

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 783366 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 783366

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/63
C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 06.11.1978

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 06.11.1978

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 09.05.1979

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

08.11.1977 US 849591

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Riggs, Arthur D., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Parannettu menetelmä mikrobipolypeptidi-ilmaisulla.

Förbättrat förfarande för mikrobpolypeptiduttryck.

Genentech Inc, 460 Point San Bruno Boulevard, San Francisco,
Kalifornia 94080, Yhdysvallat

Menetelmä imettäväisen polypeptidin valmistamiseksi ekspressoimalla mikrobisessa rekombinanttikloonausvektorissa oleva, polypeptidiä koodaava heterologinen rakennegeeni - Förfarande för framställning av en polypeptid hos däggdjur genom att exprimera en för polypeptiden kodande heterolog strukturgen i en mikrobiell rekombinantkloningsvektor

Geneettinen informaatio on koodattu kaksisäikeiseen deoksiribonukleiinihappoon (DNA eli geenit) sen järjestyksen mukaan, jossa DNA koodausketjussa ovat sen toistuvien nukleotidikomponenttien tyypilliset emäkset. Koodatun informaation ekspressio polypeptidien muodostamiseksi on kaksiosainen prosessi. Geenien tiettyjen kontrollialueiden (regulonien) määräysten mukaan RNA-polymeraasi voidaan saada siirtymään koodausketjua pitkin ja muodostamaan lähetti-RNA:n (ribonukleiinihappo) prosessissa, jota nimitetään transkriptioksi. Sitä seuraavassa translaatiovaiheessa solun ribosomit yhdessä siirtäjä-RNA:n kanssa muuttavat mRNA:n "tiedonannon" polypeptideiksi. Informaatiossa, jonka mRNA välittää DNA:sta, on signaaleja, jotka määrävät ribosomitranslaation alkamisen ja päättymisen sekä myös niiden aminohappojen luonteen ja sekvens-

sin, joista polypeptidi koostuu. DNA-koodausketju sisältää pitkiä nukleotiditriplettisekvenssejä, joita nimitetään kodoneiksi, koska kunkin tripletin eli kodonin sisältämien nukleotidien emäkset koodaavat spesifisiä informaation osia. Esimerkiksi 3 nukleotidia, joita merkitään ATG:llä (adeniini-tyymiini-guaaniini) aiheuttavat mRNA-signaalin, joka tulkitaan "lähtötranslaatioksi", kun taas lopetuskodonit TAG, TAA ja TGA tulkitaan "päättymistranslaatioksi". Aloitus- ja lopetuskodonien välissä ovat ns. rakennegeenit, joiden kodonit määrittelevät lopullisesti itse aminohapposekvenssin. Tämä määrittely tapahtuu vakiintuneen käsityksen mukaan geneettisen koodin mukaan (esim. J.D. Watson, Molecular Biology of the Gene, W.A. Benjamin Inc, N.Y., 3.painos 1976), joka kuvaa kodonit eri aminohappoja varten. Geneettinen kodoni on siinä mielessä degeneroitunut, että eri kodonit voivat aiheuttaa saman aminohapon muodostumisen, mutta täsmällinen siinä mielessä, että kutakin aminohappoa varten on yksi tai useampi kodoni, joka on vain sitä varten. Esimerkiksi kaikki kodonit, TTT, TTC, TTA ja TTG, luettuna sellaisenaan koodaavat seriiniä eikä mitään muuta aminohappoa. Transkription aikana on säilytettävä oikea lukuvaihe eli lukusuunta. Voidaan esimerkiksi kuvitella, mitä tapahtuu, kun RNA-polymeraasitranskriptori lukee sekvenssissä GCTGGTTGTAAG ... kodonin (alleviivattu) ensimmäisen emäksen eri tavalla:

. . . <u>GCT</u> <u>GGT</u> <u>TGT</u> <u>AAG</u> . . .	. . . Ala-Gly-Gys-Lys . . .
. . . G <u>CGT</u> <u>GTT</u> <u>GTA</u> AG . . .	. . . Leu-Val-Leu . . .
. . . GC <u>TGG</u> <u>TTG</u> <u>TAA</u> A . . .	. . . Trp-Leu-(seis) .

Lopullisesti tuotettu polypeptidi riippuu siten elintärkeästi rakennegeenin ja reguloinnin avaruudellisesta suhteesta toisiinsa.

Geneettisen prosessin selvän ymmärtämisen kannalta on tiedyt geenien komponentit määriteltävä:

Operoni - Geeni, joka käsittää rakennegeenin tai -geenit peptidiekspressiota varten ja kontrollialueen (reguloinnin), joka säätelee tätä ekspressiota.

Promoottori - Reguloinnissa oleva geeni, johon RNA-polymeraasin on sitouduttava transkription alkuunsaattamiseksi.

Operaattori - Geeni, johon repressoriproteiini voi sitoutua estäen siten RNA-polymeraasin sitoutumisen viereiseen promoottoriin.

Induktori - Aine, joka deaktivoi repressoriproteiinin,

vapauttaa operaattorin ja mahdollistaa RNA-polymeraasin sitoutumisen promoottoriin, jolloin transkriptio alkaa.

Kataboliittisen aktivaattoriproteiinin (CAP) sitoutumiskohta - Geeni, joka sitoo syklisen adenosiinimonofosfaatin ("cAMP") välittämän CAP:n, jota myös yleensä tarvitaan transkription alkuunsaattamiseen. CAP-sitoutumiskohta voi määrätyissä tapauksissa olla tarpeeton, esimerkiksi faagin λ plac UV5 promoottorimutaatio laktoosioperoinnissa tekee cAMP:n ja CAP:n tarpeettomiksi ekspressiossa, J. Beckwith et. al., J. Mol. Biol. 69, ISS-160 (1972).

Promoottori-operaattori-systeemi - Tässä käytettynä se merkitsee operonin toimintakykyistä kontrollialuetta riippumatta siitä, sisältyykö siihen CAP-sitoutumiskohta tai riippumatta se kyvyistä koodata repressoriproteiiniekspressiota.

Seuraavassa määritellään rekombinantti-DNA:ta koskevassa selvityksessä käytetyt nimitykset.

Kloonausvektori - Kromosomin ulkopuolinen kaksisäikeinen DNA, joka sisältää muuttumattoman "replikonin", jolloin vektori replikoituu "transformaatio-menetelmällä", kun se sijoitetaan yksisoluiseen organismiin (mikrobiin), Näin transformoitua organismia nimitetään "transormantiksi".

Plasmidi - Tässä yhteydessä viruksista tai bakteereista saatu kloonausvektori; bakteereista saatua nimitetään "bakteeriplasmidiksi".

Komplementaarisuus - Yksisäikeisen DNA:n emäsekvenssiin liittyvä ominaisuus, joka saa aikaan kaksisäikeisen DNA:n muodostumisen vetysiltojen avulla vastaavien säikeiden komplementtaaristen emästen välillä. Adeniini (A) on tymiinin (T) komplementti ja guaniini (G) on sytosiinin (C) komplementti.

Biokemian viime vuosien tutkimusten tuloksena on muodostettu "rekombinantti"-kloonausvektoreita, joissa esimerkiksi plasmideihin on saatu sisällytettyä eksogeenista DNA:ta. Erityistapauksissa rekombinantti saattaa sisältää "heterologista" DNA:ta, jolla tarkoitetaan DNA:ta, joka koodaa polypeptidejä, joita rekombinantti-vektorilla transformoitava organismi ei tavallisesti tuota. Plasmidit pilkotaan lineaarisen DNA:n muodostamiseksi, jossa on ligoitavissa olevat terminaalit. Nämä sitoutuvat eksogeeniseen geeniin, jossa on ligoitavissa olevat terminaalit, joihin muodostuu biologisesti toimintakykyinen osa, jossa on muuttumaton replikoni

ja haluttu fenotyyppiominaisuus. Rekombinanttiosa insertoidaan transformaation avulla mikro-organismiin ja transformantit eristetään ja kloonataan tarkoituksena saada aikaan populaatioita, jotka pystyvät ekspressoimaan uuden geneettisen informaation. Menetelmiä ja keinoja rekombinanttikloonausvektoreiden muodostamiseksi ja organismien transformoimiseksi niiden avulla on esitetty laajalti kirjallisuudessa, ks. esim. H.L. Heynecker et. al., *Nature* 263, 748-752 (1976); Cohen et. al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2110 (1972); *ibid.*, 70, 1923 (1973); *ibid.*, 70, 3240 (1973); *ibid.*, 71, 1030 (1974); Morrow et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1743 (1974); Novick, *Bacteriological Rev.*, 33, 210 (1969); Hershfield et. al., *Proc. Soc. Nat.l. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3455 (1974) ja Jackson et. al., *ibid.* 69, 2904 (1972). Asiaa on yleisesti käsitelty julkaisussa S. Cohen, *Scientific America* 233, 24 (1975).

Tunnetaan useita DNA:n rekombinaatiomenetelmiä, joissa erillisten DNA-fragmenttien yhteen liitettävät päät tehdään tavalla tai toisella ligatioon sopiviksi. Ligaatiolla tarkoitetaan fosfodiesterisidosten muodostamista yhteen liitettävien nukleotidien välille useimmiten T4-DNA-ligaasi-entsyymin avulla. Tällä tavalla voidaan tylpät päät suoraan sitoa. Vaihtoehtoisesti yhteen liitettävissä päissä komplementaarisia yksisäikeisiä ketjuja sisältävien fragmenttien sitoutumista helpottavat vetysillat, jotka asettavat päät asemiin ligaatiota varten. Tällaisia yksisäikeisiä ketjuja, joita nimitetään kohesiiviterminaaleiksi, voidaan muodostaa liittämällä nukleotideja tylppiin päihin käyttämällä terminaalitransferaasia, ja toisinaan yksinkertaisesti katkaisemalla tylpäästä päästä toinen ketju esim. λ -eksonukleaasin avulla. Useimmiten on kuitenkin turvauduttava restriktiendonukleaaseihin, jotka pilkkovat fosfodiesterisidoksia erityisiin nukleotidisekvensseihin, joiden pituudet ovat noin 4-6 emäsparia. Tunnetaan monia restriktiendonukleaaseja ja niiden tunnistuskohtia. Tavallisimmin käytetty on ns. EcoRI endonukleaasi. Restriktiendonukleaasit, jotka pilkkovat kaksisäikeisen DNA:n kierteisesti symmetrisissä "palindromeissa", aiheuttavat kohesiiviterminaalien muodostumisen. Plasmidi tai muu kloonausvektori voidaan siten pilkkoa, joten siitä jää terminaalit, jotka käsittävät puolikkaan restriktiendonukleaasin tunnistuskohdasta. Samalla restriktiendonukleaasilla saadulla eksogee-

nisen DNA:n pilkkoutumistuotteella on plasmidi-terminaalien kanssa komplementaariset terminaalit. Toisaalta, kuten jäljempänä esitetään, synteettisä DNA:ta, jossa on kohesiiviterminaalit, voidaan insertoida pilkottuun vektoriin. Eksogeenisen DNA:n insertoimisen helpottamiseksi vektoriin voidaan vektorin kohesiiviterminaalien jälleensiirtymistä estää käsittelemällä terminaalet alkalisella fosfataasilla, mikä saa aikaan eksogeenisen fragmentin käsittävän määrätyn molekyylin liittämisen.

Vektorin suhteen sopivasti orientoituneen fragmentin liittymisen voi helpottua, kun fragmentti syrjäyttää kahden erilaisen restriktioendonukleaasin lohkaiseman vektori DNA:n, ja itse sisältää terminaalit, jotka koostuvat eri endonukleaasien tunnistuskohtien sekvenssipuolikkaista.

Huolimatta laajoista viime vuosina suoritetuista rekombinantti-DNA:ta koskevista tutkimuksista on saavutettu vain harvoja sellaisia tuloksia, joita mahdollisesti voitaisiin välittömästi soveltaa käytäntöön. Näin on käynyt varsinkin epäonnistuneissa yrityksissä ekspressoida synteettisen DNA:n koodaamia polypeptidejä tai sen kaltaisia riippumatta siitä, onko DNA koottu tavallisella tavalla liittämällä nukleotideja toisiinsa vai saatu käänteisellä transkriptiolla eristetyistä mRNA:sta (komplementaarinen eli "cDNA"). Nyt kuvataan ensimmäistä kertaa synteettisen geenin funktionaalisen polypeptidituotteen ekspressiota.

Keksintö koskee menetelmää imettäväisen polypeptidin valmistamiseksi ekspressoimalla mikrobisessa rekombinanttikloonausvektorissa oleva polypeptidiä koodaava heterologinen rakennegeeni. Menetelmälle on tunnusomaista, että polypeptidin aminohapposekvenssiä koodaava heterologinen geeni on lukusuunnassa toisen proteiinin aminohapposekvenssiä koodaavien kodonien suhteen niin, että ekspressiossa saadaan prekursoriproteiini, joka sisältää sekä polypeptidin että toisen proteiinin aminohapposekvenssit ja jossa on selektiivinen pilkkoutumiskohta mainitun polypeptidin aminohapposekvenssin vieressä.

Menetelmällä valmistettava tuote voi esim. olla somatostatini (Guillemin, US-patenttijulkaisu 3 904 594, kasvuhormonin, insuliinin ja glukagonin erittymistä ehkäisevä aine, jota voidaan käyttää akromegalian, akuutin haimatulehduksen ja insuliinista

johtuvan sokeritaudin hoidossa, ks. R. Guillemain et. al., Annual Rev. Med. 27, 379 (1976).

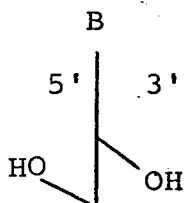
Liitteenä olevat kuviot valaisivat edullisia suoritusmuotoja somatostatiinin ja insuliinin valmistamiseksi.

Seuraavassa kuvioita tarkastellaan lähemmin.

Kuvio 1. Menetelmän kaavioesitys: somatostatiinin geeni, joka on valmistettu kemiallisella DNA-synteesillä, liitetään plasmidissa pBR322 olevaan *E. coli* β -galaktosidaasigeeniin. *E. coli* transformoinnin jälkeen rekombinanttiplasmidi aikaansaa prekursoriproteiinin synteesin, joka proteiini voidaan spesifisesti pilkkoa *in vitro* syaanibromidilla metioniinitähteiden kohdalla, jolloin saadaan aktiivista imettäväisen polypeptidihormonia. A, T, C ja G esittävät somatostatiinigeenin koodausketjussa olevien deoksiribonukleotidien tyypillisiä emäksiä (vastaavasti adeniinia, tyymiiniä, sytosiinia ja guaniinia).

Kuvio 2. Synteettisen geenin kaaviokuva, jonka geenin koodausketju (so. "ylempi" ketju) sisältää esitetyn somatostatiinin aminohapposekvenssin kodonit.

Kuvio 3. Kaaviokuva edullisesta menetelmästä synteettisten geenien kokoamiseen käytettyjen nukleotiditrimereiden valmistuksesta. Kuviossa 3 olevien nukleotidien tavanomaisessa piirtämisessä 5'-OH on vasemmalla ja 3'-OH on oikealla, siis



Kuvio 4. Somatostatiinia ("SOM") sisältävä proteiinin ekspressioon pystyvän rekombinantti-plasmidin (esim. pSOM11-3) muodostamista esittävä kaavio, jossa muodostaminen aloitetaan lähtöplasmidista pBR322. Kuviossa 4 kunkin plasmidin likimääräinen molekyylipaino on ilmoitettu daltonina ("d"). Ap^r ja Tc^r

esittävät ampicilliini ja vastaavasti tetrasykliiniresistenssiä vastaavia geenejä, kun taas Tc^S tarkoittaa tetrasykliiniherkkyyttä, joka on saatu aikaan poistamalla osa Tc^R -geenistä. Restriktioendonukleaasin eri spesifisten pilkkomiskohtien suhteelliset asemat plasmidissa on merkitty piirrokseseen (esim. EcoRI, BamI jne.).

Kuviot 5A ja 5B. Näissä on esitetty kahden plasmidin avainosan nukleotidisekvenssit sekä lähetti-RNA:n ("mRNA") transkriptio, joka aina etenee koodausketjun 5'-päästä lähtien. Restriktioendonukleaasin substraattikohdat on esitetty. Jokainen piirretty sekvenssi sisältää sekä lac-operonin (laktoosi-operonin) kontrollielementit että kodonit somatostatiinin aminohapposekvenssin ekspressiolle (kursiivilla). β -galaktosidaasia (" β -gal") vastaavien aminohapposekvenssien numerot ovat suluisissa.

Kuviot 6-8. Kuten lähemmin kuvataan jäljempänä esitetyssä kokeellisessa osassa, nämä kuviot esittävät tuloksia vertailevista radioimmunokokeista, jotka osoittavat rekombinanttiplasmidien ekspressiolla saadun tuotteen somatostatiiniaktiivisuutta.

Kuvio 9. Synteettisten geenien kaaviokuva, joiden geenien koodausketjut sisältävät kodonit ihmisen insuliinin A- ja B-ketjun aminohapposekvensseille.

Kuvio 10. Juoksukaavio rekombinanttiplasmidin muodostamiseksi, joka plasmidi pystyy ekspressoimaan ihmisen insuliinin B-ketjun.

1. Heterologista polypeptidiä koodaavien geenien valmistus

Minkä tahansa, tunnettua aminohapposekvenssiä olevan polypeptidin DNA voidaan valmistaa valitsemalla geneettisen koodin mukaisia kodoneja. Puhdistamisen ym. helpottamiseksi valmistetaan erikseen oligodeoksiribonukleotidifragmentteja, joissa on esimerkiksi 11-16 nukleotidia, jotka fragmentit sitten kootaan halutuksi sekvenssiksi. Valmistetaan sarja sopivan kokoisia oligodeoksiribonukleotidifragmentteja ja sitten edelleen toinen sarja. Ensimmäisen sarjan fragmentit liitetään yhteen sopivaksi sekvenssiksi, jolloin saadaan DNA-koodausketju polypeptidiekkspressiolle (ks. esim. kuvio 2, fragmentit A, B, C ja D). Toisen sarjan fragmentit

muodostavat samalla tavalla yhteenliitettynä sopivaksi sekvenssiksi koodausketjua vastaavan komplimentaarisen ketjun (esim. kuvio 2, fragmentit E, F, G ja H). Vastaavien ketjujen fragmentit menevät edullisesti toistensa päälle siten, että niiden komplementaarisuus edistää niiden yhteenliittymistä itsestään fragmenttiryhmien kohesiivisten terminaalien vetysiltojen välityksellä. Yhteenliittymisen jälkeen suoritetaan ligaatio tavallisella tavalla.

Geneettisen koodin degeneraatio mahdollistaa sen, että tietyn aminohapposekvenssin kodonit voidaan pääasiallisesti valita vapaasti. Tämän keksinnön tarkoituksiin kodonin valintaan vaikuttaa kuitenkin lähinnä kolme seikkaa. Ensinnäkin kodonit ja fragmentit valitaan ja fragmenttiyhteenliittymä määrätään siten, että vältetään fragmenttien - paitsi halutun geenin viereisten fragmenttiensopimatonta komplementaarisuutta toistensa suhteen. Toiseksi ennen aikaisen transkription päättymisen estämiseksi vältetään sekvenssejä, joissa on runsaasti AT-emäspareja (esim. noin 5 tai enemmän), varsinkin kun niitä edeltää sekvenssi, jossa on runsaasti GC-emäspareja. Kolmanneksi ainakin suurin osa kodoneista valitaan siten, että ne ovat edullisia mikrobien genomien ekspressiossa (ks. esim. W. Fiers et. al., Nature 260, 500 (1976)). Seuraavassa määritellään kodonit, jotka ovat "edullisia mikrobien ekspressiossa".

Taulukko I

Kodonien edullinen yhteenliittymä

1. asema (5'-pää) (lue alaspäin)	2. asema (lue vaakasuoraan)				3. asema (3'-pää) (lue alaspäin)
	T	C	A	G	
T	Phe	---	---	Cys	T
	Phe	Ser	Tyr	---	C
	Leu	---	seis	seis	A
	---	Ser	seis	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	T
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	---	A
	---	Pro	Gln	---	G
A	Ile	Thr	Asn	---	T
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	---	---	---	---	A
	Met (lähtö)	Thr	Lys	---	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	T
	Val	---	Asp	---	C
	Val	---	Glu	---	A
	Val	Ala	Glu	---	G

Somatostatiinin tapauksessa rakennegeenin edullisimmat aminohappo-(kodoni) suhteet ovat:

Gly (GGT); Cys (TGT); Lys (AAG); Trp (TGG); Ala (GCT, GCG); Asn (AAT, AAC); Phe (TTC, TTT); Thr (ACT, ACG); ja Ser (TCC, TCG).

Kun halutun polypeptidin rakennegeeni liitetään kloonausvektoriin ekspressiota varten, niin geeniä edeltää "lähtökodoni" (esim. ATG), ja sitä seuraa välittömästi yksi tai useampi "lopetus"-kodonit

(ks. kuvio 2). Kuten jäljempänä kuvataan, tietyn polypeptidin aminohapposekvenssi voidaan kuitenkin ekspressoida niin, että sitä edeltää ja/tai seuraa lisäproteiini. Jos polypeptidin aiottu käyttö vaatii lisäproteiinin lohkaisemista, niin sopivat pilkkomiskohdat saadaan polypeptidi-lisäproteiinikodoniliitoksen vieressäolevan koodauksen avulla. Kuviossa 1 on tästä esimerkki, siinä ekspressiotuote on prekursoriproteiini, joka sisältää sekä somatostatiinin että suurimman osan β -galaktosidaasipolypeptidistä. Tässä ei tarvita ATG:tä koodaamaan translaation alkua, koska lisäproteiinin, β -gal-proteiinin ribosomikoostumus lukee suoraan somatostatiinirakennegeenin. Säilyttämällä ATG-signaali voidaan kuitenkin koodata metioniinia, joka on spesifisesti syaanibromidilla lohkeava aminohappo, jolloin on saatu helppo menetelmä prekursoriproteiinin muuttamiseksi halutuksi polypeptidiksi.

Kuviossa 2 on vielä eräs piirre, joka on edullinen rekombinanttikäyttöön tarkoitettulle heterologiselle DNA:lle, so. kohesii-viset terminaalit, jotka edullisesti käsittävät toisen säikeen restriktioendonukleasin tunnistuskohdan kahdesta säikeestä. Aikaisemmin esitetyistä syistä terminaalit ovat edullisesti sellaisia, että ne vastaavasti muodostavat erilaiset tunnistuskohdat rekombinaatiossa.

Vaikka tässä kuvatut tutkimustulokset voidaan onnistuneesti soveltaa somatostatiiniin, niin on huomattava, että heterologista DNA-koodausta voidaan käyttää itse asiassa mille tahansa tunnetulle aminohapposekvenssille tarpeelliset muutokset huomioonottaen. Edellä ja jäljempänä kuvattua tekniikkaa voidaan siten sopivasti muuntaen soveltaa poly(amino)happojen, kuten polyleusiinin ja polyalaniinin, entsyymien, seerumiproteiinien, analgeettisten polypeptidien, kuten β -endorfiinien, jotka siirtävät kipukynnystä, jne., valmistukseen. Edullisimpia sellaisenaan valmistettuja polypeptidejä ovat imettäväisten hormonit tai niiden välituotteet. Näistä voidaan mainita esim. somatostatiini, ihmisen insuliini, ihmisen ja härän kasvuhormoni, luteinisoiva hormoni, ACTH, haiman polypeptidi jne. Välituotteita ovat esimerkiksi ihmisen preproinsuliini, ihmisen proinsuliini, ihmisen insuliinin A- ja B-ketjut jne. In vitro valmistetun DNA:n ohella heterologinen DNA saattaa sisältää cDNA:ta tuloksena mRNA:n käänteisestä transkriptiosta. Katso esim. Ullrich et al., Science, 196, 1313 (1977).

2. Rekombinantit, jotka koodaavat prekursoriproteiinin ekspressiota

Kuviossa 1 esitetyssä prosessissa saadaan ekspressiossa prekursoriproteiinia, joka sisältää sekä heterologisen rakennegeenin koodaamaa polypeptidia (somatostatiini) että lisäproteiinia (joka sisältää osan β -galaktosidaasientsyymistä). Selektiivinen pilkkoutumiskohta somatostatiiniaminohapposekvenssin vieressä mahdollistaa sitten halutun polypeptidin erottamisen ylimääräisestä proteiinista. Kuviossa 1 esitetty tapaus on edustava esimerkki menetelmistä, joihin voidaan soveltaa tässä kuvattua tekniikkaa.

Useimmiten pilkkominen suoritetaan plasmidin tai muun vektorin replikaatioalueen ulkopuolella, esimerkiksi mikrobiviljelmän talteenoton jälkeen. Tällä tavalla pienten polypeptidien väliaikainen liittyminen ylimääräiseen proteiiniin saattaa suojata edelliset esim. in vivo tapahtuvaa endogeenisten entsyymien hajottavaa vaikutusta vastaan. Samalla lisäproteiini tavallisesti estää halutun polypeptidin bioaktiivivisuudesta riippuvan solun ulkopuolella tapahtuvan pilkkoutumisen ja siten vaikuttaa menetelmän bioturvallisuutta kohottavasti. Erityistapauksissa saattaa tietenkin olla toivottua saada aikaan pilkkoutuminen solun sisällä. Kloonausvektorit voidaan varustaa esimerkiksi sellaisia entsyymejä koodaavalla DNA:lla, jotka muuttavat insuliiniprekursorit aktiivimuotoon, jolloin ne toimivat yhteistyössä prekursorimuodon ekspressiota koodaavan toisen DNA:n kanssa.

Edullisessa tapauksessa halutusta, määrätystä polypeptidistä puuttuu sisäiset pilkkoutumiskohdat, jotka vastaavat ylimääräisen suojaproteiinissa käytettyjä, vaikka on otettava huomioon, että milloin näin ei ole laita, haluttua tuotetta saadaan lisäreaktioilla vaikkakin alemmalla saannolla. Kun haluttu tuote on metioniinivapaa, niin erittäin tehokkaaksi on osoittautunut syaanibromidilohkaisu halutun sekvenssin vieressä olevan metioniinin kohdalla. Samalla tavoin arginiini- ja lysiinivapaita tuotteita voidaan entsyymaattisesti pilkkoa esim. trypsiinillä tai kymotrypsiinillä halutun sekvenssin vieressä olevissa Arg-Arg-, Lys-Lys-pilkkoutumiskohdissa. Milloin pilkkomisesta jää haluttuun tuotteeseen esimerkiksi ei toivottu arginiini, se voidaan poistaa karboksipeptidaasikäsitteilyllä. Kun Arg-Arg-pilkkomiseen käytetään trypsiiniä, niin halu-

tun polypeptidin lyysiinikohdat voidaan ensin suojata esimerkiksi maleiinihappo- tai sitrakonihappoanhydridillä. Tässä esitetyt pilkkomismenetelmät ovat ainoastaan esimerkkejä, joista voidaan alalla tunnetulla tavalla tehdä monia eri muunnoksia.

Lohkaistava proteiini saattaa olla ekspressioitu spesifisen polypeptidin C- tai N-terminaalien vieressä tai jopa itse polypeptidissä, kuten siinä tapauksessa, että sekvenssissä erottuvat proinsuliini ja insuliini. Käytetty vektori voi koodata proteiiniekspressiota, jossa on halutun polypeptidin toistuvia sekvenssejä, joita kutakin erottaa selektiiviset pilkkomiskohdat. Edullisimmin kuitenkin ylimääräisen proteiinin kodonit transloituvat ennen halutun tuotteen rakennegeeniä, kuten kuviossa on esitetty. Joka tapauksessa olisi huolehdittava siitä, että regulonin suhteen sopiva lukusuunta säilyy.

3. Immunogeenien ekspressio

Koska pystytään ekspressoimaan sekä spesifisiä polypeptidejä että ylimääräisiä proteiineja, saadaan tästä sopiva keino immunogeenisten aineiden tuottamiseen. Polypeptidihapteenit (so. aineet, jotka sisältävät vasta-aineisiin tms. erityisesti sitoutuneita determinantteja, mutta jotka yleensä ovat liian pieniä saamaan aikaan immuunivastetta) voidaan ekspressoida konjugaatteina lisäproteiinin kanssa, joka on kooltaan riittävä aiheuttamaan immunogeenisuuden. Tässä valmistetulla β -gal-somatostatiini-konjugaatilla on esimerkiksi immunogeeninen koko, ja sen voidaan odottaa aiheuttavan sellaisten vasta-aineiden muodostumista, jotka sitovat somatostatiinihapteenin. Proteiinit, joissa on yli 100 aminohappoa, yleensä yli 200 aminohappoa, ovat luonteeltaan immunogeenisiä.

Edellä kuvatulla tavalla valmistettuja konjugaatteja voidaan käyttää radioimmunologisissa määrityksissä tai muissa hapteenin määrityskokeissa käytettävien vasta-aineiden tuottamiseen tai vaihtoehtoisesti rokotteiden tuottamiseen. Virusvaippaproteiinin syaanibromidi- tai muilla pilkkomistuotteilla saadaan oligopeptidejä, jotka sitoutuvat itse proteiinia vastaan syntyneisiin vasta-aineisiin. Annettaessa heterologiselle DNA:lle tällaisen oligopeptidihapteenin aminohapposekvenssi, se voidaan ekspressoida konjugaattina lisäproteiinin kanssa, jolla aikaansaadaan immunogeenisuus. Tällaisten konjugaattien käyttö rokotteina saattaa vähentää sivureaktioita, joita vaippaproteiinit aiheuttavat itse immuuniuudelle.

4. Kontrollielementit

Kuviossa 1 on esitetty prosessi, jossa transformanttiorganismi ekspressoii regulonin kontrollin alaiseksi saatetun heterologisen DNA:n polypeptidituotteen, jolloin reguloni on transformoitamattomassa tilassa olevan organismin "homologi". Laktoosiriippuvainen *E. coli*in kromosomi-DNA sisältää laktoosi- eli lac-operonia, joka välittää laktoosihajoamisen, mm. valmistamalla entsyymiä β -galaktosidaasi. Kuvatussa tapauksessa lac-kontrollielementit saadaan bakterifaagista, λ plac 5, joka pystyy tartuttamaan *E. coli*in. Faagin lac-operoni puolestaan saadaan transduktoimalla samaa bakteerilaji, tästä nimitys "homologi". Esillä olevan keksinnön menetelmässä käytettäväksi sopivat homologiset regulonit voidaan vaihtoehtoisesti saada organismista peräisin olevasta plasmidi-DNA:sta.

Lac-promoottori-operaattori-systeemin yksinkertaisuus ja tehokkuus puoltaa sen käyttöä kuvatussa systeemissä; samoin sen käyttöä puoltaa sen kyky indusoida IPTG:n vaikutuksesta (isopropyylitio- β -D-galaktosidi). Voidaan tietenkin käyttää yhtä hyvin muita operoneja tai niiden osia, esim. lambda-promoottori-operaattoria, arabinoosi-operonia (phi 80 dara), tai kolisiini EI:ä, galaktoosia, alkalista fosfataasia tai tryptofaani-operoneja. Viimeksi mainitusta johdettujen promoottori-operaattorien (so. "tryp-operoni") voidaan olettaa aiheuttavan 100-%:sen repressiosta riippuvan induktion (indoliakryylihapon avulla) ja talteenoton.

5. Plasmidin muodostaminen yleensä

Prosessin yksityiskohdat, joita kaavamaisesti on kuvattu kuviossa 4, ilmenevät jäljempänä olevasta kokeellisesta osasta. Seuraavassa käsitellään erilaisia edullisia menetelmiä, joita keksinnön mukaisessa edullisessa toteutusmuodossa käytetään rekombinanttiplasmidin muodostamiseksi.

Synteettisen somatostatiini-geenin kloonaukseen ja ekspressioon käytettiin kahta plasmidia. Kummassakin plasmidissa on β -galaktosidaadin rakennegeenin (katso kuviot 4 ja 5) eri alueella EcoRI-substraattikohta. Synteettisen somatostatiini-DNA-fragmentin sijoittaminen näiden plasmidien EcoRI-kohtiin saa aikaan fragmentin geneettisen informaation ekspression lac-operonin kontrollielementtien säätelyn alaisena. Somatostatiinifragmenttien sijoittaminen näihin plasmideihin johtaa translaatioon, jonka tuloksena on somatostatiinipolypeptidi, jota edeltää joko 10 aminohappoa (PSOM1)

tai itse asiassa koko β -galaktosidaasialayksikkö rakenne (pSOM11-3).

Plasmidin muodostaminen alkaa plasmidista pBR322, joka on hyvin karakterisoitu kloonauksvektori. Lac-elementtien vieminen tähän plasmidiin suoritettiin insertoimalla HaeIII-restriktioendonukleaasifragmentti (203 nukleotidia), jossa oli lac-promoottori, CAP-sitoutumiskohta, operaattori, ribosomi-sitoutumiskohta ja β -galaktosidaasi-rakennegeenin ensimmäiset 7 aminohappokodonia. HaeIII-fragmentti oli johdettu λ plac 5 DNA:sta. EcoRI-pilkottu pBR322-plasmidi, jonka terminaalija oli käsitelty T4 DNA-polymerasilla ja deoksiribonukleotidi-trifosfaateilla, ligoitiin tylpapäpäisesti HaeIII-fragmenttiin, jolloin saatiin EcoRI-terminaalit insertiokohtiin. Liittämällä nämä HaeIII ja käsitellyt EcoRI-terminaalit saadaan syntymään EcoRI-restriktiokohta (katso kuvat 4 ja 5) kumpaankin terminaaliin. E. coli RR1:n transformantteja tämän DNA:n kanssa valittiin tetrasykliinin (Tc) ja ampisilliini (Ap) resistenssikokeeseen 5-bromi-4-kloori-indolyylilaktosidiväliaineella (X-gal). Tällä indikaattoriväliaineella β -galaktosidaasisynteesille olennaiset pesäkkeet voidaan indentifioida sinisen värin perusteella; tämä johtuu lac-operaattorien titrausrepressorin lisääntymisestä. HaeIII-fragmenttien kaksi orientaatiota oli mahdollisia, mutta nämä erotettiin Hha-restriktioaseman asymmetrisen sijainnin perusteella fragmentissa. Plasmidi pNH10 modifioitiin edelleen eliminoimalla EcoRI-endonukleaasikohta, joka on vastakkaisella puolella kuin lac-operaattori (pBH 20).

Kahdeksan kemiallisesti systesitoitua oligodeoksiribonukleotidia leimattiin (kuvio 2) 5'-terminaalien kohdalla $\left[\text{}^{32}\text{P} \right] - \gamma\text{-ATP}$:llä polynukleotidikinaasin avulla ja liitettiin yhteen T4 DNA-ligasilla. Vetysiltojen muodostumisessa päällekkäin menevien fragmenttien välille somatostatiini-geeni syntyy itsestään ja polymeroituu lopuksi suuremmiksi molekyyleiksi kohesiivisten restriktiokohtaterminaalien vaikutuksesta. Ligoituja tuotteita käsiteltiin EcoRI- ja BamHI-restriktioendonukleaaseilla somatostatiinigeenin tuottamiseksi, kuten kuviossa 2 nähdään.

Synteettinen somatostatiinigeenifragmentti, jossa oli EcoRI- ja BamI-terminaalit ligoitiin pBH20-plasmidiin, jota oli aikaisemmin käsitelty EcoRI- ja BamHI-restriktioendonukleaaseilla ja alkalisella fosfataasilla. Alkalisella fosfataasilla käsittelemällä saadaan insertoidun fragmentin sisältävälle plasmidille sopiva mo-

lekyyli rakenne. Ampisilliiniresistenteille transformanteille, jotka oli saatu näin ligoidulla DNA:lla suoritettiin seulontakoe tetrasykliiniherkkyyden suhteen, ja useita niistä tutkittiin sopivan kokoisten insertoitujen EcoRI-BamHI-fragmenttien suhteen.

Kahdesta kloonista olevien plasmidien EcoRI-BamHI-fragmenttien molemmat säikeet analysoitiin nukleotidisekvenssianalyysillä, lähtien BamHI- ja EcoRI-kohdista. Sekvenssianalyysi ulotettiin lac-kontrolloituihin elementteihin asti; lac-fragmenttisekvenssi oli muuttumaton, ja eräässä tapauksessa pSOM1, molempien säikeiden nukleotidisekvenssi määritettiin itsenäisesti, jolloin saatiin kuviossa 5A oleva sekvenssi.

pSOM1-plasmidin EcoRI-Pst-fragmentti, jossa oli lac-kontrollielementti, poistettiin ja korvattiin pBR322:n EcoRI-Pst-fragmentilla, jolloin saatiin plasmidi pSOM11. λ plac5:n EcoRI-fragmentti, jossa oli lac-operonikontrollialue ja suurin osa β -galaktosidaasirakennegeenistä, insertoitiin pSOM11:n EcoRI-kohtaan. Oli odotettavissa λ plac⁵:n kaksi EcoRI-lac-orientaatiota. Toinen näistä orientaatioista säilyttää oikean lukusuunnan somatostatiinigeeniin, toinen ei. Analysoimalla itsenäisesti eristettyjä somatostatiiniaktiiviteettia aiheuttavia klooneja voitiin identifioida klooneja, joissa oli oikein orientoituneet geenit, joista klooni, joka nimitetään pSOM11-3, on yksi.

6. Mikro-organismi

Transformaatioon on ehdotettu käytettäväksi erilaisia yksisoluisia mikro-organismeja, kuten bakteereja, sieniä ja leviä, ts. sellaisia yksisoluisia organismeja, joita voidaan kasvattaa viljelmänä fermentoimalla. Yleensä sopivimpia käytettäväksi ovat bakteerit. Transformaatio-alttiita bakteereja ovat esimerkiksi heimoon Enterobacteriaceae kuuluvat, kuten Escherichia coli ja Salmonella, heimoon Bacillaceae kuuluvat Bacillus subtilis, sekä Pneumococcus, Streptococcus ja Haemophilus influenzae.

Seuraavissa somatostatiinia koskevassa tutkimuksessa käytetty organismi oli E. coli, kanta RRL, genotyyppi: Pro⁻Leu⁻Thi⁻R_B⁻M_B⁻rec⁻A⁺Str^rLac^y⁻. E.coli RRL on johdettu E.coli HB101:stä (.H.W. Boyer et al., J. Mol. Biol. (1969) 41, 459-472) yhdistämällä se Hfr-donorina olevan E. coli K12-KL 16-kannan kanssa. Katso J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor, New York, 1972). Sekä E. coli RRL:n (ATCC no. 31343) että E. coli RRL (pBR322):n (ATCC no. 31344) viljelmät on deponoitu lai-

tokseen The American Type Culture Collection, josta ne ovat vapaasti saatavissa.

Somatostatiinia tuottava organismi on samoin deponoitu (ATCC no. 31447). Ihmisen insuliinin A- ja B-ketjun tapauksessa geenit kloonataan E. coli K-12 kantaan 294 (pääte A, thi^- , hsr^- , hsm_k^+), ATCC no. 31446 ja tätä organismia käytettiin A-ketjun ekspressioon (E. coli K-12 kanta 294 pIAI^- , ATCC no. 31448). Ihmisen insuliinin B-ketju ekspressoitiin ensin HB101:n johdannaisessa, so. E. coli K-12 kanta D1210 lac^+ ($\text{i}^{\text{O}}\text{o}^+\text{z}^{\text{t}}\text{y}^+$), ja B-geenin sisältävä organismi on samoin deponoitu (ATCC no. 31449). Vaihtoehtoisesti B-geeni voidaan liittää ensin mainittuun organismiin, so. kantaan 294 ja ekspressoida siinä.

Kokeellinen osa

I Somatostatiini

1. Somatostatiinin geenifragmenttien muodostaminen

Ensin koottiin kuviossa 2 merkeillä A-H merkityt kahdeksan oligodeoksiribonukleotidia pääasiassa K. Itakura'n et al., J. Am. Chem. Soc. 97, 7327 (1975) esittämällä modifioidulla triesterimenetelmällä. Fragmenttien C, E ja H tapauksessa turvauduttiin kuitenkin parannettuun tekniikkaan, jossa ensin valmistettiin täysin suojattuja trimeerejä pitempien oligodeoksiribonukleotidin rakentamiseen tarvittaviksi perusyksiköiksi. Parannettu tekniikka on esitetty kaaviona kuvassa 3, jossa B on tyimiini N-bentsyloitu adeniini N-bentsyloitu sytosiini, tai N-isobutyroyloitu guaniini. Viittaamalla kuvioon 3 menetelmä suoritettiin lyhyesti kuvattuna seuraavasti: käyttämällä I:tä ylimäärin (2 mmol) kytkentäreaktio II:n (1 mmol) kanssa tapahtui lähes täydellisesti 60 minuutissa vaikuttavan kytkentäreagenssin, 2,4,6-tri-isopropylibentseeni-sulfonyylitetratsolidin (TPSTe, 4 mmol; 2) avulla. 5'-suojarahmnan poistamisen jälkeen 2-%:lla bentseenisulfonihappoliuoksella 5'-hydroksyylidimeeri V voitiin erottaa 3'-fosfodiesterimonomeerin IV ylimäärästä yksinkertaisella liuotinuutolla vesipitoisella NaHCO_3 :lla CHCl_3 :ssa. Täysin suojattu trimeeriyhdiste valmistettiin sen jälkeen 5'-hydroksyylidimeeristä V, I:stä (2 mmol) ja TPST:stä (4 mmol) ja eristettiin kromatografoimalla silikageelillä (B. T. Hunt et al., Chem. and Ind. 1967, 1868. (1967)). Parannetulla menetelmällä valmistettujen trimeerien saannot on esitetty taulukossa II.

Taulukko II
Täysin suojattujen trimeerien saannot

Sekvenssi	Saanto	Sekvenssi	Saanto
TTT	81 %	ATG	69 %
TTT	75 %	GCC	61 %
GGA	41 %	CCA	72 %
AGA	49 %	CAA	72 %
ATC	71 %	TTA	71 %
CCT	61 %	CAT	52 %
ACA	63 %	CCC	73 %
ACC	65 %	ACC	59 %
CGT	51 %	GAT	60 %

Kahdeksan oligodeoksiribonukleotidia, joista suojaryhmät oli poistettu, puhdistettiin suurpainenestekromatografiolla Permaphase AAX:llä (R.A. Henry et al., J. Crom. Sci. II, 358 (1973)). Kunkin oligodimeerin puhtaus tarkistettiin homokromatografiolla DEAE-selluloosaohutkerroksella ja myös geelielektroforeesilla 20-%:lla akryyliamidikerroksella, jolloin oligomeerit oli leimattu polynukleotidikinaasin läsnäollessa $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP:llä. Kustakin DNA-fragmentista saatiin yksi pääasiallinen leimattu tuote.

2. Ligaatio ja somatostatiini-DNA:n akryyliamidigeeliana-lyysi

Kemiallisesti syntetisoitujen fragmenttien A-H 5'-OH-terminaalit fosforyloitiin erikseen T4-polynukleotidikinaasilla. Fosforylointiin käytettiin $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP:tä, jolloin reaktiotuotteita pystyttiin tarkkailemaan autoradiograafisesti, vaikka on huomattava, että leimaamatonta ATP:tä voitaisiin yhtä hyvin käyttää, jos ei käytetä autoradiografiaa. Juuri ennen kinaasireaktiota 25 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP:tä (noin 1500 Ci/mmol) (Maxam ja Gilbert, Proc. Nat. Acad.: Sci. USA, 74, 1507 (1977)) haihdutettiin kuiviin 0,5 ml:n Eppendorf-putkissa. 5 μg fragmenttia inkuboitiin 20 minuuttia 37°C:ssa 2 yksikön kanssa T4-DNA-kinaasia (hydroksyyliapatiittifraktio, 2500 yksikköä/ml; 27) 70 mM tris-HCl:sää (pH 7,6) ja 10 mM MgCl_2 :ssa, 5 mM ditiotreitolissa kokonaistilavuudessa 150 μl . Fragmenttien ligaation kannalta maksimaalisen fosforylaation takaamiseksi

lisättiin seos, joka sisälsi 70 mM tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiotreitolia, 0,5 mM ATP:tä ja 2 yksikköä DNA-kinaasia, ja inkubointia jatkettiin vielä 20 minuuttia 7°C:ssa. Fragmentteja, (250 mg/ μ l) säilytettiin 20°C:ssa ilman enempää käsittelyä. Kinaasikäsitteltyjen fragmenttien A, B, E ja F (1,25 μ g kutakin) liigaatio suoritettiin 50 μ l:n kokonaistilavuudessa 20 mM tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM ditiotreitolia, 0,5 mM ATP ja 2 yksikköä T4 DNA-ligaasia (hydroksyyliapatiittifraktio, 400 yksikköä/ml; 27) 16 tunnin ajan 4°C:ssa. Fragmenttien C, D, G ja H ligaatio suoritettiin samankaltaisissa olosuhteissa. Otettiin 2 μ l:n näytteitä analyysiä varten elektroforeesilla 10-%:sella polyakryyliamidigeelillä ja sitten autoradiografialla (H. L. Heyneker et al., Nature 263, 748 (1976), jossa reagoimattomat DNA-fragmentit esiintyivät nopeasti etenevänä materiaalina ja ligoitujen fragmenttien monomeeri eteni bromifenolisinivärin (BPF) kanssa. Tapahtui myös jonkin verran dimerisoitumista ligoitujen fragmenttien A, B, E ja F ja ligoitujen fragmenttien C, D, G ja H ja kohesiivisten päätteiden johdosta. Nämä dimeerit olivat hitaammin etenevää materiaalia, ja ne voitiin pilkkoa restriktioendonukleaasilla EcoRI ja vastaavasti BamHI.

Molemmat molekyylin puolikkaat (ligoidut A+B+E+F ja ligoitu C+D+G+H) liitettiin yhteen uudessa liigaatiovaiheessa, joka suoritettiin 150 μ l:n lopullisessa tilavuudessa 4°C:ssa 16 tunnin ajan. 1 μ l otettiin analysoitavaksi. Reaktioseosta kuumennettiin 15 minuuttia 65°C:ssa T4 DNA-ligaasin inaktivoimiseksi. Lämpökäsittely ei vaikuta DNA-seoksen elektroforeesitulokseen. Reaktioseokseen lisättiin riittävästi restriktioendonukleaasia BamHI somatostatiini DNA:n multimeeristen muotojen pilkkomiseksi 30 minuutin kuluessa 37°C:ssa. Lisättiin NaCl 0,1-m konsentraatioon ja sitten DNA hajotettiin EcoRI-endonukleaasilla. Käsittely restriktioendonukleaasilla keskeytettiin uuttamalla DNA fenoli-kloroformilla. Somatostatiini-DNA-fragmentti puhdistettiin poistamalla siitä reagoimattomat ja osittain ligoituneet DNA-fragmentit preparatiivisella elektroforeesilla 10-%:sella polyakryyliamidigeelillä. Somatostatiini-DNA-fragmenttia sisältävä nauha leikattiin irti

geelistä ja DNA eluoitiin leikkaamalla geeli pieniksi kappaleiksi ja uuttamalla DNA eluointipuskurilla (0,5 M ammoniumasetaatti, 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 0,1 % SDS) yön yli 65°C :ssa, DNA saostettiin 2 tilavuudella etanolia, sentrifugoitiin ja liuotettiin uudelleen 200 μl :aan 10 mM tris-HCl (pH 7,6) ja dialysoitiin samaa puskuria vastaan, jolloin saatiin somatostatiini-DNA-pitoisuus 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3. Rekombinanttiplasmidien muodostaminen

Kuviossa 4 on kaaviona esitetty somatostatiinigeenin sisältävien rekombinantti-plasmidien muodostus. Seuraavassa lähemmässä tarkastelussa viitataan tähän kuvioon.

A. Lähtöaine-plasmidi pBR322

Somatostatiinikloonaukseen valittu plasmidi oli pBR322, joka on pieni (molekyylipaino noin 2,6 megadaltonia) plasmidi, jossa on ampisilliinin (Ap) ja tetrasykliinin (Tc) resistenssigeenit. Kuten kuviossa 4 on esitetty ampisilliiniresistenssigeenissä on restriktioendonukleasille Pst pilkkoutumiskohta ja tetrasykliiniresistenssigeenissä on samanlainen kohta restriktioendonukleasille BamHI, ja EcoRI kohta sijaitsee Ap^r - ja Tc^r - geenien välissä. Plasmidi pBR322 on johdettu plasmidista pBR313, joka on 5,8 megadaltonin $\text{Ap}^r\text{Tc}^r\text{Col}^{\text{imm}}$ -plasmidi (R.L. Rodriguez et al., ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology 5, 471-77 (1976), R.L. Rodriguez et al., Konstruktion and Characterization of Cloning Vehicles in Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression, s. 471-77, Academic Press, Inc. (1976)). Plasmidi karakterisoitiin johdosten avulla siten kuin ovat kuvanneet F. Bolivar et al., "Konstruktion and Characterization of New Cloning Vehicles II. A. Multipurpose Cloning System", Gene (marraskuu 1977).

B. Plasmidin pBH10 muodostaminen

5 μg plasmidia pBR322 DNA hajotettiin 10 yksiköllä restriktioendonukleasia EcoRI liuoksessa 100 mM tris-HCl (pH 7,6), 6 mM MgCl_2 37°C :ssa 30 minuutin ajan. Reaktio keskeytettiin fenolikloroformiuutolla, DNA saostettiin 2,5 tilavuudella etanolia, suspen-

doitiin 50 μ l:aan T4 DNA-polymeraasipuskuria (67 mM tris-HCl, pH 8,8, 6,7 mM MgCl_2 , 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 167 $\mu\text{g/ml}$ härän seerumialbumiinia, 50 μM kumpaakin dNTP:tä; A. Planet et al., Biochem. 12, 5045 (1973)). Reaktio pantiin alulle lisäämällä 2 yksikköä T4 DNA-polymeraasia. 30 minuutin inkubaation jälkeen 37°C:ssa reaktio keskeytettiin DNA:n fenoli-kloroformiuutolla ja sitten saostamalla etanolilla. 3 μg plac^5 DNA:ta (Shapirc et al., Nature 224, 768 (1969)) käsiteltiin tunnin ajan 37°C:ssa restriktioentsyymillä HaeIII (3 yksikköä) 20 μ l:ssa 6 mM tris-HCl (pH 7,6) 6 mM MgCl_2 , 6 mM β -merkaptoetanolia. Reaktio keskeytettiin kuumentamalla 10 minuuttia 65°C:ssa. pBR322-käsitelty DNA sekoitettiin HaeIII-käsitellyn λplac^5 DNA:n kanssa ja tylppäpää ligoitiin 1,2 yksikön kanssa T4 DNA-ligaasia (hydroksyyliapatiittifraktio; A. Planet et al., ks. edellä, 30 μ l:ssa 20 mM tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl_2 , 10 mM ditiotreitolia, 0,5 mM ATP 12 tuntia 12°C:ssa. Ligoitu DNA-seos dialysoitiin 10 mM tris-HCl-puskuria (pH 7,6) vastaan, ja sitä käytettiin sitten E. coli kannan RR1 transformaatioon. Transformanteista valittiin tetrasykliini- ja ampisilliini-resistantit minimiväliainelevyiltä, jotka sisälsivät 40 $\mu\text{g/ml}$ 5-bromi-4-kloori-indolyyligalaktosidi-(X-gal) väliainetta (J.H. Miller, Experiments in molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, 1972). Pesäkkeet, joille oli ominaista β -galaktosidaasi-synteesi, tunnistettiin sinisestä väristä. 45:stä erikseen eristetystä sinisestä pesäkkeestä havaittiin kolmen sisältävän plasmidi-DNA:ta, jossa oli kaksi EcoRI-kohtaa, joiden välissä oli suunnilleen 200 emäsparia. Epäsymmetrisesti sijaitseva HhaI-fragmentti HaeIII lac kontrollifragmentin emäsparin 203 kohdalla (W. Gilbert et al., Protein-Ligand Interactions, H.Sand ja G. Baluer, De Greyter, Berliini (1975). s. 193-210) mahdollistaa HaeIII-fragmentin, joka nyt on EcoRI-fragmentti, orientaation määrittämisen. Plasmidin pBH10 osoitettiin sisältävän fragmentin halutussa orientaatiossa, sc. lac-transkriptio meni plasmidin Tc^r -geenin sisään.

C. Plasmidin pBH20 muodostaminen

Plasmidi pBH10 modifioitiin seuraavaksi eliminoimalla lac-operaattorin toisella puolella oleva EcoRI-kohta. Tämä suoritettiin lohkaisemalla valikoivasti EcoRI-endonukleaasilla kyseinen kohta, jolloin toinen EcoRI-kohta, joka sijaitsi Tc^r :n ja lac-promoottororien välissä, ja jotka ovat ainoastaan 40-emäsparin päässä toisistaan, oli osittain suojattu RNA-polymeraasilla. RNA-polymeraasin sitomisen jälkeen DNA (5 μ g) käsiteltiin EcoRI:llä (1 yksikkö) lopullisessa tilavuudessa 10 μ l 10 minuutin ajan 37°C:ssa. Reaktio keskeytettiin kuumentamalla 65°C:ssa 10 minuuttia. EcoRI:n kohesiivisiä terminaaleja käsiteltiin S1-nukleaasilla 25 mM Na-asetaatia (pH 4,5), 300 mM NaCl ja 1 mM $ZnCl_2$ sisältävässä liuoksessa 25°C:ssa 5 minuuttia. Reaktio keskeytettiin lisäämällä EDTA:n (10 nM lopullinen konsentraatio) ja tris-HCl-puskuria, pH8. 50 mM lopullinen konsentraatio) DNA uutettiin fenolikloroformilla, saostettiin etanolilla ja suspendoitiin 100 μ l:aan T4 DNA-ligaatio-puskuria. Lisättiin T4 DNA-ligaasia (1 μ l) ja seosta inkuboitiin 12°C:ssa 12 tuntia. Ligoitu DNA transformoitiin E. coli kantaan RR1, ja transformanteista valittiin Ap^rTc^r -kannat X-gal-antibioottiväliaineella. Suorittamalla restriktioentsyymianalyysi 10:lle eristetylle siniselle pesäkkeelle havaittiin, että näissä pesäkkeissä oli plasmidi-DNA:ta, joissa oli yksi EcoRI-kohta. Seitsemällä näistä oli EcoRI-kohta lac- ja Tc^r -promoottorin välissä säilynyt. Yhden plasmidin, pBH20:n nukleotidisekvenssi EcoRI-kohdasta lac-kontrollialueeseen vahvistettiin. Tätä plasmidia käytettiin seuraavassa somatostatiinigeenin kloonaukseen.

D. Plasmidin pSOM1 muodostaminen

20 μ g plasmidia pBH 20 käsiteltiin restriktioendonukleaa-seilla EcoRI ja BamHI lopullisessa tilavuudessa 50 μ l. Lisättiin bakteeriperäistä alkalista fosfataasia (0,1 yksikköä Worthington BAPF) ja inkubointia jatkettiin 10 minuuttia 65°C:ssa. Reaktiot keskeytettiin uuttamalla fenoli-kloroformilla, ja DNA saostettiin 2 tilavuudella etanolia, sentrifugoitiin ja liuotettiin 50 μ l:aan 10 mM-tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA. Käsittely alkalisella fosfa-taasilla estää tehokkaasti EcoRI:n, ja BamHI-käsitellyn pBG20-

DNA:ta sisältäviä rengasmaisia rekombinantti-plasmideja voi vielä ligaatiossa muodostua. Koska *E. coli* RRI transformoituu erittäin alhaisella tehokkuudella lineaarisen plasmidi-DNA:n vaikutuksesta, niin suurin osa transformanteista sisältää rekombinantti-plasmideja. 50 μ l somatostatiini-DNA:ta (4 μ g/ml) ligoitiin 25 μ l:n kanssa BamHI:llä, EcoRI:llä ja alkalisella fosfataasilla käsiteltyä pBH20-DNA:ta 22°C:ssa kokonaistilavuudessa 5 μ l, joka sisälsi 20 mM tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritalia, 0,5 mM ATP:tä ja 4 yksikköä T4 DNA-ligaasia. 10, 20 ja 30 minuutin kuluttua reaktioseokseen lisättiin lisämäärä DNA:ta (40 ng) (asteittainen somatostatiinin lisääminen saattaa edistää ligaatiota plasmidiin itseligaatioon verrattuna). Ligaatiota jatkettiin tunnin ajan, sitten seos dialysoitiin 10 mM tris-HCl:ä (pH 7,6) vastaan. Kontrollikokeessa ligoitiin BamHI:llä, EcoRI:llä, alkalisella fosfataasilla käsitelty pBH20-DNA samoissa olosuhteissa ilman somatostatiini-DNA:ta. Kumpaakin valmistetta käytettiin ilman enempää käsittelyjä *E. coli* RRI:n transformaatioon. Transformaatiokokeet suoritettiin P3-laitoksessa. (National Institutes of Health, U.S.A. Recombinant DNA Research Guidelines, 1976). Transformantit valittiin minimi-kasvatusainelevyiltä, jotka sisälsivät 20 μ g/ml Ap ja 40 μ g/ml X-gal. 10 transformanttia, jotka kaikki olivat Tc-herkkiä, eristettiin. Näille annettiin nimitykset pSOM1, pSOM2 jne.... pSOM 10. Kontrollikokeesta ei saatu yhtään transformanttia. 4 transformanttia 10:stä sisälsi plasmideja, joissa oli sekä EcoRI- että BamHI-kohta. Näiden rekombinanttiplasmidien pienet EcoRI- ja BamHI-fragmentit olivat kaikissa neljässä tapauksessa kooltaan samanlaisia kuin in vitro valmistettu somatostatiini-DNA. Emässekvenssianalyysi (Maxam ja Gilbert, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 560 (1977)) osoitti, että plasmidissa pSOM1 oli haluttu somatostatiini-DNA-fragmentti.

Klooniiin sisältyvän plasmidin pSOM1 DNA-sekvenssianalyysin perusteella oli odotettavissa, että se tuottaisi somatostatiinia sisältävää peptidiä. Kuitenkaan ei soluaineen uutteis- ta eikä supernatantista löydetty somatostatiinin radioimmuniaktiivisuutta, eikä somatostatiinia myöskään löydetty, kun kasvavaa viljelmää lisättiin suoraan 70-%:seen muurahaishappoon

kasvavaa viljelmää lisättiin suoraan 70-%:seen muurahaishappoon ja syaanibromidiin. *E. coli* RR1:n on havaittu hajottavan eksogeenisen somatostatiinin erittäin nopeasti. Somatostatiinin puuttuminen plasmidi pSOM1:ä sisältävistä klooneista saattaa hyvin olla seurausta endogeenisten proteolyyttisten entsyymien solunsisäisestä hajouksesta. Plasmidia pSOM1 käytettiin siten rakentamaan plasmidikoodi somatostatiinia sisältävälle prekursoriproteeiinille, joka on riittävän suuri, jotta se voisi vastustaa proteolyyttistä hajoamista.

E. Plasmidien pSOM11 ja pSOM 11-3 muodostaminen

Muodostettiin plasmidi, jonka somatostatiini-geeni sijoitettiin β -galaktosidaasigeenin C-terminaaliin ja joka piti translaation oikeassa vaiheessa. Tämän geenin C-terminaalin lähellä oleva EcoRI-kohta ja tämän proteiinin tunnettu aminohapposekvenssi (B. Polisky et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3900 (1976), A.V. Fowler et al., idem 74, 1507 (1976), A.I. Bukhari et al., Nature New Biology 243, 238 (1973), ja K.E. Langley, J. Biol. Chem. 250. 2587 (1975)) mahdollistavat EcoRI BamHI somatostatiinigeenin inser-toimisen EcoRI-kohtaan samalla säilyttäen oikean lukusuunnan. Tällaisen plasmidin muodostamiseksi pSOM1-DNA:ta (50 μ g) digeroitiin restriktioentsyymien EcoRI ja PstI kanssa lopullisessa tilavuudessa 100 μ l. Somatostatiinigeenin sisältävä suuren Pst-EcoRI-fragmentin erottamiseen lac-kontrollielementit sisältävästä pienemmästä fragmentista käytettiin 5-%:ista polyakryyliamidigeeliä. Leveä nauha leikattiin irti geelistä ja DNA eluoitiin leikkelemällä geeli pieniksi palasiksi ja uuttamalla DNA 65°C:ssa yön yli. Samalla tavalla plasmidi pBR322 DNA (50 μ g) digeroitiin PstI- ja EcoRI-restriktioendonukleaasilla, ja saadut kaksi DNA-fragmenttia puhdistettiin preparatiivisella elektroforeesilla 5-%:isella polyakryyliamidigeelillä. pBR322:sta (1 μ g) saatu pieni PstI-EcoRI-fragmentti ligoitiin pSOM1:stä saadun suuren PstI-EcoRI-DNA-fragmentin (5 μ g) kanssa 50 μ l:ssa 1 yksikön kanssa T4 DNA-ligaasia 12°C:ssa 12 tunnin aikana. Ligoitua seosta käytettiin transformoimaan *E. coli* RR1, ja transformanteista valittiin ampisilliiniresistentit kannat X-gal-kasvu-alustalla. Odotetusti lähes kaikki AP^r-transformantit (95%) kasvoivat valkeina pesäkkeinä (ei lac-operaattoria) X-gal-indikaattorilevyillä. Saatua plasmidia pSOM11 käytettiin plasmidin pSOM11-3 muodostamiseen. Seosta, jossa oli 5 μ g pSOM11-DNA:ta ja 5 μ g λ plac⁵

DNA:ta digeroitiin EcoRI:n (10 yksikköä, 30 minuuttia 37°C:ssa) kanssa. Restriktio-endonukleasikäsittely päätettiin uuttamalla fenoli-kloroformilla. DNA saostettiin sitten etanolilla ja suspendoitiin T4 DNA-ligaasipuskuriin (50 µl). Seokseen lisättiin T4 DNA-ligaasia (1 yksikkö), ja sitä inkuboitiin 12°C:ssa 12 tuntia. Ligoitu seos dialysoitiin 10 mM tris-HCl:ä (pH 7,6) vastaan, ja sitä käytettiin E. coli kannan RR1 transformaatioon. Transformanteista valittiin Ap^r-transformantit ampisilliinia sisältävillä X-gal-levyillä, ja niistä valittiin sellaiset, jotka tuottavat β-galaktosidaasia. Noin 2 % pesäkkeistä oli sinisiä (pSOM11-1, 11-2 jne.). Näistä klooneista saadun plasmidi-DNA:n restriktioentsyymianalyysi osoitti, että kaikissa plasmideissa oli uusi EcoRI-fragmentti, jonka koko oli noin 4,4 megadaltonia, jossa on lac-operonikontrolliasemat ja suurin osa β-galaktosidaasigeenistä. Koska EcoRI-fragmentit saattavat olla orientuneita kahdella eri tavalla, HindIII-restriktioaseman epäsymmetristä asemaa käytettiin määrittämään, mitkä näistä pesäkkeistä sisälsivät EcoRI-fragmentin, jonka lac-transkriptio siirtyy somatostatiinigeeniin. Kaksoisdigeroinnilla HindIII-BamHI:llä voitiin osoittaa, että vain kloonit, joissa oli plasmidit pSOM11-3, pSOM11-5, pSOM11-6 ja pSOM11-7, sisälsivät tällä tavoin orientoituneen EcoRI-fragmentin.

4. Radioimmunokoe somatostatiiniaktiivisuuden määrittämiseksi

Standardiradioimmunokoe (RIA) somatostatiinin määrittämiseksi (A. Arimura et. al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 748 (1975)) modifioitiin pienentämällä koetilavuutta ja käyttämällä fosfaattipuskuria. Tyr¹¹-somatostatiini jodattiin kloramiini-T-menetelmällä (idem). Somatostatiinin määrittämiseksi näyte, joka oli tavallisesti 70-%:isessa muurahaishapossa, joka sisälsi 5 mg/ml syaanibromidia, kuivattiin kartiomaaisessa polypropyleeniputkessa (0,7 ml, Sarstedt) tyhjässä kostean KOH:n yllä. Putkeen lisättiin 20 µl PBSA-puskuria (75 mM NaCl, 75 mM natriumfosfaattia, pH 7,2, 1 mg/ml härän seerumialbumiinia ja 0,2 mg/ml natriumatsidia) ja sen jälkeen 40 µl [¹²⁵J]-somatostatiini-"cocktailia" ja 20 µl PBSA:lla 1000-kertaisesti laimennettua kaniinin antisomatostatiini-immuuniseerumia S39 (Vale et. al., Metabolism 25, 1491 (1976)). [¹²⁵J]-somatostatiini-cocktail sisälsi PBSA-puskurin ml:aa koh- ti 250 µg normaalia kaniinin gammaglobuliinia (Antibodies, Inc).

1500 yksikköä proteaasi-inibiittoria (Trasylol, Calbiochem) ja noin 100 000 sykettä $\left[^{125}\text{J}\right]$ Tyr¹¹-somatostatiinia. Vähintään 16 tunnin seisotuksen jälkeen huoneen lämpötilassa näyteputkiin lisättiin 0,333 ml vuohen anti-kaniini-gammaglobuliinia (Antibodies, Inc. P=0,03) PBSA-puskurissa. Seosta inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa, se jäähdytettiin 5°C:een ja sentrifugoitiin sitten 10 000 x g:ssä 5 minuuttia. Supernatantti poistettiin ja saostuman syke laskettiin gammalaskimella. Käytetyllä antiseerumimäärällä 20 % sykkeestä saostui eikä leimaamatonta kilpailevaa somatostatiinia saostunut lainkaan. Infiniitti-somatostatiinin (200 µg) tausta oli tavalisesti 3 %. Puolet maksimikilpailusta saatiin 10 pg:llä somatostatiinia. E. coli kannan RR1 (vastaanottajakanta) uutteilla tehdyt esikokeet osoittivat, että alle 10 pg somatostatiinia voitiin helposti havaita, kun läsnä oli 16 µg tai enemmän syaanibromidi-käsiteltyä bakteeriproteiinia. Yli 2 µg proteiinia muurahaishappolla käsitellyistä bakteeriuutteista häiritsi jonkin verran lisäämällä taustaa, mutta syaanibromidilohkaisu vähensi huomattavasti tätä häirintää. Uudelleen suoritettut kokeet osoittivat, että somatostatiini on pysyvä syaanibromidikäsitellyissä uutteissa.

A. Bakteeriuutteiden kilpailu

E. coli kantoja RR1 (pSOM11-5) ja RR1 (pSOM11-4) kasvatettiin 37°C:ssa Luria-elatusliuoksessa, kunnes solumäärä oli 5×10^8 solua/ml. Sitten lisättiin IPTG:tä konsentraatioon 1 mM ja kasvustta jatkettiin 2 tuntia. Otettiin 1 ml:n näytteitä ja ne sentrifugoitiin joidenkin sekuntien ajan Eppendorf-sentrifugissa, ja pelletit suspendoitiin 500 µl:aan 70-%:ista muurahaishappoa, joka sisälsi 5 mg/ml syaanibromidia. Noin 24 tunnin seisotuksen jälkeen huoneen lämpötilassa otettiin osanäytteitä, jotka laimennettiin 10-kertaisiksi vedellä ja kuviossa 6A esitetyistä tilavuuksista mitattiin kolmoiskokeella somatostatiini. Kuviossa 6A B/B₀ on näytteen läsnäollessa sitoutuneen $\left[^{125}\text{J}\right]$ -somatostatiinin ja ilman kilpailevaa somatostatiinia sitoutuneen $\left[^{125}\text{J}\right]$ -somatostatiinin suhde. Laimentamattomien näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin, ja se oli E. coli RR1 (pSOM11-5)-kannalla 2,2 mg/ml ja E. coli RR1 (pSOM11-4)-kannalla 1,5 mg/ml.

B. pSOM11-kloonien somatostatiinialkuseulonta

11 kloonin (pSOM11-2, pSOM11-3 jne.) syaanibromidi-käsiteltyt uutteet valmistettiin edellä kuvion 6A yhteydessä kuvatulla

tavalla. Kutakin uutetta otettiin radioimmunokokeen kolmoiskokeisiin 30 μ l. Tulokset nähdään kuviossa 6B. Koepisteet on esitetty. Somatostatiinimäärät pikogrammoina luettiin saman kokeen osana tehdyiltä standardikäyrältä.

Suoritettujen radioimmunikokeiden tuloksista voidaan esittää seuraava yhteenveto. Poiketen pSOM1:llä suoritettujen kokeiden tuloksesta havaittiin neljällä kloonilla (pSOM11-3, 11-5, 11-6 ja 11-7) olevan helposti määritettävä somatostatiinin radioimmuuniviteetti (kuviot 6A ja 6B). Restriktiofragmenttianalyysi osoitti, että pSOM11-3:lla, pSOM11-5:llä, pSOM11-6:lla ja pSOM11-7:llä oli toivottu lac-operoinnin orientaatio, kun taas pSOM11-2:lla ja 11-4:llä oli vastakkainen orientaatio. Lac-operonin sopivan orientaation ja somatostatiinin radioimmuuniviteetin välillä on siten täydellinen korrelaatio.

C. IPTG²-induktion ja CNBr-lohkaisun vaikutus positiivisiin ja negatiivisiin klooneihin

Somatostatiiniplasmidin mallista voidaan päätellä, että somatostatiinisynteesi on lac-operoinnin kontrolloima. Lac-repressorigeeni ei sisälly plasmidiin ja vastaanottava kanta (E. coli RR1) sisältää villintyyppistä kromosomi-lac-repressorigeeniä, joka tuottaa ainoastaan 10-20 repressorimolekyyliä solua kohti (15). Plasmidin kopioluku (ja siten lac-operaattorien lukumäärä) on noin 20-30 solua kohti, joten täydellinen repressio ei ole mahdollinen. Kuten jäljempänä esitetyssä taulukossa III nähdään, IPTG, joka on lac-operonin induktori, kohotti somatostatiinin spesifistä aktiviteettiä E. coli RR1 (pSOM11-3):ssa. Odotetusti induktion taso oli alhainen, ja se vaihteli 2,4-kertaisesta 7-kertaiseen. Kokeessa 7 (taulukko III) α -aktiviteetti, joka on β -galaktosidaasin 92 ensimmäinen aminohapon mitta, kohosi myös kertoimella 2. Missään suoritetuista monista kokeista ei voitu havaita somatostatiinin radioimmuuniviteettiä ennen kokonaisen soluproteiinin pilkkomista syaanibromidilla. Koska radioimmunokokeessa käytetty antiserumi, S 39, tarvitsee vapaan N-terminaalialaniinin, niin aktiivisuutta ei voitu odottaa ennen syaanibromidipilkkomista.

Taulukko III

Somatostatiinin spesifinen radioimmunoaktiiviteetti

Lyhennykset: Luria elatusliuos, LB; isopropyylitiogalakto-
sidi, IPTG; syaanibromidi, CNBr; somatostatiini, SS. Proteiini mää-
ritettiin Brandford'in, Anal. Biochem. 72, 248 (1976) menetelmällä.

Esim. no.	Kanta	Elatusaine	IPTG 1 mM	CNBr 5 mg/ml	pg SS/ug proteiinia
1	11-2	LB	+	+	< 0.1
	11-3	LB	+	+	12
	11-4	LB	+	+	< 0.4
	11-5	LB	+	+	15
2	11-3	LB	+	+	12
	11-3	LB	+	-	< 0.1
3	11-3	LB	+	+	61
	11-3	LB	-	+	8
	11-3	LB	+	-	< 0.1
4	11-3	LB	+	+	71
	11-3	VB ^x + glyseroli ^x	+	+	62
5	11-3	LB + glyseroli	+	+	250
6	11-3	LB	+	+	320
7	11-2	LB	+	+	< 0.1
	11-3	LB	+	+	24
	11-3	LB	-	+	10

^x Vogel-Bonner-minimi-elatusaine + glyseroli.

D. Syaanibromidi-käsiteltyjen uutteen geelisuodatus

Positiivisten kloonien (pSOM11-3, 11-5, 11-6 ja 11-7) muura-
haishapolla ja syaanibromidilla käsiteltyt uutteen yhdistettiin
(kokonaistilavuus 250 µl), kuivattiin ja suspendoitiin 0,1 ml:aan
50-%:ista etikkahappoa. Suspensioon lisättiin [³H]leusiinia, ja näy-
te vietiin Sephadex G-50-pylvääseen 50-%:isessa etikkahapossa pyl-
vään koko oli 0,7 x 47 cm. Pylväästä saaduista fraktioista otettiin
50 µl:n näytteitä somatostatiinimääritykseen. Yhdistettyjä nega-
tiivisten kloonien (11-2, 11-4 ja 11-11) uutteen käsiteltiin sa-
malla tavalla. Tulokset nähdään kuviossa 5C. Samasta pylväästä
eluoitui tunnettu somatostatiini (Beckman Corp) esitetyllä tavalla
(SS). Tällä systeemillä somatostatiini saadaan hyvin eroon suuris-
ta peptideistä ja siihen liittyneistä pienistä molekyyleistä. Vain
somatostatiinin suhteen positiivisten kloonien uutteen osoittivat
radioimmunoaktiivisuutta pylväsfraktioissa, ja tämä aktiivisuus
eluoitui samassa kohdassa kuin kemiallisesti syntetisoitu somatos-
tatiini.

Yhteenvedo aktiivisuusinformaatiosta

Somatostatiiniaminohapposekvenssiä sisältävä polypeptidin synteesiä koskevat tiedot voidaan yhteenvedona esittää seuraavasti: (1) Somatostatiiniradioimmunoaktiivisuutta on *E. coli* soluissa, joissa on plasmidi pSOM11-3, joka sisältää todistetusti oikean sekvenssin ja lac-EcoRI-DNA-fragmentin oikean orientaation omaavan somatostatiinigeenin. Solut, jossa on lähisukuinen plasmidi pSOM11-2, jossa on somatostatiinigeeni, mutta vastakkainen lac-EcoRI-fragmentin orientaatio, ei tuota havaittavasti somatostatiiniaktiivisuutta; (2) Kuten rakennuskaaviosta voidaan ennustaa, minkäänlais- ta havaittavaa radioimmunoaktiivisuutta ei ole ennen solu-uutteen käsittelyä syaanibromidilla; (3) Somatostatiiniaktiivisuutta kontrolloin lac-operoni, kuten IPTG:n, joka on lac-operoni-induktori, induktiosta voidaan todeta; (4) Somatostatiiniaktiivisuus kromatografoituu yhdessä tunnetun somatostatiinin kanssa Sephadex G-50:llä; (5) Kloonatun somatostatiinigeenin DNA-sekvenssi on oikea. Jos translaatiossa on vaihepoikkeama, syntyy peptidi, joka on joka kohdaltaan erilainen kuin somatostatiini. Radioimmunoaktiivisuudesta havaitaan, että on muodostunut somatostatiinia läheisesti muistuttava peptidi, ja translaation on oltava oikeassa vaiheessa. Kun translaatio on oikeassa vaiheessa, niin geneettinen koodi määrää sellaisen peptidin muodostumisen, jossa on täysin sama sekvenssi kuin somatostatiinissa; (6) Edellä saadut *E. coli* RRI (pSOM11-3) uutteen ehkäisevät kasvuhormonin vapautumista rotan aivolisäkkeen etulohkon soluista, kun taas samanaikaisesti valmistetun *E. coli* RRI (pSOM11-2) näytteet, joissa on sama proteiinikonsentraatio, eivät vaikuta kasvuhormonin vapautumiseen.

Somatostatiinin pysyvyys, saanto ja puhdistus

EcoRI lac-operonifragmentin sisältävät kannat (pSOM11-2, pSOM11-3 jne.) erottuvat plasmidifenotyypin suhteen. Esimerkiksi noin 15 sukupolven jälkeen noin puolet *E. coli* RRI (pSOM11-3 viljelmästä oli β -galaktosidaasia tuottava, so. sisälsi lac-ope- raattorin, ja näistä noin puolet oli ampisiliiniresistenttejä. So- matostatiinin suhteen positiiviset kannat (pSOM11-3) ja negatiivi- set kannat (pSOM11-2) ovat pysymättömiä, ja siitä syystä kasvuhait- ta oletettavasti johtuu epätäydellisen ja inaktiivisen galaktosi- daasin ylituotannosta. Somatostatiinin saanto vaihteli välillä 0,001-0,3 % solun kokonaisproteiinista (taulukko I) todennäköisesti

johtuen soluen valinnasta viljelmässä, jossa on plasmideja ilman lac-aluetta. Suurimmat somatostatiinisaannot saatiin valmisteista, joissa viljely aloitettiin yhdestä ainoasta ampisilliiniresistentistä pesäkkeestä. Myös näissä tapauksissa 30 %:lla soluista esiintyi talteenotettaessa lac-alueen häviämistä. Säilyttäminen jäädytettynä (lyofilisoituna) ja kasvattaminen yhdestä ainoasta tällaisesta pesäkkeestä on siten kuvatulle systeemille suositeltavaa. Saantoja voidaan parantaa esim. turvautumalla bakteerikantoihin, joilla on lac-repressorin ylituotantoa, jotta prekursoriproteiinin ekspressio olennaisesti täysin estyy ennen induktiota ja talteenottoa. Toisena mahdollisuutena on, kuten edellä kuvattiin, että käytetään tryptofaania tai muuta operaattori-promootorisysteemiä, joka on tavallisesti täysin estetty.

β -galaktsodaasi-somatostatiiniprekursoriproteiini on liukenematon soluja hajottamalla, esim. Eaton-puristimella saatuun raakauutteeseen ja saadaan eroon ensimmäisessä alhaisella nopeudella suoritettussa sentrifugoinnissa muodostuneesta saostumasta. Aktiivisuus voidaan saada liukenemaan 70-%:iseen muurahaishappoon, 6 M guanidiniumhydroksidiin tai 2-%:iseen natriumdodekyylisulfaattiin. Edullisimmin Eaton-puristimesta saatu raakauute kuitenkin uutetaan 8 M urealla, ja jäännös pilkotaan syaanibromidilla. Alustavissa kokeissa E. coli kannasta RR1 (pSOM11-3) saatu somatostatiiniaktiivisuus rikastettiin noin 100-kertaiseksi uuttamalla pilkkomistuote alkoholilla ja kromatografoimalla Sephadex G-50:llä 50-%:isessä etikkahapossa. Kun tuote kromatografoidaan uudelleen Sephadex G-50:llä ja sitten suurpainenestekromatografiolla, saadaan olennaisesti puhdasta somatostatiinia.

II Ihmisen insuliini

Edellä kuvattuja menetelmiä sovellettiin seuraavaksi ihmisen insuliinin tuottamiseen. Niinpä geenit insuliinin B-ketjua varten (104 emäsparia) ja insuliinin A-ketjua varten (77 emäsparia) suunniteltiin ihmisen polypeptidien aminohapposekvenssin mukaan, jolloin kummassakin oli kohesiiviterminaalit EcoRI- ja BamHI-restriktioendonukleaasille, ja kumpikin oli suunniteltu erikseen sijoitettavaksi pBR322 plasmideihin. Synteettiset fragmentit, deka- ja pentadekanukelotidit, syntetitoitiin blokkifosfotriesterimenetelmällä käyttäen trinukleotideja rakennusblokkeina ja puhdistettiin lopuksi suuren erotuskuvun nestekromatografiolla (HPLC). Ihmisen insuliinin

A- ja B-ketjun synteettiset geenit kloonattiin erikseen plasmidiin pBR322. Kloonatut synteettiset geenit fuusioitiin samoin kuin edellä *E. coli* β -galaktosidaasigeeniin tehokkaan transkription, translaation ja pysyvän prekursoriproteiinin saamiseksi. Insuliinipeptidit lohkaistiin β -galaktosidaasiprekursorista, määritettiin radioimmunokokeella ja puhdistettiin. Insuliinin radioimmunoaktiivisuus synnytetttiin sitten sekoittamalla *E. coli* tuotteet.

1. Ihmisen insuliini-geenien malli ja synteesi

Ihmisen insuliinia varten rakennetut geenit on esitetty kuviossa 9. Geenit ihmisen insuliinin B-ketjua ja A-ketjua varten suunniteltiin ihmisen polypeptidien aminohapposekvensseistä. Kunkin geenin 5'-päänteessä on yksisäikeinen kohesiiviterminaali EcoRI- ja BamHI-restriktioendonukleaaseille kunkin geenin insertoimiseksi oikein plasmidiin pBR322. B-ketjun geenin keskelle sijoitettiin HindIII-endonukleaasi-tunnistuskohda aminohapposekvenssille Glu-Ala kummankin geenin puolikkaan laajentamisen ja toteuttamisen mahdollistamiseksi erikseen ennen koko B-ketjun geenin rakentamista. B-ketjun ja A-ketjun geenit suunniteltiin rakentuviksi 29 erilaisesta oligodeoksiribonukleotidista, jotka vaihtelivat dekameereistä pentadekameereihin. Kukin nuoli osoittaa parannetulla fosfotriesterimenetelmällä syntetisoitua fragmenttia H1-H8 ja B1-B12 B-ketjun geenissä ja A1-A11 A-ketjun geenissä.

2. Oligodeoksiribonukleotidien kemiallinen synteesi

Materiaalit ja menetelmät, joita käytettiin oligodeoksiribonukleotidien synteessissä olivat seuraavia muunnoksia lukuunottamatta olennaisesti ne, jotka Itakura, K. et. al., (1975), J. Biol. Chem. 250, 4592 ja Itakura, K. et. al., (1975), J. Amer. Chem. Soc. 97, 7327, ovat kuvanneet:

a) Täysin suojatut mononukleotidit, 5'-O-dimetoksitriityyli-3'-p-kloorifenyyli- β -syaanietyylifosfaatit syntetisoitiin nukleosidijohdannaisista käyttämällä monofunktionaalista fosforylointia-ainetta, p-kloorifenyyli- β -syaanietyylifosforokloridaattia (1,5 mooliekvivalenttia) asetonitriilissä 1-metyyli-imidatsolin läsnäollessa [Van Boom, J.H. et. al., (1975) Tetrahedon 31, 2953]. Tuotteet eristettiin suuressa mittakaavassa (100-300 g) preparaatiivisella nestekromatografialla (Prep 500 LC. Waters Associates).

b) 32 bifunktionaalista trimeeriä syntetisoitiin (katso taulukko IV) käyttäen liuotinmenetelmää Hirose, T. et al. (1978). Tetrahedron Letters, 2449/ 5-10 mmol mittakaavassa, ja 13 trimeeriä 3 tetrameeriä ja dimeeriä 3'-terminaaliryhmiksi syntetisoitiin samo 1 mmol mittakaavassa. Täysin suojattujen trimeerien homogeenisuus tarkistettiin ohutkerroskromatografialla silikageelillä kahdella metanoli/kloroformiliuotinsysteemillä: liuotin a 5 % (tilav./tilav. ja liuotin b 10 % (tilav./tilav.) (katso taulukko IV). Lähtien tästä yhdistekokoelmasta syntetisoitiin 29 määritellyn sekvenssin omaavaa oligodeoksiribonukleotidia, näistä 18 B-ketjun geeniä varten ja 11 A-ketjun geeniä varten.

Taulukko IV

Trimeerirakennusblokkien synteesi

No.	Yhdiste x	Saanto xx (%)	Rf a.	Puhtaus b.	Kuviossa 9 läsnä (%)xxx
1.	AAG	47	0.15	0.40	93 B5,B6
2.	AAT	49	0.25	0.52	95 H1,A1,A6
3.	AAC	52	0.28	0.55	93 H5,B6,A2,A8
4.	ACT	43	0.27	0.53	91 B4,B5,A6
5.	ACC	56	0.33	0.60	96 B7
6.	ACG	39	0.18	0.45	90 H5,B7
7.	AGG	45	0.10	0.26	89 H6,H7,B9
8.	AGT	33	0.14	0.40	96 B9,A2,A11
9.	AGC	50	0.19	0.48	92 H8,B1,A5,A10
10.	AGA	48	0.24	0.50	91 A9,
11.	TTC	44	0.26	0.52	95 B4,B7,A3
12.	TTC	49	0.11	0.31	94 H3,H5,A2,A3,A5
13.	TCT	58	0.24	0.49	96 A4
14.	TCA	45	0.28	0.53	92 H1,H2,H4,A1
15.	TCG	39	0.12	0.34	91 A2
16.	TGG	32	0.10	0.28	87 H3,A1,A10
17.	TGC	51	0.18	0.47	93 H6,B2,A4,A7,A8
18.	TGA	46	0.12	0.37	94 H7
19.	TAC	61	0.22	0.50	90 B4,A11
20.	TAA	55	0.17	0.44	95 B5,A10
21.	CCT	53	0.30	0.55	97 H3,H4,B10
22.	CAC	47	0.25	0.51	92 A3
23.	CAA	58	0.25	0.51	93 H2,H6,H8,A7
24.	CTT	41	0.28	0.54	92 B2,B9,A4
25.	CGA	40	0.27	0.52	93 A7
26.	CGT	75	0.25	0.50	89 H2,H4,B3,B1
27.	GGT	35	0.09	0.26	90 B3
28.	GTT	46	0.18	0.45	93 B2
29.	GTA	38	0.25	0.50	95 B6,B8,A6
30.	GAA	39	0.15	0.39	88 H7,B3,B8,A5
31.	GAT	52	0.22	0.49	89 B10,A9
32.	GCA	42	0.14	0.39	93 A9

* Täysin suojatut trideoksinukleotidit; 5'-O9-dimetoksitrityyli-3'-p-kloorifenyyli- β -syaanietyyllifosfaatti

xx Saanto oli kokonaissaanto laskettuna 5'-hydroksyyylimonomeereista

xxx HPLC-analyysin mukaan.

Polynukleotidien rakentamiseen käytetyt perusyksiköt olivat kahta trimeeriblokkityyppiä, so. taulukossa IV esitettyjen bifunktionaalisia trimeeriblokkeja ja vastaavia 3'-terminaalitrimeerejä, joiden 3'-hydroksiryhmä oli suojattu anisoyyliryhmällä. Bifunktionaalinen trimeeri hydrolysoitiin vastaavasti 3'-fosfordiesterikomponentiksi pyridiini-trietyyliamiini-vesi-seoksella (3:1:1 tilav./tilav.) ja myös vastaavaksi 5'-hydroksikomponentiksi 2-%:sella bentseenisulfonihapolla. Edellä mainittua 3'-terminiblokkia käsiteltiin 2-%:sella bentseenisulfonihapolla, jolloin saatiin vastaava 5'-hydroksyyli. Ylimäärin käytetyn 3'-fosforiesteritrimmerin (1,5 mooliekvivalenttia) kytkentäreaktio saadun 5'-hydroksyylikomponentin (1 mooliekvivalentti) kanssa 2,4,6-tri-isopropyylibentseenisulfonyylitetratsolidin (TPSTe, 3-4 ekvivalenttia) läsnäollessa tapahtui lähes täydellisesti 3 tunnissa. Ylimääräisen 3'-fosfodiesteriblokkireaktantin poistamiseksi reaktioseoksesta seos laskettiin lasisintteripohjalla olevan silikageelikerroksen lävitse. Pylväs pestiin ensin CHCl_3 :lla joiden sivutuotteiden eluoimiseksi ja sitten CHCl_3 -MeOH-seoksella (95:5, tilav./tilav.), jolloin lähes kaikki täysin suojattu oligomeeri eluoitui. Näissä olosuhteissa 3'-fosfodiesteriblokkireaktantti jäi pylvääseen. Kytkentöjä jatkettiin samalla tavalla, kunnes oli saatu riittävä ketjun pituus.

Oligonukleotidisynteesin aikana käytettiin laajalti suuren erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) a) trimeeri- ja tetrameeriblokkien analyysiin, b) välituotefragmenttien (heksameerit, nonameerit ja dekameerit) analyysiin, c) viimeisen kytkentäreaktion analysointiin ja d) lopputuotteiden puhdistamiseen. HPLC suoritettiin käyttäen Spectra-Physics 3500B nestekromatografiaa. Kun kaikki suojaryhmät oli poistettu käsittelemällä väkevällä NH_4OH :lla 50°C :ssa (6 tuntia) ja 80-%:sella etikkahapolla huoneen lämpötilassa (15 min), yhdisteet analysoitiin Permaphase AAX-pylväällä (1 m x 2 mm) (PuPont) [Van Boom, J. et. al., (1977), J. Chromatography 131, 169], ja eluoitui lineaarisella liuottimen B (0,05M KH_2PO_4 , 1, 0M KCl, pH 4,5) ja liuottimen A (0,01M KH_2PO_4 , pH 4,5) gradientilla. Gradientti muodostettiin lähtien puskurista A ja lisäämällä puskuria B 3 % minuutissa. Eluointi suoritettiin 60°C :ssa virtausnopeudella 60°C :ssa virtausnopeudella 2 ml/min. Myös 29 lopullisen oligonukleotidin puhdistus suoritettiin Permaphase

AAX:llä edellä kuvatuissa olosuhteissa. Haluttua tuotetta sisältävät fraktiot yhdistettiin, suola poistettiin dialysoimalla ja tuote lyofilisoitiin. 5'-terminit merkittiin ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP:llä käyttäen T_4 -polynukleotidikinaasia, ja jokaisen oligonukleotidin homogeenisuus tutkittiin elektroforeesilla 20-%:lla polyakryyliamidigeelillä.

3. B-ketjugeenin ja A-ketjugeenin kokoaminen ja kloonauk-

Geeni-insuliinin B-ketjua varten suunniteltiin siten, että siinä oli EcoRI-restriktioasema vasemmassa päätteessä, HindIII-asema keskellä ja BamHI-asema oikeassa päätteessä. Tämä tehtiin siten, että molemmat puolikkaat, vasen EcoRI-HindIII-puolikas (BH) ja oikea HindIII-BamHI-puolikas (BB) voitiin erikseen kloonata sopivassa kloonauksevenikselissä pBR322, ja sekvenssien muodostumisen jälkeen liittää yhteen täydelliseksi B-geeniksi (kuvio 10). BB-puolikas koottiin liittämällä 10 oligodeoksisiribonukleotidia, joita kuviossa 9 on merkitty B1-B10, jotka oli valmistettu fosfotriesterisynteisillä. B1-B10 eivät olleet fosforyloitua, jolloin vältettiin näiden fraktioiden ei-toivottu polymeroituminen kohesiivipäätteiden välityksellä (HindIII ja BamHI). Preparatiivisella akryyliamidigeelielektroforeesilla suoritettua puhdistuksen ja suurimman DNA-nauhan eluoimisen jälkeen BB-fragmentti sijoitettiin plasmidiin pBR322, joka oli pilkottu HindIII:lla ja BamHI:llä. Noin 50 % DNA:sta johdetuista ampicilliiniresistenteistä pesäkkeistä oli herkkiä tetrasykliinille, mikä osoitti ei-plasmidi HindIII-BamHI-fragmentin insertoituneen. Neljästä näistä pesäkkeistä (pBB101-pBB103) saadut pienet HindIII-BamHI-fragmentit koottiin sekvenssiksi ja todettiin oikeiksi.

BH-fragmentti valmistettiin samalla tavalla ja sijoitettiin pBR322:een, joka oli pilkottu EcoRI- ja HindIII-restriktioendonukleaaseilla. Kolmen ampicilliiniresistentin, tetrasykliiniherkän transformantin plasmidit (pBH1-pBH3) analysoitiin. Pienillä EcoRI-HindIII-fragmenteilla todettiin olevan odotettu nukleotidisekvenssi.

A-ketjugeeni koottiin kolmessa osassa. Neljä vasemmalla olevaa, neljä keskellä olevaa ja neljä oikealla olevaa oligonukleotidia (kuvio 9) ligoitiin erikseen, sekoitettiin ja liitettiin yhteen (oligonukleotidit A1 ja A2 olivat fosforyloimattomia). Koottu A-ketjugeeni fosforyloitiin, puhdistettiin geelielektroforeesilla ja kloonattiin pBR322:n EcoRI- ja BamHI-kohtiin. EcoRI- ja BamHI-

fragmentit kahdesta ampisilliiniresistentistä, tetrasykliiniherkäästä pesäkkeestä (pAl0, pAl1) sisälsivät halutun A-geenisekvenssin.

4. Plasmidien muodostaminen A- ja B-insuliinigeenien ekspressiota varten

Kuviossa 10 on esitetty lac-insuliini-B-plasmidin (pIBI) muodostus. Plasmideja pBH1 ja pBB101 digeroitiin EcoRI- ja HindIII-endonukleaasien kanssa. pBH1:n pieni BH-fragmentti ja pBB101:n suuri fragmentti (joka sisälsi BB-fragmentin ja pääosan pBR322:a) puhdistettiin geelielektroforeesilla, sekoitettiin ja ligoitiin EcoRI-lohkaistun λ plac 5:n läsnäollessa. λ plac 5:n megadalton EcoRI-fragmentti sisältää lac-kontrollialueen ja pääosan β -galaktosidaasirakennegeenistä. Restriktiokohtien konfiguraatio varmistaa BH:n ja BB:n oikean liittymisen. Fragmentti lac EcoRI voi sijoittua orientoituneena kahdella tavalla; siten vain puolet transformaation jälkeen saaduista klooneista on halutulla tavoin orientoituneita. Kymmenen ampisilliiniresistentin, β -galaktosidaasikonstitutiivisen kloorin orientaatio tutkittiin restriktioanalyysillä. Viidessä näistä oli koko B-geenisekvenssi ja oikea lukusuunta β -galaktosidaasigeenistä B-ketjugeeniin. Yksi, nimittäin pIB1, valittiin seuraavin kokeisiin.

Samankaltaisessa kokeessa 4,4 megadaltonin lac-fragmentti λ plac 5:stä sijoitettiin pAl1-plasmidiin EcoRI-kohtaan, jolloin saatiin pIA1. pIA1 on muuten identtinen pIB1:n kanssa paitsi, että B-geenifragmentin sijasta on A-geenifragmentti. DNA-sekvenssianalyysillä osoitettiin, että pIA1:ssä ja pIB1:ssä säilyivät vastavasti oikeat A- ja B-ketjugeenit.

5. Ekspressio

Kannat, jotka sisältävät insuliinigeenit oikealla tavalla liittyneinä β -galaktosidaasiin tuottavat molemmat suuria määriä β -galaktosidaasin kokoista proteiinia. Noin 20 % solun koko proteiinista oli tätä β -galaktosidaasi-insuliini-A- tai B-ketjuhybridiä. Hybridiproteiinit ovat liukenemattomia, ja ne olivat ensimmäisessä alhaisella nopeudella saadussa saostumassa, jossa niiden osuus oli noin 50 % proteenista.

Insuliini-A- ja B-ketjun ekspression havaitsemiseksi käytettiin radioimmunokoetta (RIA), joka perustui insuliinin rekons tituointiin erillisistä ketjuista. Insuliinin rekonstituointimene telmä, jonka Katsoyannis et al., (1967) ovat esittäneet julkaisussa

Biochemistry 6, 2642-2655, sovitettuna 27 μ l:n koetilavuuteen, on erittäin sopiva koe. Helposti havaittava insuliiniaktiivisuus saadaan, kun insuliiniketjujen S-sulfonoidut johdannaiset sekoitetaan ja rekonstituoidaan. Erilliset insuliinin S-sulfonoidut ketjut eivät reagoi pelkistyksen ja hapetuksen jälkeen merkitsevästi käytetyn anti-insuliini-vasta-aineen kanssa.

Rekonstituointikokeen suorittamiseksi β -galaktosidaasi-A- tai -B-ketjuhybridiproteiini, osittain puhdistettiin, pilkottiin syaanibromidilla ja muodostettiin S-sulfonoiduiksi johdannaisiksi.

Todisteena siitä, että on saatu ihmisen insuliinin kemiallisesti syntetisoitujen geenien oikea ekspressio, voidaan esittää yhteenvetona seuraavaa:

- a) Molemmilla ketjuilla on havaittu radioimmunoaktiivisuus.
- b) Kloonauksen ja plasmidin muodostamisen jälkeen saadut DNA-sekvenssit on osoitettu malliltaan oikeiksi. Radioimmunoaktiivisuus osoittaa, että translaatio on oikeassa faasissa. Senvuoksi geneettinen koodi sanelee sellaisten peptidien muodostuksen, joissa on ihmisen insuliinin sekvenssit.
- c) E. coli tuotteet käyttäytyvät syaanibromidipilkkomisen jälkeen kuten insuliiniketjut kolmessa eri kromatografiasysteemissä, joissa erotus tapahtuu eri periaatteilla (geelisuodatus, ioninvaihto ja käänteisfaasi-HPLC). E. coli'n tuottama A-ketju on puhdistettu pienessä mittakaavassa HPCL:llä, ja siinä on oikea aminohappokoostumus.

IV
rak
hylyt

1. Menetelmä imettäväisen polypeptidin valmistamiseksi ekspressoimalla mikrobisessa rekombinanttikloonausvektorissa oleva polypeptidiä koodaava heterologinen rakennegeeni, t u n n e t t u siitä, että polypeptidin aminohapposekvenssiä koodaava heterologinen geeni on lukusuunnassa toisen proteiinin aminohapposekvenssiä koodaavien kodonien suhteen niin, että ekspressiossa saadaan prekursoriproteiini, joka sisältää sekä polypeptidin että toisen proteiinin aminohapposekvenssit ja jossa on selektiivinen pilkkoutumiskohta mainitun polypeptidin aminohapposekvenssin vieressä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että selektiivinen pilkkoutumiskohta on mainitussa toisessa proteiinissa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu toinen proteiini on ylimääräinen ja että prekursoriproteiini ekspansion jälkeen pilkotaan mainitussa kohdassa.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu toinen proteiini sisältää yhden tai useamman polypeptidin aminohapposekvenssiä vastaavan aminohapposekvenssin ja että selektiiviset pilkkoutumiskohdat erottavat kaikki prekursoriproteiinissa olevat polypeptidin aminohapposekvenssit toisistaan.

5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pilkkoutuminen tapahtuu kloonausvektorin replikaatioalueen ulkopuolella.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitussa polypeptidissä ei ole yhtään samanlaista selektiivistä pilkkoutumiskohtaa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu polypeptidi ei sisällä metioniinia ja että pilkkominen suoritetaan syaanibromidilla.

8. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vektori on bakteeriplasmidi.

9. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että heterologista geeniä seuraa lukusuunnassa yksi tai useampi lopetuskodoni.

10. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittua polypeptiä edeltää mainittu toinen proteiini.

11. Jonkin edellä esitetyn patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu polypeptidi on imetäväisen hormoni tai sen välituote.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että prekursoriproteiinilla ei ole hormonin bioaktiivisuutta.

13. Patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hormoni on somatostatiini, insuliini, pro-insuliini, ihmisen insuliinin A-ketju tai ihmisen insuliinin B-ketju.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä somatostatiinin valmistamiseksi ekspressoimalla somatostatiinia koodaava rakennegeeni rekombinanttibakteeriplasmidivektorissa, t u n n e t t u siitä, että somatostatiinigeeniä edeltää lukusuunnassa jonkin toisen proteiinin aminohapposekvenssiä koodaava geeni siten, että ekspressiossa saadaan prekursoriproteiini, joka sisältää sekä somatostatiinin että toisen proteiinin aminohapposekvenssit, jolloin toisessa proteiinissa on selektiivinen pilkkoutumiskohta somatostatiinin aminohapposekvenssin vieressä ja että pilkkominen tapahtuu plasmidin replikaatioalueen ulkopuolella.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä polypeptidi-hapteenia sisältävän immunogeenisen aineen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) muodostetaan mikrobinen rekombinanttikloonausvektori, joka sisältää hapterenin heterologisen rakennegeenin ja sen suhteen lukusuunnassa olevan DNA-sekvenssin, joka koodaa toista polypeptidiä, jonka koko on riittävä DNA:n ekspressiotuotteen tekemiseksi immunogeeniseksi, ja

b) ekspressoidaan konjugoitu polypeptidi, joka pääasiallisesti koostuu hapterenin aminohapposekvenssistä ja mainitun toisen polypeptidin aminohapposekvenssistä.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että haptereni, joka on saatettu immunogeeniseksi, on somatostatiini.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning en polypeptid hos däggdjur genom att exprimera en för polypeptiden kodande heterolog struktur i en mikrobiell rekombinantkloningsvektor, k ä n n e t e c k n a t därav, att den heterologa strukturen, som kodas för polypeptidens aminosyrasekvens, är i avläsningsram i förhållande till kodoner, som kodar för ett annat proteins aminosyrasekvens, sålunda att det vid expressionen erhålls ett prekursorprotein, som innehåller både polypeptidens och det andra proteinets aminosyrasekvenser och som har ett selektivt spjälkningsställe bredvid nämnda polypeptids aminosyrasekvens.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det selektiva spjälkningsstället är i nämnda andra protein.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda andra protein är överflödigt och att prekursorproteinet efter expressionen spjälks på nämnda ställe.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda andra protein innehåller en eller flera aminosyrasekvenser som motsvarar polypeptidens aminosyrasekvens, och att selektiva spjälkningsställena skiljer alla polypeptidens aminosyrasekvenser i prekursorproteinet från varandra.

5. Förfarande enligt patentkravet 3 eller 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att spjälkningen sker utanför kloningsvektorns replikeringsområde.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det i nämnda polypeptid inte finns ett enda likadant selektivt spjälkningsställe.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda polypeptid ej innehåller metionin och att spjälkningen utförs med cyanbromid.

8. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att vektorn är en bakterieplasmid.

9. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att den heterologa genen följs i avläsningsram av en eller flera stoppkodoner.

10. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda polypeptid föregås av nämnda andra protein.

11. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda polypeptid är ett däggdjurs-hormon eller en mellanprodukt därav.

12. Förfarande enligt patentkravet 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att prekursorproteinet ej har hormonets bioaktivitet.

13. Förfarande enligt patentkravet 11 eller 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att hormonet är somatostatin, insulin, pro-insulin, A-kedjan i människans insulin eller B-kedjan i människans insulin.

14. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av somatostatin genom att exprimera en strukturen, som kodas för somatostatin, i en rekombinantbakterieplasmidvektor, k ä n n e t e c k n a t därav, att somatostatingenen föregås i avläsningsram av en gen, som kodar för något annat proteins aminosyrasekvens, sålunda att det vid expressionen erhålls ett prekursorprotein, som innehåller både somatostatinet och det andra proteinets aminosyrasekvenser, varvid det andra proteinet har ett selektivt spjälkningsställe bredvid somatostatinet aminosyrasekvens och att spjälkningen sker utanför plasmidens replikeringsområde.

15. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av ett immunogent ämne innehållande polypeptidhaptent, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) bildar en mikrobisk rekombinantkloningsvektor, som innehåller haptentets heterologa strukturen och i avläsningsram i förhållande till denna en DNA-sekvens, som kodas för en annan polypeptid, vars storlek är tillräcklig för att göra expressionsprodukten av DNA:t immunogent, och

b) exprimerar den konjugerade polypeptiden, som huvudsakligen består av haptentets aminosyrasekvens och den nämnda andra polypeptidens aminosyrasekvens.

16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e t e c k n a t därav, att haptentet, som gjorts immunogent, är somatostatin.

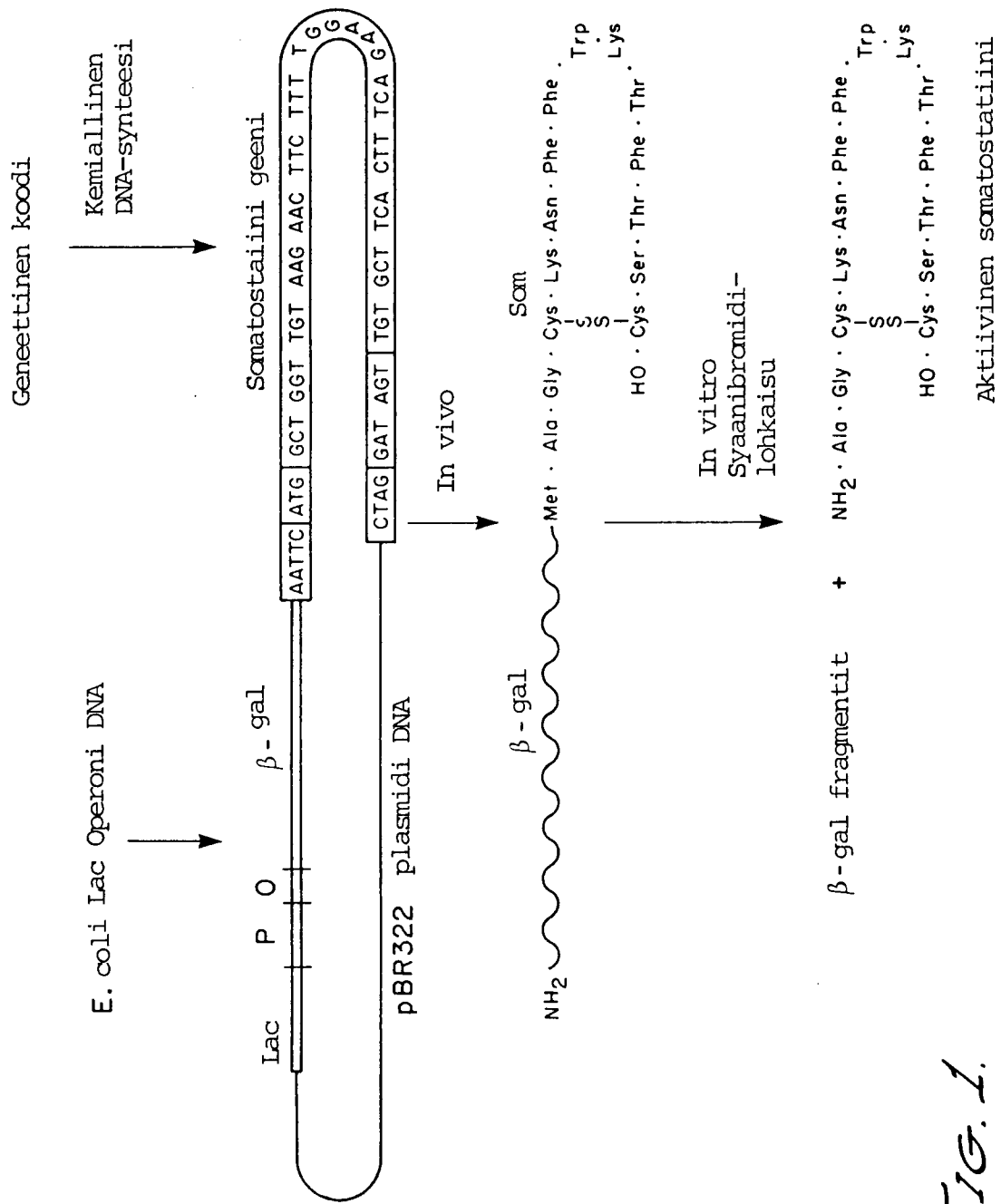


FIG. 1.

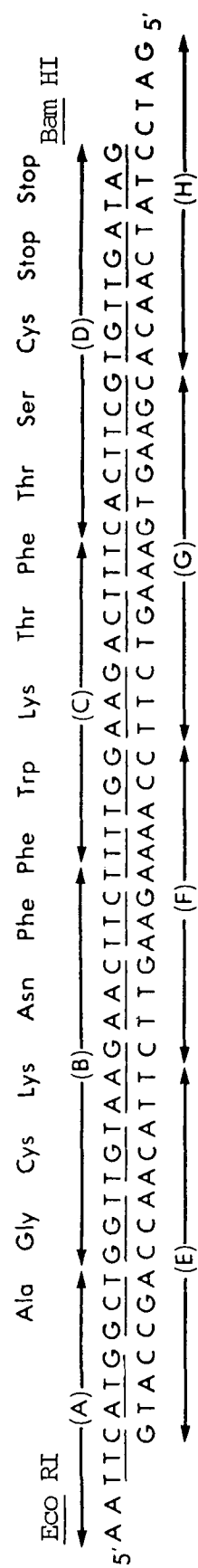


FIG. 2.

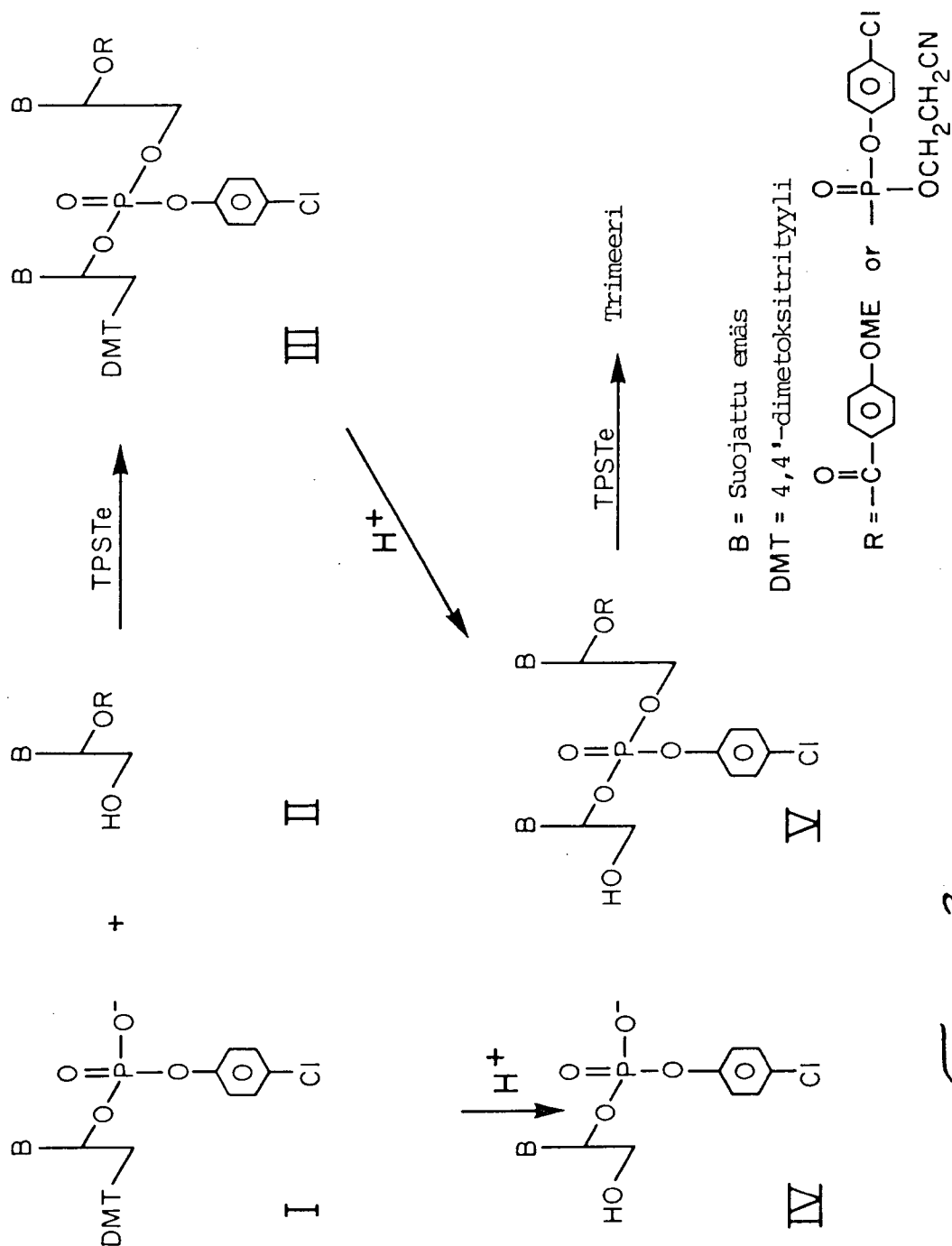


FIG. 3.

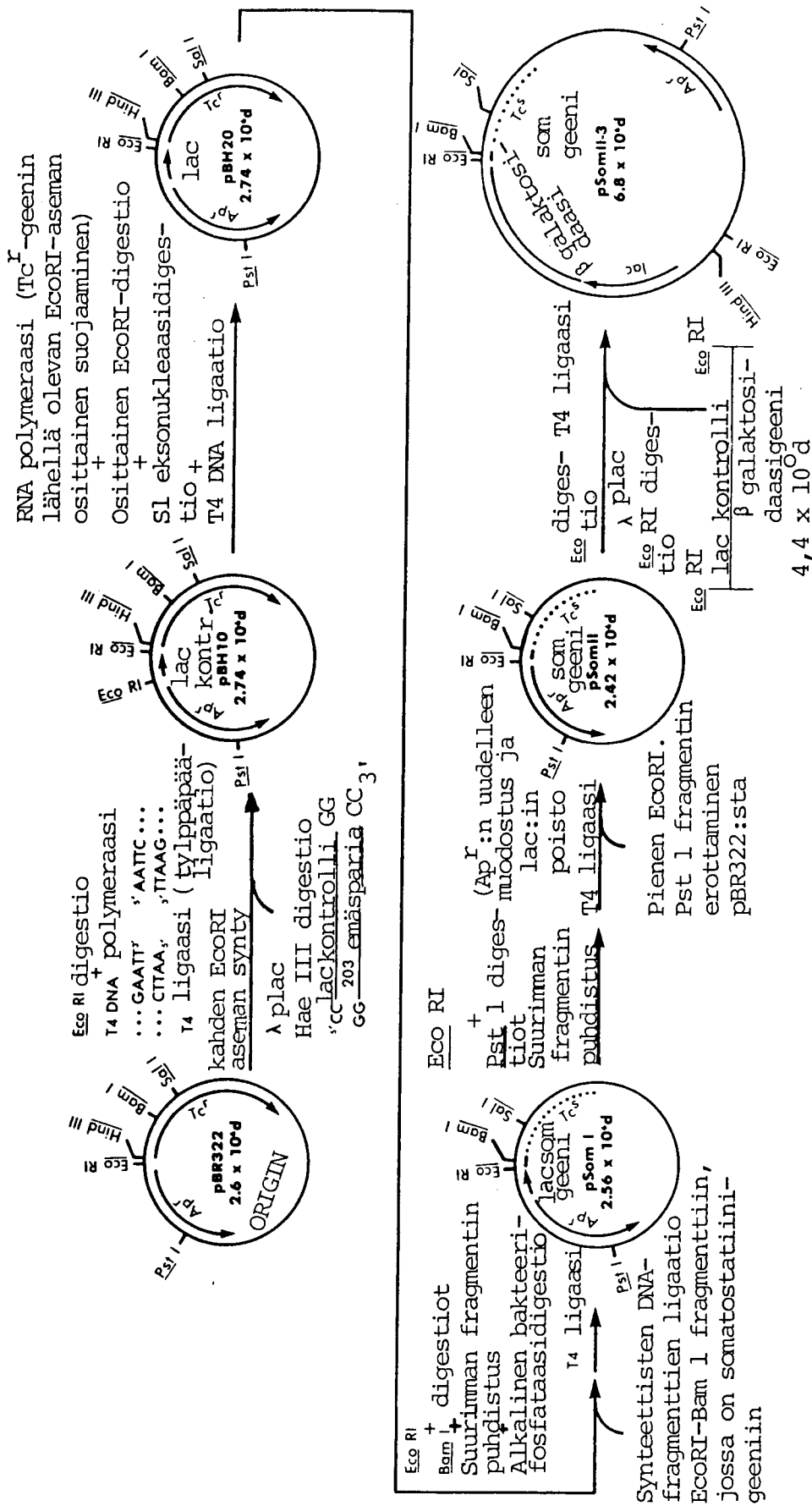


FIG. 4.

Fig. 5A.

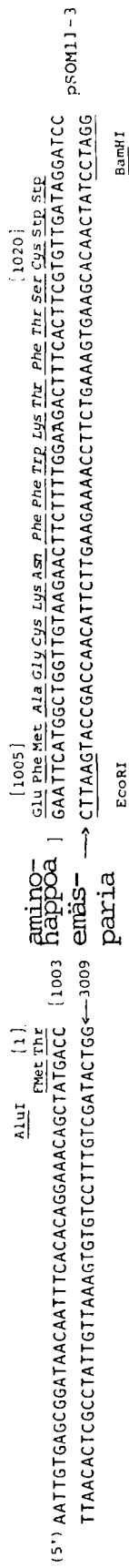
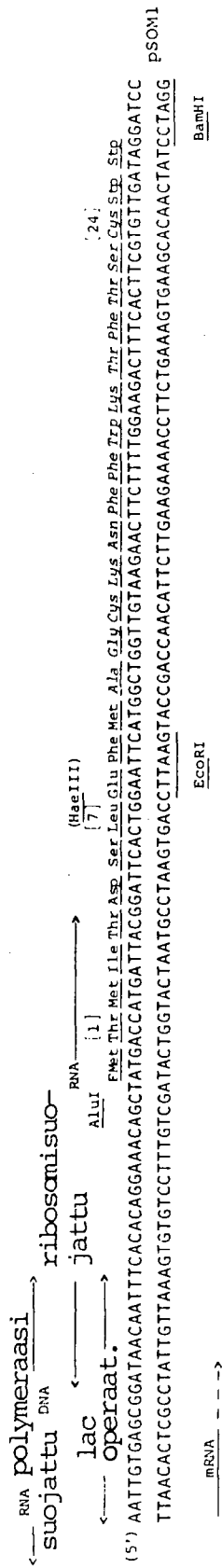


Fig. 5B.

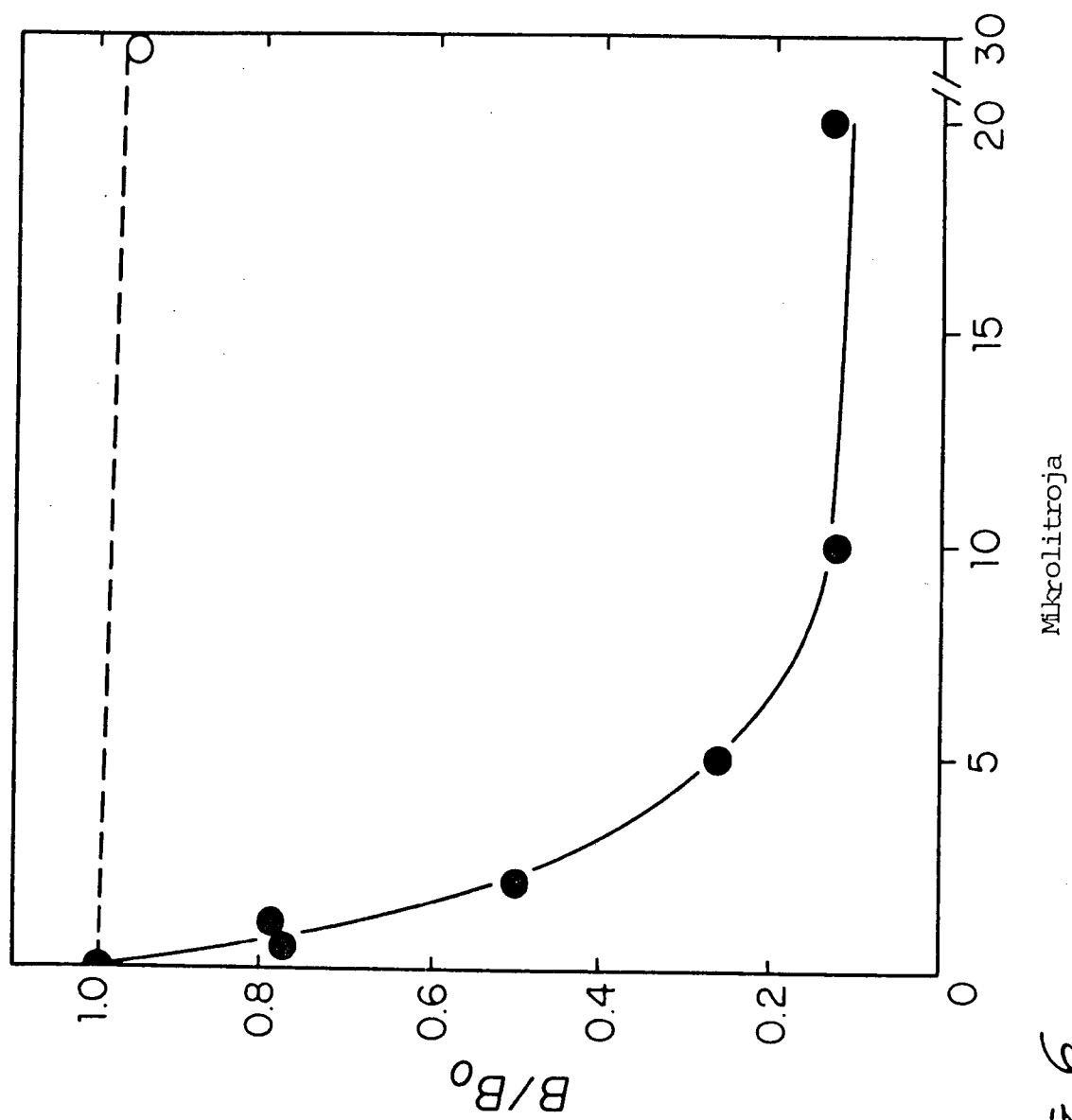


FIG. 6.

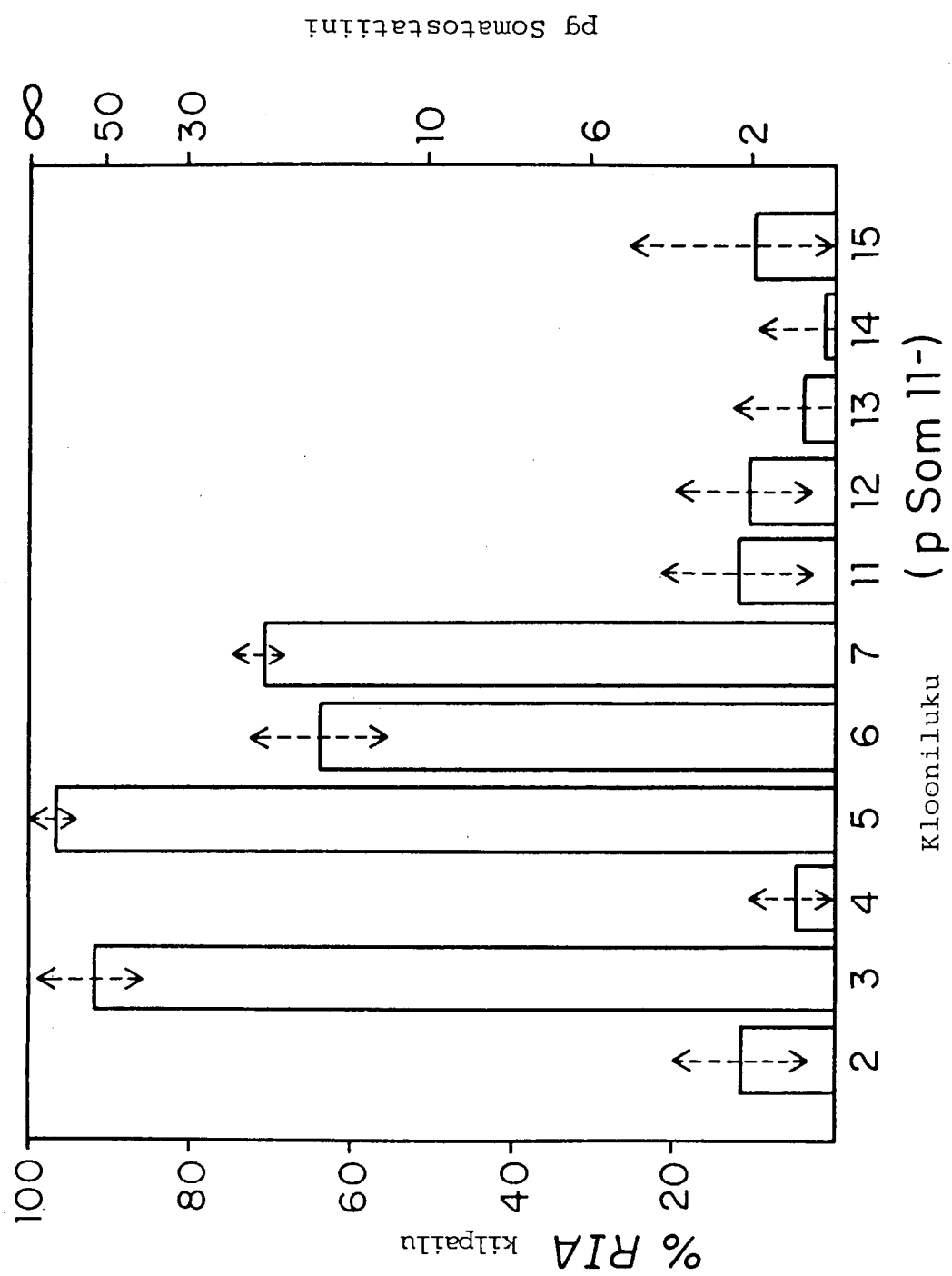


FIG. 7

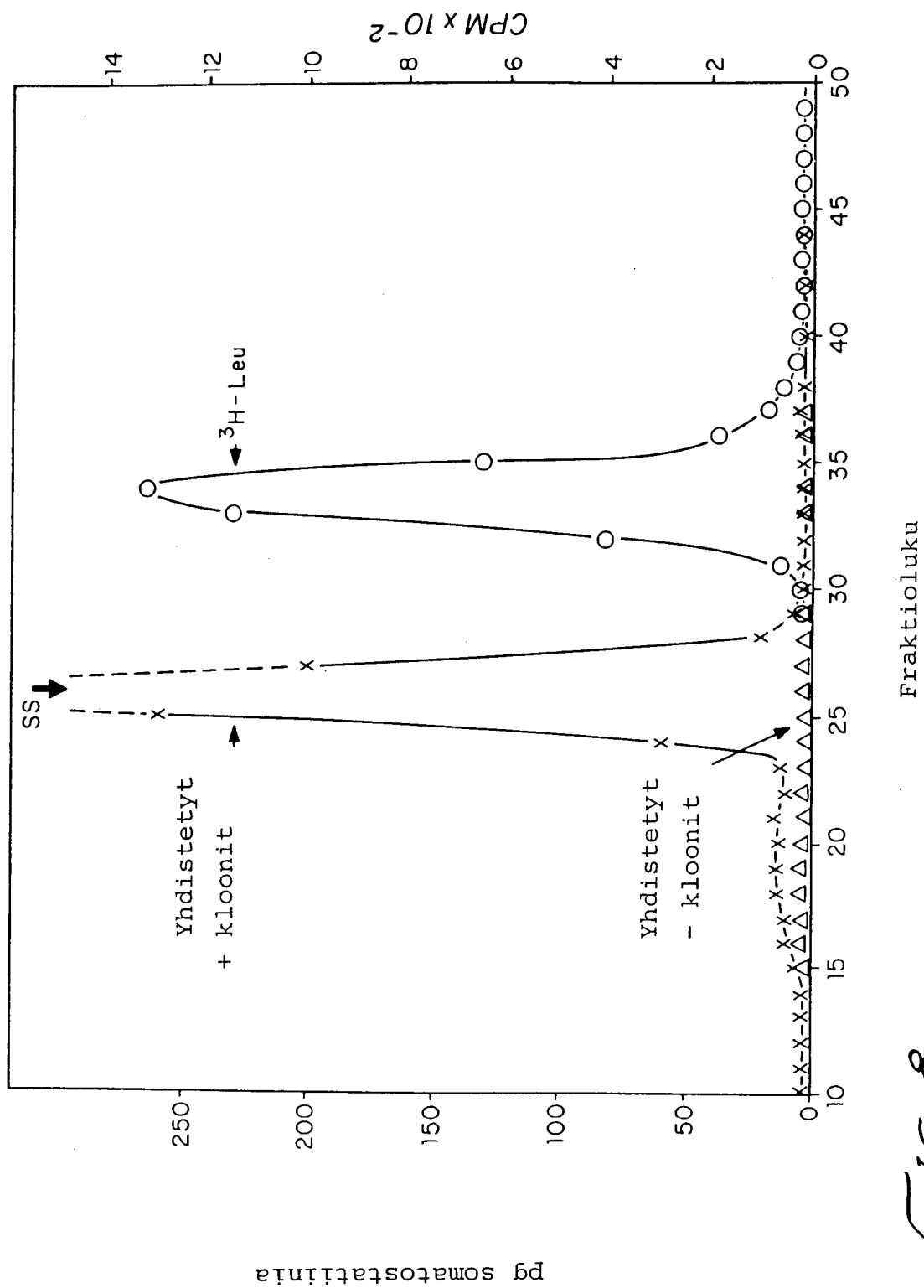


Fig. 8.

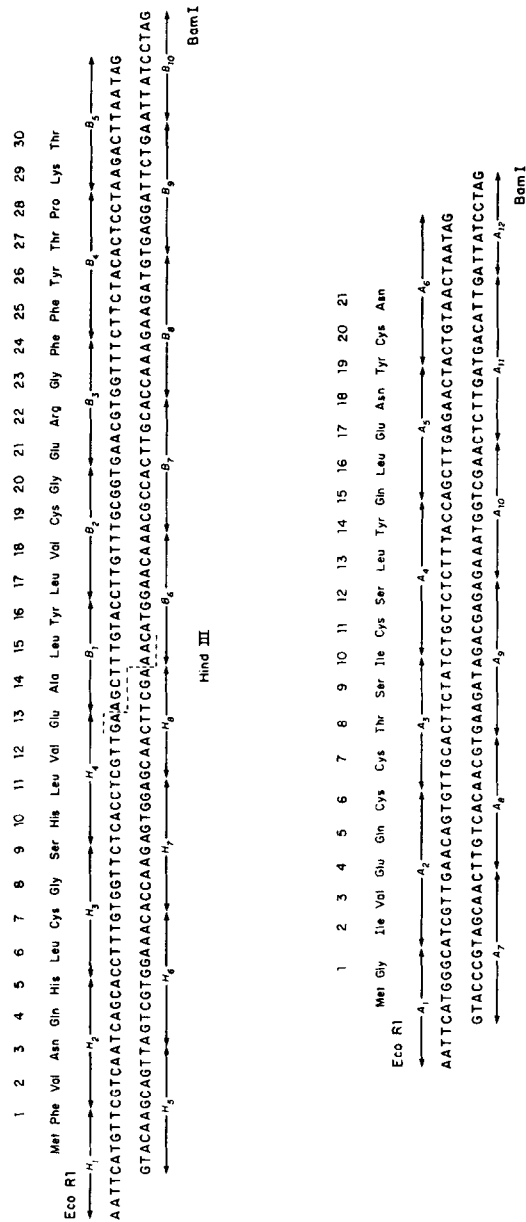


FIG. 9.

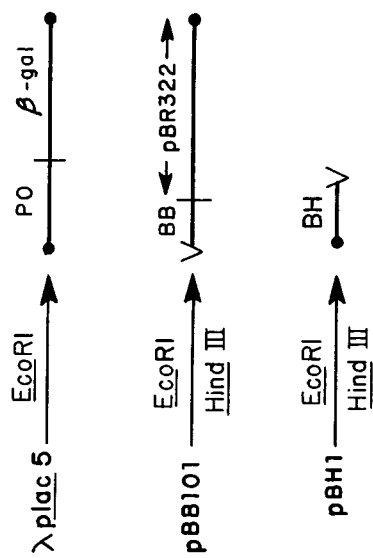
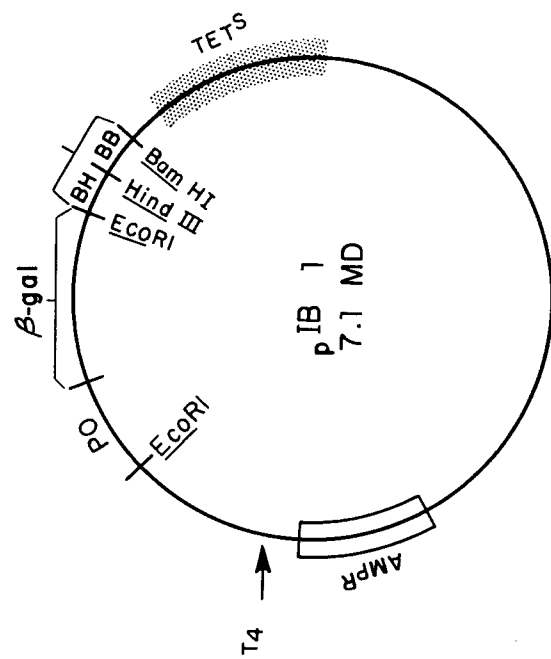


Fig. 10.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen K ja vastausjulkaisun (esim. saksal. Patentblatt) numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 73 (1976) 3900-3904

ibid. s. 4174

Science 198 (1977) 1056-1063

13/5-86 E. Lönn

Allekirjoitus