 8, inkuboidaan 5 minuuttia 95°C:ssa vesihauteella. Vesihaude jäädytetään hitaasti 5 tunnissa 30°C:een. Tähän emäspariutettuun liuokseen lisätään 0,1 M $MgCl_2$ -liuosta, 0,1 M NaCl-liuosta, 30 mM DTT-liuosta ja 4 mM ATP-liuosta (2 μ l) kutakin) ja 8 yksikköä (1 μ l) polynukleotidikinaasia (Boehringer). Kinasointi suoritetaan 1 tunnissa 37°C:ssa. Emäspariutetut, kinasoidut oligonukleotidit ja 60 pmol EcoRI-XhoI-katkaistua p31R/SS-TPA42-vektoria (1,5 μ l) liitetään yhteen käyttämällä 400 yksikköä (1 μ l) T4 DNA-ligaasia (Biolabs) reaktioajan ollessa 17 tuntia 14°C:ssa. Reaktio pysäytetään inkuboimalla 10 minuuttia 65°C:ssa. 10 μ l:lla tätä yhteenliittämisseosta transformoidaan E. coli HB101 Ca^{2+} -solut (M. Dagert ja S.D. Ehrlich, Gene 56, 23 - 28 (1979)). Poimitaan 20 amp^R pesäkettä. DNA valmistetaan nopealla eristysmenetelmällä (D.S. Holmes ja M. Quigley, Anal. Biochem. 114, 193 - 197 (1981)). DNA

katkaistaan EcoRI:llä ja XhoI:llä, leimataan radioaktiivisesti EcoRI-päästä ja analysoidaan 6-prosenttisessa polyakryyliamidigeelissä, joka sisältää 8 mol/l ureaa, käyttämällä merkkinä HaeIII:lla katkaistua pBR322-DNA:ta. Kaikista 20 kloonista saaduissa DNA-valmisteissa havaitaan oikeaa kokoa oleva vyöhyke. Yhtä kloonia kasvatetaan 100 ml:ssa LB-alustaa, joka sisältää 100 µg/ml ampisilliiniä. Plasmidi-DNA eristetään ja sille annetaan nimeksi p31RIT-12.

Esimerkki 3: Plasmidin pJDB207/PHO5-I-UPA (kuva 5) rakentaminen

Plasmidi pJDB207/PHO5-I-UPA sisältää PHO5-promootorin, invertaasin signaalsekvenssin, kypsää urokinaasia koodittavan sekvenssin ja PHO5:n transkriptionlopetussekvenssin peräkkäisessä järjetyksessä hiivan ilmentämisvektoriin pJDB207 kloonattuina.

20 µg plasmidia pCS16/UPA katkaistaan täysin 40 yksiköllä EcoRI:tä. Fenoliuuton ja etanolisaostuksen jälkeen katkaistaan EcoRI:llä katkaistu DNA vielä TaqI:llä 65°C:ssa. Saadut fragmentit erotetaan prepratiivisessa 1,2-prosenttisessa agarosegeelissä. 462 bp:n Taq-EcoRI-fragmentti eristetään elektroeluutiolla geelistä ja saostetaan etanolilla.

DNA-fragmentin TaqI-kohtaan liitetään seuraavan kaavan mukainen oligodeoksiribonukleotidi

(I) 5'-CTGCAAGCAATGAACTTCATCAAGTTCCAT-3'

(II) 3'-TCGTTACTTGAAGTAGITCAAGGTAGC-5'

Kytkejä palauttaa kypsää u-PA:ta koodittavan sekvenssin 5'-pään (nukleotidit 130 - 154, kuva 2) ja saa aikaan lukuvaiheistuksessa olevan liittymisen invertaasin signaalsekvenssiin. Kytkejän 5'-CTGCA-sekvenssi täyttää invertaasin signaalsekvenssin vastaa-

van sisempänä olevan 3'-pään, joka on syntynyt HgaI-katkaisussa.

300 pmol kutakin oligodeoksinukleotidia I ja II fosforyloidaan ja emäspariutetaan. 5,25 µg (600 pmol) fosforyloitua, kaksisäikeistä kytkijä-DNA:ta liitetään 1,7 µg:aan (5,6 pmol) 462 ep:n TaqI-EcoRI-fragmenttia (ks. edellä) 175 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM DTT ja 800 yksikköä T4 DNA-ligaasia, reaktioajan ollessa 16 tuntia 15°C:ssa. T4 DNA-ligaasi inaktivoidaan inkuboimalla 10 minuuttia 85°C:ssa. Kytkijäylimäärä poistetaan saostamalla siten, että läsnä on 10 mM EDTA, 300 mM natriumasettaattia, pH 6,0, ja 0,54 tilavuutta isopropanolia. DNA katkaistaan PstI:llä. Näin saadaan yksi ainut 312 ep:n fragmentti, joka sisältää kytkijän liittyneenä u-PA:n DNA-sekvenssiin, joka ulottuu nukleotidiin 436 asti (PstI-kohta, ks. kuva 2). DNA-fragmentti puhdistetaan elektroeluutiolla ja saostetaan etanolilla.

Plasmidi pCS16/UPA katkaistaan XhoI:llä ja PstI:llä. 1007 ep:n PstI-XhoI-fragmentti eristetään ja puhdistetaan. Tämä fragmentti sisältää suurimman osan urokinaasia koodittavasta sekvenssistä.

Plasmidi p31RIT-12 (ks. esimerkki 2) katkaistaan SalI:llä ja XhoI:llä. Eristetään 882 ep:n SalI-XhoI-fragmentti geelistä elektroeluutiolla ja etanolisaostuksella. Saatu fragmentti katkaistaan vielä BamHI:llä ja HgaI:llä. Eristetään 591 ep:n BamHI-HgaI-fragmentti, joka sisältää PHO5-promoottorialueen ja invertaasin signaalisekvenssin.

Plasmidi pJDB207(PHO5-TPA 18 (ks. eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu no. 143 081) katkaistaan BamHI:llä ja XhoI:llä. 6,8 ke:n vektorifragmentti eristetään preparatiivisessa, 0,6-prosenttisessa garoosigeelissä, joka on tehty Tris-asettaattipuskuriin, pH 8,2. DNA elektroeluoidaan ja saostetaan etanolilla.

Kaikki DNA-fragmentit uudelleensuspendoidaan veteen

pitoisuuteen 0,1 pmol/ μ l. 0,2 pmol 591 ep:n BamHI-HgaI-fragmenttia, 0,2 pmol 312 ep:n HgaI-PstI-fragmenttia, 0,2 pmol 1007 ep:n PstI-XhoI-fragmenttia ja 0,1 pmol 6,8 ke:n BamHI-XhoI-vektorifragmenttia liitetään yhteen 15 tunnissa 15°C:ssa 10 μ l:ssa liuosta, jossa on 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM ATP ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia. 1 μ l:lla yhteenliittämisseosta transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut. Poimitaan 12 amp^R-pesäkettä ja niitä kasvatetaan LB-alustassa, joka sisältää 100 mg/ml ampicilliiniä. DNA valmistetaan nopealla eristysmenetelmällä (D.S. Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981)). Kun plasmidi-DNA:lle suoritetaan restriktiokatkaisut HindIII:lla ja EcoRI:llä, havaitaan odotetut restriktiofragmentit. Yhden kloonin plasmidi-DNA valitaan ja sille annetaan nimeksi pJDB207/PHO5-I-UPA.

Esimerkki 4: Plasmidin pJDB207/PHO5-UPA rakentaminen

Tämä rakenne koostuu PHO5-promoottorista ja PHO5:n signaalisekvenssistä, jotka on liitetty lukuvaiheistukseen kypsää urokinaasia koodittavan sekvenssin kanssa ja kloonattu hiivan pJDB207-vektoriin.

Seuraavan kaavan mukainen oligodeoksisiribonukleotidikytijä

(I) 5'-CCAATGCAAGCAATGAACTTCATCAAGTCCAT-3'

(II) 3'-GGTTACGTTTCGTTACTTGAAGTAGTTCAAGGTAGC-5'

antaa PHO5-signaalisekvenssin 8 nukleotidia (5'-CCAATGCA) (signaalisekvenssin sisäisestä BalI-kohdasta prosessointikohtaan asti) ja saa aikaan lukuvaiheistuksessa olevan liittymisen kypsää u-PA:ta koodittavaan sekvenssiin (nukleotidiasemat 130 - 154, kuva 2). Tämä kytijä liitetään pCS16/UPA:n 462 ep:n TaqI-EcoRI-fragmenttiin (ks. esimerkki 3). Fosforylointi, emäspariutus ja yhteen-

liittäminen tehdään esimerkin 3 mukaisesti. DNA katkaistaan BalI:llä ja PstI:llä. 315 ep:n fragmentti eristetään. Tämä DNA-fragmentti sisältää u-PA-geenin DNA-sekvenssin asemassa 436 olevaan PstI-kohtaan asti (kuva 2).

Plasmidi p31 (ks. eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu no. 100 561) katkaistaan BalI:llä ja BamHI:llä. Eristetään 584 ep:n BamHI-BalI-fragmentti, joka sisältää PHO5-promoottorin ja suurimman osan PHO5:n signaalsekvenssistä. DNA-fragmentit puhdistetaan elektroeluutiolla ja DE52-kromatografiolla, saostetaan etanolilla ja uudelleensuspendoidaan veteen pitoisuuteen 0,1 pmol/ μ l.

0,2 pmol 584 ep:n BamHI-BalI-fragmenttia, 0,2 pmol 315 ep:n BalI-PstI-fragmenttia, 0,2 pmol 1007 ep:n PstI-XhoI-fragmenttia (ks. esimerkki 3) ja 0,1 pmol 6,8 ke:n BamHI-XhoI-vektorifragmenttia (ks. esimerkki 3) liitetään yhteen ja yhteenliittämisseoksella transformoidaan E. coli HB101. Poimitaan 6 amp^R-pesäkettä ja niitä kasvatetaan LB-alustassa, joka sisältää 100 mg/l ampisilliinia. Plasmidi-DNA valmistetaan nopealla DNA:n eristysmenetelmällä ja analysoidaan BamHI/PstI-kaksoiskatkaisulla. Valitaan yksi kloon, jossa on odotetut restriktiofragmentit, ja sille annetaan nimeksi pJDB207/PHO5-UPA.

Esimerkki 5: Plasmidin pJDB207/PHO5-SSUPA rakentaminen

Tämä plasmidi sisältää urokinaasigeenin ja urokinaasin signaalsekvenssin PHO5-promoottorin ohjauksessa hiivan ilmentämisvektorissa pJDB207.

20 μ g plasmidia pCS16/UPA-13 (ks. esimerkki 1) katkaistaan täysin 100 yksiköllä BglI:tä (nukleotidi-asetat 76 - 86, kuva 2). Syntyneet 3 fragmenttia erotetaan preparatiivisessa 1-prosenttisessä agarosigeelissä, joka on tehty Tris-boraatti-EDTA-puskuriin, pH 8,3. 1,7 ke:n BglI-fragmentti elektroeluoidaan ja saostetaan etanolilla.

Seuraavan kaavan mukaisessa oligodeoksiribonukleotidikytkijässä

(I) 5'-AATTCGATTACCAATGAGAGCCCTGC-3'

(II) 3'- GCTAATGGTTACTCTCGGG -5'

on EcoRI-kohta liittyneenä PHO5:n koodittamattoman 5'-alueen 8 nukleotidiin sen ATG:n edessä ja u-PA:n koodittavan sekvenssin nukleotidit 70 - 82 (kuva 2), kun ATG luetaan mukaan. Kytkijä liitetään porrastettuihin BglI-päihin, kuten esimerkissä 3 on selostettu. DNA katkaistaan EcoRI:llä ja PstI:llä.

Eristetään 380 ep:n fragmentti, joka sisältää u-PA:n signaalsekvenssin ja osan kypsää u-PA:ta koodittavasta sekvenssistä ulottuen nukleotidiin 436 asti (PstI-kohta, kuva 2).

Plasmidi p31R (ks. eurooppalainen patenttihakemus-julkaisu no. 100 561) katkaistaan BamHI:llä ja EcoRI:llä ja eristetään 534 ep:n BamHI-EcoRI-fragmentti, joka sisältää PHO5-promoottorin. DNA-fragmentit elektroeloidaan agarosegeelistä, puhdistetaan DE52-kromatografisesti, saostetaan etanolilla ja uudelleensuspendoidaan veteen pitoisuuteen 0,1 pmol/μg.

0,2 pmol 534 ep:n BamHI-EcoRI-fragmenttia, 0,2 pmol 380 ep:n EcoRI-PstI-fragmenttia, 0,2 pmol 1007 ep:n PstI-XhoI-fragmenttia (ks. esimerkki 3) ja 0,1 pmol 6,8 ke:n BamHI-XhoI-vektorifragmenttia (ks. esimerkki 3) liitetään yhteen ja yhteenliittämiseksi transformoidaan E. coli HB101 Ca^{2+} -solut. 12 amp^R-pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-alustassa, joka sisältää 100 mg/l ampisilliinia. DNA valmistetaan nopealla DNA:n eristysmenetelmällä ja analysoidaan BamHI- ja EcoRI-katkaisulla. Valitaan yhden kloonin plasmidi-DNA ja sille annetaan nimeksi pJDB207/PHO5-SSUPA.

Esimerkki 6: Plasmidin pJDB207R/PHO5-UPA rakentaminen

Kypsää urokinaasia koodittava sekvenssi liitetään

PHO5-promoottoriin. Tähän rakenteeseen ei sisälly signaalisekvenssiä ja se onkin tehty vertailutarkoituksia varten.

Seuraavan kaavan mukainen oligodeoksiribonukleotidikytkijä

(I) 5'-AATTCATGAGCAATGAACTTCATCAAGTTCCAT -3'

(II) 3'- GTACTCGTTACTTGAAGTAGTTCAAGGTAGC-5'

sisältää ATG:n ja u-PA:n nukleotidit 130 - 154 (ks. kuva 2), jotka koodittavat kypsän urokinaasin aminohappoja Ser1 - Ser9. Oligonukleotidit fosforyloidaan, emäspariutetaan ja liitetään plasmidin pCS16/UPA 462 ep:n TaqI-EcoRI-fragmenttiin (ks. esimerkki 3). DNA katkaistaan EcoRI:llä ja PstI:llä. Eristetään 315 ep:n EcoRI-PstI-fragmentti, joka sisältää ATG:n ja kypsää u-PA:ta koodittavan sekvenssin asemassa 436 olevaan PstI-kohtaan asti (kuva 2).

Plasmidi p31R (ks. eurooppalainen patenttihakemus-julkaisu no. 100 561) katkaistaan BamHI:llä ja EcoRI:llä ja 534 ep:n BamHI-EcoRI-fragmentti eristetään preparatiivisessa 1,5-prosenttisessä agarosigeelissä. Tämä fragmentti sisältää PHO5-promoottorin.

Kaikki DNA-fragmentit elektroeluoitetaan, puhdistetaan DE52-kromatografiolla, saostetaan etanolilla ja uudelleensuspendoidaan veteen pitoisuuteen 0,1 pmol/ μ l. 0,2 pmol 534 ep:n BamHI-EcoRI-fragmenttia, 0,2 pmol 315 ep:n EcoRI-PstI-fragmenttia ja 0,2 pmol 1007 ep:n PstI-XhoI-fragmenttia (ks. esimerkki 3) ja 0,1 pmol 6,9 ke:n BamHI-XhoI-vektorifragmenttia (ks. esimerkki 3) liitetään yhteen ja yhteenliittämiseksi transformoidaan E. coli HB101 Ca^{2+} tavalliseen tapaan. Poimitaan 8 amp^R-pesäkettä ja niitä kasvatetaan LB-alustassa, joka sisältää 100 mg/l ampisilliinia. Valmistetaan plasmidi-DNA ja analysoidaan se katkaisemalla BamHI:llä ja EcoRI:llä. Yhden pesäkkeen plasmidi-DNA:lle, jolla on odotettu

restriktiokuvio, annetaan nimeksi pJDB207R/PHO5-UPA.

Esimerkki 7: Hiivan GAPDH-geenin kloonauksen konstitutiivisen promoottorinsa kanssa

a) Hiivan geenikirjaston rakentaminen

30 µg suurimolekyyllipainoista hiivan kokonais-DNA:ta (M.V. Olsen et al., J. Mol. Biol. 132, 387 (1979)), joka on saatu villityypisistä *Saccharomyces cerevisiae*-kannasta S288C, inkuboidaan 30 minuuttia 37°C:ssa 2 yksikön kanssa EcoRI-metylaasia (New England Biolabs) 250 µl:ssa EcoRI-metylointipuskuria valmistajan ohjeiden mukaan. DNA saostetaan etanolilla ja uudelleensuspendoidaan 500 µl:aan puskuria, jossa on 25 mM Tris-HCl pH 8,5 ja 2 mM MgCl₂ (EcoRI*-puskuri) (H. Meyer, FEBS Lett. 90, 341 (1979)), ja pilkotaan EcoRI:llä (Boehringer), kunnes DNA-fragmenttien kokojakautuman maksimi on 30 - 50 ke:n alueella (λDNA:n XhoI-katkaisu antaa tarvittavat 33 ke:n ja 17 ke:n merkit). EcoRI*-olosuhteissa pilkottu hiivan DNA fraktioidaan koon mukaan sakkaroosigradientissa (5 - 20 % sakkaroosia puskurissa, jossa on 10 mM Tris.HCl pH 7,5 ja 1 mM EDTA) fraktiointiajan ollessa 6 tuntia nopeudella 38 000 min⁻¹ SW 40-roottorissa. Gradientin päältä kerätään 30 jaetta, joiden kunkin tilavuus on 0,4 ml. Jae 16 sisältää DNA-fragmentit, joiden koko on 30 - 40 ke. Tämän jakeen DNA (3 µg) saostetaan etanolilla ja liitetään 16 tunnin ajan 15°C:ssa 15 µl:n kokonaistilavuudessa 1 µg:aan kosmidivektoria pYc1 (B. Hohn et al., teoksessa "Genetic Engineering", Vol. 2, s. 169, New York 1980), joka on sitä ennen linearisoitu EcoRI:llä. Yhteenliittäminen suoritetaan 300 yksiköllä T4 DNA-ligaasia (New England Biolabs) käyttämällä valmistajan kuvaamaa puskurisysteemiä. DNA pakataan in vitro bakteriofagiinλ (B. Hohn, teoksessa "Methods in Enzymology", Vol. 68, s. 299, New York 1979) ja näin kootuilla fageilla transdusoidaan

E. coli-kanta HB101 (r_k^- , m_k^- , leu^- , pro^- , $recA$). Transduktionin tehokkuus on noin 5000 ampicilliinille resistenttiä pesäkettä per μg pYcl-vektoria. Poimitaan 3000 amp^R -pesäkettä ja niitä kasvatetaan erikseen mikrotiterlevyjen koloissa LB-alustassa (10 g Bacto-Tryptone:a (Difco), 5 g Bacto Yeast Extract:ia (Difco) ja 10 g NaCl), joka sisältää 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilliinia.

b) Hiivan GAPDH-geenin eristäminen

Edellä kuvattu geenikirjasto seulotaan synteettisellä oligonukleotidilla (valmistettu fosfotriesterimenetelmällä: K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 97, 7327 (1975); J.F.M. de Rooij et al., Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 98, 537 (1979)), jonka rakenne on seuraava: 5'-GCTCCATCTTCCACCGCCCC-3'. 10 μg oligonukleotidia kinasoidaan käyttämällä 10 μl γ - ^{32}P -ATP:tä (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ Amersham) ja T4-polynukleotidikinaasia (Boehringer) 50 μl :n kokonaistilavuudessa Maniatis et al:n kuvaamalla tavalla ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Lab., 1982, s. 125). Pesäkehybridisointi suoritetaan samojen tekijöiden kuvaamalla tavalla (s. 312). Positiiviset kloonit havaitaan autoradiografialla käyttämällä Kodak X-5-röntgenfilmiä. Kun plasmidi-DNA eristetään (ks. eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu no. 100 561), saadaan yhdistelmäklooni, joka sisältää GAPDH:ta koodittavan 2100 ep:n HindIII-fragmentin (J.P. Holland et al., J. Biol. Chem. 254, 9839 (1979)). Lopullinen todiste sille, että kloonattu DNA on oikea, saadaan DNA:n sekventoinnilla, jossa käytetään edellä mainittua oligonukleotidia sekä dideoksisekventointimenetelmää, kuten G.F. Hong (Bioscience Reports 1, 243 (1981)) on selostanut kaksisäikeiselle DNA:lle. Kloonatulla GAPDH-geenillä on sama sekvenssi kuin Holland et al:n (J. Biol. Chem. 255, 2596 (1980)) julkaisemalla pgap491:llä.

c) GAPDH-promoottorin valmistus

649 ep:n TaqI-fragmentti, joka kattaa GAPDH-geenin nukleotidit -27 - -675, kun laskenta aloitetaan ATG-kodon vierestä (ks. kuva 6), eristetään katkaisemalla edellä mainittu yhdistelmäplasmidi TaqI:llä (New England Biolabs) ja erottamalla DNA-fragmentit 1,2-prosenttisessa agarosigeelissä ja uuttamalla DNA kuumalla fenolilla. TaqI-fragmentti kloonataan pBR322:n ClaI-kohtaan seuraavalla tavalla. 1 µg plasmidia pBR322 katkaistaan kolmella yksiköllä ClaI:tä (New England Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaan. 300 ng fenoloitua, katkaistua vektoria liitetään noin 300 ng:aan liitettävää DNA:ta (649 ep:n Taq-fragmentti) käyttämällä 200 yksikköä T4 DNA-ligaasia 20 µl:n kokonaistilavuudessa. E. coli HB101-solut transformoidaan ampisilliinille resistenteiksi ja valmistetaan plasmidi-DNA ja analysoidaan se restriktioanalyysillä (TaqI, DraI). TaqI-fragmentin suunta todetaan käyttämällä restriktioendonukleaasia DraI yhdessä plasmidien BamHI-kohdan kanssa ja valitaan plasmidi, jossa on aseman -675 Taq-kohta lähellä plasmidin pBR322 HindIII-kohtaa. Tälle plasmidille annetaan nimeksi pBR322/GAPDH ja se linearisoidaan käyttämällä BamHI:tä (New England Biolabs). DNA uudelleensuspendoidaan 10 mM Tris-liuokseen, pH 8,0, pitoisuuteen 0,5 µg/ml. 16 µg SalI-katkaistua DNA:ta pilkotaan 2 yksiköllä eksonukleaasia Bal31 (BRL) 100 µl:ssa liuosta, jossa on 20 mM Tris pH 8,0, 199 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 12 mM CaCl₂ ja 1 mM EDTA. 2 µg:n erät DNA:ta otetaan 1, 2, 3, 4, 5 ja 6 minuutin inkuboinnin jälkeen (30°C) ja kuhunkin erään sekoitetaan välittömästi 50 µl fenolia ja 60 µl TNE-liuosta. Sen jälkeen uutetaan fenoli/kloroformilla ja saostetaan etanolilla ja DNA uudelleensuspendoidaan 10 mM Tris-liuokseen, pH 8,0, pitoisuuteen 100 µg/ml. Jotta Bal31:n aikaansaama eksonukleolyttinen hajoaminen saadaan analysoiduksi, 0,5 µg kunakin ajankohtana saatua DNA:ta

katkaistaan BamHI-endonukleaasilla ja analysoidaan 1,5-prosenttisessa agarosigeelissä, joka on tehty Tris-bo-raattipuskuriin, pH 8,3 (90 mM Tris.HCl, pH 8,3, 90 mM boorihappo ja 2,5 mM EDTA). Bal31-pilkkomisessa poistuu keskimäärin 100 emäsparia fragmentin kummastakin päästä minuutissa.

BglII-kytkijät (5'-GGAGATCTCC-3') fosforyloidaan, emäspariutetaan ja liitetään Bal31:llä käsiteltyihin DNA-fragmentteihin. Kytkijäylimäärät poistetaan isopropanolilla saostamalla. DNA katkaistaan BglII:lla ja saatetaan suoraan rengasmuotoon pitoisuudessa 5 µg/ml 20 µl:n kokonaistilavuudessa. Bal31:llä lyhennetyn TaqI-fragmentin koko määritetään restriktioanalyysillä (käyttämällä BglII:ta ja HindIII:a). Valitaan kolme kloonia. Ne sisältävät DNA-fragmentit, jotka ulottuvat vastaavasti noin 200 emäsparia, 265 emäsparia ja 540 emäsparia ATG-kodonista ylävirtaan GAPDH-promoottoriin. Kaikki kolme fragmenttia sisältävät oletetun TATA-alueen noin -140 ep:n kohdalla. Nämä kloonit sisältävät vielä replikoitumisen aloituskohdan plasmidista pBR322 johdetussa DNA:n osassa ja ne nimetään vastaavasti seuraavasti: pGAPDH-F, pGAPDH-E ja pGAPDH-D.

Jotta GAPDH-promoottorielementit saadaan jatketuiksi asemassa -27 olevasta kohdasta aivan GAPDH-geenin ATG-kodonin viereen, syntetisoidaan kaksi synteettistä komplementaarista oligonukleotidia, joiden rakenteet ovat seuraavat:

```

5' CGAATAAACACACATAAAATAAG      3'
3' TTATTTGTGTGTTATTATTCTTAA 5'

```

Nämä oligonukleotidit antavat aidon GAPDH-promoottorisekvenssin, joka ulottuu asemasta -26 asemaan -5, ja samalla päähän syntyy EcoRI-kohta. 2 µg kutakin plasmidia pGAPDH-F, pGAPDH-E ja pGAPDH-D katkaistaan 6 yksiköllä TaqI:tä 50 µl:ssa ja saatu seos fenoloidaan, saostetaan

etanolilla ja uudelleensuspendoidaan 10 µl:aan vettä. Synteettiset oligonukleotidit emäspariutetaan sekoittamalla 2 µl kutakin säiettä 100 µl:aan liuosta, joka sisältää 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂ ja 50 mM NaCl, ja kuumentamalla 3 minuuttia 90°C:ssa ja jäädyttämällä liuos hitaasti huoneenlämpötilaan (noin 3 tunnissa). 1 µg TaqI:llä katkaistua plasmidia sekoitetaan noin 20-kertaiseen ylimäärään emäspariutettuja oligonukleotideja 20 µl:n tilavuudessa ja liitetään yhteen noin 18 tuntia käyttämällä 800 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Kun ligaasi on inaktivoitu, koko seos katkaistaan 3 yksiköllä BglII:ta (New England Biolabs). BglII-EcoRI-fragmentit, joiden koot ovat vastaavasti 200 ep, 265 ep ja 540 ep, erotetaan 1,5-prosenttisessä pehmeäagargeelissä, uutetaan geelistä ja saostetaan etanolilla.

Plasmidi p31RIT-12 (ks. esimerkki 2) katkaistaan BamHI:llä ja EcoRI:llä. 3,6 ke:n pituinen suuri vektorifragmentti eristetään. Tähän vektorifragmenttiin kloonataan 200 ep:n, 265 ep:n ja 540 ep:n BglII-EcoRI-GAPDH-promoottorifragmentit. Yhteenliittäminen, transformointi ja plasmidin eristäminen suoritetaan edellä kuvatuissa olosuhteissa. Plasmidit, joissa on oikea liitännäinen, nimetään seuraavasti: p31GAPFL-IT, p31GAPEL-IT ja p31GAPDL-IT vastaavasti (kuva 7).

Plasmidien p31GAPFL-IT, p31GAPEL-IT ja p31GAPDL-IT BglII-EcoRI-fragmenttien DNA-sekvenssit on esitetty kuvassa 8. Näiden fragmenttien tarkat koot ovat 202 ep, 267 ep ja 544 ep vastaavasti.

Esimerkki 8: Plasmidin pJDB207/GAPDL-I-UPA (kuva 9) rakentaminen

Tämä plasmidi sisältää GAPDH-D-promoottorin, invertaasin signaalsekvenssin, kypsää urokinaasia koodittavan sekvenssin ja PHO5:n transkription lopettajan peräkäisessä järjestyksessä pJDB207-sukkulavektorissa.

Plasmidin p31GAPDL-IT DNA katkaistaan SalI:llä ja

HindIII:lla. 0,8 ke:n SalI-HindIII-fragmentti erotetaan preparatiivisessa 1-prosenttisessa agarosigeelissä. Tämä fragmentti sisältää GAPDH-D-promoottorin ja osan invertaasin signaalisekvenssistä.

Plasmidi pJDB207/PHO5-I-UPA katkaistaan HindIII:lla ja BamHI:llä. 1239 ep:n HindIII-BamHI-fragmentti sisältää invertaasin signaalisekvenssin loppuosan ja suurimman osan u-PA:ta koodittavasta sekvenssistä. pJDB207/PHO5-I-UPA katkaistaan myös SalI:llä ja BamHI:llä. Suuri 6,6 ke:n vektorifragmentti eristetään preparatiivisessa 0,6-prosenttisessa agarosigeelissä, joka on tehty tris-asetaattipuskuriin, pH 8,2.

DNA-fragmentit eristetään elektroeluoimalla geelistä, puhdistetaan DE52-kromatografiolla ja saostetaan etanolilla. 0,8 ke:n SalI-HindIII-fragmentti, 1239 ep:n HindIII-BamHI-fragmentti ja 6,6 ke:n SalI-BamHI-vektorifragmentti liitetään yhteen ja yhteenliittämisseoksella transformoidaan E. coli HB101 Ca^{2+} -solut. 6 amp^R pesäkkeen plasmidi-DNA analysoidaan katkaisemalla HindIII:lla ja SalI:llä. Yhden kloonin plasmidi-DNA:lle, jossa on odotetut restriktiofragmentit, annetaan nimeksi pJDB207/GAPDL-I-UPA.

Vastaavalla tavalla eristetään plasmidin p31GAPFL-IT 493 ep:n SalI-HindIII-fragmentti (ks. esimerkki 7) ja suoritetaan sen liittäminen. Näin saadulle plasmidi-DNA:lle annetaan nimeksi pJDB207/GAPFL-I-UPA.

Vastaavalla tavalla rakennetaan pJDB207/GAPFL-I-UPA.

Esimerkki 9: Plasmidin pJDB207/GAPDL-UPA rakentaminen
(kuva 10)

GAPDH-D-promoottori, PHO5:n signaalisekvenssi, urokinaasia koodittava sekvenssi ja PHO5:n transkription lopettaja kloonataan peräkkäiseen järjestykseen hiivan pJDB207-sukkulavektoriin.

20 µg plasmidia pJDB207/PHO5-UPA katkaistaan BglII:lla ja SalI:llä. Näin saadut kaksi fragmenttia erotetaan preparatiivisessa 0,8-prosenttisessa agarosigeelissä,

joka on tehty tris-asetatipuskuriin, pH 8,2. 7,6 ke:n ja 1,1 ke:n BglII-SalI-fragmentit eristetään. 1,1 ke:n fragmentti katkaistaan vielä DraI:llä. Fenoli/klooroformiuuton ja etanolisaostuksen jälkeen 3,5 pmol DNA:ta liitetään 100-kertaiseen ylimäärään seuraavan kaavan mukaista kinasoitua ja emäspariutettua oligodeoksiribonukleotidikytkijää

5'-AATTCGATTACCAATGTTT-3'

3'- GCTAATGGTTACAAA_5'

jossa on EcoRI-kohta ja 8 nukleotidia PHO5:n koodittamattomasta 5'-alueesta ATG-kodonin edessä ja DraI:n tunnistussekvenssin osa.

Kun on liitetty yhteen 16 tuntia 15°C:ssa, ligaasi inaktivoidaan ja kytkijäylimäärä poistetaan isopropanolisaostuksella (0,54 tilavuutta) siten, että läsnä on 300 mM natriumasetattia, pH 6,0, ja 10 mM EDTA. DNA katkaistaan BglII:lla ja EcoRI:llä. 326 ep:n EcoRI-BglII-fragmentti eristetään.

Plasmidi p31GAPDL-IT katkaistaan SalI:llä ja EcoRI:llä. 0,75 ke:n SalI-EcoRI-fragmentti eristetään.

DNA-fragmentit eristetään elektroeluutiolla agarosigeelistä, puhdistetaan DE52-kromatografiolla ja saostetaan etanolilla. 0,2 pmol 0,75 ke:n SalI-EcoRI-fragmenttia, 0,4 pmol 326 ep:n EcoRI-BglII-fragmenttia ja 0,1 pmol 7,6 ke:n SalI-BglII-vektorifragmenttia liitetään yhteen 5,5 tuntia 15°C:ssa. 1 µl:lla yhteenliittämisestä transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut.

Kasvatetaan 10 amp^R transformanttia ja valmistetaan plasmidi-DNA. Plasmidi-DNA analysoidaan EcoRI-restriktiokatkaisulla. Yhden kloonin, jolla on odotettu restriktiokuvio, plasmidi-DNA:lle annetaan nimeksi pJDB207/GAPDL-UPA.

Vastaavalla tavalla rakennetaan plasmidit pJDB207/GAPFL-UPA ja pJDB207/GAPEL-UPA.

Esimerkki 10: Plasmidin pDP38 (kuva 11 ja kuva 12)
rakentaminen

2 mikronin kokoinen kovalenttisesti suljettu rengasmainen DNA eristetään *Saccharomyces cerevisiae*-kannasta S288C hajottamalla solunseinä käyttäen 5 µg/ml Zymolase:a (100 000 yksikköä/µg) reaktioajan ollessa 20 minuuttia 37°C:ssa ja lysoimalla solut sen jälkeen 2 %:lla SDS:ää. Sen jälkeen lisätään EDTA:ta pitoisuuteen 25 mM, keesiumkloridia lopulliseen tiheyteen 1,55 g/ml ja etidiumbromidia pitoisuuteen 1 mg/ml ja sen jälkeen koko seos siirretään ultrasentrifugiputkeen. Plasmidi-DNA erotetaan kromosomaalisesta DNA:sta ultrasentrifugoimalla 42 tuntia nopeudella 42 000 min⁻¹ 15°C:ssa. 2 mikronin plasmidi otetaan gradientista ruiskun avulla. Etidiumbromidi poistetaan natriumkloridilla kyllästetyllä isopropanolilla ja plasmidi-DNA saostetaan lopuksi etanolilla. Puhdistettu plasmidi-DNA linearisoidaan sen jälkeen PstI:llä ja kloonataan plasmidin pUC19 PstI-kohtaan (J. Norrander et al., *Gene* 26, 101 (1983)), jolloin saadaan plasmidi pDP31. Plasmidi pJDB207 katkaistaan entsyymeillä KpnI ja HpaI. Saatu 0,55 ke:n fragmentti puhdistetaan ja kloonataan plasmidin pUC7/LEU2 4,25 ke:n KpnI-HpaI-fragmenttiin (tämä plasmidi sisältää 2,2 ke:n pituisessa XhoI-SalI-fragmenttissa hiivan perimän LEU2-geenin (A. Andreadis et al., *Cell* 31, 319 (1982)) kloonattuna plasmidin pUC7 (J. Vieira et al., *Gene* 19, 259 (1982) SalI-kohtaan). Näin saadaan plasmidi pDP30, jossa alkuperäinen 2 mikronia/LEU2-fuusio, jollainen on plasmidissa pJDB207, on sijoitettu LEU2-geenin sekä sen täydellisen terminaattorin eteen. Plasmidi pDP30 katkaistaan HpaI:llä ja SalI:llä ja 1,85 ke:n fragmentti, joka sisältää täydellisen LEU2-geenin, puhdistetaan ja kloonataan plasmidin pDP31 8,7 ke:n HpaI-SalI-fragmenttiin. Näin saatu plasmidi pDP33 linearisoidaan HIndIII:llä siten, että läsnä on 50 ug/ml etidiumbromidia (M. Oesterlund et al., *Gene*

20, 121 (1982)) ja liitetään 1,17 ke:n HindIII-fragmenttiin, joka sisältää URA3-geenin (M. Rose et al., Gene 29, 113 (1984)). Plasmidi, jossa on URA3-geenin positiivinen insertio, valitaan transformoimalla E. coli-kanta pyr^rf (M. Rose et al., supra). Näin saadaan plasmidi pDP34. Plasmidi pDP34 katkaistaan entsyymillä SphI. Saatu 8,4 ke:n fragmentti puhdistetaan ja liitetään päistään yhteen, jolloin saadaan plasmidi pDP38.

Esimerkki 11: Plasmidien pDP38/GAPDL-I-UPA ja pDP38/GAPDL-UPA rakentaminen

Vektori pDP38 (ks. esimerkki 10) sisältää LEU2- ja URA3-geenin, pBR322-sekvenssejä ja osan hiivan 2 mikronin DNA:sta. Plasmidi pDP38 linearisoidaan BamHI:llä. Syntyneet porrastetut päät täytetään reaktiolla Klenow-DNA-polymeraasin kanssa (Maniatis et al., s. 113, supra). Sitten DNA katkaistaan vielä täysin Sali:llä ja suuri 8,4 ke:n fragmentti eristetään.

10 µg plasmidia pJDB207/GAPDL-I-UPA katkaistaan osittain HindIII:lla (1 yksikkö/ug DNA:ta) siten, että läsnä on 10 µg/ml etidiumbromidia, ja katkaisuaika on 28 minuuttia 37°C:ssa. Reaktio pysäytetään lisäämällä EDTA:ta niin, että lopulliseksi pitoisuudeksi tulee 10 mM. DNA:n porrastetut päät täytetään käyttämällä Klenow-DNA-polymeraasia. Sitten DNA katkaistaan vielä Sali:llä. 2,2 ke:n Sali-(Hind)/tasapäinen fragmentti eristetään.

Puhdistetut DNA-fragmentit liitetään yhteen ja yhteenliittämiseksi transformoidaan E. coli HB101 Ca²⁺-solut. 24 amp^R-pesäkettä kasvatetaan. Valmistetaan plasmidi-DNA ja analysoidaan se suorittamalla katkaisut EcoRI:llä ja Sali/HindIII:lla. Yhden kloonin plasmidi-DNA:lle, jolla on odotetut restriktiofragmentit, annetaan nimeksi pDP38/GAPDL-I-UPA.

Plasmidista pJDB207/GAPDL-UPA eristetään 2,2 ke:n Sali-(HindIII)/tasapäinen fragmentti vastaavasti katkaisemalla ensin täysin HindIII:lla, suorittamalla Klenow-

DNA-polymeraasireaktio ja sen jälkeen SalI-katkaisu. Tämä fragmentti liitetään plasmidiin pDP38, kuten edellä on selostettu. Yhdelle kloonille annetaan nimeksi pDP38/GAPDL-UPA.

Vastaavalla tavalla eristetään plasmideista pJDB207/GAPEL-I-UPA, pJDB207/GAPFL-I-UPA, pJDB207/GAPEL-UPA ja pJDB207/GAPFL-UPA 2,2 ke:n SalI-(HindIII)/tasapäiset fragmentit. Puhdistetut fragmentit liitetään plasmidiin pDP38. Kullakin yhtenliittämisellä transformoidaan *E. coli* HB101.

Kustakin transformoinnista eristetyille yhdelle kloonille annetaan vastaavasti nimet: pDP38/GAPEL-I-UPA, pDP38/GAPFL-I-UPA, pDP38/GAPEL-UPA ja pDP38/GAPFL-UPA.

Esimerkki 12: *S. cerevisiae*-kantojen HT246 ja GRF18 transformointi

Saccharomyces cerevisiae-kanta HT246 (a, leu2-3, leu2-112, prb) transformoidaan plasmideilla

pJDB207/PHO5-UPA

pJDB207/PHO5-I-UPA

pJDB207/PHO5-SSUPA

pJDB207R/PHO5-UPA

pJDB207/GAPDL-UPA

pJDB207/GAPFL-UPA

pJDB207/GAPDL-I-UPA

käyttämällä Hinnen et al:n transformointimenetelmää (Proc. Natl. Acad. Sci USA 75, 1929 (1978)). Transformoituneet hiivasolut valitaan maljaamalla hiivan minimiravinnealustassa, joka ei sisällä leusiinia. Eristetään yksittäiset transformoituneet hiivapesäkkeet ja niille annetaan vastaavasti nimet

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/PHO5-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/PHO5-I-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/PHO5-SSUPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207R/PHO5-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/GAPDL-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/GAPFL-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/GAPDL-I-UPA

Vastaavalla tavalla transformoidaan *Saccharomyces cerevisiae*-kanta GRF18 (DSM 3665) edellä mainituilla plasmideilla. Näin saadut transformoituneet hiivakan-
nat nimetään seuraavasti:

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-UPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-SSUPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/PHO5-UPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/GAPDL-UPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/GAPFL-UPA

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/GAPDL-I-UPA.

Esimerkki 13: *Saccharomyces cerevisiae*-kannan HT350 transformointi

S. cerevisiae-kanta HT350 saadaan risteyttämällä *S. cerevisiae*-kanta HT246 *ura-3*-vajaan kannan, kuten *S. cerevisiae*-kannan HT285 (α , *his3-11*, *his3-15*, *leu2-3*, *leu2-112*, *ura3*, *pep4-3*) kanssa, jolloin kannalle HT350 saadaan seuraava genotyyppi (α , *his3-11*, *his3-15*, *leu2-3*, *leu2-112*, *ura3*, *prb*, *pep4-3*). Kanta HT350 transformoidaan plasmideilla pDP38/GAPDL-I-UPA, pDP38/GAPFL-I-UPA, pDP38/GAPDL-I-UPA, pDP38/GAPDL-UPA, pDP38/GAPFL-UPA ja pDP38/GAPDL-UPA vastaavasti ja transformoinneissa käytetään Hinnen et al:n (supra) menetelmää. Transformoituneet hiivasolut valitaan maljaamalla hiivan minimiravinnealustassa, josta puuttuu urasiili, mutta joka on täydennetty leusiinilla. Eristetään yksittäiset transformoituneet hiivapesäkkeet ja niille annetaan seuraavat nimet:

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPDL-I-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPFL-I-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPDL-I-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPDL-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPFL-UPA

Saccharomyces cerevisiae HT350/pDP38/GAPEL-UPA

Esimerkki 14: Transformoitujen hiivojen fermentointi

Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/PHO5-UPA,
Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207/PHO5-I-UPA ja
Saccharomyces cerevisiae HT246/pJDB207R/PHO5-I-UPA
 sisältävät plasmidin, jossa on täyspitkä PHO5-promoottori, josta syystä ne vaativat promoottorin kytkemistä päälle scu-PA:n ilmentämistä varten. Kutakin *S. cerevisiae* HT246-transformanttikantaa kasvatetaan erikseen 10 ml:ssa hiivan minimiravinnealustaa (Difco Yeast Nitrogen Base ilman aminohappoja niin, että on lisätty 2 % glukoosia ja 20 mg/l L-histidiiniä) 50 ml:n Erlenmeyer-kolveissa ravistelemalla 30°C:ssa 24 tuntia, kunnes saavutetaan tiheys $5 - 7 \times 10^7$ solua/ml. Esiviljelmän solut pestään sen jälkeen 0,9-prosenttisessä NaCl-liuoksessa ja 20 %:lla esiviljelmän soluja ympätään 50 ml matala-P₁-minimiravinnealustaa, joka on valmistettu Difco Yeast Nitrogen Base-ravinnealustan reseptillä (ilman aminohappoja), mutta joka sisältää 0,03 g/l KH₂PO₄, 10 g/l L-asparagiinia (NH₄)₂SO₄:n tilalla, 20 g/l glukosia ja 1 g/l L-histidiiniä. Viljelmiä sekoitetaan 30°C:ssa korkeintaan 48 tuntia nopeudella 180 kierrosta minuutissa. Lopulliset solutiheydet ovat 1×10^8 solua/ml (vastaa OD₆₀₀ = 4 - 5).

Hiivatransformantit, joissa on GAPDH-promoottori eri pituisena, ilmentävät scu-PA:ta konstitutiivisesti. Vastaavat transformantit, jotka sisältävät pJDB207:sta johdetun plasmidin, kasvatetaan hiivan minimiravinnealustassa esiviljelmiksi (edellä). 20 %:lla pestyä esiviljelmää ympätään 50 ml ravinnerikasta pääviljelmän ravinnealustaa, joka sisältää (g/l): peptonia 5, hiivauutetta 10, glukoosia 20, sakkaroosia 40, (NH₄)₂SO₄ 3, KH₂PO₄ 2, MgSO₄ 0,5, NaCl 0,1, CaCl₂ 0,1, biotiinia 10 ug/l. Solutiheydeksi saadaan noin 1×10^9 solua/ml (vastaa OD₆₀₀ 40 - 45), kun inkuboidaan 48 tuntia 30°C:ssa kier-

rosnopeudella 200 kierrosta minuutissa.

Vastaavia transformantteja, jotka sisältävät pDP38:sta johdetun plasmidin, kasvatetaan urasiilivalinnassa. Soluja kasvatetaan 24 tuntia 30°C:ssa kierrosnopeudella 180 kierrosta minuutissa esiviljelmäalustassa, joka sisältää (g/l): kasaminohappoja 4,5, hiivauutetta 6,5, sakkaroosia 20, glukosia 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,6, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0,2, CaCl_2 0,013 ja hivenaineita.

10 %:lla pestyä esiviljelmää ympätään 50 ml valintaan tarkoitettua pääviljelmän ravinnealustaa, joka sisältää (g/l): Yeast Nitrogen Base:a (Difco, ilman aminohappoja) 5, L-asparagiinia 7,5, kasaminohappoja 8,5, metyylietyylisulfonaattia 10, adeniinia 0,05, L-histidiiniä 0,04, L-leusiinia 0,1, L-tryptofaania 1, Ca-pantotenaattia 0,03, glukosia 30. Solutiheydeksi saadaan noin 8×10^8 solua/ml (vastaa OD_{600} n. 35), kun inkuboidaan 48 tuntia 30°C:ssa kierrosnopeudella 200 kierrosta minuutissa.

24 tunnin ja 48 tunnin inkuboinnin jälkeen otetaan vastaavasti solut talteen 2 ml:sta sentrifugoimalla 10 minuuttia nopeudella 3000 min^{-1} Falcon 2070-putkissa. Solut pestään kerran 0,9-prosenttisellä NaCl-liuoksella ja sentrifugoidaan. Solupelletti suspendoidaan lyysipuskuriin (66 mM kaliumfosfaatti, pH 7,4, 4 mM Zwittergent (Calbiochem)). Solususpensioon lisätään 8 g lasihelmiä (halkaisija 0,5 - 0,75 mm) ja saatua suspensiota ravistellaan Vortex-sekoittimessa (Scientific Instruments Inc. USA) täydellä nopeudella 4 - 5 x 2 minuuttia. Tällöin rikkoutuu yli 90 % soluista. Rikkoutuneet solunosat ja lasihelmet sentrifugoidaan pohjaan 5 minuutissa nopeudella 3000 min^{-1} 4°C:ssa. Välittömästi ennen biologisen aktiivisuuden testaamista emäliuokset laimennetaan 500-kertaiseen asti liuoksella, jossa on 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,05 % Tween 80 ja 0,1 % naudan seerumin albumiinia.

Esimerkki 15: Biologisen aktiivisuuden määrittäminen

scu-PA:n amidolyyttinen aktiivisuus voidaan mitata suoraan käyttämällä Kabi:n (KabiVitrum, Tukholma, Ruotsi) synteettistä, kromogeenista tripeptidisubstraattia S-2444 (pyro-Glu-Gly-Arg-pNA). Jotta saataisiin määritetyksi Lys158:n ja/tai Lys136:n kohdasta katkenneen tcu-PA:n pitoisuus, suoritetaan määrittäminen valmistajan suositusten mukaisesti (ilman plasmiinilla tapahtuvaa aktivointia). scu-PA vaatii aktivointia plasmiinilla ennen sen amidolyyttisen aktiivisuuden määrittämistä, mistä syystä suora määrittäminen pitää muuntaa seuraavalla tavalla: 100 µl scu-PA:ta sisältävää näytettä (ks. esimerkki 14) esi-inkuboidaan 0,01 yksikön kanssa ihmisen plasmiinia (Boehringer Mannheim, Saksa) 60 minuuttia 37°C:ssa. Lisätään 5 kansainvälistä yksikköä aprotiniinia (Boehringer, Mannheim, Saksa) ja saatua seosta inkuboidaan vielä 10 minuuttia 100°C lämpötilassa ennen kromogeenisen substraatin S-2444 (supra) lisäämistä.

Aktiivisuuden kvantifiointi suoritetaan vertaamalla WHO:n urokinaasistandardiin (erä 66/46) ja ilmoitetaan kansainvälisinä yksiköinä (ky). Kaupallisesti saatavissa olevan valmisteen Ukidan^R (Serono, Freiburg, Saksa) sisältämän ihmisen virtsasta eristetyt erittäin puhtaan urokinaasin ominaisaktiivisuus 70 000 - 100 000 ky/mg proteiinia.

scu-PA-pitoisuus voidaan myös määrittää sen plasminogeenia aktivoivan vaikutuksen perusteella käyttämällä synteettistä tripeptidisubstraattia S-2251 (KabiVitrum, Tukholma, Ruotsi). Määrittäminen suoritetaan valmistajan suositusten mukaan (KabiVitrum, supra) siten, että streptokiinaasin tilalla ovat plasminogeenin aktivaattoreina scu-PA:ta sisältävät näytteet.

Hiivan fermentointiliuoksissa läsnä oleva antigeenimäärä arvioidaan dot-blot-menetelmällä (Bio-Rad, Richmond, USA). Detektiossa käytetään ihmisen virtsan urokinaasiin kohdistuvaa, kanissa tuotettua polyklonaalista vasta-ainetta.

Näytteet otetaan 24 tunnin fermentoinnin jälkeen ja esikäsitellään esimerkissä 14 kuvatulla tavalla. Taulukossa 1 on esitetty yhteenveto eri plasmideilla saaduista plasminogeenia aktivoivista (substraattina S-2251) aktiivisuuksista kahdella eri kannalla.

Taulukko 1

plasmidi	isäntä	valinta	S-2251, aktiivisuus ky/2 x 10 ⁷ solua
pJDB207R/PHO5-UPA	HT246	leu	0
pJDB207/PHO5-SSUPA	HT246	leu	2,2
pJDB207/PHO5-I-UPA	HT246	leu	10
pJDB207/PHO5-UPA	HT246	leu	1,4
pJDB207/GAPDL-UPA	HT246	leu	9
pDP38/GAPDL-I-UPA	HT350	leu	3
pDP38/GAPDL-I-UPA	HT350	ura	5,7
pDP38/GAPFL-I-UPA	HT350	leu	0,4
pDP38/GAPFL-I-UPA	HT350	ura	3,4

Taulukossa 2 on esitetty kyseisillä kolmella menetelmällä määritettyjen aktiivisuuksien vertailu. Taulukossa on esitetty volymetriset kokonaistiitterit (per ml viljelmälientä) kun on fermentoitu 48 tuntia HT246-kantaa, joka sisälsi plasmidin pJDB207/GAPDL-I-UPA.

Taulukko 2

ky/ml viljelmälientä			
Aktiivisuus kun kohteena on		Aktiivisuus kun kohteena on	dot-blottaus (arvio)
S-2444 ilman plasmiinia	S-2444 plasmiinin kanssa	S-2251	
25,8	215	1670	noin 1000

Tuloksista ilmenee, että paras scu-PA:n tuotto saavutetaan hiivalla, kun DNA-rakenne sisältää hiivan signaalisekvenssin, kuten PHO5:n tai invertaasin signaalisekvenssin. Tuloksista ilmenee lisäksi, että scu-PA ilmenee erilaisissa hiivaisäntätaustoissa niin, että fermentointi valintaolosuhteissa (joko matala- P_i -minimivinnealusta tai urasiilivalinta) johtaa suhteellisesti suurempaan ominaistuottoon per OD.

Noin 90 % ilmentymistuotteesta on scu-PA:ta, kun tarkastellaan S-2444:ään kohdistuvan aktiivisuuden mitaustuloksia, kun määrittelyssä on aktivoitu plasmiinilla tai ei ole aktivoitu. Dot-blottaus osoittaa, että läsnä oleva antigeenin määrä ei merkitsevästi ylitä mittaamalla saatua biologista aktiivisuutta. Näin ollen geeniteknologialla hiivassa tuotettu scu-PA on laskostunut oikealla tavalla niin, että tuloksena on aito scu-PA.

Esimerkki 16: scu-PA:n talteenotto hiivasoluista (30 litraa viljelmälientä)

S. cerevisiae-kantaa HT246/pJDB207/GAPDL-I-UPA kasvatetaan samoin kuin hirudiinin tuottamiseksi kasvatettua *S. cerevisiae*-kantaa GRF18/pJDB207/GAPFL-HIR (ks. eurooppalainen patenttihakemusjulkaisu no. 225633). Solujen sisällä oleva scu-PA-määrä (solujen rikkomisen jälkeen, ks. esimerkki 14) määritetään epäsuoralla amidolyttisellä määrittelymenetelmällä käyttämällä substraattia S-2251 (ks. esimerkki 15). 48 tunnin inkuboinnin jälkeen solut otetaan talteen sentrifugoimalla Sharplessentrifugissa (Appareils Centrifuges, Rueil, Ranska) ja suspendoidaan yhtä suureen tilavuuteen lyysipuskuria (200 mM K_2HPO_4 , 0,2 % Tween 80). Sitten solut rikotaan lasikuulamylyssä (Dyno-Mill, KDL, Bachofen AG, Basel; 4500 min⁻¹, 18 l/h). Sitten suspensiosta tehdään viisinkertainen laimennos liuoksella, jossa on 150 mM NaCl ja 0,05 % Tween 80, ja solujen osat sentrifugoidaan pohjaan 4°C:ssa siten, että läsnä on 0,6 % polyetyleniimiiniä, käyttämällä Westfalia separator-laitetta SB7-47.

Hieman samea emäliuos suodatetaan Zetapor Cartridge:n (huokoshalkaisija $0,22\ \mu\text{m}$) läpi ja sen pH:ksi säädetään $6,05$ lisäämällä $1\ \text{N}$ suolahappoa. Lisätään 1 litra kationinvaihtimena toimivaa S-Sepharose fast flow:ta (Pharmacia) per kg pohjaan kerrostuneita hiivasoluja ja saatua suspensiota sekoitetaan 1 tunti 4°C :ssa. Sitten helmet siirretään pylvääseen, jonka halkaisija on $9\ \text{cm}$, ja pestään liuoksella, jossa on $50\ \text{mM}$ natriumfosfaattia pH $7,0$, $150\ \text{mM}$ NaCl ja $0,05\ \%$ Synperonic:ia. Sitten scu-PA eluoidaan virtausnopeudella $30\ \text{ml/min}$ samalla puskurilla, joka sisältää $250\ \text{mM}$ NaCl. Jakeisiin, jotka sisältävät scu-PA:n (mitattu suoralla amidolyyttisellä määritysmenetelmällä; ks. esimerkki 15) lisätään concanavalin A Sepharose:a (Pharmacia) ($1\ \text{ml}$ geeliä per $0,2\ \text{mg}$ scu-PA:ta) ja saatua suspensiota sekoitetaan 45 minuuttia 4°C :ssa. Sen jälkeen helmet pestään liuoksella, jossa on $1\ \text{M}$ NaCl, $10\ \text{mM}$ natriumfosfaattia pH $7,0$ ja $0,05\ \%$ Synperonic:ia, ja pestyt helmet siirretään pylvääseen, jonka halkaisija on $4,4\ \text{cm}$, ja scu-PA eluoidaan virtausnopeudella $1\ \text{l/h}$ liuoksella, jossa on $0,8\ \text{M}$ metyyli- α -D-mannopyranosidia, $150\ \text{mM}$ NaCl, $20\ \text{mM}$ natriumaseptaattia, pH $4,0$, ja $0,05\ \%$ Synperonic:ia. Jakeisiin, jotka sisältävät scu-PA:ta, lisätään antiurokinaasi-IgG-Sepharose:a (kanissa tuotettu puhdistettu polyklonaalinen vasta-aine (IgG-jae), joka on aikaansaatu ihmisen virtsan urokinaasia vastaan) ja saatua suspensiota sekoitetaan 45 minuuttia 4°C :ssa. Sitten helmet siirretään pylvääseen, jonka halkaisija on $2,2\ \text{cm}$, ja pestään liuoksella, jossa on $1\ \text{M}$ NaCl, $10\ \text{mM}$ natriumfosfaattia, pH $7,0$, ja $0,05\ \%$ Synperonic:ia, virtausnopeudella $1\ \text{ml/min}$. scu-PA:ta sisältävien jakeiden pH säädetään arvoon 6 lisäämällä $1\ \text{N}$ NaOH-liuosta.

Tässä vaiheessa noin $25 - 30\ \%$ kokonaisaktiivisuudesta on tcu-PA:ta, kun toteaminen suoritetaan suoralla amidolyyttisellä määrityksellä (ks. esimerkki 15)

Vasta-aineepylväästä tullut effluentti sijoitetaan

Mono-S-pylvääseen (täytteen tilavuus 1 ml; Pharmacia), joka on tasapainotettu liuoksella, jossa on 50 mM natriumfosfaattia, pH 6,0, ja 0,05 % Synperonic:ia. Kun on pesty tasapainotuspuskurilla, scu-PA eluoidaan porrastetulla gradientilla, joka koostuu tasapainotuspuskurista ja puskurista B, jossa on 500 mM NaCl, 50 mM natriumfosfaattia pH 7,0 ja 0,05 % Synperonic:ia, virtausnopeuden ollessa 1 ml/min. Tässä eluutiassa havaitaan kaksi aktiivisuuspiikkiä, ensimmäinen, joka eluoituu ensimmäisessä portaassa, joka sisältää 30 % puskuria B, ja toinen, joka eluoituu toisessa portaassa, joka sisältää 55 % puskuria B. Suora amidolyyttinen määrittäminen paljasti, että 30 %:n B-määrällä eluoitunut jae sisälsi vielä suuren määrän tcu-PA:ta, kun taas 55 %:n B-määrällä eluoitunut jae sisälsi vain 1 - 3 % tcu-PA:ta.

Tällä tavoin tuotettu hiivan scu-PA vaeltaa yhtenä vyöhykkeenä, jonka molekyylimassa on noin 51 kilodaltonia, SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesissa ei-pelkistävässä olosuhteissa. Näin saadun scu-pA:n puhtausaste on noin 95% tai enemmän, kun arviointi suoritetaan suoralla amidolyyttisellä määrittäyksellä (ks. esimerkki 15) ja SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla pelkistävässä olosuhteissa.

Esimerkki 17: Hiivan scu-PA:n glykosyloituneisuusaste

Glykosyloituneisuus määritetään ^{125}I -konkanavaliini A-peittomenetelmällä geelielektroforeesin jälkeen. Konkanavaliini A on kasvilesitiini, joka tunnistaa spesifisesti mannoositähteitä. Hiivasta saatu puhdistettu scu-PA ja u-PA-standardina käytetty Ukidan^R (Serono, Freiburg, Saksa) alistetaan geelielektroforeesiin käyttämällä 10-prosenttisia geelejä. Sitten proteiinit kiinnitetään geeleihin 7-prosenttisella etikkahapolla 30 minuutin kuluessa. Sitten geelit pestään puskurilla, jonka koostumus on seuraava:

0,15 M NaCl

50 mM Tris.HCl pH 7,4

0,5 mM CaCl_2

0,5 mM MnCl_2

Pesua jatketaan, kunnes pH saavuttaa arvon 7,3. Sitten geeli peitetään varovaisesti 2 ml:lla lesitiinipusku-
ria, joka sisältää 3 mg hemoglobiinia, 100 μg konkanavaliini A:ta ja 2 μCi ^{125}I -konkanavaliini A:ta.

Toinen muuten identtinen geeli peitetään edellä mainitulla seoksella, joka sisältää täydennyksenä 0,2 M α -metyylimannosidia. Kun on inkuboitu 3 tuntia kosteuskammiossa, geelit pestään perusteellisesti lesitiinipuskurissa, kuivataan ja valotetaan röntgenfilmeille. Kun α -metyylimannosidia ei ole, sekä Ukidan^R että hiivan scu-PA värjäytyvät ^{125}I -konkanavaliinilla. Näiden molekyylimassat ovat oleellisesti ottaen identtiset. Kun läsnä on α -metyylimannosidia, joka on lesitiinin sitoutumisen kompetitiivinen inhibiittori, ihmisen virtsan urokinaasi häipyy, mutta hiivan scu-PA jää vielä näkyviin. Tämä osoittaa, että hiivan scu-PA on glykosyloitunut, ja että sen glykosyloituneisuus on tyypiltään erilaista kuin ihmisen virtsan urokinaasin.

Esimerkki 18: scu-PA:n jatkopuhdistus

scu-PA-liuos (ks. esimerkki 16), joka on dialysoitu liuosta vasten, jossa on 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 % Tween 80 ja 0,05 M NaCl, ladataan 3 ml:n bentsamidiini-Sepharose-pylvääseen (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi) ja pestään Tris-HCl-puskurilla, pH 8,0, joka sisältää 1 M NaCl. scu-PA saadaan täysin talteen läpi virranneessa liuoksessa ja pesuliuoksessa, kun taas tcu-PA-sivutuote voidaan eluoida pylväästä 0,05 M Tris-HCl-puskurilla, pH 8,0, joka sisältää 1 M L-arginiinia. Näin saadun scu-PA:n puhtausaste on noin 98 % tai enemmän.

Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LG
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LS
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LGP
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LSP
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LGPW
Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/PHO5-I-UPA-LSPW

Kantoja kasvatetaan kuten esimerkissä 14 on selostettu. scu-PA-mutanttiproteiinit eristetään kuten esimerkissä 16 tai 18 on selostettu.

Esimerkki 19 : Ensimmäinen farmaseuttinen koostumus parenteraalista antoa varten

Parenteraalisesti annettavaksi tarkoitettu liuos valmistetaan liuottamalla 3 mg puhdistettua scu-PA:ta, 25 mg mannitolia ja 45 mg natriumkloridia 5 ml:aan steriloitua vettä ja sekoittamalla näin saatu liuos sopivaan tilavuuteen 5-prosenttista glukoosiliuosta. Liuos steriloidaan suodattamalla 0,22 μ m:n kalvosuodattimen läpi.

Esimerkki 20 : Toinen farmaseuttinen koostumus parenteraalista antoa varten (injektoitava dispersio)

169,3 mg soijalesitiiniä (soybean phosphatide NC 95, valmistaja Nattermann, Köln, Saksa; puhtausaste 90 - 96 %, rasvahappokoostumus: linolihappoa 61 - 71 %, linoleenihappoa 4 - 7 %, öljyhappoa 6 - 13 %, palmitiinihappoa 10 - 15 %, steariinihappoa 1,5 - 3,5 %) ja 92,7 mg puhdasta natriumglykokolaattia liuotetaan 752,5 ml:aan steriloitua vettä. Liuoksen pH säädetään arvoon 7,4 lisäämällä 1 N natriumhydroksidia. Lisätään 10 mg lyofilisoitua scu-PA:ta. Seosta sekoitetaan, kunnes saadaan kirkas liuos. Liuos steriloidaan suodattamalla 0,22 μ m:n kalvosuodattimen läpi ja annostellaan ampulleihin.

Mikro-organismien talletukset

Seuraavat mikro-organismikannat talletettiin
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen-kokoelmiin (DSM)
*Grisebachstrasse 8, D-3400 Göttingen,
**Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig
(talletuspäivämäärät ja kokoelmanumerot on ilmoitettu):
*Saccharomyces cerevisiae HT246: 15. huhtikuuta, 1987;
DSM 4084;
**Escherichia coli HB101/pCS16: 23. lokakuuta, 1987;
DSM 4294;
**Escherichia coli HB101/p31R/SS-TPA42: 23. lokakuuta,
1987; DSM 4295;
**Escherichia coli HB101/pcUK176: 23 lokakuuta, 1987;
DSM 4290;
**Escherichia coli JM109/pDP38: 19. helmikuuta, 1988;
DSM 4414.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ihmisen yksiketjuisen urokinaasityyppisen plasminogeenin aktivaattorin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että sopivissa ravinneolosuhteissa viljellään *Saccharomyces cerevisiae* -kantaa, joka on transformoitu-
nut yhdistelmävektorilla, joka sisältää *S. cerevisiae*en ilmentymisensäätelysekvenssin, DNA-jakson, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaali-
peptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää uro-
kinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria, ja joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää *S. cerevisiae*en geenin transkriptionlopetus-
signaalit, ja mainittu urokinaasityyppinen plasminogeenin aktivaattori eristetään.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että tuotetaan plasminogeenin aktivaattoria, jolla on luonnollisen ihmisen yksiketjuisen urokinaasityyppisen plasminogeenin aktivaattorin aminohapposekvenssi, jossa Asn302 on hiivaspesifisesti glykosyloitunut.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että tuotetaan kaavan I mukaista proteiinia

Ser Asn Glu Leu His Gln Val

Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn
Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe
Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu
Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met
Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln
Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu Gly
Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp
Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met
Val His Asp Cys Ala Asp Gly X₁ X₂ Pro Ser Ser Pro Pro Glu

Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Y₁ Y₂
 Y₃ Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
 Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr
 Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala
 Thr His Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val
 Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met
 Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala
 Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg
 Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr
 Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser
 Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Z₁ Ser Z₂ Asp Tyr Leu
 Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys Leu Ile Ser His
 Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr
 Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg
 Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu
 Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro
 Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

jossa kaavassa kumpikin ryhmistä X₁ ja X₂ voi olla Lys, Y₁ on Arg, Y₂ on Phe, Y₃ on Lys, Z₁ on Asn, joka on hiivaspesifisesti glykosyloitunut ja Z₂ on Thr.

4. *S. cerevisiae* -yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää *S. cerevisiae*en ilmentymisensäätelysekvenssin, DNA-jakson, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaaliptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityypistä plasminogeenin aktivaattoria, ja joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää *S. cerevisiae*en geenin transkriptionlopetussignaalit.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen *S. cerevisiae* -yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää *S. cerevisiae*en PHO5- tai GAPDH-promoottorin.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen *S. cerevisiae* -yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää signaalsekvenssin, joka on johdettu *S. cerevisiae*en PHO5-geenistä, *S. cerevisiae*en invertaasigeenistä tai ihmisen urokinaasigeenistä.

7. Transformoitunut *S. cerevisiae* -isäntä, **tunnettu** siitä, että se sisältää yhdistelmävektorin, jossa on *S. cerevisiae*en ilmentymisensäätelysekvenssi, DNA-jakso, joka koostuu ensimmäisestä DNA-sekvenssistä, joka koodittaa signaaliptidiä ja on ylävirrassa ja lukuvaiheistuksessa toiseen DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa kypsää urokinaasityyppistä plasminogeenin aktivaattoria, ja joka DNA-jakso on mainitun ilmentymisensäätelysekvenssin transkriptionaalisessa ohjauksessa, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää *S. cerevisiae*en geenin transkriptionlopetussignaalit.

Patentkrav

1. Förfarande för produktion av en enkelsträngad human plasminogenaktivator av urokinastyp, **kännetecknat** därav, att en stam av *Saccharomyces cerevisiae*, som transformerats med en hybridvektor, som innehåller en uttryckningsreguleringssekvens av *S. cerevisiae*, ett DNA-fragment, som består av en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och är uppströms av och i läsram med en andra DNA-sekvens, som kodar för en mogen plasminogenaktivator av urokinastyp, och vilket DNA-fragment är i transkriptionell kontroll av den nämnda uttryckningsreguleringssekvensen, och en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av en *S. cerevisiae* gen, odlas i lämpliga näringsförhållanden, och den nämnda plasminogenaktivatorn av urokinastyp isoleras.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav,

att en plasminogenaktivator produceras, som har aminosyrasekvensen av den naturliga enkelsträngade humana plasminogenaktivatorn av urokinastyp, i vilken Asn302 är jästspecifikt glykosylerad.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att ett protein enligt formeln I produceras

Ser Asn Glu Leu His Gln Val

Pro Ser Asn Cys Asp Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn
 Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe
 Gly Gly Gln His Cys Glu Ile Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu
 Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met
 Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln
 Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu Gln Leu Gly Leu Gly
 Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg Arg Arg Pro Trp
 Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln Glu Cys Met
 Val His Asp Cys Ala Asp Gly X₁ X₂ Pro Ser Ser Pro Pro Glu
 Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Y₁ Y₂
 Y₃ Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
 Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr
 Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala
 Thr His Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val
 Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met
 Lys Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala
 Asp Thr Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg
 Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr
 Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser
 Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Z₁ Ser Z₂ Asp Tyr Leu
 Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val Val Lys Leu Ile Ser His
 Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr
 Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys
 Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly Arg
 Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu
 Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro
 Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

i vilken formel var och en av grupperna X_1 och X_2 kan vara Lys, Y_1 är Arg, Y_2 är Phe, Y_3 är Lys, Z_1 är Asn, som är jästspecifikt glykosylerad och Z_2 är Thr.

4. *S. cerevisiae* hybridvektor, **kännetecknad** därav, att den innehåller en uttryckningsreguleringssekvens av *S. cerevisiae*, ett DNA-fragment, som består av en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och är uppströms av och i läsram med en andra DNA-sekvens, som kodar för en mogen plasminogenaktivator av urokinastyp, och vilket DNA-fragment är i transkriptionell kontroll av den nämnda uttryckningsreguleringssekvensen, och en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av en *S. cerevisiae* gen.

5. *S. cerevisiae* hybridvektor enligt patentkravet 4, **kännetecknad** därav, att den innehåller PHO5- eller GAPDH-promotorn av *S. cerevisiae*.

6. *S. cerevisiae* hybridvektor enligt patentkravet 4, **kännetecknad** därav, att den innehåller en signalsekvens härledd från PHO5-genen av *S. cerevisiae*, invertasgenen av *S. cerevisiae*, eller den humana urokinasgenen.

7. Transformerad *S. cerevisiae* värd, **kännetecknad** därav, att den innehåller en hybridvektor, som har en uttryckningsreguleringssekvens av *S. cerevisiae*, ett DNA-fragment, som består av en första DNA-sekvens, som kodar för en signalpeptid och är uppströms av och i läsram med en andra DNA-sekvens, som kodar för en mogen plasminogenaktivator av urokinastyp, och vilket DNA-fragment är i transkriptionell kontroll av den nämnda uttryckningsreguleringssekvensen, och en DNA-sekvens, som innehåller transkriptionsterminationssignaler av en *S. cerevisiae* gen.

FIG.1 : Hep3 soluista eristetyistä mRNA:sta johdetun ihmisen u-PA-cDNA:n restriktioendonukleaaasikartta

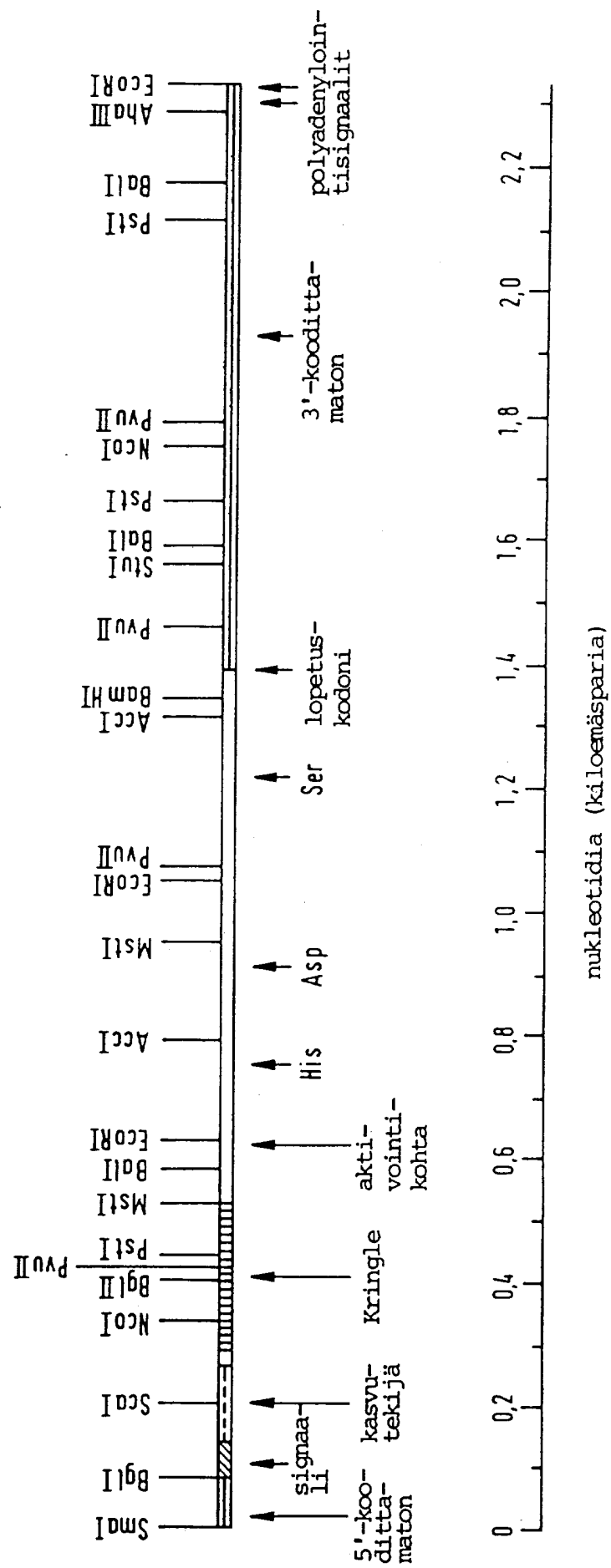


FIG.2 : Hep3-soluista valmistetun u-PA-cDNA-insertin nukleotidisekvenssi ja päätelty aminohapposekvenssi

```

1  CCGGGGCTCCGGGCTGCGGTCTCCTGCCGCAGCCACCGAGCCGCCGTCTAGCGCCCCGA
      MET ARG ALA LEU LEU ALA ARG LEU LEU LEU CYS VAL   -9
60  CCTCGCCACC  ATG AGA GCC CTG CTG GCG CGC CTG CTT CTC TGC GTC
      LEU VAL VAL SER ASP SER LYS GLY SER ASN GLU LEU HIS GLN VAL   7
106 CTG GTC GTG AGC GAC TCC AAA GGC AGC AAT GAA CTT CAT CAA GTT
      PRO SER ASN CYS ASP CYS LEU ASN GLY GLY THR CYS VAL SER ASN   22
151 CCA TCG AAC TGT GAC TGT CTA AAT GGA GGA ACA TGT GTG TCC AAC
      LYS TYR PHE SER ASN ILE HIS TRP CYS ASN CYS PRO LYS LYS PHE   37
196 AAG TAC TTC TCC AAC ATT CAC TGG TGC AAC TGC CCA AAG AAA TTC
      GLY GLY GLN HIS CYS GLU ILE ASP LYS SER LYS THR CYS TYR GLU   52
241 GGA GGG CAG CAC TGT GAA ATA GAT AAG TCA AAA ACC TGC TAT GAG
      GLY ASN GLY HIS PHE TYR ARG GLY LYS ALA SER THR ASP THR MET   67
286 GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC ACC ATG
      GLY ARG PRO CYS LEU PRO TRP ASN SER ALA THR VAL LEU GLN GLN   82
331 GGC CGG CCC TGC CTG CCC TGG AAC TCT GCC ACT GTC CTT CAG CAA
      THR TYR HIS ALA HIS ARG SER ASP ALA LEU GLN LEU GLY LEU GLY   97
376 ACG TAC CAT GCC CAC AGA TCT GAT GCT CTT CAG CTG GGC CTG GGG
      LYS HIS ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP ASN ARG ARG ARG PRO TRP  112
421 AAA CAT AAT TAC TGC AGG AAC CCA GAC AAC CGG AGG CGA CCC TGG
      CYS TYR VAL GLN VAL GLY LEU LYS PRO LEU VAL GLN GLU CYS MET   127
466 TGC TAT GTG CAG GTG GGC CTA AAG CCG CTT GTC CAA GAG TGC ATG
      VAL HIS ASP CYS ALA ASP GLY LYS LYS PRO SER SER PRO PRO GLU  142
511 GTG CAT GAC TGC GCA GAT GGA AAA AAG CCC TCC TCT CCT CCA GAA
      GLU LEU LYS PHE GLN CYS GLY GLN LYS THR LEU ARG PRO ARG PHE   157
556 GAA TTA AAA TTT CAG TGT GGC CAA AAG ACT CTG AGG CCC CGC TTT
      LYS ILE ILE GLY GLY GLU PHE THR THR ILE GLU ASN GLN PRO TRP   172
601 AAG ATT ATT GGG GGA GAA TTC ACC ACC ATC GAG AAC CAG CCC TGG
      PHE ALA ALA ILE TYR ARG ARG HIS ARG GLY GLY SER VAL THR TYR   187
646 TTT GCG GCC ATC TAC AGG AGG CAC CGG GGG GGC TCT GTC ACC TAC
      VAL CYS GLY GLY SER LEU ILE SER PRO CYS TRP VAL ILE SER ALA   202
691 GTG TGT GGA GGC AGC CTC ATC AGC CCT TGC TGG GTG ATC AGC GCC

```

FIG. 2: (jatkoa)

THR HIS CYS PHE ILE ASP TYR PRO LYS LYS GLU ASP TYR ILE VAL 217
 736 ACA CAC TGC TTC ATT GAT TAC CCA AAG AAG GAG GAC TAC ATC GTC
 TYR LEU GLY ARG SER ARG LEU ASN SER ASN THR GLN GLY GLU MET 232
 781 TAC CTG GGT CGC TCA AGG CTT AAC TCC AAC ACG CAA GGG GAG ATG
 LYS PHE GLU VAL GLU ASN LEU ILE LEU HIS LYS ASP TYR SER ALA 247
 826 AAG TTT GAG GTG GAA AAC CTC ATC CTA CAC AAG GAC TAC AGC GCT
 ASP THR LEU ALA HIS HIS ASN ASP ILE ALA LEU LEU LYS ILE ARG 262
 871 GAC ACG CTT GCT CAC CAC AAC GAC ATT GCC TTG CTG AAG ATC CGT
 SER LYS GLU GLY ARG CYS ALA GLN PRO SER ARG THR ILE GLN THR 277
 916 TCC AAG GAG GGC AGG TGT GCG CAG CCA TCC CGG ACT ATA CAG ACC
 ILE CYS LEU PRO SER MET TYR ASN ASP PRO GLN PHE GLY THR SER 292
 961 ATC TGC CTG CCC TCG ATG TAT AAC GAT CCC CAG TTT GGC ACA AGC
 CYS GLU ILE THR GLY PHE GLY LYS GLU ASN SER THR ASP TYR LEU 307
 1006 TGT GAG ATC ACT GGC TTT GGA AAA GAG AAT TCT ACC GAC TAT CTC
 TYR PRO GLU GLN LEU LYS MET THR VAL VAL LYS LEU ILE SER HIS 322
 1051 TAT CCG GAG CAG CTG AAA ATG ACT GTT GTG AAG CTG ATT TCC CAC
 ARG GLU CYS GLN GLN PRO HIS TYR TYR GLY SER GLU VAL THR THR 337
 1096 CGG GAG TGT CAG CAG CCC CAC TAC TAC GGC TCT GAA GTC ACC ACC
 LYS MET LEU CYS ALA ALA ASP PRO GLN TRP LYS THR ASP SER CYS 352
 1141 AAA ATG CTG TGT GCT GCT GAC CCA CAG TGG AAA ACA GAT TCC TGC
 GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO LEU VAL CYS SER LEU GLN GLY ARG 367
 1186 CAG GGA GAC TCA GGG GGA CCC CTC GTC TGT TCC CTC CAA GGC CGC
 MET THR LEU THR GLY ILE VAL SER TRP GLY ARG GLY CYS ALA LEU 382
 1231 ATG ACT TTG ACT GGA ATT GTG AGC TGG GGC CGT GGA TGT GCC CTG
 LYS ASP LYS PRO GLY VAL TYR THR ARG VAL SER HIS PHE LEU PRO 397
 1276 AAG GAC AAG CCA GGC GTC TAC ACG AGA GTC TCA CAC TTC TTA CCC
 TRP ILE ARG SER HIS THR LYS GLU GLU ASN GLY LEU ALA LEU 411
 1321 TGG ATC CGC AGT CAC ACC AAG GAA GAG AAT GGC CTG GCC CTC TGA
 1366 GGGTCCCCAGGGAGGAAACGGGCACCACCCGCTTTCTTGCTGGTTGTCATTTTTGCAGTA
 1426 GAGTCATCTCCATCAGCTGTAAGAAGAGACTGGGAAGATAGGCTCTGCACAGATGGATTT
 1486 GCCTGTGGCACCACCAGGGTGAACGACAATAGCTTTACCCTCACGGATAGGCCTGGGTGC
 1546 TGGCTGCCCAGACCCTCTGGCCAGGATGGAGGGGTGGTCCTGACTCAACATGTTACTGAC
 1606 CAGCAACTTGTCTTTTTCTGGACTGAAGCCTGCAGGAGTTAAAAAGGGCAGGGCATCTCC

FIG. 2 : (jatkoa)

1666 TGTGCATGGGCTCGAAGGGAGAGCCAGCTCCCCGACCGGTGGGCATTGTGAGGCCCAT
1726 GGTGAGAAATGAATAATTTCCCAATTAGGAAGTGTAAGCAGCTGAGGTCTCTTGAGGGA
1786 GCTTAGCCAATGTGGGAGCAGCGGTTTGGGGAGCAGAGACACTAACGACTTCAGGGCAGG
1846 GCTCTGATATTCCATGAATGTATCAGGAAATATATATGTGTGTGTATGTTTGCACACTTG
1906 TTGTGTGGGCTGTGAGTGTAAAGTGTGAGTAAGAGCTGGTGTCTGATTGTTAAGTCTAAAT
1966 ATTCCTTAAACTGTGTGGACTGTGATGCCACACAGAGTGGTCTTCTGGAGAGGTTATA
2026 GGTCACCTCCTGGGGCCTCTTGGGTCCCCACGTGACAGTGCCTGGGAATGTACTTATTCT
2086 GCAGCATGACCTGTGACCAGCACTGTCTCAGTTTCACATAGATGTCCCTTTCTT
2146 GGCCAGTTATCCCTTCCTTTTAGCCTAGTTCATCCAATCCTCACTGGGTGGGGTGAGGAC
2206 CACTCCTTACACTGAATATTTATATTTCACTATTTTTATTTATATTTTTGTAAATTTAAA
2266 TAAAAGTGATCAATAAAATGTGATTTTTCTG(A)_n

5/14

FIG.3 : Plasmidin pCS16 rakentaminen

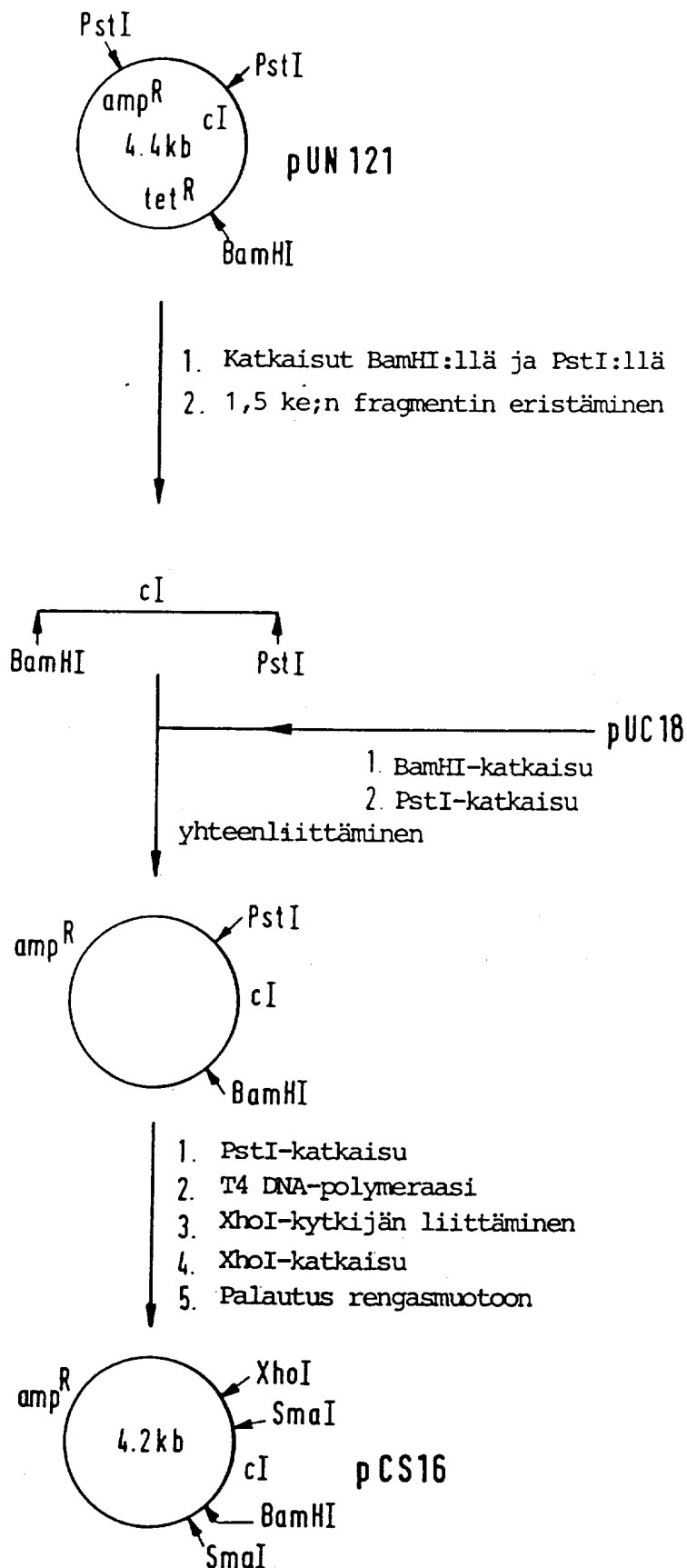


FIG. 4 : Plasmidin pCS16/UPA rakentaminen

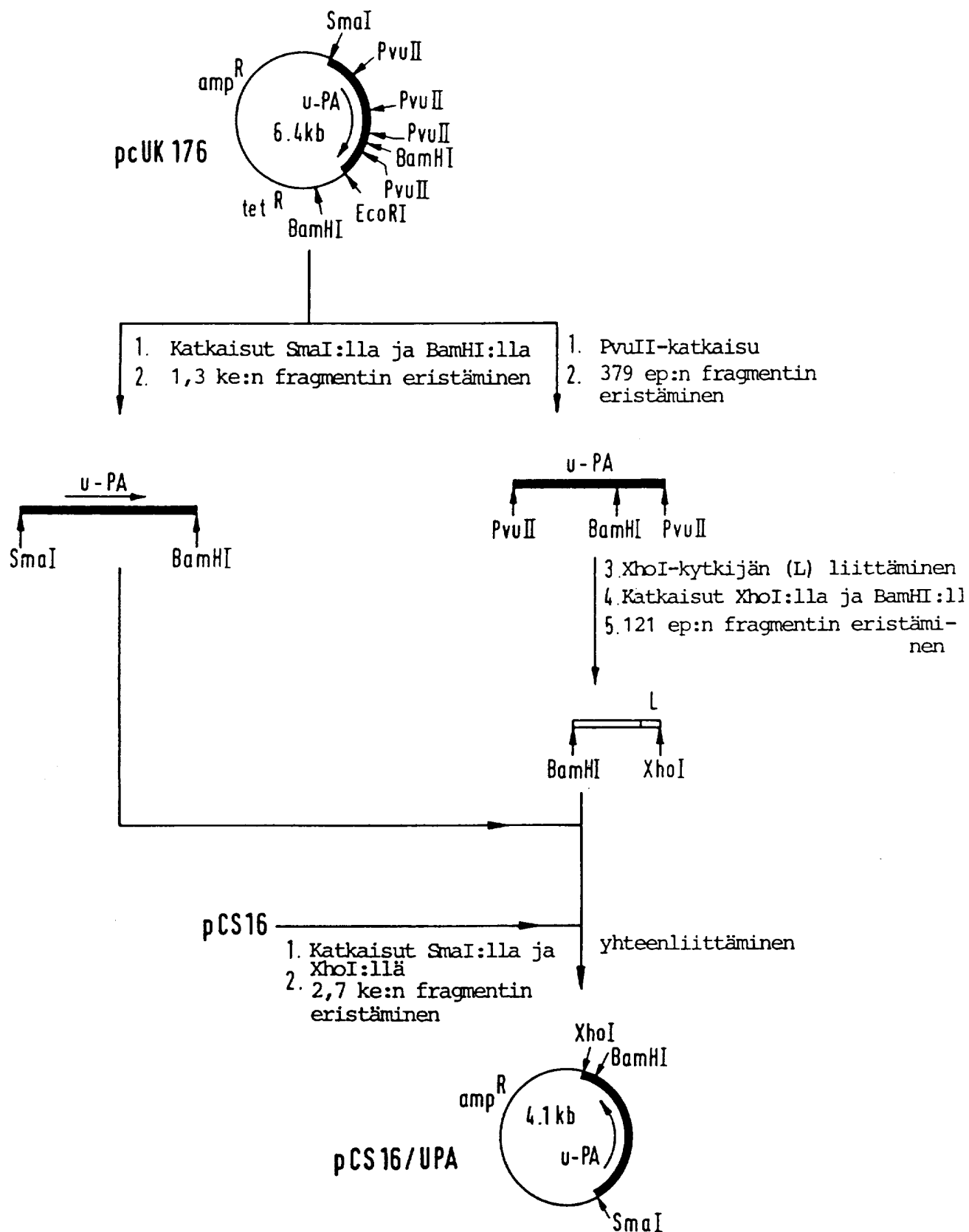


FIG. 5: Plasmidin pJDB207/PH05-I-UPA-rakentaminen

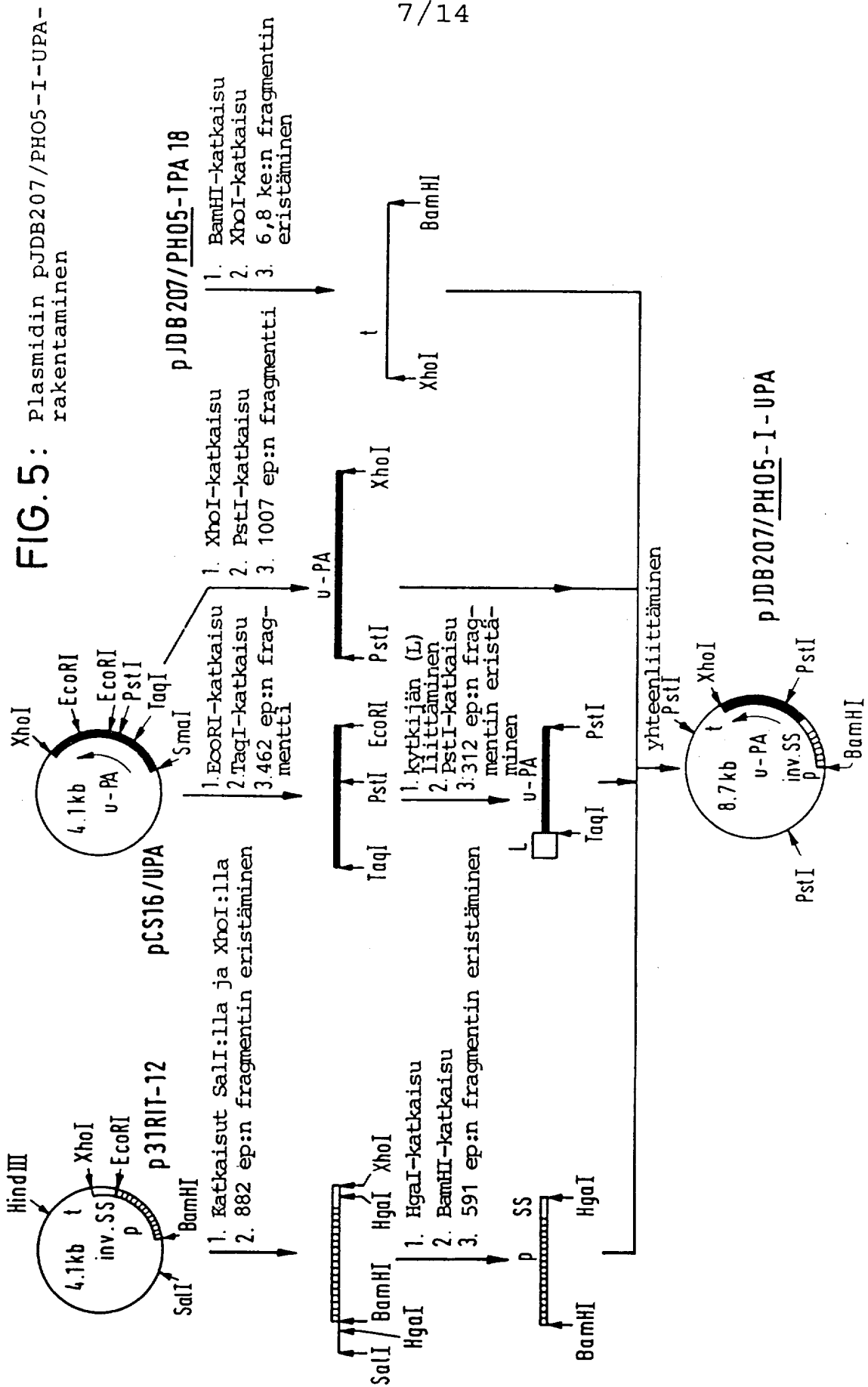


FIG. 6 : GAPDH-geenin promoottorialue

	TaqI	-670	-660	-650	-640
		TCGAGT	TTATCATTAT	CAATACTCGC	CATTTCAAAG AATACGTAAA
-630		-620	-610	-600	-590
		TAATTAATAG	TAGTGATTTT	CCTAACTTTA	TTTAGTCAAA AAATTAGCCT
-580		-570	-560	-550	-540
		TTTAATTCTG	CTGTAACCCG	TACATGCCAA	AATAGGGGGC GGGTTACACA
-530		-520	-510	-500	-490
		GAATATATA	CATCGTAGGT	GTCTGGGTGA	ACAGTTTATT CCTGGCATCC
-480		-470	-460	-450	-440
		ACTAAATATA	ATGGAGCCCG	CTTTTAAAGC	TGGCATCCAG AAAAAAAAAAG
-430		-420	-410	-400	-390
		AATCCCAGCA	CCAAAATATT	GTTTTCTTCA	CCAACCATCA GTTCATAGGT
-380		-370	-360	-350	-340
		CCATTCTCTT	AGCGCAACTA	CAGAGAACAG	GGGCACAAAC AGGCAAAAAA
-330		-320	-310	-300	-290
		CGGGCACAAC	CTCAATGGAG	TGATGCAACC	TGCCTGGAGT AAATGATGAC
-280		-270	-260	-250	-240
		ACAAGGCAAT	TGACCCACGC	ATGTATCTAT	CTCATTTTCT TACACCTTCT
-230		-220	-210	-200	-190
		ATTACCTTCT	GCTCTCTCTG	ATTTGGAAAA	AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
-180		-170	-160	-150	-140
		ACCAGTTCCC	TGAAATTATT	CCCCTACTTG	ACTAATAAGT ATATAAGAC
-130		-120	-110	-100	-90
		GGTAGGTATT	GATTGTAATT	CTGTAAATCT	ATTCTTAAA CTTCCTTAAAT
-80		-70	-60	-50	DraI -40
		TCTACTTTTA	TAGTTAGTCT	TTTTTTTAGT	TTTAAAACAC CAAGAACTTA
-30	TaqI	-20	-10	-1	
		GTTCGAATA	AACACACATA	AATAAACAAA	<u>ATG</u>

9/14

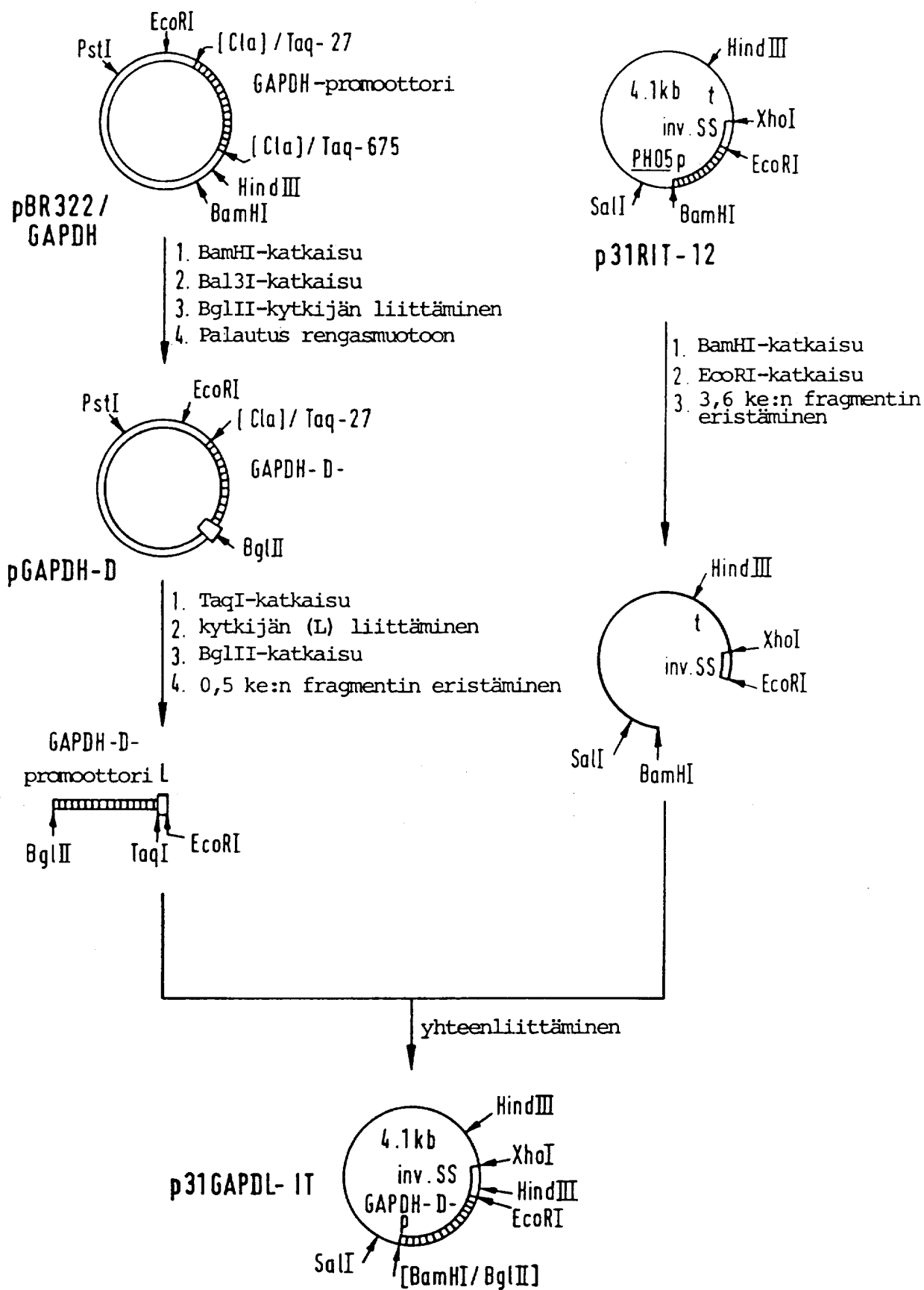
FIG.7: Plasmidin p31GAPDL-IT rakentaminen

FIG. 8 : GAPDH-promoottorin osan sisältävien BglII-EcoRI-fragmenttien eristäminen vastaavasti plasmideista p31GAPFL-IT, p31GAPEL-IT ja p31GAPDL-IT

a. p31GAPFL-IT

-198

5'-GATCT CCCTGAAAAA AAAGGTTGAA
 ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
 GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
 TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTITTTAGT TTAAAAACAC CAAGAACTTA
 GTTTCGAATA AACACACATA AATAAAG-3'

-5

b. p31GAPEL-IT

-263

5'-GATCTCCCGC ATGTATCTAT CTCATTTTCT TACACCTTCT
 ATTACCTTCT GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA
 ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG ACTAATAAGT ATATAAAGAC
 GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAAATCT ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT
 TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTITTTAGT TTAAAAACAC CAAGAACTTA
 GTTTCGAATA AACACACATA AATAAAG-3'

-5

c. p31GAPDL-IT

-540

5'-GATCTCC GGGTTACACA GAATATATAA CATCGTAGGT GTCTGGGTGA
 ACAGTTTATT CCTGGCATCC ACTAAATATA ATGGAGCCCG CTTTTTAAGC
 TGGCATCCAG AAAAAAAAAAG AATCCCAGCA CCAAAATATT GTTTTCTTCA
 CCAACCATCA GTTCATAGGT CCATTCTCTT AGCGCAACTA CAGAGAACAG
 GGGCACAAAC AGGCAAAAAA CGGGCACAAC CTCAATGGAG TGATGCAACC
 TGCCTGGAGT AAATGATGAC ACAAGGCAAT TGACCCACGC ATGTATCTAT
 CTCATTTTCT TACACCTTCT ATTACCTTCT GCTCTCTCTG ATTTGGAAAA
 AGCTGAAAAA AAAGGTTGAA ACCAGTCCC TGAAATTATT CCCCTACTTG
 ACTAATAAGT ATATAAAGAC GGTAGGTATT GATTGTAATT CTGTAAATCT
 ATTTCTTAAA CTTCTTAAAT TCTACTTTTA TAGTTAGTCT TTTTITTTAGT
 TTAAAAACAC CAAGAACTTA GTTTCGAATA AACACACATA AATAAAG-3'

-5

FIG.9: Plasmidin pJDB207/GAPDL-I-UPA rakentaminen

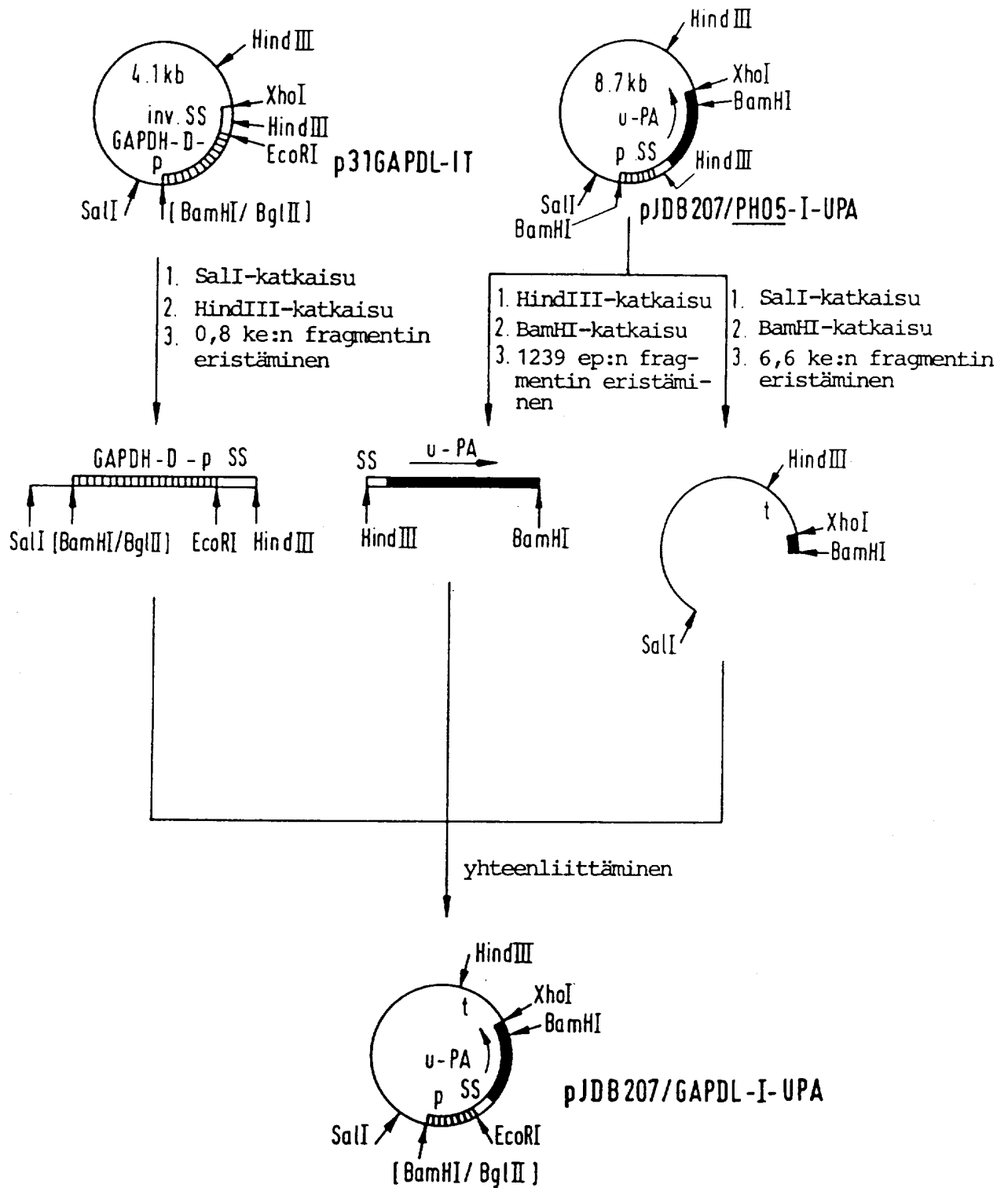


FIG.10: Plasmidin pJDB207/GAPDL-UPA rakentaminen

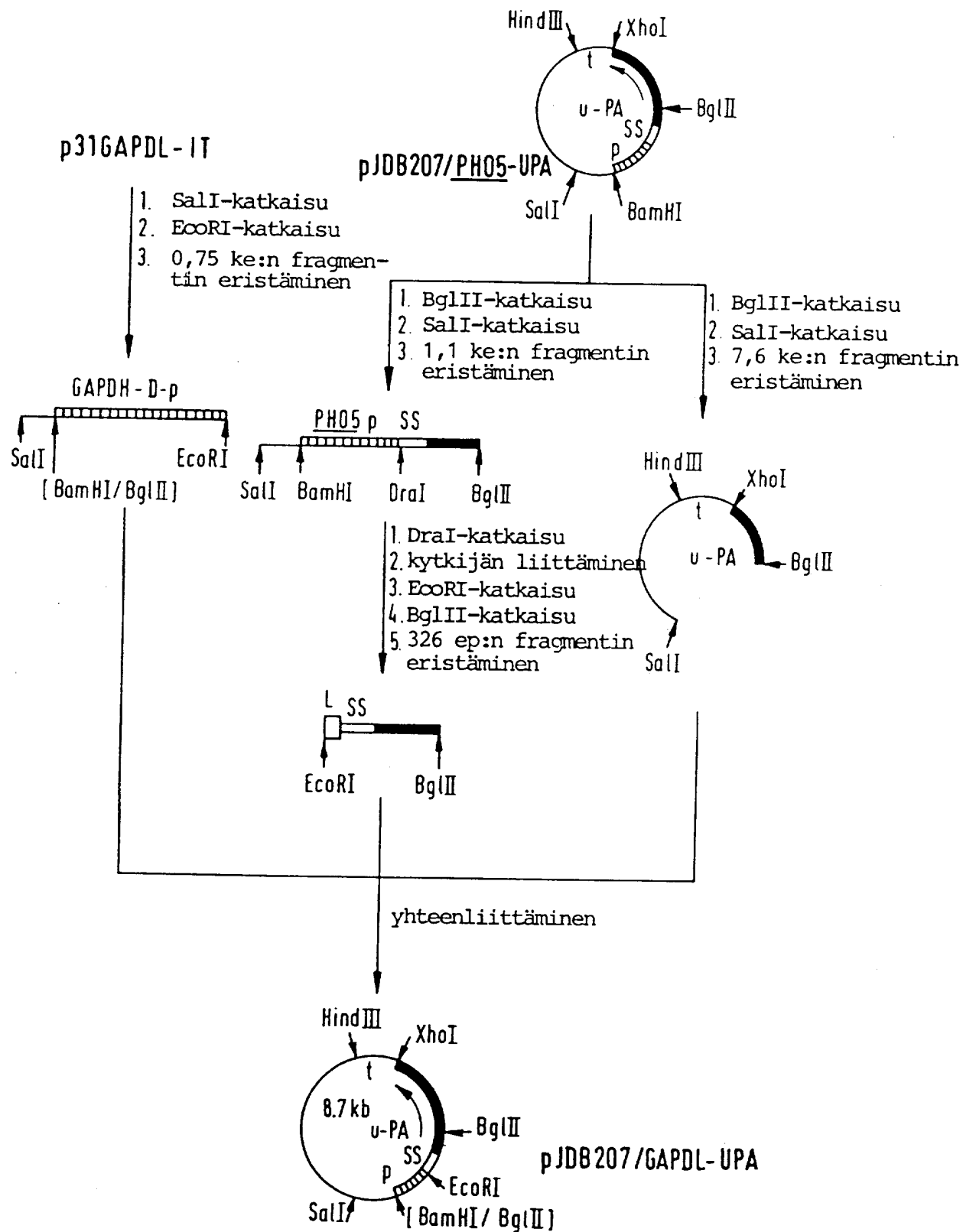


FIG.11: Plasmidin pDP33 rakentaminen

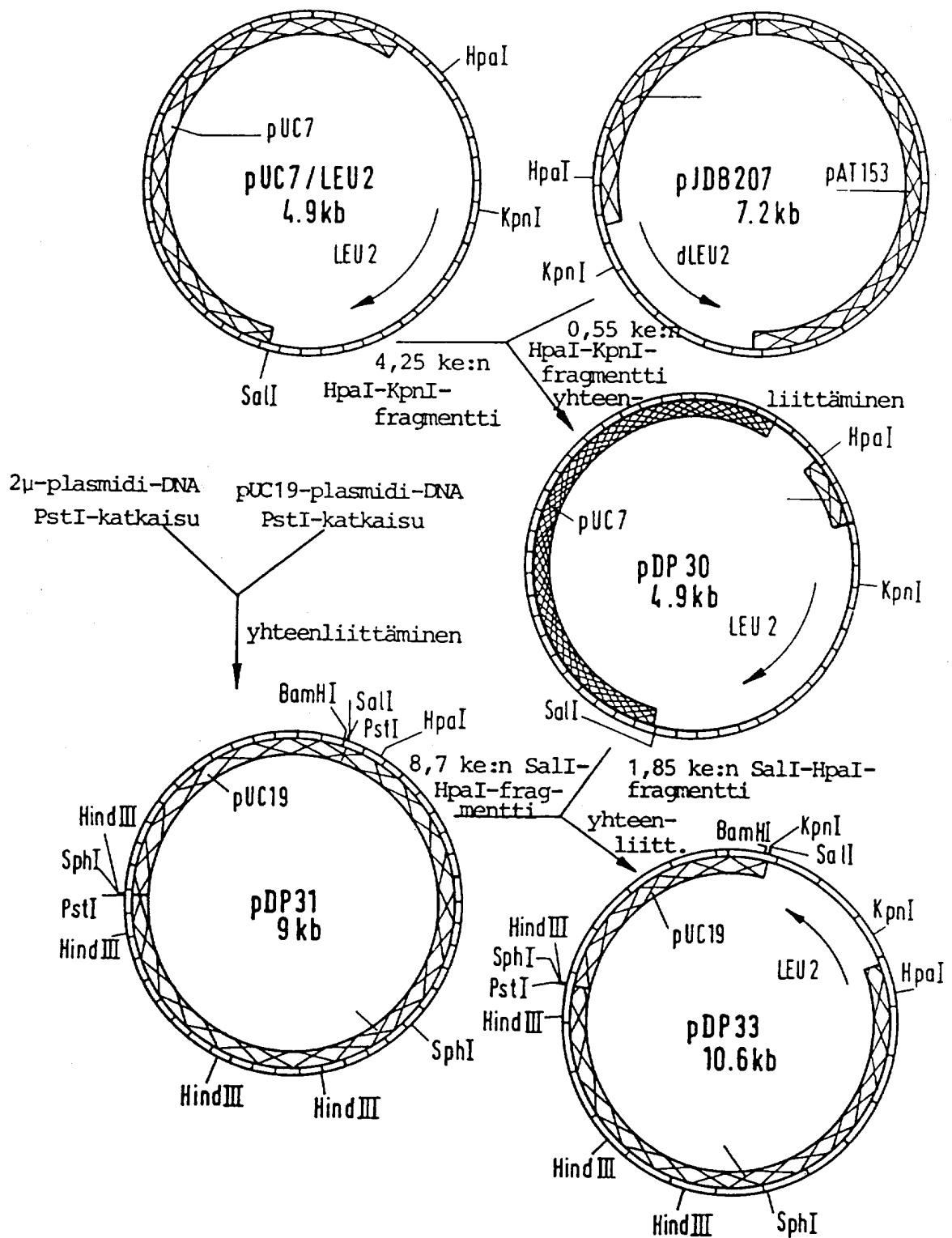


FIG.12: Plasmidin pDP38
rakentaminen

