



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1434/92

(51) Int.Cl.6

C 07 K 14/64

(22) Indleveringsdag: 30 nov 1992

(24) Løbedag: 13 dec 1983

(41) Alm. tilgængelig: 30 nov 1992

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 15 sep 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 5737/83

(30) Prioritet: 13 dec 1982 AU 7247/82

(73) Patenthaver: *Howard Florey Institute of Experimental Physiology and Medicine; c/o University of Melbourne; Parkville; State of Victoria, AU

(72) Opfinder: Peter John *Hudson; AU, Hugh David *Niall; AU, Geoffrey William *Tregar; AU

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard, Lehmann & Ree A/S

(54) Rekombinant human-H2-præprorelaxin, -prorelaxin og -relaxin samt polypeptid med relaxinaktivitet

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1434-92

Humant reproduktivt væv indeholder gener, der koder for to forskellige præprorelaxinhormoner, human-H1-præprorelaxin og human-H2-præprorelaxin.

Med opfindelsen er der blevet fremstillet i alt væsentligt ren human-H2-præprorelaxin, human-H2-prorelaxin og human-H2-relaxin samt polypeptidanaloge hertil med relaxinaktivitet, hvori antallet af aminosyrer i relaxin-A-kæden er reduceret med op til ni aminosyrer fra den aminoterminale ende i A-kæden, og B-kæden er forkortet med op til ni aminosyrer fra den aminoterminale ende og/eller fra den carboxyterminale ende.

Opfindelsen angår i alt væsentligt ren rekombinant human-H2-præpro-relaxin, -prorelaxin og -relaxin samt i alt væsentligt rent polypeptid med relaxinaktivitet.

5 I beskrivelsen til DK patentansøgning nr. 3664/83 med prioritet 12. aug.1982 omtales den molekylære kloning og karakterisering af et gen, der koder for humanrelaxin. Vi har nu fundet et andet gen, som også koder for humanrelaxin.

10 Yderligere angår opfindelsen modificerede gener, der koder for de individuelle relaxinkæder og for ovennævnte modificerede former.

[Note: Litteraturreferencer, som anvendes i den følgende beskrivelse, angives i slutningen af beskrivelsen].

15

I pionerarbejdet af Hisaw 1926 foreslås en vigtig rolle for peptidhormonet relaxin i pattedyr, ved at det virker dilaterende på skambensfugen og således gør fødselsprocessen lettere. Relaxin syntetiseres og opbevares under svangerskab i ovariernes corpus luteum og frigøres i blodstrømmen forud for fødslen. Tilgængeligheden af ovarier har gjort det muligt at isolere og bestemme aminosyresekvensen af relaxin fra svin (James et al, 1977; Schwabe et al, 1977), fra rotter (John et al, 1981) og fra hajer (Schwabe et al, 1982). Det biologisk aktive hormon består af to peptidkæder (kendt som A- og B-kæderne), sammenholdt ved disulfidbindinger, 20 inter-kæde bindinger og 1 intra-kæde binding. Strukturen ligner således meget strukturen af insulin hvad angår anbringelsen af disulfidbindingerne, hvilket har ført til spekulation angående et fælles stamgen for disse hormoner (James et al, 1977; Schwabe et al, 25 30 1977).

Rekombinant-DNA-metoder er blevet anvendt til isolering af cDNA-kloner for både rotte- og svinerelaxiner (Hudson et al, 1981; Harley et al, 1982), se også DK patentansøgning nr. 615/83. Syntetiske nukleotider indeholdende 11 nukleotider og fremstillet på basis af aminosyresekvensinformation blev anvendt som primere for syntesen af cDNA-prober (-prøvemidler), som var stærkt beriget med hensyn til relaxin-cDNA-sekvenser, hvorved identificerede relaxin-cDNA-kloner i gen-"biblioteker" hidrørende fra både rotte- og svineovarievæv. Man 35

fandt, at relaxinstrukturgenet i begge tilfælde kodede for et enkelt kædeforstadie, som ligner preproinsulin i den overordnede konfiguration, dvs. signalpeptid/B-kæde/C-peptid/ A-kæde.

5 Corpus luteum i ovariet såvel som i deciduale og placentale væv er de mest sandsynlige steder, hvor relaxin-beslægtede gener kommer til udtryk. På grund af den store udbredelse af mange peptidhormoner er det imidlertid meget sandsynligt, at relaxingenet også kommer til
10 udtryk i ikke-reproduktivt væv, inklusiv hjerne og mave/tarm-systemet. Relaxin har de almene egenskaber som en vækstfaktor har og er i stand til at ændre bindevævs natur og påvirke glatte musklers kontraktion. Vi formoder, at den ene eller begge de genstrukturer, der omtales i denne beskrivelse og i DK patentansøgning nr. 3664/83 er vidt udbredt i legemet. Vi formoder, at de relaxinpeptider, der
15 udtrykkes af sådanne gener, spiller en vigtig fysiologisk rolle ud over deres veldokumenterede hormonale funktion under reproduktionen.

Følgende forkortelser anvendes i den foreliggende beskrivelse:

20 H1: det relaxingen, der omtales i DK patentansøgning nr. 3664/83, som er afledt ud fra en genklon,

H2: det relaxingen, der beskrives her, og som afledes ud fra en cDNA-klon,

25

30

35

	DNA : deoxyribonukleinsyre	A : adenin
	RNA : ribonukleinsyre	T : thymin
5	cDNA : komplementært DNA (syntetiseres enzymatisk ud fra en mRNA-sekvens)	G : guanin C : cytosin U : uracil
	mRNA : meddeler-RNA (messenger-RNA)	

10 Koderelationerne mellem nukleotidsekvensen i DNA og aminosyresekvensen i protein benævnes den genetiske kode og er anført nedenfor.

	Første base (5' ende)	Anden base				Tredie base (3' enden)
		<u>U</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	
	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
20		Leu	Ser	Stop	Stop	A
		Leu	Ser	Stop	Trp	G
	C	Leu	Pro	His	Arg	U
		Leu	Pro	His	Arg	C
25		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu	Pro	Gln	Arg	G
	A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
		Ile	Thr	Asn	Ser	C
30		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met	Thr	Lys	Arg	G
	G	Val	Ala	Asp	Gly	U
		Val	Ala	Asp	Gly	C
35		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val	Ala	Glu	Gly	G

De forkortelser, der anvendes for aminosyrerne i tabellen,

identificeres som følger:

	Phenylalanin	(Phe)	Histidin	(His)
	Leucin	(Leu)	Glutamin	(Gln)
5	Isoleucin	(Ile)	Asparagin	(Asn)
	Methionin	(Met)	Lysin	(Lys)
	Valin	(Val)	Asparaginsyre	(Asp)
	Serin	(Ser)	Glutaminsyre	(Glu)
	Prolin	(Pro)	Cystein	(Cys)
10	Threonin	(Thr)	Tryptophan	(Trp)
	Alanin	(Ala)	Arginin	(Arg)
	Tyrosin	(Tyr)	Glycin	(Gly)

Hver 3-bogstavkode (kaldet en codon) i tabellen, f.eks. AUG, CAU
 15 (ellers kendt som en deoxynukleotidtriplekt eller nukleotidtriplekt)
 svarer til et trinukleotid i mRNA med en 5'-ende på venstre side og
 en 3'-ende på højre side. Bogstaverne står for de purin- eller pyri-
 midinbaser, der udgør nukleotidsekvensen. Alle de DNA-sekvenser, der
 refereres til heri, er sekvenser i den streng, hvis sekvens svarer
 20 til mRNA-sekvensen, idet thymin (T) angives i stedet for uracil (U).

Opfindelsen vil blive diskuteret yderligere og uddybet i den efter-
 følgende diskussion. Der vil blive henvist til den tilhørende
 25 tegning, hvor:

fig.1 viser et forkortet restriktionsenzymkort og sekventerings-
 strategien for cDNA-klonen i pBR322, genklonen H11 og GT10 cDNA-
 klonerne a-f. Pilene angiver sekventeringsretningen på endemærkede
 30 fragmenter (se metoder). GT10-klonerne a-f blev sekventeret ved
 subkloning i en M13-vektor, hvilket beskrives senere. Nucleotiderne
 nummereres fra AUG-initieringscodon, position 1-3, til den termine-
 rende codon, positionen 554-556.

Fig. 2 sammenligner aminosyresekvensen og mRNA-sekvensen for human-
 præprorelaxin H2 (øverst) med den tilsvarende sekvens for H1
 35 (nederst). Sekvenserne er blevet anbragt ved siden af hinanden for
 at maximere homologi, idet nukleotid-identiteter er blevet angivet
 ved stjerner og aminosyrehomologer med indrammede arealer. Aminosy-
 rerne nummereres fra starten af B-kæden (H2-gensekvensen begyndende

ved -1 og H1-sekvensen ved +1), skønt denne position alene repræsenterer den hypotetiske start for B-kædesekvensen og ganske enkelt er blevet deduceret ud fra homologien med de beslægtede porcin- og rottepreprorelaxinstrukturer. Stjernen under Ala 45 i C-peptidet
 5 angiver positionen for en intron i G/CA-codon i begge gener.

Fig.3 viser autoradiogrammer af identiske nitrocellulosestrimler taget fra a) Northern-geloverførsel af humanovarie-RNA eller b) g-plaque svarende til H1-genet (gH7) eller H2-genet (gGT10-a), hvor
 10 der som hybridiseringsprober anvendes A: et tilfældigt primet 600 bp lang H2-relaxin-cDNA-fragment (72-660), B: en H2-specifik 25-mer (483-507), C: en H1-specifik 25-mer (483-507), D: en H1-specifik 25-mer (248-272).

15 Fig. 4 viser autoradiogrammer af identiske nitrocellulosestrimler efter Northern-geloverførsel af humanovarie-RNA, hvor der som hybridiseringsprober anvendes fragmenter af H2-cDNA-klonen i pBR322 (se fig. 1).

20 A: 600 bp-fragment (72-660) svarende til det meste af det kodende område.
 B: 5'-ikke-translateret område (til Hinf-I-stedet ved nukleotid 30).
 C: 3'-ikke-translateret område (fra Hinf-I-stedet ved nukleotid
 25 660).
 D: 3'-ikke-translateret område (fra Hpa-I-stedet ved nukleotid 850).

30 Fig. 5 sammenligner aminosyresekvenserne for B- og A-kæderne for de to humane relaxingener, human insulin og andre medlemmer af relaxinfamilien. Indrammede arealer udpeger områder, som er bevaret mellem de to humane relaxingener og relaxinfamilien. Pile angiver sandsynlige spaltningsteder for proteolytisk spaltning, hvilket
 35 bekræftes ved proteinsekvereringsresultater for den aminosyreterminale rest af B- og A-kæderne i porcinrelaxin (Schwabe et al, 1977; James et al, 1977), rotterelaxin (John et al., 1981), hajrelaxin (Schwabe et al, 1982) og "dogfish"-relaxiner (Schwabe et al, 1983).

Den på fig. 2 viste H2-mRNA-sekvens bestemtes ved de metoder, der

omtales herefter. For at gøre det lettere at sammenligne, er den nummerering af aminosyrer, der tidligere er anvendt for det peptid, der hidrører fra H1-sekvensen, blevet bevaret i den foreliggende beskrivelse for det H2-afløede peptid. Strukturen af H1-preprorelaxin blev afledt ud fra gensekvensen ved sammenligning med de homologe strukturer af svine- og rotterelaxin. H2-preprorelaxinstrukturen blev deduceret ved sammenligning med H1-strukturen såvel som med svine- og rottestrukturerne. Bekræftigelse af A- og B-peptidkæde-strukturerne er blevet tilvejebragt ved syntese og kæderekombination in vitro, hvilket tilvejebringer et materiale, som er biologisk aktivt i uteruskontraktionsanalysen.

Det fremgår af fig. 2, at den foreliggende og de tidligere sekvenser udviser signifikante forskelle såsom som ligheder. Bemærkelsesværdigt er:

(1) Signifikante aminosyreforskelle i de tre hovedområder:

- (a) den N-terminale ende af B-kæden
- (b) den N-terminale ende af A-kæden
- (c) midten af C-peptidet.

(2) Områder med stærk homologi i B-kæden og C-peptidet:

- (a) 120 identiske baser fra Val⁶ til Ile⁴⁷.
- (b) 88-90 identiske baser fra Phe¹⁰¹ til Ser¹³².

De to gener ligner derfor meget hinanden, men forskellen er tilstrækkelig til at indicere, at H2-genet virkelig er et andet gen og ikke blot et polymorft gen af H1.

In vitro indvirkningen (eng.: processing) på H1-preprorelaxin er ikke helt kendt, men i analogi med svinerelaxin forventes spaltningen af signalpeptidet at ske ved Ala⁻¹-Lys¹-bindingen. Udskæringen af H1-C-peptidet forudsiges at ske ved Leu³²-Ser³³ og Arg¹³⁶-Arg¹³⁷, hvilket således giver H1-B- og H1-A-kæderne på 32 henholdsvis 24 aminosyrerester (fig.2).

I H2-preprorelaxin er Ala⁻¹ blevet erstattet med Asp og man ville således forvente spaltning af signalpeptidet efter alanin svarende til position -2 i H1. Spaltning af forbindelsen mellem H2-B-kæden og

C-peptidet forventes efter Leu³² i analogi med alle andre prorelaxiner, hvilket giver H2-B-kæden med 33 aminosyrerester. Spaltning af forbindelsen mellem H2-C-peptidet og A-kæden vil ske efter Arg¹³⁶ i analogi med rottepreprorelaxin, hvilket således giver H2-A-kæden med
5 24 aminosyrerester.

Som anført i forbindelse med vore undersøgelser af svinerelaxin er der indre sekvenser i svinerelaxinens B- og A-kæde, som alle er essentielle elementer for biologisk aktivitet. Vore syntetiske
10 undersøgelser på humanrelaxinkæden viser lignende resultater, hvilket angives i større detaljer senere.

Ifølge et aspekt for den foreliggende opfindelse tilvejebringes et gen til ekspression af human H2-preprorelaxin.
15

Med mindre andet angives, vil de efterfølgende henvisninger til gensekvenser for preprorelaxin, prorelaxin, relaxin og signalet, A-, B- og C-peptiderne samt til selve peptiderne angå H2-varianter og udelukke H1-varianterne.
20

Ovennævnte aspekt af opfindelsen tilvejebringer mere specifikt et dobbeltstrengt DNA-fragment til ekspression af human preprorelaxin, hvilket fragment omfatter en kodende streng og en komplementær streng svarende til den fuldstændige mRNA-sekvens (codon -25 til
25 160), som vises på fig. 2 på den tilhørende tegning.

Opfindelsen omfatter også en hvilken som helst subunit (underenhed) af H2-preprorelaxingensekvensen beskrevet herefter eller en hvilken som helst ækvivalent til denne sekvens eller subunit. Blandt de
30 subunits, som omfattes af denne definition, er de individuelle strukturelle gener, der koder for signalpeptidkæden og de separate H2-A- og H2-B-peptider samt H2-C-kæden i humanpreprorelaxin (se fig. 2) og hvilke som helst kombinationer af disse kæder, f.eks. generne, der udtrykker H2-A- og H2-B-peptiderne, separat eller som prorelaxin
35 (med H2-C-kæden). Disse subunits omfatter også fragmenter og kombinationer af fragmenter af hvilke som helst af disse gensekvenser.

Ifølge et andet aspekt for den foreliggende opfindelse

tilvejebringes således et gen til ekspression af human prorelaxin.

5 Mere specifik tilvejebringes med dette aspekt for opfindelsen et dobbeltstrenget DNA-fragment, der koder for humanprorelaxin, hvilket fragment omfatter en kodende streng og en komplementær streng, der svarer til de codon, der er nummereret 1 til 160 i den på fig. 2 viste mRNA-sekvens.

10 Ifølge et yderligere aspekt for opfindelsen tilvejebringes gener til den separate ekspression af A-, B- og C-kæderne i humanrelaxin eller en hvilken som helst kombination af to eller flere af disse kæder samt et hvilket som helst fragment eller kombination af fragmenter af kæderne.

15 Mere specielt tilvejebringer dette aspekt ved opfindelsen dobbeltstrengede DNA-fragmenter til den separate ekspression af A- og/eller B- og/eller C-kæderne i humanrelaxin (eller fragmenter som ovenfor beskrevet), hvilket DNA-fragmenter omfatter en kodende streng og en komplementær streng, der svarer til de codon, der er nummereret som -1 til 32, 33-136 og 137-160 i den på fig. 2 i den tilhørende tegning viste mRNA-sekvens.

25 De ovenfor beskrevne gener kan ud over de angivne codon også indbefatte de hensigtsmæssige "start"- og "stop"-codon, f.eks. AUG henholdsvis UGA (codon -25 og 161 i figur 2).

En fagmand vil forstå, at der kan eksistere polymorfe former af generne. Sådanne former er inkluderet i den foreliggende opfindelse.

30 Opfindelsen omfatter ligeledes komplementerne til de ovenfor nævnte sekvenser, underenheder eller ækvivalenter samt de tilsvarende RNA-sekvenser, underenheder eller ækvivalenter.

35 Ifølge et andet aspekt ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en DNA-transfervektor omfattende deoxynucleotidsekvenserne, der svarer til de ovenfor definerede gener.

Som vist ovenfor indeholder den genetiske kode "overflødige" koder (redundancer), det vil sige at der for visse aminosyrer er mere end

en codon. Opfindelsen omfatter således de deoxynucleotidsekvenser, i hvilke de codon'er, der er afbildet på tegningen, eller deres cDNA-ækvivalenter er erstattet med andre codon'er, som koder for den samme aminosyre.

5

Som allerede anført ovenfor kan der fremstilles peptider med relaxinaktivitet, og som adskiller sig fra B- og/eller A-kædestrukturene i naturlig relaxin. Disse forskelle kan omfatte deletion (udeladelse) af en eller flere aminosyrer og/eller addition (tilføjelse) af yderligere aminosyrer og/eller substitution af forskellige aminosyrer i de naturlige kæder.

10

Opfindelsen omfatter således også gener og DNA-transfervektorer, som beskrevet ovenfor, hvori en eller flere af de naturlige codon'er er udeladt og/eller er erstattet med codon'er, som koder for andre aminosyrer end den, der kodes for med den naturlige codon, og/eller der er tilføjet yderligere codon'er til den naturlige sekvens.

15

Transfervektorerne ifølge opfindelsen kan også omfatte bl.a. genetisk information, som sikrer deres replikation, når de er overført til en værtscelle. Disse celler kan f.eks. omfatte celler af prokaryotiske mikroorganismer, såsom bakterier, og også eukaryotiske celler, såsom gær og svampe foruden også celler såsom pattedyrceller og -cellelinier.

20

25

Eksempler på transfervektorer, der er almindeligt benyttet ved bakteriell genetisk arbejde er plasmider og DNA fra visse bakteriofager. Både fag-DNA og bakterielle plasmider er blevet anvendt som transfervektorer ved det foreliggende arbejde. Det må imidlertid forstås, at andre transfervektortyper kan anvendes. De generelle metoder til frembringelse af sådanne transfervektorer og overføringen af dem til mikroorganismer er velkendt indenfor det faglige område.

30

35

Opfindelsen omfatter også en prokaryotisk eller eukaryotisk celle, der er transformeret med en hvilken som helst af de ovenfor omtalte transfervektorer.

En foretrukken mikroorganisme er den særdeles velkendte Escherichia

coli, men en hvilken som helst anden egnet mikroorganisme kan anvendes.

5 Ifølge et yderligere aspekt ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en fremgangsmåde til fremstilling af en DNA-transfervektor til brug ved bevaring og replikering af en deoxynukleotidsekvens, der koder for human preprorelaxin, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en deoxynukleotidsekvens, der koder for human preprorelaxin, forbindes med et DNA-molekyle, der er fremstillet ved
10 at spalte en transfervektor med et restriktionsenzym.

DNA-transfervektorer til brug ved bevaring og replikation af deoxynukleotidsekvenser, som koder for human preprorelaxin og for A- og B-kæderne i humanrelaxin, kan fremstilles på lignende måde ud fra
15 de hensigtsmæssige deoxynukleotider.

A- og B-peptidkæderne samt også prorelaxin og preprorelaxin kan fremstilles ved de sædvanlige fremgangsmåder til genekspression, dvs. ved at dyrke celler, der indeholder den behørigt transformerede
20 transfervektor, og isolere og oprense det (de) ønskede peptid(er), der er produceret af cellerne.

Opfindelsen omfatter således endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af et fusionsprotein, der omfatter aminosyresekvensen i
25 humanpreprorelaxin som dets C-terminale sekvens samt en del af et prokaryotisk eller eukaryotisk protein som dets N-terminale sekvens, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man inkuberer en cellekultur, der er transformeret med en ekspressionstransfervektor, som omfatter en deoxynukleotidsekvens, der koder for humanpreprorelaxin, og som er fremstillet ifølge den ovenfor beskrevne fremgangsmåde.
30

Fusionsproteiner, der omfatter aminosyresekvenserne for human prorelaxin og/eller A- og/eller B- og/eller C-kæderne i humanrelaxin
35 kan fremstilles tilsvarende.

De således fremstillede fusionspeptidprodukter vil foreligge i form af et fusionsprotein, i hvilket det ønskede peptid er forbundet med en del af et prokaryotisk eller eukaryotisk protein, som er

karakteristisk for værtscellen. Disse fusionsproteiner udgør også en del af opfindelsen.

5 Opfindelsen omfatter også en fremgangsmåde til syntetisering af humanprorelaxin, der omfatter A- og B-peptiderne, som er adskilt fra hinanden med et C-peptid, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en kultur af celler, der er transformeret med en ekspressions-transfervektor, som omfatter en deoxynukleotidsekvens, der koder for human prorelaxinet, og som er fremstillet som beskrevet ovenfor, 10 inkuberes under betingelser, der er egnet til ekspresion af den sekvens, der koder for human prorelaxin, og at humanprorelaxin oprenses fra lysatet eller dyrkningsmediet fra cellerne.

15 Det interessante peptid kan indvindes fra fusionsproduktet ved en hvilken som helst passende, kendt spaltningsprocedure.

Som det allerede er anført ovenfor kan transfervektoren være modificeret ved codon-substitution/-deletion/-addition, eller sådanne modifikationer som vil frembringe modificerede fusionspeptider. På 20 denne måde kan der fremstilles hensigtsmæssige modifikationer til at fremme spaltningen af fusionspeptiderne, f.eks. ved forbindelsen mellem B/C- eller C/A-kæderne, eller til ændring af peptidkæde-adfæren under efterfølgende kemisk eller biologisk behandling.

25 Som anført ovenfor tilvejebringer opfindelsen ligeledes human-relaxin, -prorelaxin og -preprorelaxin.

30 Relaxin kan fremstilles ved direkte kombination af separate A- og B-kæder ved en hvilken som helst af de fremgangsmåder, der for tiden kendes og bruges til fremstilling af insulin.

På tilsvarende måde som insulin kan relaxin fremstilles ud fra prorelaxin ved oxidation eller ved på anden måde at omdanne sulfhydrylgrupperne på A- og B-peptiderne i relaxin, der er fremstillet 35 som ovenfor beskrevet, til dannelse af disulfidtværbindinger mellem A- og B-peptiderne, og derpå udskære C-peptiderne, f.eks. ved en enzymkatalyseret hydrolyse, som er specifik for de bindinger, som sammenbinder C-peptidet med A- og B-peptiderne.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes ydermere en fremgangsmåde til syntetisering af humanrelaxin, hvilken fremgangsmåde omfatter, at A- og B-kæderne i relaxin (i deres fulde længde, eller i forkortede eller modificerede udgaver) kombineres ved i sig selv kendte metoder til kombination af A- og B-kæder i humaninsulin.

Ved en sådan fremgangsmåde reduceres en blanding af S-sulfonerede A- og B-kæder, hvorpå blandingen overlades til oxidation i luften.

Vi har ligeledes konstateret, at virkningsfuldheden ved ovenanførte fremgangsmåde forbedres, når den ene eller begge A- og B-kæder foreligger i form af et S-thioethyl-cys-derivat i stedet for på S-sulfoformen.

I beskrivelsen til Australisk patentansøgning nr. 15413/83 (PF 4385/82) er det også vist, at den ene eller både A- og B-kæderne i relaxinet kan forkortes i amino- og/eller carboxyterminalerne uden væsentligt tab af biologisk aktivitet og under opnåelse af forbedrede kombinationsudbytter. Disse metoder kan ligesåvel anvendes til fremstilling af humanrelaxin.

Ved et andet aspekt ifølge opfindelsen tilvejebringes en human-relaxin-analog, som i det væsentlige består af forkortede og/eller modificerede former af de naturlige B- og/eller A-peptidkæder.

Dette aspekt ved opfindelsen tilvejebringer også en fremgangsmåde til fremstilling af en humanrelaxinanalogue, hvilken fremgangsmåde omfatter dannelse af de forkortede og/eller modificerede B- og/eller A-peptidkæder samt kombineret af dem ved en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder.

Vore undersøgelser af både svine- og menneskerelaxin har vist, at relaxinaktivitet kan være til stede ved human-A-kæder så korte som A(10-24) og B-kæder så korte som B(10-22), selv om de praktiske minima forventes at være A(4-24) henholdsvis B(4-23). Det er allerede kendt, at peptidet A(4-24)-B(1-25) har relaxinaktivitet.

Generelt kan A-kæden for den foreliggende relaxinstruktur (H2) varieres fra A(1-24) til A(10-24) og B-kæden fra B(-1-32) til

B(10-22).

De foretrukne kombinationer afledes fra:

	A		<u>B</u>
5	En hvilken (1-24)	med en hvilken	(-1-23)
	som helst af (2-24)	som helst af	(op til)
	(3-24)		(-1-31)

10 Modifikationer af B- og/eller A-kæderne kan ifølge den foreliggende opfindelse involvere enten "genetisk" modifikation, som beskrevet ovenfor, eller kemisk modifikation af B- og/eller A-kæderne (i enten fuld længde eller forkortet form) før kombination ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Der kan anvendes to typer modifikationer enten

15

Den første type involverer modifikation af en eller flere af de aminosyrer, som forekommer i de naturlige eller forkortede B- og/eller A-kæder. Denne modifikation vil almindeligvis involvere beskyttelse af aktive grupper på en eller flere af aminosyrerne ved i sig selv kendte metoder, og disse beskyttelsesgrupper kan om ønsket fjernes efter kombination af de (modificerede) A- og B-kæder.

20

25 Eksempler på denne type modifikation indbefatter acetylering, formylering eller lignende beskyttelse af frie aminogrunder, herunder den N-terminale, amidering af C-terminale grupper eller dannelsen af estere af hydroxyl- eller carboxylgrupper. Formylgruppen er et typisk eksempel på en let fjernelig beskyttelsesgruppe.

30

Den anden type modifikation omfatter, at en eller flere af de naturlige aminosyrer i B- og/eller A-kæderne erstattes med en herfra forskellig aminosyre (indbefattende D-formen af en naturlig aminosyre). Denne almene modifikationstype kan også involvere deletion af en naturlig aminosyre fra kæden eller tilføjelse af en eller flere

35

Formålet med sådanne modifikationer er at forøge kombinationsudbyttet af A- og B-kæderne under bibeholdelse af produktets aktivitet, dvs. relaxin eller en analog heraf, eller at forstærke

eller modificere aktiviteten af produktet for et givet kombinations-udbytte. Denne modifikation kan udstrækkes sig til frembringelsen af syntetiske analoger, som har relaxin-blokerende eller -antagonistiske virkninger.

5

Et specifikt eksempel på den første modifikationstype er modificeringen af tryptofanresten (Trp) ved B2 ved addition af en formylgruppe.

10

Eksempler på den anden modifikationstype er erstatningen af Met-delen ved B24 med norleucin (Nle), valin (Val), alanin (Ala), glycin (Gly), serin (Ser) eller homoserin (HomoSer).

15

Ved dette aspekt omfatter opfindelsen også humanrelaxinanaloger fremstillet ud fra naturlige eller forkortede B- og/eller A-kæder, der er modificeret ifølge opfindelsen som beskrevet ovenfor.

20

A- og B-peptidkæderne og også prorelaxin og preprorelaxin kan fremstilles ved sædvanlige genekspressionsfremgangsmåder, det vil sige ved dyrkning af en mikroorganisme, som indeholder den hensigtsmæssige, transformerede transfervektor, og isolering og rensning af det ønskede peptid (eller peptider), der er produceret af mikroorganismen.

25

De således frembragte peptidprodukter kan foreligge i form af et fusionsprotein, i hvilket det ønskede peptid er forbundet med en del af et prokaryotisk protein.

30

Opfindelsen beskrives og illustreres yderligere ved den efterfølgende beskrivelse og de benyttede eksperimentelle procedurer og de herved opnåede resultater.

35

Metoder og materialerIsolering af mRNA og cDNA-kloning

5

Humanovarievæv, der var opnået ved kirurgi til behandling af en ektopisk graviditet, blev hurtigt frosset ned på tøris, og RNA blev isoleret i 5M guanidiniumthiocyanat (Merck) ifølge den af Chirgwin et al., 1979 beskrevne metode. Poly-A⁺-RNA blev omdannet til dobbeltstrenget DNA (Wickers et al., 1978) og klonet enten ved den homopolymere G/C-"tailing"-metode i en pBR322-plasmidvektor (Chang et al., 1978) eller ved lambda-pakketoden under anvendelse af λGT10-vektoren (Huynh et al., 1983). Det er vores erfaring, at transformationseffektiviteten med pBR322-metoden (10⁴ rekombinanter pr. µg cDNA) var langt mindre end med lambda-metoden (op til 10⁶ rekombinanter/µg cDNA).

10
15Fremstilling af hybridiseringsprober

20

Der fremstilledes radioaktivt mærkede prober ved primede syntese på forskellige DNA-fragmenter under anvendelse af denaturerede, statistisk vilkårlige primere af kalvethymus-DNA (Hudson et al., 1983, Taylor et al., 1976). DNA-templaten (100-200 µg) blev denatureret med de statistisk vilkårlige primere (1µg) ved kogning i 25 20 µl H₂O i 2 minutter. Syntesen blev indledt ved tilsætning af 30 ml reaktionsblanding indeholdende 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 5 enheder E.coli DNA-polymerase I (Klenow-fragment), 500 µM af respektivt dCTP, dGTP, dTTP og 0,3 µM α-[³²P]-dATP (ca. 3000 Ci/mmol, Amersham). Efter inkubering ved 37⁰C 30 i 30 minutter blev reaktionen bragt til afslutning ved fortynding i 300 µl af en puffer indeholdende 0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, og reaktionsblandingen blev passeret gennem en Sephadex-G50-søjle (1 cm x 5cm) i den samme puffer. Den radioaktivt mærkede probe blev indsamlet fra topfraktionerne ved udtømt volumen 35 og fældedes med 2 volumener ethanol ved -20⁰C i 2 timer under anvendelse af tRNA (10µg) som bærer (carrier).

Selektion af specifikke cDNA-kloner

5 Til screening af den humane ovarie-cDNA-klonbank for relaxin-specifikke sekvenser anvendtes som en probe et segment af det tidligere identificerede human-H1-gen svarende til et 400 nukleotid-segment, der koder for C-peptidet og A-kæden fra aminosyre 64, gennem termineringscodon og indbefattende 80 baser af det ikke-translaterede 3'-område. En enkelt positiv cDNA-klon fra pBR322-10 biblioteket isoleredes og sekventeredes. 23 unikke rekombinanter isoleredes fra λ GT10-bibliotekerne, men af disse blev kun 6 underkastet fuldstændig nukleotidsekvensanalyse.

DNA-sekvensanalyse

15 Sekventeringsstrategien og et forkortet restriktionskort for cDNA-klonerne opsummeres på fig. 1. Rekombinantplasmidet i pBR322 fordøjedes med restriktionsenzymene Hpa II (P), Hinf I (F) eller Taq I (T) og blev endemærket under anvendelse af revers trans-20 scriptase og det hensigtsmæssige α -mærkede deoxynucleotidtriphosphat (dCTP for Hpa II og Taq I, dATP for Hinf I). Fragmenter blev internt spaltet med en anden restriktionsendonuklease og derefter adskilt ved elektroforese på 8% polyacrylamidgeler før sekventering ved den af Maxam og Gilbert et al., 1977 beskrevne kemiske nedbrydningsmetode.25

cDNA-kloner i λ GT10 blev sekventeret ved subkloning af Eco RI restriktionsfragmenter i M13mp9 og under anvendelse af de af Sanger et al., 1977 beskrevne metoder.30

Southern og Northern gelanalyser

35 Blev udført på oprenset genomisk DNA efter restriktionsendonukleasespaltning ved metoden ifølge Southern (1975) eller på oprenset RNA. De DNA-fragmenter, som anvendtes som prober, fandtes at være specifikke overfor enten exon I eller exon II i H1-genklonen på trods af, at de havde en lille mængde flankerende sekvenser. Disse fragmenter blev frembragt ved i M13mp8 at subklone et 500 bp Alu I fragment af λ H7-klonen i tilfældet med exon I-proben, og et 400 bp

Eco RI-Ava II fragment for exon-II-proben. Der blev frembragt en probe fra H2-cDNA-klonen ved at fordøje med Hinf I og isolere en 300 bp dublet svarende til det kodende område fra Asp I til den terminerende kode og indbefattende 110 baser af det ikke-translaterede 3'-område (fig.1). Oligonukleotidprober syntetiseredes ved den kemiske fosphitmetode af Beaucage og Caruthers (1981) og blev endemærket med γ -³²P-ATP under anvendelse af T4-polynucleotidkinase. Hybridiseringsbetingelserne udregnedes på basis af G+C-indholdet.

10 Isolering og nukleotidsekvensanalyse af H2-genklonen

Det humane genom- λ -bibliotek af Lawn et al. (1978) blev undersøgt ved hjælp af de tidligere omtalte metoder (Hudson et al., 1983) med undtagelse af, at der som probe anvendtes en blanding af DNA-fragmenter svarende til exon I og exon II af H1-genklonen. Positive fager dyrkedes i 1 liter flydende kulturer, DNA'et blev isoleret og fordøjet med restriktionsendonuklease forud for kortlægning med exon I og II prober. Et 4-kilobase EcoRI-fragment fandtes at indeholde hele det kodende exon I område, hvilket differentierer denne klon fra den homologe H1-genstruktur. Dette fragment subklonedes i M13mp8 og sekventeredes ved metoden af Maxam og Gilbert (1977). Efter fordøjelsen med Ava I blev fragmenter, der spændte over det kodende område, endemærket og spaltedes internt med et andet restriktionsenzym (Hpa II eller Hinf I) til frembringelse af fragmenter, der er egnet til sekvensanalyse.

Isolering af en cDNA-klon

Prøver af human corpus luteum opnåedes ved kirurgisk intervention i ektopiske graviditeter eller fra lutectomi ved kejsersnit. Fra RNA isoleret fra et enkelt corpus luteum konstrueredes et cDNA bibliotek i pBR322 tilvejebringende ca. 300 unikke rekombinanter. Screening af dette bibliotek med en H1-cDNA-probe afslørede en enkelt rekombinant med sekvenshomologi til humanrelaxin I. For at forøge det totale antal rekombinanter fra en så lille mængde ovarievæv konstrueredes cDNA-biblioteker under anvendelse af λ GT10-kloningssystemet (Huynh et al., 1983). Screening med en relaxin-specifik probe identificerede 23 unikke cDNA-kloner, hvoraf 6 blev karakteriseret som vist på fig. 1. Nukleotidsekvensanalyse

afslørede, at alle 6 cDNA-rekombinanter indkodede fragmenter af samme relaxinstrukturgen (fig.2), og dog var denne sekvens forskellig fra den tidligere omtalte genklon (Hudson et al., 1983). Vi forventede, at denne nye sekvens svarede til det andet
5 humanrelaxin-gen (H2), som var blevet observeret i genomisk DNA.

Det var overraskende, at ingen af cDNA-klonerne indeholdt en polyadenosinsekvens ved 3'-enden, skønt størrelsen af cDNA-klonerne i pBR322 og λ GT10 (1800 bp henholdsvis 1900 bp) indicerede, at der
10 blev syntetiseret store transkriptionsprodukter under kloningsprocessen. Disse to cDNA-kloner havde overlappende sekvensidentitet ved den 3'-terminale ende, hvilket bekræftede, at de hidrørte fra den samme mRNA-struktur. Vi tilskrev tabet af poly-A-enden til for tidlig afslutning af den dobbeltstrengede transkriptionsreaktion eller overskydende S1-nucleasenedbrydning under
15 kloningsprocessen.

Isolering af en genklon svarende til det andet gen

20 En grundig undersøgelse af 10^8 rekombinantfag fra det humane genbibliotek ifølge Lawn et al., (1978) under anvendelse af blandede prober specifik for exon I eller II i λ H7-relaxinklonen afslørede 16 positive fager. Restriktionskortlægningsanalyse i lille skala afslørede, at 14 af disse rekombinantfager svarede til det tidligere
25 omtalte H1-relaxingen (11 var identisk med λ H7-genklonen; 3 var identisk med gH5, en anden genklon af H1-genet, som tidligere omtalt af Hudson et al., 1983). De to andre rekombinantfager var imidlertid identiske og havde et unikt restriktionsmønster, der var karakteristisk for H2-relaxingenet, hvis struktur er givet i fig. 1. Det usædvanlige rekombinantforhold afspejler enten deres andel i det oprindelige genbibliotek eller skyldes selektiv vækst under ampli-
30 fikation. Southernblot-analyser af denne nye rekombinantfag (λ H11) under anvendelse af separate prober svarende til enten exon I eller II i λ H7-klonen afslørede, at λ H11 kun indeholdt exon I kodningsområ-
35 det. Forsøg på at finde en genklon i fuld længde og svarende til H2-relaxingenet enten i biblioteket ifølge Lawn et al., (1978) eller i et andet bibliotek (Dr. R.Crawford, upubliceret) er indtil nu ikke lykkedes.

Nukleotidsekvensen af det relaxinkodende område af λ GH11 fandtes at være identisk med det, der observeredes i den på fig. 2 viste cDNA-klon. En intron afbryder det kodende område på nøjagtig samme position som i GH7-genklonen (Hudson et al., 1983), hvilket antyder, at disse gener opstod ved en gendublikationsbegivenhed på et eller andet tidspunkt i evolutionen.

Northern gelanalyse

RNA isoleredes fra forskellige prøver af human corpus luteum taget fra forskellige personer under kirurgisk indgreb for ektopisk svangerskab eller under kejsersnit. Northern gelanalyse under anvendelse af prober fremstillet fra det kodende område af enten det ene eller det andet relaxingen afslørede, at to mRNA hovedarter på ca. 1000 bp og 2000 bp var til stede i fem undersøgte humanovarie-RNA-prøver (fig.3). De mindre mRNA-arter var 2-3 gange mere talrige i de undersøgte RNA-prøver, og dette resultat var uafhængigt af, om den anvendte probe i analysen svarer til H1- eller H2-relaxin, hvilket indicerer, at der under vore eksperimentelle betingelser sker en høj grad af krydshybridisering. For at skelne imellem, om disse to mRNA-arter repræsenterer de separate produkter fra H1- og H2-generne, syntetiseredes oligonukleotidprober over et område med minimal homologi (60%) mellem de to relaxingener (enhederne 137-144 på fig. 2). Disse syntetiske 25-mere oligonukleotidprober blev mærket radioaktivt ved behandling med kinase og γ - 32 P-ATP, og de blev anvendt som hybridiseringsprober under betingelser, der har vist sig at tilvejebringe specificitet for enten H1- eller H2-gelerne (fig.3). Northern gelanalyse under anvendelse af de radioaktivt mærkede prober afslørede, at begge mRNA-arterne svarer til produkter fra H2-genet. Vi kunne ikke påvise nogen transkriptionsprodukter fra H1-genet under anvendelse af de specifikke prober, dog ville et lavt ekspressionsniveau (mindre end 5% af H2-niveauet) være vanskelig at identificere.

Til analyse af de forskellige mRNA-transkriptorer fra H2-genet fremstilledes specifikke prober fra segmenter af de to store H2-cDNA-kloner svarende til det kodende område og de ikke-translaterede 5'- og 3'-områder (fig.4). Det større mRNA-transkript (ca. 2 kb i længde) hybridiseredes selektivt til segmenter af det ikke-

translaterede 3'-område fra begge cDNA-kloner, fra en position ca. 100 baser fra termineringscodon. Et potentielt polyadenylerings-signal eksisterer i nukleotidsekvensen i cDNA-klonerne, 140 baser fra termineringscodon, og dette område har ikke homologi med porcine-relaxinpolyadenyleringsstedet. Spørgsmålet om, hvorvidt det kortere mRNA-produkt imidlertid polyadenyleres nær denne position kan ikke løses, før fuld længde cDNA-kloner svarende til begge mRNA-former er blevet isoleret og karakteriseret.

Når man mangler gensekvensen for H2-genet, er det ikke muligt at definere de mekanismer, der fører til dannelsen af de to mRNA-transkriptorer. Som i tilfældet med kollagen- og β -mikroglobulin-generne er det muligt, at spaltningen af det primære RNA-transkript kan ske ved alternative polyadenyleringssteder. På den anden side kan vi ikke udelukke muligheden for alternative splejsningsmekanismer, sådan som det forekommer i kalcitonin-, væksthormon- og α -krystallingenerne.

Den primære struktur af preprorelaxin indkodet i H2-genet.

Man forstår endnu ikke helt den måde humanpreprorelaxingenerne behandles på in vivo, og den må deduceres ved analogislutning med behandlingen af svine- og rottepreprorelaxiner (fig.5). De forudsagte B- og A-kædestrukturer for H1- og H2-generne er blevet bragt på linie med andre medlemmer i relaxinfamilien og humaninsulin vist i fig. 5.

Fraspaltningen af signalpeptidet i H1 var blevet forudsagt (Hudson et al., 1983) at ske efter en enhed med en kort sidekæde, såsom Ala₁, -2 eller -4 eller efter Ser₆. Spaltning efter Ala₁ er i overensstemmelse med homologi til svinepreprorelaxin og humanpreproinsulin. Ved lignende analogi sker spaltningen af H2-signalpeptidet sandsynligvis efter Ala₂, skønt spaltning efter Ala₄ eller Ser₆ er andre muligheder.

Ved analogi med rotte- og svinepreprorelaxiner sker spaltningen ved forbindelsen mellem B-kæden/C-peptidet efter Leu 32 i begge H1- og H2-forstadier. Begge humanrelaxin-B-kæder har imidlertid ved positionerne 29-30 den konserverede dibasiske sekvens Lys-Arg,

hvilket er et kendt indvirkningssted (eng: processing site) i andre prohormoner, såsom proinsulin, og spaltning her kan ikke udelukkes. For at afgøre dette, vil direkte aminosyresekvensanalyse af relaxin isoleret ved corpus luteum hos gravide være nødvendig. For tiden
 5 synes den mest sandsynlige struktur af H1-B-kæden at være 32 enheder (Lys 1 til Leu 32) og H2-B-kæden at være 33 enheder (Asp₁ til Leu₃₂).

Spaltningen ved forbindelsen mellem C-peptidet og A-kæden i
 10 H1-prorelaxin er blevet forudsagt (Hudson et al., 1983) at ske efter Arg 136 indenfor en gruppe på 4 basiske enheder, fordi Arg-Proimidbindingen ved 137-138 vil være resistent overfor proteolyse. H2-prorelaxin har den samme sekvens på 4 basiske enheder og et lignende indvirkningstrin efter Arg 136 vil resultere i at både H1-
 15 og H2-relaxin-A-kæderne er 24 enheder lange.

Biologisk aktivitet af H2-genet

Som anført i tidligere undersøgelser af syntetiske svinerelaxinpeptider er der kernesekvenser i svinerelaxin B- og A-kæderne, som indeholder alle de essentielle elementer for biologisk aktivitet. Vores synteseundersøgelser på H1-relaxinpeptiderne har vist, at kombination af den komplette H1-A-kæde (Arg 137 - Cys 160) og en forkortet form af H1-B-kæden (Lys 1 - Ser 25) tilvejebragte
 20 materiale, som udviste biologisk aktivitet (Hudson et al., 1983). Yderligere undersøgelser af begge H1- og H2-genstrukturerne under anvendelse af peptidsyntesen viser, at begge gener koder for former af relaxin, som er biologisk aktive i rotteuteruskontraktionsanalysen.
 30

Kemisk syntese af et modificeret humanrelaxin H2 (hRLX) A(1-24) - B(-1-24)

(i) Syntese af humanrelaxin-A-kæde, H2-hRLX A(1-24)

35 Aminosyresekvensen svarende til enhederne 1-24 i humanrelaxin-A-kæden udledt som beskrevet ovenfor ud fra nucleotidsekvensen i den genomiske klon blev syntetiseret ved faststoffase-proceduren ifølge de generelle principper, der er beskrevet af Merrifield

(f.eks. Barany, G. og Merrifield, R.B. i "The Peptides", red.: E.Gross & J. Meienhofer, Academic Press, N.Y., s.1-284, 1980).

5 N- α -tert-butyloxycarbonyl^{*}-4-methyl-benzyl-L-cystein (^{*} i det følgende betegnet "BOC") blev koblet til en 1% tværbunden polystyrenharpiks via phenylacetamidomethyl (PAM) -koblingen i et omfang på 0,30 mmol/g under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Tam et al., (Synthesis 12, 955-057, 1979). BOC-L-CYS-PAM-harpiksen (8,0 g) blev overført til en reaktionsbeholder i en Beckman model 990
10 peptidsyntetisør, og aminosyresekvensen fra enhed 23 til 1 blev samlet ved den trinvis tilsætning af hver aminosyre beskyttet på passende måde. Den aminoterminale BOC-beskyttelsesgruppe på hver aminosyre blev fjernet ved behandling af harpiksen med 35% trifluoreddikesyre i methylenchlorid i 30 minutter efterfulgt af en
15 neutralisation med 5% diisopropylethylamin i methylenchlorid i 15 minutter. Efter hver behandling blev harpiksen vasket grundigt med methylenchlorid. Den næste aminosyre i sekvensen (med α -aminogruppen passende beskyttet af BOC-gruppen, og hvor det var nødvendigt med en passende beskyttelse af en funktionel sidekædegruppe) blev koblet
20 til harpiksen under anvendelse af dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Harpiksen blev omrørt med aminosyren i methylenchlorid i 10 minutter forud for indføringen af DCC'et, som også var opløst i methylenchlorid. Et 2,5 molær overskud (6,0 mmol) af aminosyre og DCC blev benyttet ved hver kobling. Efter omrøring i 1 time blev en prøve af harpiksen fjernet fra reaktionsblandingen og undersøgt for tilstedeværelse af frie aminogru-
25 værelse af frie aminogru- pper under anvendelse af ninhydrinproceduren ifølge Kaiser et al. (Anal. Biochem., 34, 595-598, 1970). Hvis ninhydrinprøven var negativ indicerende fuldstændig kobling, blev reaktionscyklussen fortsat med BOC-beskyttelsesfjernelse, neutrali-
30 sation og kobling med næste aminosyre. I tilfælde af en positiv ninhydrinprøve blev koblingsreaktionen gentaget med yderligere aminosyre og DCC.

35 Aminosyrer med funktionelle sidekædegrupper blev benyttet i form af følgende beskyttede derivater:

N- α -BOC-2,6-dichlorbenzyl-L-tyrosin, N- α -BOC- ξ -chlorbenzyloxy-carbonyl-L-lysin, N- α -BOC-L-serin-O-benzylether, N- α -amyloxycarbonyl-N^G-tosyl-L-arginin, N- α -BOC-L-threonin-O-benzylether,

N- α -BOC-S-ethylmercapto-L-cystein (til CYS i A-kædesekvensposition 15, 11 og 10).

5 Efter samling af 1-24 peptidsekvensen blev den sidste BOC-gruppe på det aminoterminale arginin fjernet under anvendelse af afbeskyttelses-neutralisationscyklussen, og peptidharpiksen blev tørret i vakuum (vægt af peptidharpiks 13,0 g). En portion af peptidharpiksen (2 g) blev behandlet med vandfri hydrogenfluorid i nær værelse af anisol (2 ml) ved 0°C i 30 minutter. Den totale kontakttid for harpikspeptidet med hydrogenfluorid (HF) blev holdt på 10 et minimum (ikke over 70 minutter) ved hurtig fjernelse af HF under vakuum fra en oliepumpe. Harpikspeptidet blev derpå vasket adskillige gange med ethylacetat til fjernelse af anisoloverskud, peptidet blev ekstraheret i 1M eddikesyre, og opløsningen blev lyophiliseret. 15 Udbyttet af rå-peptid (med cyteinet i positionerne 10, 11 og 15 stadig beskyttet som S-thioethylderivater) var 392 mg. Indledende rensning af rå-peptidet skete ved gelfiltrering på Biogel P10 i 0,1 M eddikesyre. De fraktioner, der repræsenterede hovedtoppen fra denne søjle, og som blev elueret på et sted svarende til en molekylvægt på ca. 3000, blev opsamlet og lyophiliseret. 20 Aminosyreanalyse af en prøve af dette peptid indicerede, at alle aminosyrerne i 1-24 sekvensen forekom i det rette forhold.

25 Yderligere rensning af [S-thioethyl-Cys^{10,11,15}]-hRLX A(1-24)-peptidet blev udført ved præparativ omvendt fase HPLC på en Waters C-18 Bondapak-søjle under anvendelse af et 0,1% TFA-vand/acetonitril-solventsystem.

30 En prøve (80 mg) af det ved gelfiltrering rensede peptid blev S-sulfoeret med en blanding af natriumsulfit og natriumtetrathionat (samlet reaktionstid 3 timer) ifølge fremgangsmåden beskrevet af Du et al., (Scientia Sinica, 10I, 84-104 (1961)). Præcipitatet, der dannes under S-sulfoeringsreaktionen, blev fjernet ved filtrering, og både præcipitatet og supernatantopløsningen blev dialyseret mod 35 destilleret vand ved 4°C i 48 timer. Indholdene i dialyseposerne blev lyophiliseret til opnåelse af 39,5 mg peptid fra supernatantopløsningen og 20,3 mg peptid fra præcipitatet, som fremkom under S-sulfoeringsreaktionen. En prøve af det "opløselige" [S-sulfo-Cys^{10,11,15,24}]-hRLX A(1-24)-peptid blev

renset ved præparativ omvendt fase HPLC på en Waters C-18 Bondapak-søjle under anvendelse af et 0,1% TFA-vand/acetonitrilsolventsysteem.

(ii) Syntese af forkortet humanrelaxin-B-kæde, H2-hRLX B(-1-24)

5

Aminosyresekvensen svarende til enhederne -1 - 24 i H2-humanrelaxin-B-kæden blev synteseret under anvendelse af de ovenfor beskrevne procedurer begyndende med 6,0g N- α -tert-butyloxy-carbonyl-L-methionin-O-benzyl-L-serin-phenylacetamid-methylpolystyrenharpiks ladet med 0,5 mmol Met pr. gram. Sidekædebeskyttelses-grupperne, der blev benyttet til syntese af A-kæden, blev også benyttet til B-kæden, herunder S-ethylmercaptoderivatet til begge cysteiner i positionerne 10 og 22. Glutaminsyre-enhederne i positionerne 4 og 5 og asparaginsyre-enheden i position -1 blev adderet som N- α -BOC- ξ -benzylesterderivatet. Glutaminet i position 18 blev koblet ved en fremgangsmåde med aktiv ester under anvendelse af N- α -BOC-L-glutamin-p-nitrophenylester i DMF. Efter kobling af tryptofanet i position 2 blev der tilsat 0,1 % indol til trifluoreddikesyre-afbeskyttelsesreagenset og til de efterfølgende methylenchloridvask.

20

Slutvægten af peptidharpiksen efter fjernelse af BOC-gruppen fra den aminoterminal asparaginsyre-enheden og vacuumtørring var 8,5 g. En portion af peptidharpiksen (3,5 g) blev behandlet med vandfri hydrogenfluorid i nærværelse af anisol (2 ml) ved 0°C i 30 minutter, og B-kædepeptidet blev isoleret under anvendelse af den ovenfor beskrevne procedure for A-kæden. Det rå [S-thioethyl-Cys^{10,22}]-hRLX B(-1-24), (0,97 g) blev renset ved gelfiltrering på BioGel P10 i 0,1M eddikesyre efterfulgt af præparativ HPLC.

25

En prøve (100 mg) af det ved gelfiltrering rensede peptid blev S-sulfoneret ved pH 8,3 i 3 timer, reaktionsblandingen blev filtreret, og præcipitatet og supernatantopløsningen blev dialyseret mod destilleret vand. Det "opløselige" peptid, der blev indvundet efter lyophilisering, udgjorde 42,4 mg; det "uopløselige" peptid udgjorde 59,5 mg. De S-sulfonerede B-kædepeptider blev yderligere renset ved præparativ HPLC under anvendelse af en C-18 omvendt-fasesøjle og et 0,1% TFA-vand-acetonitrilsolventsysteem.

30

35

(iii) Kædesammenføjning

De syntetiske H2 hRLX A(1-24)- og H2 hRLX B(-1-24)-peptider blev sammenføjet under anvendelse af fremgangsmåden, beskrevet af Chance og Hoffmann (australsk patentansøgning nr. 68844/81) til insulinkæder, hvorved de S-sulfonerede peptider blev blandet i et forhold A:B på 2,6:1 ved en peptidkoncentration på 10 mg/ml i glycinpuffer, pH 10,5. Dithiothreitol i glycinpuffer blev derpå tilsat i en mængde, der samlet tilvejebragte 1,0 sulfhydrylgruppe for hver S-sulfogruppe. Reaktionsblandingen blev derpå omrørt i en åben beholder i 24 timer.

Som en yderligere modifikation af denne fremgangsmåde er det blevet opdaget, at kædesammenføjningsreaktionen til dannelse af biologisk aktivt relaxin forløb effektivt, når en eller fortrinsvis begge peptidkæderne blev anvendt som deres S-thioethyl-Cys-derivater i stedet for i S-sulfoformen, som angivet af Chance og Hoffmann (citeret ovenfor) i forbindelse med insulin. Anvendelsen af S-thioethyl-Cys-peptiderne eliminerer et reaktions- og rensningstrin, der kræves til omdannelse af peptiderne til S-sulfoderivaterne. Ifølge den erhvervede erfaring ledsages S-sulfoneringsomsætningen af relaxinpeptiderne af sidereaktioner, som gør det vanskeligt at rense S-sulfopeptiderne, hvilket resulterer i lave udbytter.

Ved anvendelse af de ovenfor angivne betingelser blev der opnået kædesammenføjningsudbytter på fra 1,5 til 6,0% som målt ved den biologiske aktivitet ved kontraktionsforsøg med rotteuterus ifølge Wiqvist & Paul (Acta Endocrinol., 29, 135-136, 1958).

30 Eksempel på kædesammenføjningsreaktion

Humanrelaxin-H2-[S-thioethyl-Cys^{10,11,15}]-A(1-24), (4,2 mg tørvægt, 2,4 mg peptid ved aminosyreanalyse, 0,84 μmol) blev opløst i 500 μl 0,1M glycinpuffer, pH 10,5, i et 3 ml plastcentrifugerør forsynet med prop. Humanrelaxin-H2-[S-sulfo-Cys^{10,11}]-B(-1-24), (1,60 mg, 1,60 mg peptid ved aminosyreanalyse, 0,33 μmol) opløst i 200 μl 0,1M glycinpuffer, pH 10,5, blev tilsat og blandingen blev omrystet. En delmængde (23,0 μl , 2,21 μmol DTT) af en stamopløsning af dithiothreitol (DTT), der var fremstillet med 0,1 M glycinpuffer, pH

10,5 (0,96 μmol DTT i 10 μl), blev tilsat til peptidopløsningen, og efter en kort omrystning fik reaktionsblandingen lov til at henstå ved 4⁰C i 24 timer under luftens adgang. Blandingen blev derefter centrifugeret, og delprøver af supernatantopløsningen blev testet for biologisk relaxinaktivitet ved rotteuterus-kontraktionsforsøg. Delprøver af reaktionsblandingen forhindrede de spontane kontraktioner af rotteuterus på en dosisafhængig måde. En 75 ml delprøve forhindrede fuldstændig uteruskontraktioner, hvilket svarer til et kædesammenføjningsudbytte på 5,3% sammenlignet med en naturlig svinerelaxin-A22-B31-standard.

Syntese af autentisk humanrelaxin H2 (hRLX) A(1-24) - B(-1-32)

(i) Syntese af humanrelaxin H2-kæde: hRLX B(-1-32) i fuld længde

Den aminosyresekvens, der svarer til enhederne -1 til +32 i den fulde længde af human-H2-relaxin-B-kæden, blev syntetiseret under anvendelse af de ovenfor beskrevne metoder og begyndende med 6,4 g N- α -tert-butyloxycarbonyl-L-leucin-phenylacetamidomethylpolystyrenharpiks ladet med 0,23 mmol Leu pr. g. De sidekædebeskyttende grupper, der anvendtes for A(1-24) og B(-1 - 24)-peptiderne blev også anvendt til B-kæden i fuld længde inklusiv S-ethylmercapto-derivatet for begge cysteiner i positionerne 10 og 22. En modifikation af denne strategi var anvendelsen af N-formylderivatet af BOC-L-tryptofan til kobling ved sekvenspositionerne 27 og 2.

Slutvægten af peptidharpiksen efter kædesamling var 8,2 g. En del af peptidharpiksen (4,0 g) blev behandlet med vandfri hydrogenfluorid-anisol som beskrevet i de tidligere eksempler til frembringelse af 1,50 g rå [S-thioethyl-Cys^{10,22},N-formyl-Trp^{2,27}] hRLX B(-1 - 32). Det rå peptid oprensedes ved gelfiltrering på BioGel P6 i 0,1 M eddikesyre. Hovedtoppene, der blev elueret fra gelfiltreringssøjlen, karakteriseredes ved aminosyreanalyse. Fraktioner, hvor analyserne stemte overens med -1 til 32 peptidsekvensen, opsamledes og frysetørredes. Deformylering af tryptofanenhederne udførtes ved at behandle peptidet (100 mg) med natriumhydroxidopløsning (5 ml), pH 11,5 i 5 minutter, i hvilken tidsperiode peptidet præcipiterede fra opløsningen.

Reaktionsblandingen neutraliseredes til opløsning af peptidet, og blandingen påførtes direkte på en BioGel P6-søjle i 0,1 M eddikesyre. Fjernelse af formylgrupper fra tryptophan målt ved UV-spektroskopi ved at følge, at N-formylabsorptionen ved 300 nm forsvandt og tilsynekomst af de karakteristiske tryptophanspektre med et absorptionsmaximum ved 280 nm. Peptidfraktioner, der eluerede fra søjlen og havde den korrekte aminosyreanalyse opsamledes og frysetørredes.

10 Forsøg på at oprense [S-thioethyl-Cys^{10,22}(hRLX B)-1 - 32)-peptidet ved preparativ HPLC faldt ikke heldigt ud, på grund af tab af peptid ved adsorption til søjlemediet. Peptid renses ved gelkromatografi anvendes direkte i kædesammenføjningseksperimenter.

15 (ii) Kædesammenføjnning af A(1-24) med B(-1 - 32): fremstilling af humanrelaxin H2

De syntetiske S-sulfonerede og S-thioethyl-H2 humanrelaxin A(1-24)-peptider kobledes til S-thioethyl-H2-humanrelaxin-B(-1-32) under anvendelse af de kædesammenføjningsmetoder, der tidligere er beskrevet for den forkortede B-kæde (-1 - 24). Prøver af blandingen efter sammenføjnning undersøges for biologisk relaxinaktivitet i rotteuterus-kontraktionsforsøg. Delprøver af reaktionsblandingen forhindrede de spontane kontraktioner af rotteuterus på en dosisafhængig måde. 100 µl delprøve forhindrede fuldstændig uteruskontraktioner, hvilket svarer til et kædesammenføjningsudbytte på 3,0% sammenlignet med en naturlig svinerelaxin-A22-B31-standard.

30

35

LITTERATURFERENCER

- 5 Anderson, M.L., Long, J.A. og Hayashida, T.
Immunofluorescence studies on the localisation of relaxin in the
corpus luteum of the pregnant rat. *Biol.Reprod.* 13, 499-504 (1975).
- 10 Beaucage, S.L. og Caruthers, M.H. *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-1862
(1981).
- Chang, A.C.Y. *Nature* 275, 617-624 (1978).
- 15 Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. og Rutter, W.J.:
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources
enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18, 5294-5299 (1979).
- 20 Haley, J., Hudson, P., Scanlon, D., John, M., Cronk, M., Shine, J.,
Tregear, G. og Niall, H. *DNA* 1, 155-162 (1982).
- Hisaw, F.L. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 23, 661-663 (1926).
- 25 Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J. og Niall, H. *Nature* 291,
127-131, (1981).
- 30 Hudson, P., Haley, J., John, M., Cronk, M., Crawford, R., Hara-
lambidis, J., Tregear, G., Shine, J. og Niall, H.: Structure of a
genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature*
301, 628-631 (1983).
- Huynh, T., Saint, R. og Davis, R. (1983) personlig kommunikation.
- 35 James, R., Niall, H., Kwok, S. og Bryant-Greenwood, G.: *Nature* 267,
544-546 (1977).
- John, M.J., Walsh, J.R., Borjesson, B.W. og Niall, H.D.: *Endo-
crinology* 108, 726-729 (1981).
- Lawn, R.M., Fritsch, E.F., Parker, R.C., Blake, G. og Maniatis, T.

Cell 15, 1157-1174 (1978).

Maxam, A.M. og Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 560-564.

5

Morrison, D.A., i: Methods in Enzymology. R.Wu, ed. (New York:
Academic Press) s.326-331 (1979).

10

Roychoudbury, R., Jay, E. og Wu, R.: Terminal labelling and addition
of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal
deoxynucleotidyl transfrase. Nucleic Acid Res. 3, 863-877 (1976).

15

Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. og Roe, B.A.
J.Mol.Biol. 143, 161-178 (1980).

Schwabe, C., Gowan, L.K. og Reinig, J.W., Ann.N.Y.Acad.Sci. 380,
6-12, (1982).

20

Schwabe, C., McDonald, J.K. og Steinetz, B.C. Biochem.Biophys. Res.
Commun, 75, 503-510 (1977).

Southern, E.M., J.Mol.Biol. 98 503-517 (1975).

25

Taylor, J.M., Illmersee, R. og Summers,J. Biochem.Biophys.Acta 442,
324-330 (1976).

30

Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Picket, R., Tischer, E.,
Rutter, W.J. og Goodman, H.M.: Rat insulin genes: construction of
plasmids containing the coding sequences. Science 196, 1313-1319
(1977).

35

Vogt, V.M.: Purification and further properties of single-strand-
specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. Eur.J.Biochem. 33,
192-200 (1973).

Wickers, M.P., Buell, G.N. og Schimke, R.T.: Syntesis of double-
stranded DNA complementary to lysozyme, ovomucoid, and ovalbumin
mRNAs. J.Biol.Chem. 253, 2483-2495, (1978).

bestående af A(1-24) til A(5-24), hvorhos aminosyrerne 1-24 har følgende sekvens:

```

5           1           5           10
      Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His
           15           20           24
      Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys,

```

og at B-polypeptidkæden er:

10

(ii) en human-H2-relaxin B-kæde, der er udvalgt fra gruppen bestående af B(-1-32) til B(4-23), hvorhos aminosyrerne -1-32 har følgende sekvens:

```

15      -1  1           5           10
      Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg
           15           20           25
      Gly Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
           25           30           32
20      Thr Trp Ser Lys Arg Ser Leu,

```

og at C-polypeptidkæden er:

25 (iii) en human-H2-prorelaxin C-kæde, som har den i figurerne 2A-2D angivne aminosyresekvens som ordnet i figur 2.

11. I alt væsentligt rent polypeptid ifølge krav 4, k e n d e - t e g n e t ved, at polypeptidet omfatter:

30

(i) en human-H2-relaxin A-kæde, der er udvalgt fra gruppen bestående af A(1-24) til A(5-24), hvorhos aminosyrerne 1-24 har følgende sekvens:

```

35           1           5           10
      Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His
           15           20           24
      Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys

```

(ii) en human-H2-relaxin B-kæde, der er udvalgt fra gruppen

bestående af B(-1-32) til B(4-23), hvorhos aminosyrerne -1-32 har følgende sekvens:

	-1	1				5						10		
5	Asp	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	
					15					20				
			Glu	Leu	Val	Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met
			25				30		32					
10			Ser	Thr	Trp	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu,	og			

(iii) en human-H2-prorelaxin C-kæde med den i figurerne 2A-2D angivne aminosyresekvens som ordnet i figur 2, hvorhos C-kædeaminosyresekvensen er modificeret i forbindelsen mellem B/C- og C/A-kæderne til fremme af kløvning af B/C- og C/A-forbindelserne og efterfølgende udskæring af C-kæden.

20

25

30

35

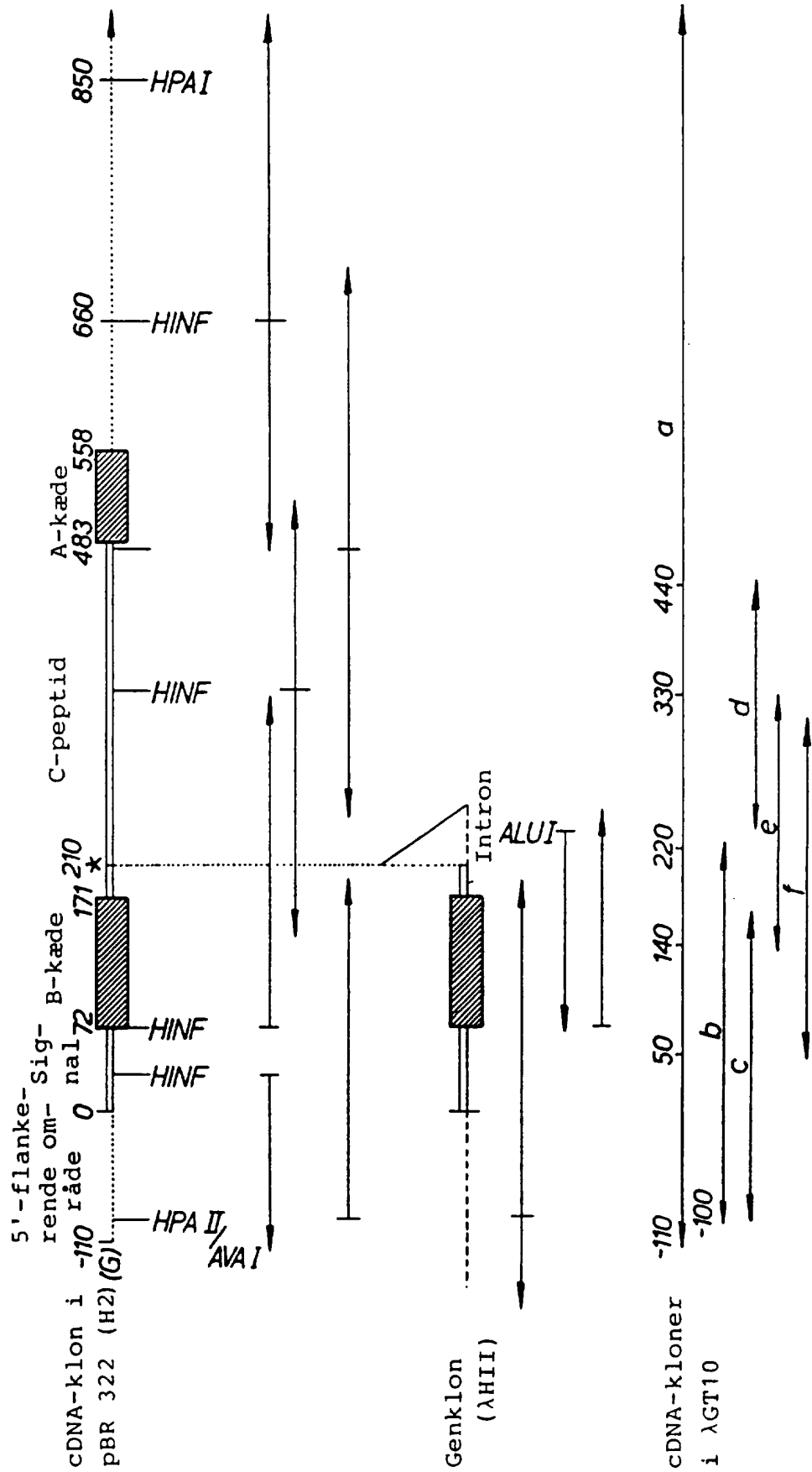


FIG.1.

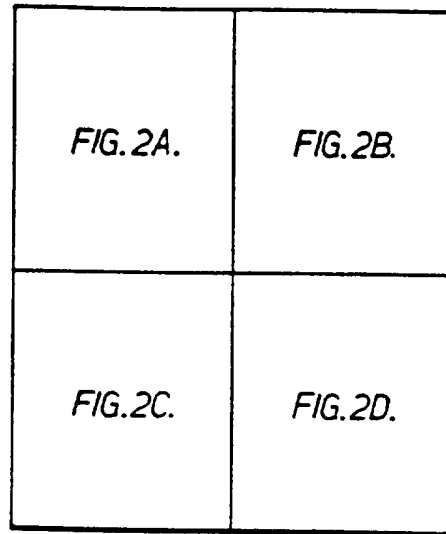


FIG. 2.

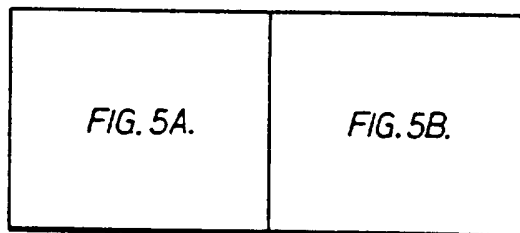


FIG. 5.

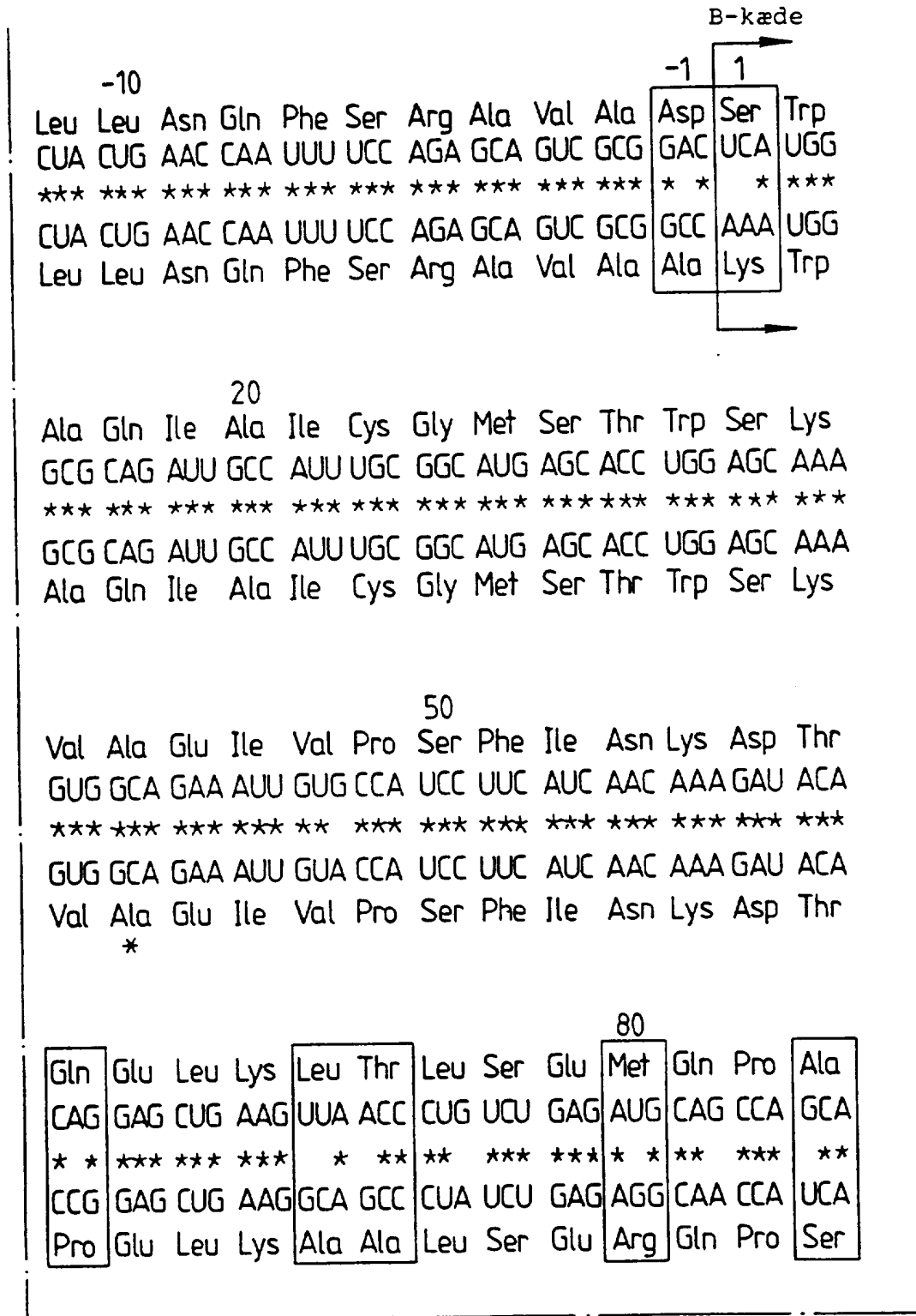


Fig. 2B.

														90																
Leu	Pro	Gln	Leu	Gln	Gln	His	Val	Pro	Val	Leu	Lys	Asp	Ser																	
UUA	CCA	CAG	CUA	CAA	CAA	CAU	GUA	CCU	GUA	UUA	AAAG	GAU	UCC																	
***	***	**	***	**	**	**	***	***	* *	***	**	***	***																	
UUA	CCA	GAG	CUA	CAG	CAG	UAU	GUA	CCU	GCA	UUA	AAG	GAU	UCC																	
Leu	Pro	Glu	Leu	Gln	Gln	Tyr	Val	Pro	Ala	Leu	Lys	Asp	Ser																	
														120																
Arg	Gln	Ser	Glu	Ala	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys																	
AGA	CAA	AGU	GAA	GCC	GCA	GAC	AGC	AGU	CCU	UCA	GAA	UUA	AAA																	
**	***	***	***	***	***	***	***	* *	***	***	***	***	***																	
AGG	CAA	AGU	GAA	GCC	GCA	GAC	AGC	AAU	CCU	UCA	GAA	UUA	AAA																	
Arg	Gln	Ser	Glu	Ala	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys																	
														140																
Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys																	
CUC	UAC	AGU	GCA	UUG	GCU	AAU	AAA	UGU	UGC	CAU	GUU	GGU	UGU																	
* *	***		***	**	* *	*	***	***	***	*	**	***	***																	
CCC	UAC	GUG	GCA	CUG	UUU	GAG	AAA	UGU	UGC	CUA	AUU	GGU	UGU																	
Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Cys	Cys	Leu	Ile	Gly	Cys																	
														150																

FIG. 2C.

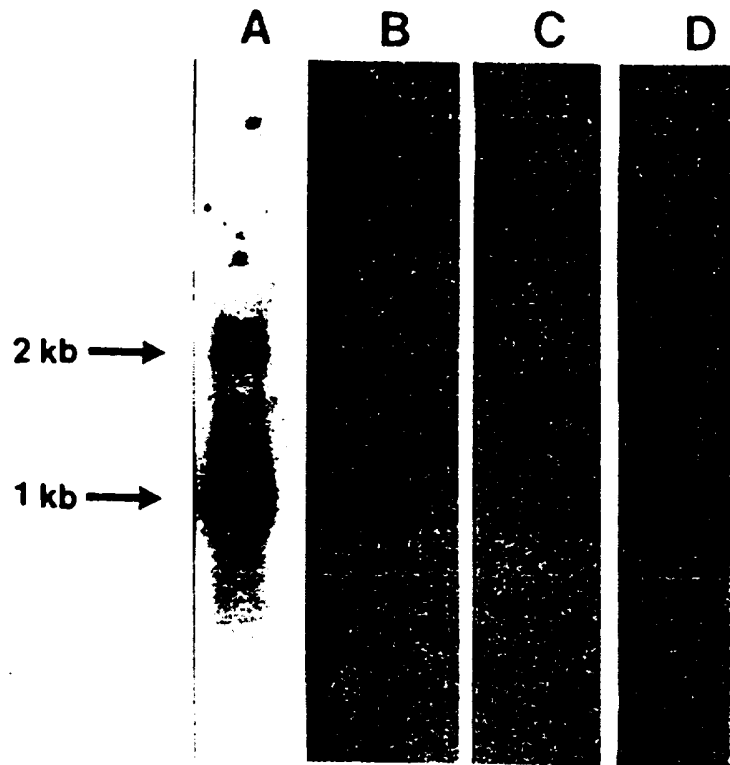


FIG. 3a.

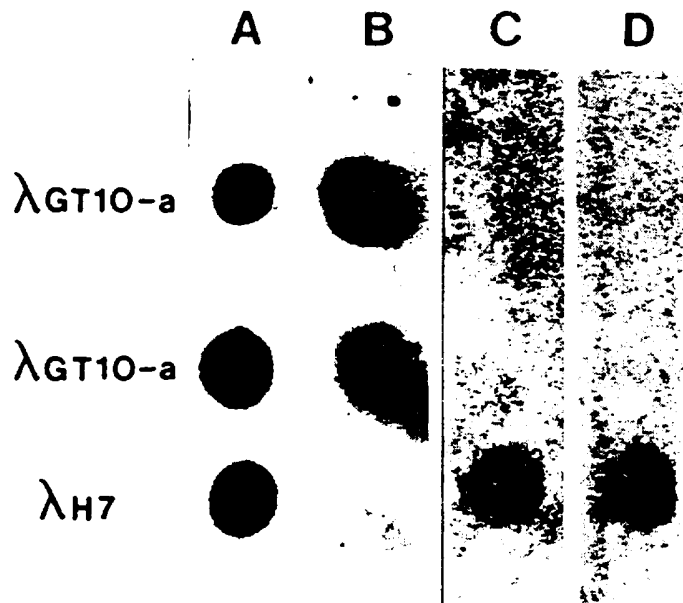


FIG. 3b.

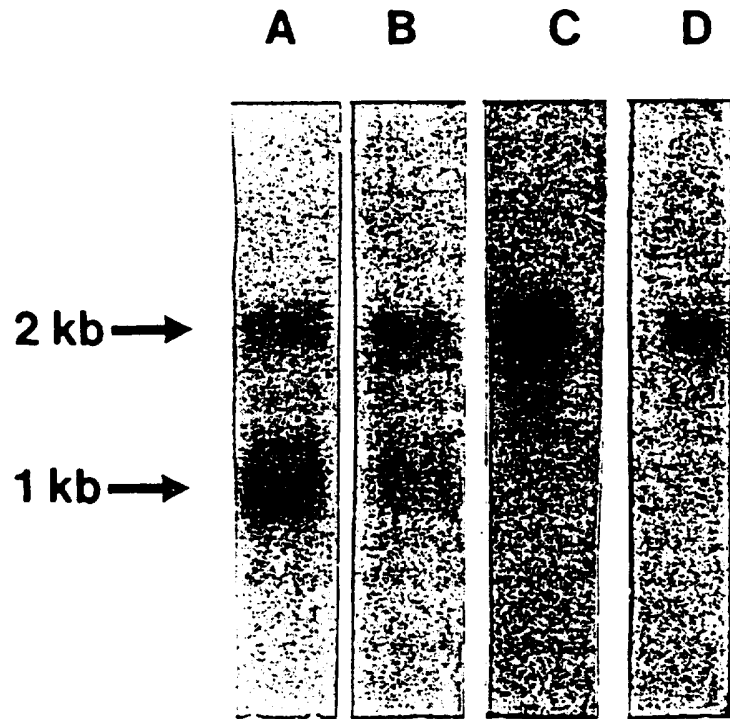


FIG. 4.

Humaninsulin	B-KÆDE: -4 Ala Val Ala Ala -1 Ala Lys Ala Val Ala Asp Ser Ala Val Ala Asp Ser Gln Ser Thr Asn Asp Phe Gln Ser Glu Trp Met Ser Gln Ile Gln Ser Leu Ser Asn Ala Gly Ser Gly Gln Asn Ala Glu Pro Gly	Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Lys Asp Asp Val Ile Lys Leu Cys Gly Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Thr Asn Asp Phe Ile Lys Ala Cys Gly Trp Met Asp Gln Val Ile Gln Val Cys Gly Ser Asn Ala Gly Ser Gly Ile Lys Leu Cys Gly Asn Ala Glu Pro Gly Ile Lys Leu Cys Gly	Leu Cys Gly Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly Lys Leu Cys Gly	Ser His Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu
Humanrelaxin-1				
Humanrelaxin-2				
Svinerelaxin				
Rotterelaxin				
Hajrelaxin				
"Dogfish"relaxin				
Humaninsulin	A-KÆDE: 140 Lys Lys Arg Arg Arg Pro Tyr Val Arg Gln Leu Tyr Leu Phe Arg Met Thr Leu Ser Glu Gln Ser Gly Ala Leu Leu Ser Glu Ala Thr Ser Pro Ala Met Ser Ile Lys Glu Gly Ser Pro Gly Met Ser Ser Lys	Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Ala Leu Phe Glu Ala Leu Ala Asn Thr Leu Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala Thr Ser Pro Ala Met Ser Ile Lys Glu Gly Ser Pro Gly Met Ser Ser Lys	Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys	Thr Ser Ile Leu Ile His Val Gln Val His Ile Ile Tyr Thr Tyr
Humanrelaxin-1				
Humanrelaxin-2				
Svinerelaxin				
Rotterelaxin				
Hajrelaxin				
"Dogfish"relaxin				

FIG. 5A.

