



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3654/84

(51) Int.Cl.6

C 12 P 21/00

(22) Indleveringsdag: 26 jul 1984

C 07 K 14/60

(41) Alm. tilgængelig: 28 jan 1985

C 12 N 15/16

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 18 aug 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 jul 1983 DE 3327007

(73) Patenthaver: \*HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Brüningstrasse 45; D-W-6230 Frankfurt/Main 80, DE

(72) Opfinder: Joachim \*Engels; DE, Wolfgang \*Koenig; DE, Hubert \*Müllner; DE, Eugen \*Uhlmann; DE, Waldemar \*Wetekam; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af polypeptider med en C-terminal carboxamidgruppe, polypeptider til anvendelse ved fremgangsmåden, fusionsproteiner deraf og dertil egnede DNA-sekvenser, plasmider og værtsorganismer

(56) Fremdragne publikationer

EP offentl.skr. nr. 70675

(57) Sammendrag:

3654-84

Polypeptider med endestillet carboxylsyreamid-carboxy og en eventuelt til et bakterieprotein bundet methioningruppe i aminoenden kan fremstilles ved hjælp af genteknisk syntese af det tilsvarende polypeptid med en glycingruppe ved C-endestillingen og dettes enzymatiske omdannelse til den ønskede carboxamidfunktions amino-gruppe. Peptider, som har aminosekvensen i den væksthormonfrigørende faktor, delsekvenser deraf eller modifikationer af disse peptider kan let opnås på denne måde. Den gentekniske syntese sker formålstjenligt via to genfragmenter, som syntetiseres kemisk af enstrengede små byggesten. De to genfragmenter bindes så enzymatisk til et komplet gen, indsættes i en egnet vektor, forøges der, peptidet isoleres direkte eller som fusionsprotein og omdannes enzymatisk til det ønskede amid.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af polypeptider med en C-terminal carboxamidgruppe, polypeptider til anvendelse ved fremgangsmåden, fusionsproteiner deraf og dertil egnede DNA-sekvenser, plasmider og værts-  
5 organismer.

Den direkte genteknologiske syntese af polypeptider med en C-terminal carboxamidgruppe er ikke mulig. Der er dog isoleret en hel række naturlige peptider med en C-terminal carboxamidgruppe, såsom PHI, VIP, CRF, nervevækstfaktor, oxytocin, cholecystokinin, gastrin, calcitonin, vasopressin, mellitin, melanotropin og især den væksthormonfrigørende faktor, der herefter vil blive kaldt GRF.  
10

GRF dannes i hypothalamus og stimulerer i hypofysen sekretionen af væksthormonet. Tidligere kunne GRF dog ikke isoleres fra ekstrakter af humanhypothalamus. Fra en pankreastumor hos mennesker kunne man dog isolere et peptid bestående af 44 aminosyrer, som in vitro og in vivo udviser GRF-aktivitet (R. Guillemin m.fl., Science 218 (1982) 585-587). Dette peptid har følgende aminosyresekvens:  
15  
20 H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>.

I EP-A-0.070.675 diskuteres, at man kunne fremstille humant calcitonin ved, at man først fremstiller et forprodukt, ved hvilket der ved den C-terminale ende translateres et yderligere glycin. Dette glycin skal derefter omdannes enzymatisk til en carboxamidgruppe af den foregående aminosyre. Denne omdannelse skal foretages med gær-carboxypeptidase Y.  
25  
30

Det fremgår imidlertid af en artikel af Breddam et al., Carlsberg Res. Commun., bind 45, side 237-247 (1980), at gær-carboxypeptidase Y ikke er egnet til gennemførelse af denne omdannelse (jf. skema 1 på side 244).

35 I en artikel af A.F. Bradbury et al., "Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes", Nature, bind 298, nr. 5874, side 686-688 (12. august 1982), anføres,

at på grund af den almindeligt kendte substratspecificitet af enzymer hydrolyserer det dér beskrevne homogenisat af svinehypofyser tripeptiderne D-Tyr-Val-Gly eller tripeptider, hvori valinet i position 2 er erstattet med Phe eller Gly, 5 men ikke hvori valin er erstattet med D-Ala, Lys eller Asp (side 688, 3. afsnit).

I en artikel af I. Husain et al., FEBS Letters, bind 152, side 277-281 (1983), anføres yderligere, at det dér beskrevne enzym fra neurosekretoriske granula i hypofysen 10 hos okser hydrolyserer peptidet <Glu-His-Pro-Gly.

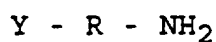
Ingen af de ovenfor anførte artikler beskriver følgende, at et peptid med -Leu-Gly som C-terminus kan hydrolyseres. Det fremgår heller ikke af artiklerne, om de beskrevne enzymer ikke også har en endolytisk aktivitet, hvilket er 15 af betydning, fordi GRF har glyciner som potentielle angrebepunkter i positionerne 15, 32 og 39 (jf. den ovenfor anførte polypeptidsekvens). Herudover skal det bemærkes, at de i artiklen af Bradbury et al. anvendte forsøgssubstrater er tripeptider med en N-terminal D-aminosyre. Anvendelsen af 20 sådanne substrater er et kunstgreb, som ganske vist forøger peptidernes stabilitet, men samtidig fører til en struktur som ikke kan sammenlignes med strukturen af naturlige substrater, som naturligvis kun indeholder L-aminosyrer.

På denne baggrund må det derfor betragtes som over- 25 raskende, at det ifølge opfindelsen nu har vist sig, at et homogenisat af svinehypofyser har -Leu-Gly-specificitet. Iøvrigt er det nævnte homogenisat af svinehypofyser også fordelagtigt frit for enhver endolytisk aktivitet.

Herved åbnes mulighed for en genteknisk/enzymatisk 30 fremstilling af polypeptider med en C-terminal gruppe -Leu-CONH<sub>2</sub> og især peptider med GRF's aminosyresekvens og delsekvenser af sådanne peptider.

Opfindelsen angår således:

1) En fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid 35 med formlen



I

hvor Y er en methioningruppe eller en via methionin  
 bundet gruppe af et bakterieprotein, og  
 R er en peptidsekvens af aminosyrer, der kan  
 kodes genetisk, og hvor den sidste aminosyre  
 er leucin,  
 5 hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at et polypeptid  
 med formlen



10 hvori Y og R har de ovenfor angivne betydninger,  
 fremstilles genteknisk, og produktet omdannes enzymatisk  
 til polypeptidet med formlen I ved hjælp af et homogenisat  
 af svinehypofyser.

R betyder fortrinsvis aminosyresekvensen (GRF 1-n),  
 15 hvor GRF er væksthormonfrigørende faktor, og n er 16 til 44.

2) Et polypeptid med formlen



hvor R har den ovennævnte foretrukne betydning, og n er 44.

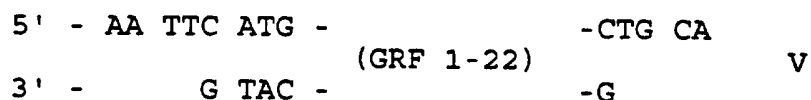
20 3) Et polypeptid med formlen



hvor R er GRF's aminosyresekvens, idet der dog i stilling  
 25 27 er Leu i stedet for Met.

4) Fusionsproteiner, som er ejendommelige ved, at de  
 har den ovenfor angivne formel II, hvor R har den ovenfor  
 anførte foretrukne betydning, og n er 44, idet et bakterielt  
 protein er bundet til methioningruppens aminogruppe.

30 5) En DNA-sekvens, som er ejendommelig ved formlen



35

hvor (GRF 1-22) er codonerne for aminosyrerne 1-22 i GRF.



I 5'-enden af den indkodende streng findes en vedhængende DNA-sekvens svarende til restriktionsendonuclease EcoRI, i 3'-enden af den indkodende streng derimod den enkeltstrengede vedhængende sekvens, der svarer til restriktionsenzymet SalI. Disse to indbyrdes forskellige genkendelsessekvenser sørger for indsætning af DNA i plasmider i den ønskede orientering.

Mellem disse genkendelsessekvenser og codonerne for aminosyrerækkefølgen findes i 5'-enden på den indkodende streng codonet for aminosyren methionin (som i DNA-sekvensen I har tallet 0). I enden på denne streng følger efter den triplet, der koder for leucin, codonet 45 for glycin og 2-terminationstripletter.

Et internt enkelt skæringsted for restriktionsenzymet PstI (i codon 24 på den indkodende streng eller codon 23 på den ikke-indkodende streng) muliggør subkloning af to genfragmenter, som kan indbygges i vel undersøgte kloningvektorer, såsom ca. pBR322 eller pUC8. Desuden indbygges inden for strukturgenet en række yderligere singulære genkendelsessekvenser for restriktionsendonucleaser, som skaffer adgang for GRF's delsekvenser:

Restriktions- enzym	Snit eft. nukleotid nr. (indkod. streng)	Peptidfragment
		aminosyre fra til
Pvu II	56	1-16
PstI	79	1-24
Xba I	90	1-29
Hinf I	105	1-34
Bst N I	114	1-36
Xho I	127	1-41

0

DNA-Sekvensen I kan opbygges af 13 oligonucleotider med en længde på 18-20 nucleotider, idet den først syntetiseres kemisk og derefter bindes enzymatisk via "klæbrige ender" af 4-6 nucleotider.

5

Ved DNA-sekvens I er der endvidere taget hensyn til, at de aminosyrer, hvortil der skal knyttes flere codoner, ikke er ækvivalente, men frembyder flere forskellige præferencer i den pågældende værtscelle såsom *Escherichia coli*. Desuden reduceres palindrome sekvenser til det mindst mulige.

10

DNA-Sekvens I's genstruktur er således let tilgængelig ud fra relativt små byggesten, muliggør subkloning af to genfragmenter til velkendte vektorer og tillader disses ekspression i stort udbytte. Afhængigt af indsætningen af det syntetiske gen i kloningsvektoren eksprimeres det ønskede peptid med GRFs aminosyresekvens umiddelbart eller i form af et fusionsprotein med et bakterielt protein såsom  $\beta$ -galactosidase. Sådanne fusionsproteiner bliver derpå på i og for sig kendt måde spaltet kemisk eller enzymatisk.

15

20

Som eksempel på en delsekvens, der fører til et peptid med GRFs første 16 aminosyrer med endestillet carbonamidgruppe (og en methioningruppe i aminoenden), kan nævnes en modificeret DNA-sekvens I, hvor tripletterne nr. 45-57 bindes umiddelbart ved triplet nr. 16. Noget tilsvarende gælder for de peptidfragmenter, der er anført i den foregående tabel og som har aminosyrerne indtil nr. 24, 29, 34, 36 og 41. Analogt kan f.eks. også en delsekvens med de første 26 aminosyrer fremstilles.

25

30

Som eksempel på et modificeret GRF kan nævnes et polypeptid, hvor methioninet i stilling 27 er erstattet med leucin. Hertil erstattes i DNA-sekvens I tripletten nr. 27 med følgende:

35

27

Leu

CTG

GAC

5 Yderligere variationer fremgår af DNA-sekvens II, hvorudfra - af hensyn til forenkling - kun den in-kodende streng er vist.

Når R er GRF's aminosyresekvens, idet der i stilling 27 er Leu, kan methioninet i aminoenden skil-  
10 les fra ved hjælp af bromcyanfraspaltning. Hvis der ved den gentekniske syntese fås et fusionsprotein, fjernes den uønskede del i bakterieproteinet ved brom-cyanfraspaltningen.

Indsætningen af det syntetiske gen eller gen-  
15 fragment i kloningsvektorerne, f.eks. plasmiderne pUC 8, pBT 322, pKK 177.3, ptac 11 og andre i handelen værende eller alment tilgængelige plasmider sker på i og for sig kendt måde. I denne forbindelse henvises til Maniatis' lærebog (Molecular Cloning, Maniatis m.fl.,  
20 Cold Spring Harbor, 1982).

Transformationen af de således opnåede hy-bridplasmider i egnede værtsorganismer, bedst E. coli, er ligeledes i og for sig kendt og nøje beskrevet i den lige nævnte lærebog. Udvindingen af det eksprimerede  
25 protein, bromcyanspaltningen og oparbejdningen er be-skrevet af Guillemin ovenfor.

Opfindelsen vil i det følgende blive forkla-  
ret ved hjælp af eksempler, i hvilke der forklares y-  
derligere udførelsesformer for opfindelsen, og af dis-  
30 se vil der for fagmanden fremgå mange mulige modifika-tioner og kombinationer. Procentangivelserne er her be-regnet på vægt, når andet ikke er anført.

0

Eksempel 1Kemisk syntese af enkeltstrenget oligonucleotid

Med genbyggeren Ia som eksempel, der omfatter nucleotiderne 1-27 i den indkodende streng, forklares syntesen af genbyggeren. Ved hjælp af kendte metoder (M.J. Gait m.fl., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 1081-1096) bindes det i 3'-enden værende nucleosid, i det foreliggende tilfælde også adenosin (nucleotid nr. 27) covalent til kieselgel ("Fractosil"<sup>®</sup>) fra firma Merck) via 3'-hydroxyfunktionen. Herved omsættes først kieselgelen under fraspaltning af ethanol med 3-(triethoxysilyl)-propylamin, hvorved der opstår en Si-O-Si-binding. Adenosinet omsættes som N<sup>6</sup>-benzoyl-3'-O-succinoyl-5'-dimethoxytritylether i nærvær af paranitrophenol og N,N'-dicyclohexylcarbodiimid med den modificerede bærer, idet succinoylgruppens frie carboxygruppe acylerer propylamingruppens aminogruppe.

I de følgende syntesetrin anvendes som basekomponent 5'-O-dimethoxytrityl-nucleosid-3'-phosphorsyremonomethylester-dialkylamid eller -chlorid, hvor adeninet forekommer som N<sup>6</sup>-benzoylforbindelse, cytosinet som N<sup>4</sup>-benzoylforbindelse, guaninet som N<sup>2</sup>-isobutyrylforbindelse, og tymin, der ikke indeholder nogen aminogruppe, er uden beskyttelsesgruppe.

100 mg af den polymere bærer, der indeholder 4  $\mu$ mol bundet adenin, behandles i rækkefølge med følgende stoffer:

- (a) Nitromethan
- (b) Mættet zinkbromidopløsning i nitromethan med 1% vand
- (c) Methanol
- (d) Tetrahydrofuran
- (e) Acetonitril
- (f) 80  $\mu$ mol af det tilsvarende nucleosidphosphit og 400  $\mu$ mol tetrazol i 1 ml vandfri acetonitril (5 minutter)

35

0

(g) 20% acetanhydrid i tetrahydrofuran med  
40% lutidin og 10% dimethylaminopyridin  
(2 minutter)

(h) Tetrahydrofuran

5

(i) Tetrahydrofuran med 20% vand og 40% lutidin

(j) 3% jod i kollidin/vand/tetrahydrofuran i  
volumenforholdet 5:4:1

(k) Tetrahydrofuran

10

(l) Methanol

15

Ved "phosphit" skal her forstås desoxyribose-3'-monophosphorsyre-monomethylester, idet den 3. valens er mættet med chlor eller en tertiær aminogruppe, f.eks. en morpholinogruppe. Udbytterne af de enkelte syntesettrin kan måles spektrofotometrisk efter detrityleringsreaktionen (b) ved måling af dimethoxytritylkationens absorption ved en bølgelængde på 496 nm

20

Efter afsluttet syntese af oligonucleotidet fraspaltes oligomerens methylphosphatbeskyttelsesgrupper ved hjælp af p-thiokresol og triethylamin. Derpå fraskilles oligonucleotidet fra den faste bærer ved en 3 timer lang behandling med ammoniak. Ved en behandling i 2-3 dage af oligomeren med koncentreret ammoniak fraspaltes basernes aminobeskyttelsesgrupper kvantitativt.

25

Det således opnåede råprodukt renses ved højtrykssvæschromatografi (HPLC) eller ved polyacrylamid-gelelektrophorese.

30

Ganske på tilsvarende måde syntetiseres også de øvrige genbyggerne i B-IIG, hvis nucleotidrækkefølge fremgår af DNA-sekvensen III.

### Eksempel 2

#### De enkeltstrengede oligonucleotiders enzymatiske binding til genfragmenterne I og II

35

Med henblik på phosphorylering af oligonucleotidierne i 5'-endestillingen behandles hver 1 nmol af oligonucleotiderne Ia og Ib med 5 nmol adisonintriphosphat

0

med 4 enheder T4-polynucleotid-kinase i 20  $\mu$ l 50 mmolær tris-HCl-puffer (pH 7,6), 10 mmolær magnesiumchlorid og 10 mmolær dithiothreitol (DDT) i 30 minutter ved 37°C (C.C. Richardson, Progress in Nucl. Acids Res. 2 (1972), 825). Enzymet deaktiveres ved 5 minutters opvarmning til 95°C. Derpå hybridiseres oligonucleotiderne Ia og Ib mod hinanden, idet man opvarmer dem i vandig opløsning i 2 minutter til 95°C og derpå afkøler langsomt til 5°C.

10

Analogt phosphoryleres oligonucleotiderne Ic og Id samt Ie og If og hybridiseres parvis.

15

Til genfragmentet II hybridiseres oligonucleotiderne IIa med IIb samt IIc med IIg parvis, og de tilbageblevne oligonucleotider IIc, IIe og IIe hybridiseres fælles.

De således opnåede tre oligo-nucleotidpar til genfragmentet I eller de to oligo-nucleotidpar og oligo-nucleotidtripel til genfragment II liggeres på følgende måde:

20

De dobbeltstrengede nucleotider kombineres og liggeres i hhv. 40  $\mu$ l 50 mmolær tris-HCl-puffer, 20 mmolær magnesiumchlorid og 10 mmolær DTT ved hjælp af 100 enheder T4-DNA-ligase ved 15°C i løbet af 16 timer.

25

Rensningen af genfragmenterne I og II sker ved hjælp af gelelektrophorese på en 15% polyacrylamidgel (uden urinstofttilsætning, 20 x 40 cm, 1 mm tyk), idet der som mærkningstof anvendes "ØX 174 DNA" (firma BRL), skåret med Hinf I.

30

### Eksempel 3

Fremstilling af hybridplasmider, som indeholder genfragmenterne I og II

(a) Indsætning af genfragment I i pBR 322.

35

Plasmid pBR 322, der findes på markedet, åbnes på kendt måde med restriktionsendonucleaserne EcoRI og PstI som anvist af producenten. Nedbrydningsmateria-

0 let fraskilles på kendte måde på en 5% polyacrylamid-  
gel ved hjælp af elektroforese, og brudstykkerne gøres  
synlige ved hjælp af farvning med ethidiumbromid eller  
ved hjælp af radioaktiv mærkning ("nick-translation"  
5 ifølge Maniatis, ovenfor). Plasmidbåndene udskæres der-  
på fra acrylamidgelen og fraskilles elektrophoretisk  
fra polyacrylamidet.

10 1 µg plasmid liggeres så med 10 ng genfragment  
I natten over ved 16°C. Herved fås det i fig. 1 viste  
hybridplasmid.

(b) Indsætning af genfragmentet II i pUC 8.

Analogt med (a) udskæres det i handelen væren-  
de plasmid pUC 8 med PstI og SalI og liggeres med genfrag-  
mentet II. Der fås det på fig. 2 viste hybridplasmid.

15 (c) Indsætning af et modificeret genfragment.

Analogt med (b) kan også et modificeret gen-  
fragment II indsættes, hvor - som for DNA-sekvensen II i  
nucleotid-tripletten nr. 27-codonet for leucin indsættes.  
Dette modificerede genfragment II fås ved en tilsvarende  
20 modificeret syntese af genbyggerne IIA og IIB, idet  
sekvensen ATG i byggeren IIA erstattes med CTG og til-  
svarende i genbyggeren IIB sekvensen TAC erstattes med  
GAC.

25 Eksempel 4

Syntese af det komplette gen

(a) Transformation og amplifikation.

De således opnåede hybridplasmider transforme-  
res i E. coli. Hertil gøres stammen E. coli K 12 egnet  
30 ved behandling med en 70 mmolær calciumchloridopløsning  
og tilsættes suspensionen af hybridplasmidet i 10 mmolær  
tris HCl-puffer (pH 7,5) eller 70 mmolær calciumchlorid-  
opløsning. De transformerede stammer selektioneres som  
vanligt ved udnyttelse af de ved hjælp af plasmidet op-  
35 nåede antibiotikaresistenser eller -sensibiliteter, og  
hybridvektorerne amplificeres. Efter at cellerne er  
dræbt, isoleres hybridplasmiderne, opskæres med de oprin-

0 deligt anvendte restriktionsenzymmer, og genfragmenterne I og II isoleres ved gelelektrophorese.

(b) Binding af genfragmenterne.

De ved amplifikation opnåede genfragmenter Ia og Ib bindes enzymatisk som beskrevet i eksempel 2, og  
5 det således opnåede syntetiske gen indsættes sammen med DNA-sekvensen I i kloningsvektorer.

Eksempel 5

10 Syntese af hybridplasmider, der indeholder det komplette gen

(a) Indsætning i pKK 177.3

Ekspressionsplasmidet pKK 177.3 (plasmid ptac 11, Amman m.fl., Gene 1983, 167-178, hvor der i EcoRI-  
15 genkendelsesstedet syntetisk indsættes en sekvens, som indeholder et SallI-skæringssted) åbnes med restriktionsenzymmerne EcoRI og SallI og ligeres med det syntetiske gen svarende til DNA-sekvensen I. Herved anbringes det indsatte gen bag ved plasmid pKK 177.3's regulationsre-  
20 gion. Efter tilsætning af en egnet igangsætter såsom isopropyl- $\beta$ -thiogalacto-pyranosid (IPTG) dannes et mRNA, som fører til ekspresion af polypeptidet Met-GRF-Gly.

(b) Indsætning i pWH1

Ekspressionsplasmidet pWH1 består af en pBR  
25 322-andel og af genet for  $\beta$ -galactosidase med dets regulationsregion (fig. 3 på tegningen). Til fremstilling heraf skæres 10  $\mu$ g pBR 322 med restriktionsendonucleaserne EcoRI og PvuII og adskilles elektrophoretisk i 5%  
30 polyacrylamidgel. Efter at DNS-båndet er gjort synligt med ethidiumbromid (eller ved radioaktiv mærkning), udskæres det største bånd (2292 basepar) fra gelen og befries ved elektroeluering fra polyacrylamid. Fra en Lac-transducerende phag såsom  $\lambda$  eller  $\phi$  80 dlac udspaltes genet for  $\beta$ -galactosidase ved omsætning med EcoRI og delvis  
35 omsætning med Pvu II. Analogt med den ovenfor beskrevne oparbejdning isoleres et fragment på ca. 3185 nucleotidpar. Dette fragment bærer Lac-operonets intakte regula-

0 tionsregion og  $\beta$ -galactosidasens genetiske information  
 med aminosyrerne 1-1005. Ved ligering af dette Lac-  
 -DNA-fragment i DNA-fragmentet fra plasmidet pBR 322 fås  
 plasmidet pWH 1 med regulationsregionen fra Lac-operon,  
 5  $\beta$ -galactosidasens kodningssekvens (aminosyrerne 1 til  
 1005), ampicillin-resistensgenet fra pBR 322 og replika-  
 tionsregionen fra pBR 322. Derved kan Lac-operonets na-  
 turlige regulationsregion erstattes med vilkårlige svnte-  
 tiske regulationsregioner såsom eksempelvis tac. Dette  
 10 plasmid indeholder ved  $\beta$ -galactosidasens aminosyre 1005  
 et enestående EcoRI-skæringssted, som kan benyttes som  
 kloningssted for eukaryotiske gener.

Til DNA-sekvensen I kan der liggeres en kemisk-  
 syntetisk kobler, som indeholder genkendelsessekvenserne  
 15 for restriktionszymerne SalI og EcoRI:

5'-TCGACGCCCG  
 GCGGGCTTA-5'

20 Efter restriktionsenzymkløvning med EcoRI fås  
 et DNA-fragment flankeret af EcoRI-genkendelsessekvenser.  
 Et sådant fragment kan derefter integreres i det med  
 EcoRI åbnede plasmid pWH1.

Hertil åbnes pWH1 med EcoRI og dephosphoryli-  
 25 seres med bakteriel alkalisk phosphatase i EcoRI-brud-  
 stedets 5'-ender. Herved forhindres en ligering af plas-  
 midet med sig selv, og "baggrunden" af transformerede  
 bakteriekulturer med ikke rekombinant plasmid reduceres  
 betydeligt. Kun sådanne plasmider kan sluttes ringfor-  
 30 migt, som har et genfragment integreret med flankerende  
 EcoRI-genkendelsessekvenser.

#### Eksempel 6

##### Transformation af hybridplasmider

35 Kompetente E. coli-celler transformeres med  
 0,1-1  $\mu$ g plasmid pWH1, som sammenligeres med 10  $\mu$ g GRF-  
 gen og udstryges på ampicillin-agarplader. Derpå kan

0 integrationen af GRF-genet og dets integrationsretning  
i plasmidet bestemmes ved hurtig DNA-oparbejdning (Ma-  
niatis, ovenfor).

#### 5 Eksempel 7

##### Ekspression

Efter transformation af disse hybridplasmider  
i E. coli eksprimeres et fusionsprotein, som i Met-GRF-  
sekvensens aminoende bærer  $\beta$ -galactosidases 1005 amino-  
10 syrer. Efter bromcyanspaltning fås et GRF-Gly-derivat.

Analogt hermed fås modificerede GRF-proteiner,  
f.eks. det produkt, hvor der som aminosyre nr. 27 er leu-  
cin i stedet for methionin.

#### 15 Eksempel 8

##### Oparbejdning og rensning

Bakteriestammerne, der er dyrket til den ønske-  
de optiske tæthed, induceres med en egnet induktor, f.  
eks. IPTG, i tilstrækkelig lang tid, f.eks. 2 timer.  
20 Herefter dræbes cellerne med 0,1% kresol og 0,1 mmolær  
phenylmethyl-sulfonylfluorid (benzylsulfonylfluorid).  
Efter centrifugering eller filtrering opbrydes celle-  
massen i en vandig-sur opløsning ved pH 3,0 i et egnet  
apparat (French Presse eller "Dyno-mølle"<sup>®</sup>), hvorpå de  
25 uopløselige bestanddele centrifugeres fra. Fra det o-  
venpå flydende lag isoleres proteinerne ved hjælp af  
Guillemin's (se ovenfor) metode. Ved hjælp af HPLC-  
analyseteknik kontrolleres produktets berigelse og ren-  
hed.

30 Methioninet (eller ved fusionsproteiner også  
den del af det til methioninet bundne bakterieprotein  
såsom  $\beta$ -galactosidase) fraskilles ved bromcyanspaltning,  
og GRF-derivatet ekstraheres surt og renses (Guillemin  
ovenfor).

35 Fusionproteiner med en  $\beta$ -galactosidaseandel  
kan allerede i råekstrakten af de lyserede bakterier

0

på grund af deres strømningsegenskaber, der afviger fra autentisk  $\beta$ -galactosidase, påvises ved gelelektrophorese. Efter bromcyanspaltningen bestemmes - som nævnt ovenfor - GRF-derivatets renhedsgrad og berigelse tillige med varianterne deraf ved hjælp af HPLC.

5

Karakteriseringen af produkter med hensyn til GRF-aktivitet kan ske immunologisk og biologisk.

10

Ved en radioimmunanalyse reagerer det bakteriologisk fremstillede GRF og varianter deraf med et antistof mod syntetisk GRF med aminosyresekvensen 1-44. Radioimmunanalysen udformes bedst som indirekte immunfældningsanalyse med anti-GRF-antistof og anti-IgG-anti-GRF-antistof. Radioimmunanalysens følsomhed er 10 ng GRF.

15

Ved den biologiske prøve afprøves det bakteriologisk fremstillede produkt og varianter heraf på rotter med hensyn til væksthormonfrigørelse. Hertil anvendes anæstetiserede rotter, der får indgivet produktet eller varianter heraf intravenøst, og frigørelsen af væksthormonet i rotterne blod påvises radioimmunologisk.

20

25

30

35

## DNA-Sequens I

Triplet-nr.				0	1	2	3			
Aminosyre				Met	Tyr	Ala	Asp			
Nucleotid-nr.		1	5							
Indkodende streng		5'		ATG	TAC	GCT	GAC			
5	Ikke-inakodende streng		3'	G	TAC	ATG	CGA	CTG		
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Ala	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Val
	20		25		30	35		40		45
10	GCT	ATC	TTC	ACT	AAC	TCT	TAC	CGT	AAA	GTT
	CGA	TAG	AAG	TGA	TTG	AGA	ATG	GCA	TTT	CAA
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu
15	50		55		60	65		70		75
	CTG	GGT	CAG	CTG	TCT	GCT	CGT	AAA	CTG	CTG
	GAC	CCA	GTC	GAC	AGA	CGA	GCA	TTT	GAC	GAC
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
20	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Arg	Gln	Gln	Gly	Glu
	80		85		90	95		100		105
	CAG	GAC	ATC	ATG	TCT	AGA	CAG	CAG	GGT	GAA
	GTC	CTG	TAG	TAC	AGA	TCT	GTC	GTC	CCA	CTT
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
25	Ser	Asn	Gln	Glu	Arg	Gly	Ala	Arg	Ala	Arg
	110		115		120	125		130		135
	TCT	AAC	CAG	GAA	CGT	GGT	GCT	CGA	GCT	CGT
	AGA	TTG	GTC	CTT	GCA	CCA	CGA	GCT	CGA	GCA
30										
	44	45	46	47						
	Leu	Gly	Stp	Stp						
	140		145	149						
	CTG	GGT	TAA	TAG			3'			
35	GAC	CCA	ATT	ATC	AGC	T	5'			

DNA-Sekvens II (inkodende streng)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ATG	1A1	GCT	GAC	GCT	ATC	TTC	ACT	A2C	TCT	TAC	CGT	A2A	2TT
Met	Tyr	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Val
	His							Ser				Arg	Ile

14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
CTG	GGT	CAG	CTG	T31	GCT	CGT	AAA	CTG	CTG	CA4	GA3	ATC	3TG
Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Met
				Tyr						His	Glu		Leu

28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
abc	ACA	CAG	CAG	GGT	GAA	deT	AAC	CAG	GAA	Clm	5GT	GCT	CGA
Ser	Arg	Gln	Gln	Gly	Glu	Ser	Asn	Gln	Glu	Arg	Gly	Ala	Arg
Asn						Arg				Gln	Arg		

42	43	44	45	46	47
fg1	hi1	CTG	GGT	TAA	TAG
Ala	Arg	Leu	Gly	Stp	Stp
Phe	Asn				

1 = T eller C    abc = TCT eller AAC  
 2 = A eller G    de = TC eller CG  
 3 = C eller A    fg = GC eller TT  
 4 = G eller T    hi = AA eller CG  
 5 = G eller C    lm = AA, AG, GA, GG eller GT



P A T E N T K R A V .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid med formlen

5 hvor 
$$Y - R - NH_2 \qquad I$$
 Y er en methioningruppe eller en via methionin bundet gruppe af et bakterieprotein, og R er en peptidsekvens af aminosyrer, der kan kodes genetisk, og hvor den sidste aminosyre er leucin,

10 k e n d e t e g n e t ved, at et polypeptid med formlen



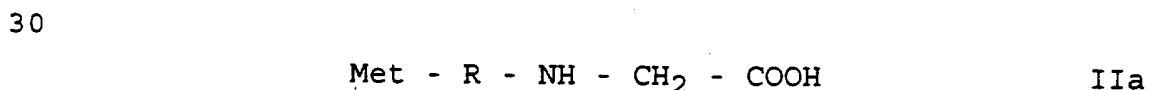
hvori Y og R har de ovenfor angivne betydninger, fremstilles genteknisk, og produktet omdannes enzymatisk til polypeptidet med formlen I ved hjælp af et homogenisat af svinehypofyser.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et peptid med formlen II, hvor R ikke indeholder nogen methioningruppe, fremstilles genteknisk, hvorefter gruppen Y fraskilles ved bromcyanfraspaltning.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at R er aminosyresekvensen (GRF 1-n), hvor GRF er væksthormonfrigørende faktor, og n er 16 til 44.

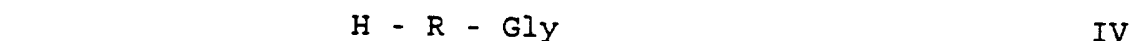
25 4. Fremgangsmåde ifølge et eller flere af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at der ved den gentekniske fremstilling af polypeptidet med formlen II bag ved den for glycin kodende triplet findes 2 stopcodoner.

5. Polypeptid med formlen



hvor R har den i krav 3 nævnte betydning, og n er 44.

6. Polypeptid, k e n d e t e g n e t ved formlen





14. E. coli-værtsorganismer, k e n d e t e g n e t  
ved, at de indeholder hybridplasmiderne ifølge krav 11-13.

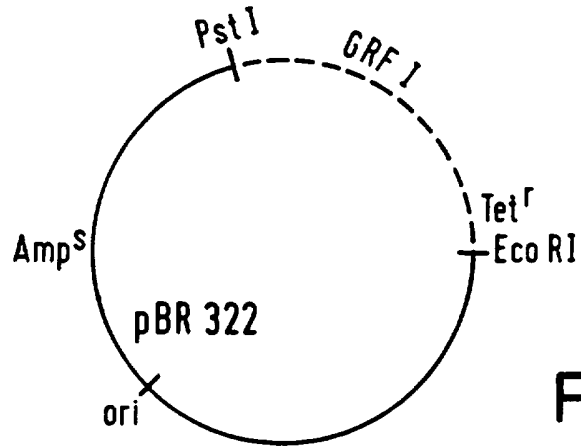


FIG.1

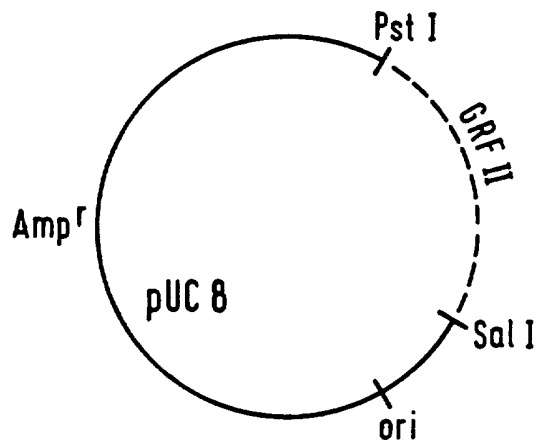


FIG.2

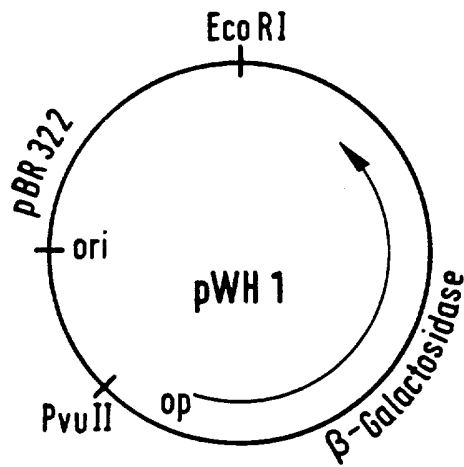


FIG.3