FI0000959158

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT
95915

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 04 1996

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6
C 07K 7/40, 7/10, C 12N 15/63

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 900600

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 07.02.90

(24) Alkupäivä - Löpdag 07.02.90

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 10.08.90

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.12.95

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
09.02.89 US 308352 P
04.08.89 US 388201 P

SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. Eli Lilly And Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Chance, Ronald Eugene, 19303 Flippin Road, Westfield, IN 46074, USA, (US)
2. DiMarchi, Richard Dennis, 3815 Wolf Creek Circle, Carmel, IN 46032, USA, (US)
3. Frank, Bruce Hill, 8025 Claridge Road, Indianapolis, IN 46260, USA, (US)
4. Shields, James Edwin, 17808 Grassy Branch Road, Noblesville, IN 46060, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten insuliinianalogien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara insulinanaloger

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:

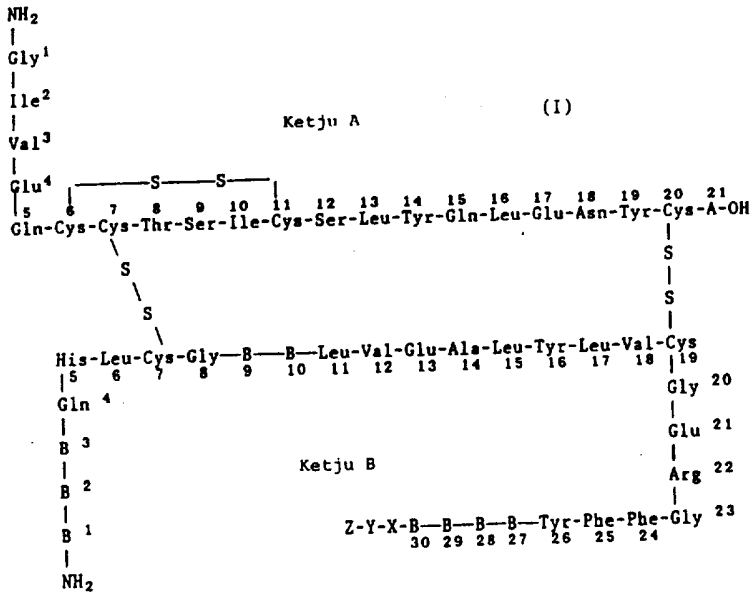
B-15624	NRRL
B-15830	NRRL
B-15993	NRRL
B-18216	NRRL

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 195691 (C 12N 15/00),
The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 8. painos, ed. Gilman, G.A., et al., kappale 61, pp 1463-1495 (1990),
Protein Engineering 2 (1988) 167, Protein Engineering 1 (1987) 205-213

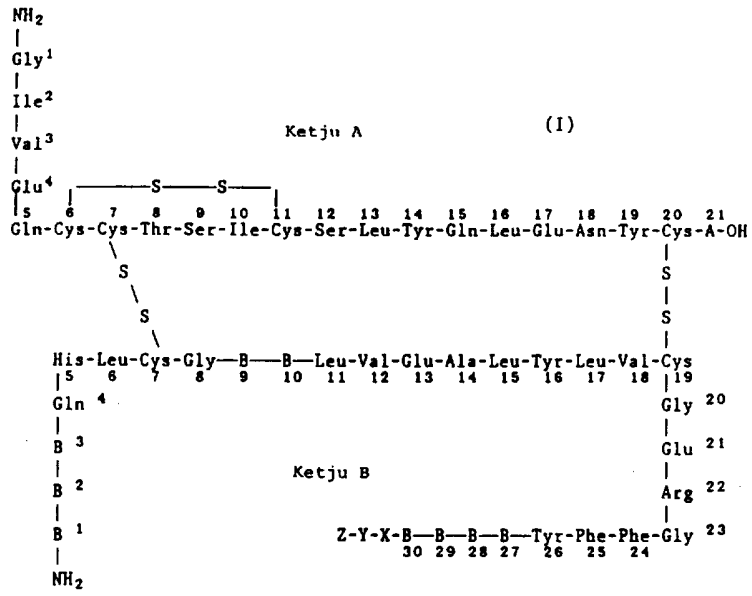
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää insuliinin analogien valmistamiseksi, joilla on kaava



jossa A21 on alaniini, asparagiini, asparagiinihappo, glutamiini, glutamiinihappo, glysiini, treoniini tai seriini; B1 on fenyylialaniini, asparagiinihappo tai puuttuu; B2 on valiini tai se voi puuttua, kun B1 puuttuu; B3 on asparagiini tai asparagiinihappo; B9 on seriini tai asparagiinihappo; B10 on histidiini tai asparagiinihappo; B27 on treoniini tai puuttuu; B28 on mikä tahansa aminohappo, B29 on L-proliini, D-proliini, D-hydroksiproliini, L-hydroksiproliini, L-(N-metyylilysiini), D-lysiini, L-(N-metyyliargininiini) tai D-argininiini; B30 on alaniini, treoniini tai puuttuu; Z on -OH, $-NH_2$, $-OCH_3$ tai $-OCH_2CH_3$; X on Arg, Arg-Arg, Lys, Lys-Lys, Arg-Lys, Lys-Arg tai puuttuu; ja Y, joka voi olla läsnä ainoastaan, kun X on läsnä, on Glu tai aminohapposekvenssi, joka käsittää seuraavan sekvenssin kokonaan tai osittain: -Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg- ja joka alkaa sekvenssin N-pääte-Glu:sta. Näillä ihmisen insuliinin analogeilla, joita on modifioitu B-ketjun asemassa 29 ja valinnaisesti muissa asemissa, on muuttuneet fysikaalis-kemialliset ja farmakokineettiset ominaisuudet ja ne ovat käyttökelpoisia veren liikasokerisuuden hoidossa.

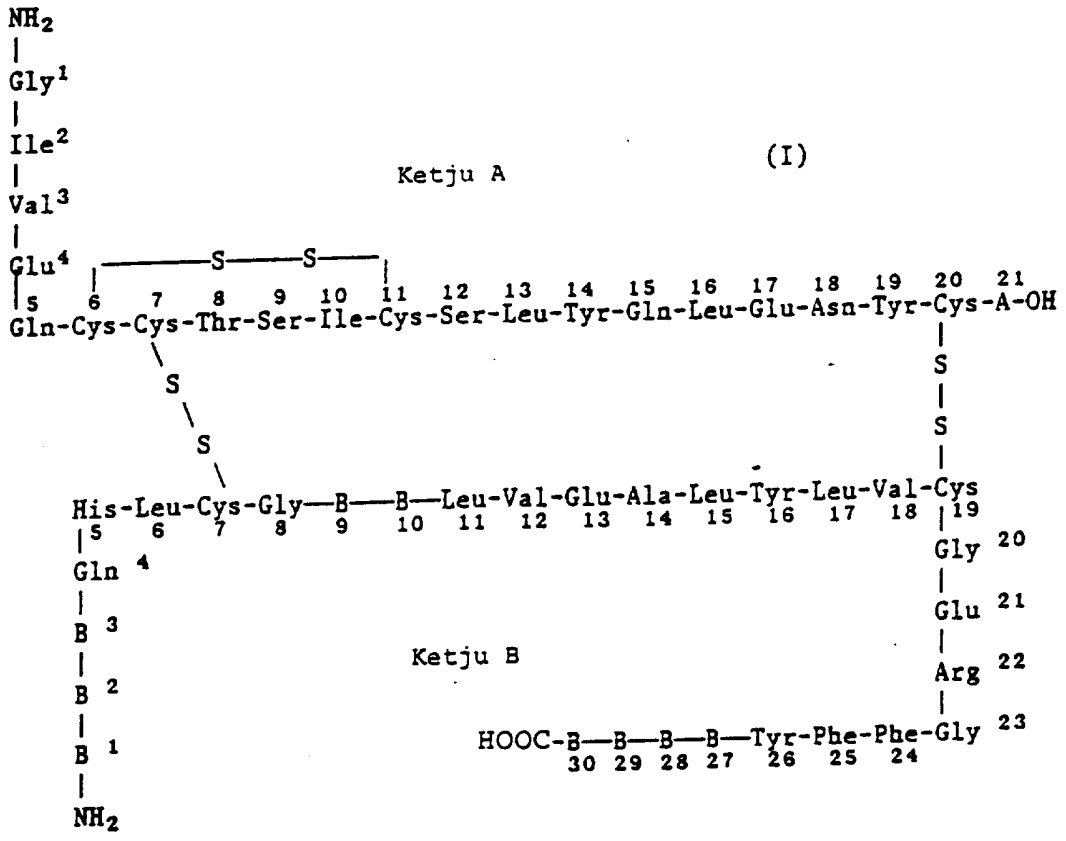
Uppfinningen avser framställning av insulinanaloger med formeln I, vari A21 är alanin, asparagin, asparaginsyra, glutamin, glutaminsyra, glycin, treonin eller serin; B1 är fenylalanin, asparaginsyra eller saknas; B2 är valin eller kan saknas då B1 saknas; B3 är asparagin eller asparaginsyra; B9 är serin eller asparaginsyra; B10 är histidin eller asparaginsyra; B27 är treonin eller saknas; B28 är någon aminosyra, B29 är L-prolin, D-prolin, D-hydroxiprolin, L-hydroxiprolin, L-(N-metyllysin), D-lysin, L-(N-metylarginin) eller D-arginin; B30 är alanin, treonin eller saknas; Z är -OH, $-NH_2$, $-OCH_3$ eller $-OCH_2CH_3$; X är Arg, Arg-Arg, Lys, Lys-Lys, Arg-Lys, Lys-Arg eller saknas, och Y som kan vara närvarande endast då X är närvarande, är Glu eller en aminosyrasekvens, vilken kan omfatta hela eller endast en del av sekvensen -Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg- och vilken börjar vid sekvensens N-terminala Glu. Dessa humaninsulinanaloger, vilka transformerats i B-kædjans 29-ställning och eventuellt i andra ställningar, har omformade fysikalkemiska och farmakokinetiska egenskaper och de är användbara vid behandlingen av hyperglykemi.



Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten insuliinianalogien valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää insuliinin analogien valmistamiseksi, joita on modifioitu alkuperäisen ihmisen insuliinin B-ketjun aminohappoasemassa 29 ja valinnaisesti muissa asemissa. Mainitut insuliinin analogit ovat vähemmän taipuvaisia dimeroitumaan tai liittymään keskenään suuremman molekyylipainon omaaviksi muodoiksi, minkä vuoksi niiden aktiivisuus alkaa suhteellisesti nopeammin niiden säilyttäessä samalla alkuperäisen ihmisen insuliinin biologisen aktiivisuuden.

Tässä keksinnössä tarjotaan menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen, kaavan I mukaisen insuliinin analogin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi



jossa A21 on asparagiini tai alaniini, B1 on fenyylialaniini tai puuttuu, B2 on valiini tai voi puuttua, kun B1 puuttuu, B3 on asparagiini tai asparagiinihappo, B9 on seriini, B10 on histidiini tai asparagiinihappo, B27 on treoniini, B28 on asparagiinihappo, valiini, leusiini, isoleusiini, norleusiini, proliini, arginiini, histidiini, sitrulliini, ornitiini, lysiini, fenyylialaniini, alaniini, glysiini, alfa-aminovoihappo, kysteiinihappo, glutamiini, glutamiinihappo, metioniini, treoniini, tyrosiini tai norvaliini, B29 on L-proliini, D-proliini, L-hydroksiproliini tai D-hydroksiproliini ja B30 on treoniini, alaniini tai puuttuu.

Tämä keksintö tarjoaa myös menetelmässä käyttökelpoisen välituotteen, joka sisältää edellä esitetyn B-ketjun.

Veren liikasokerisuutta voidaan hoitaa antamalla tarvitsevalle potilaalle tehokas määrä kaavan I mukaista insuliinin analogia.

Tässä esitettyjä kuvioita ei ole piirretty mittasuhteiltaan tarkasti oikein.

Kuvio 1 - Plasmidin pKC283 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 2 - Plasmidin pKC283PX restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 3 - Plasmidin pKC283-L restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 4 - Plasmidin pKC283-LB restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 5 - Plasmidin pKC283-PRS restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 6 - Plasmidin pL32 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 7 - Plasmidin pNM789 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 8 - Kaavioesitys plasmidin 120 kokoonpanemisesta.

Kuvio 9 - Plasmidin pL47 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 10 - Plasmidin pPR12 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 11 - Plasmidin pPR12AR1 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 12 - Plasmidin pL110 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 13 - Kaavioesitys plasmidin pL110C kokoonpanemisesta.

Kuvio 14 - Plasmidin pCZR126S restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 15 - Synteettisen ihmisen proinsuliinigeenin nukleotidisekvenssi.

Kuvio 16 - Plasmidin pRB145 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 17 - Plasmidin pRB164A restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 18 - Plasmidin pRB172 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 19 - Plasmidin pRB173 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kuvio 20 - Plasmidin pRB175 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta.

Kaava I on tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen insuliinin analogien aminohapposekvenssin pikakirjoitusesitys. Aminohappojen lyhennyksillä on seuraavat tavanomaiset merkitykset:

Lyhennys	Aminohappo
Aba	α-aminovoihappo
Ala	alaniini
Arg	arginiini
Asn	asparagiini
Asp	asparagiinihappo
Cya	kysteiinihappo
Cys	Kysteiini
Gln	glutamiini
Glu	glutamiinihappo
Gly	glysiini
His	histidiini
Ile	isoleusiini
Leu	leusiini
Lys	lysiini
Met	metioniini
Nle	norleusiini
Nva	norvaliini
Orn	ornitiini
Phe	fenyylialaniini
Pro	proliini
Ser	seriini
Thr	treoniini
Trp	tryptofaani
Tyr	tyrosiini
Val	valiini

B28 on mieluimmin asparagiinihappo, valiini, leusiini, isoleusiini, norleusiini, proliini, arginiini, histidiini, sitrulliini, ornitiini, lysiini, fenyylialaniini, alaniini tai glysiini. Yllä mainituista aminohapoista muodostavat erityisen hyvänä pidetyn alaryhmän asparagiinihappo, valiini, leusiini, isoleusiini, norleusiini, proliini, arginiini, histidiini, ornitiini tai lysiini. Lysiiniä pidetään kaikkein parhaimpana aminohappona kohdassa

B28. B29 on L-proliini, D-proliini, D-hydroksiproliini tai L-hydroksiproliini. Aivan erityisen hyvänä pidetty tämän keksinnön mukainen insuliinin analogi on sellainen, jossa B28 on lysiini ja B29 on proliini, ts. käänteinen järjestys verrattuna alkuperäisen ihmisen insuliinin aminohappo-sekvenssiin B-ketjun asemissa 28 ja 29.

Alla tarkastellaan myös muita tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen insuliinin analogien muunnoksia. ts. muunnoksia insuliinin analogien muissa asemissa kuin asemat B28 ja B29. Erityisesti voi olla toivottavaa korvata valinnaisesti Asn-jäännös A-ketjun asemasta 21 (ts. karboksipääte) jäännöksellä Ala. Samoin voi olla toivottavaa korvata B-ketjun asemassa 3 oleva Asn-jäännös asparagiinihapolla (Asp). Sellaiset valinnaiset korvaamiset suurentavat analogien stabiiliutta äärimmäisillä pH-arvoilla, koska Asn on erityisen altis amidoryhmän lohkaisuja toisiintumisreaktioille sekä alhaisessa että korkeassa pH:ssa. Alan ammattitaidon omaava huomaa myös helposti, että insuliinin analogien glutamiinijäännökset voivat olla samoin alttiita amidoryhmän lohkaisulle ja toisiintumiselle. Niin ollen niiden korvaaminen glutamiinihapolla kuuluu myös tämän keksinnön piiriin. Muita valinnaisia tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen insuliinin analogien muunnoksia ovat (minä tahansa yhdistelmänä) asemassa B10 olevan histidiinijäännöksen korvaaminen aminohapolla asparagiinihappo; asemassa B30 olevan treoniinijäännöksen korvaaminen alaniinilla; aminohappojen deleetio asemassa B1 (des-B1) yksin tai yhdessä deleetion asemassa B2 kanssa (des-B2); ja treoniinin deleetio asemasta B-30 (des-B30).

Kuten yllä on mainittu, keksintö käsittää myös menetelmän insuliinin analogien farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi. Erityisen hyvinä pidettyjä sellaisia suoloja ovat sinkin, natriumin, kaliumin, magnesiumin tai kalsiumin suolat.

Tässä esitetyt insuliinin analogit voidaan valmistaa käyttäen mitä tahansa monista erilaisista tunnetuista peptidisynteesin tekniikoista mukaan lukien klassisia (liuos-) -menetelmiä, kiinteän faasin menetelmiä, puolisynteettisiä menetelmiä ja viime aikoina käyttöön tulleita yhdistelmä-DNA-menetelmiä.

Kiinteän faasin menetelmässä aminohapposekvenssi kootaan peräkkäin lähtien ensimmäisestä liukenemattomasta, kantajahartsiin kiinnitetystä C-terminaalisesta aminohaposta. Kiinteän faasin menetelmän tekniikkoja ovat kuvanneet J. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, Freeman and Co., San Francisco, 1969.

Yleensä kiinteän faasin menetelmässä halutun peptidin C-terminaalista aminohappojäännöstä vastaava aminohappo kiinnitetään liukenemattomaan kantajahartsiin ja peptidiketju muodostetaan sitten alkaen hartsiin kiinnitetystä C-terminaalisesta aminohaposta. Yksittäisiä aminohappoja liitetään peräkkäin, kunnes on aikaansaatu haluttu aminohapposekvenssi. Vaihtoehtoisesti voidaan valmistaa pieniä peptidikappaleita ja liittää ne peptidiketjuun halutussa järjestyksessä. Peptidiketju pysyy kiinnittyneenä hartsiin synteesin ajan ja ketjun valmiiksi saamisen jälkeen peptidi lohkaistaan hartsista.

Peptidiketju on kiinnittynyt polystyreenihartsiin esterisidoksen avulla, joka on muodostunut C-terminaalisen jäännöksen karboksyyliryhmän ja sellaisen spesifisen metyleeniryhmän välille, joka on hartsimatriisissa läsnä kohtana sellaista kiinnittymistä varten.

Aminohapot liitetään käyttäen tekniikoita, jotka tunnetaan alalla peptidisidosten muodostamista varten. Yhteen menetelmään liittyy aminohapon muuttaminen johdannaiseksi, joka tekee karboksyyliryhmän alttiimmaksi reagoimaan peptidikappaleen vapaan N-terminaalisen aminoryhmän kanssa. Esimerkiksi voidaan aminohappo muuttaa sekaanhydridiksi antamalla suojatun aminohapon reagoida etyy-

liklooriformiaatin, fenyylikloriformiaatin, sek-butyylikloriformiaatin tai isobutyylikloriformiaatin kanssa. Vaihtoehtoisesti voidaan aminohappo muuttaa sellaiseksi aktiiviseksi esteriksi kuin esimerkiksi 2,4,5-trikloorifenyyliesteri, pentakloorifenyyliesteri, p-nitrofenyyliesteri, n-hydroksisukkiini-imidiesteri tai esteri, joka on muodostettu 1-hydroksibentsotriatsolista.

Erääseen toiseen kytkentämenetelmään liittyy sopivan kytkentäaineen, kuten esimerkiksi N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidin (DCC) tai N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidin (DIC) käyttö. Alan asiantuntijat huomaavat ilman muuta muita sopivia kytkentäaineita. Katso Schroder ja Lubke, The Peptides, Academic Press, 1965, kappale III, joka liitetään tähän viitteenä.

Huomattakoon, että kunkin peptidisynteesissä käytetyn aminohapon α-aminoryhmän täytyy olla suojattuna kytkemisreaktion aikana sellaisten sivureaktioiden estämiseksi, joihin osallistuu reaktiivinen α-aminoryhmä. Huomattakoon myös, että eräät aminohapot sisältävät reaktiivisia sivuketjun funktionaalisia ryhmiä (esim. sulfhydryyli, -amino, ß- ja -karboksyyli, imidatsoli, guanido ja hydroksyyli), ja että sellaisten funktionaalisten ryhmient äytyy myös olla suojattuja sekä ensimmäisen että myöhempien kytkentävaiheiden aikana. Alalla tunnetaan sopivia suojaryhmiä. Katso esimerkiksi Protective Groups In Organic Chemistry, M. McOmie, toimittaja, Plenum Press, N.Y., 1973 ja US-patentti 4 617 149, joka liitetään tähän viitteenä.

Valittaessa määrättyä suojaryhmää täytyy ottaa huomioon eräitä ehtoja. α-aminon suojaryhmän (1) täytyy tehdä α-aminoryhmä inertiksi kytkentäreaktiossa käytetyissä olosuhteissa, (2) se täytyy voida poistaa helposti kytkentäreaktion jälkeen olosuhteissa, jotka eivät poista sivuketjujen suojaryhmiä eivätkä muuta peptidikappaleen rakennetta, ja (3) sen täytyy poistaa rasemoitumisen mahdollisuus aktivoitaessa välittömästi ennen kytkemistä. Sivuketjun

suojaryhmän (1) täytyy tehdä sivuketjun funktionaalinen ryhmä inertiksi kytkentäreaktiossa käytetyissä olosuhteissa, (2) täytyy olla stabiili olosuhteissa, joita käytetään poistettaessa α-aminon suojaryhmä, ja (3) täytyy olla helposti poistettavissa halutun aminohapposekvenssin valmiiksi saamisen jälkeen reaktio-olosuhteissa, jotka eivät muuta peptidiketjun rakennetta.

Alan asiantuntijoille on selvää, että suojaryhmien, joiden tiedetään olevan hyödyllisiä peptidisynteesissä, reaktiivisuus niiden poistamiseen käytettäviä aineita kohtaan vaihtelee. Esimerkiksi eräät suojaryhmät, kuten trifenyylimetyyli ja 2-(p-bifenylyyli)isopropyylioksikarbonyyli, ovat hyvin labiileja ja ne voidaan lohkaista pois lievästi happamissa olosuhteissa. Toiset suojaryhmät, kuten esimerkiksi t-butyylioksikarbonyyli, t-amyylioksikarbonyyli, adamantyylioksikarbonyyli ja p-metoksibentsyylioksikarbonyyli, ovat vähemmän labiileja ja vaativat kohtalaisen vahvoja happoja, kuten esimerkiksi trifluorietikkahappoa, kloorivetyhappoa tai booritrifluoridia etikkahapossa, niiden poistamiseksi. Vielä eräät suojaryhmät, kuten esimerkiksi bentsyylioksikarbonyyli, halogeenibentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli, sykloalkyylioksikarbonyyli ja isopropyylioksikarbonyyli, ovat vielä vähemmän labiileja ja vaativat vahvempia happoja, kuten esimerkiksi fluorivetyä, bromivetyä tai booritrifluoriasetaattia trifluorietikkahapossa niiden poistamiseksi.

Halutun peptidisekvenssin valmiiksi saamisen jälkeen suojattu peptidi täytyy lohkaista kantajahartsista ja kaikki suojaryhmät täytyy poistaa. Lohkaisureaktio ja suojaryhmien poistaminen voidaan suorittaa samanaikaisesti vai vaiheittain. Kun kantajahartsi on kloorimetyloitu polystyreenihartsi, sidos, joka kiinnittää peptidin hartsiin, on esterisidos, joka on muodostunut C-terminaalisen jäännöksen vapaan karboksyyliryhmän ja yhden monista hart-

simatriisissa läsnä olevista kloorimetyyliryhmistä välille. On selvää, että kiinnittävä sidos voidaan katkaista reagensseilla, joiden tiedetään kykenevän katkaisemaan esterisidoksen ja tunkeutumaan hartsimatriisiin. Yksi erityisen sopiva menetelmä on käsitteleminen nestemäisellä vedettömällä fluorivedyllä. Tämä reagenssi ei ainoastaan lohkaise peptidiä hartsista, vaan poistaa myös kaikki suojaryhmät. Käyttämällä tätä reagenssia saadaan siten suoraan peptidi, josta suojaus on kokonaan poistettu. Kun halutaan lohkaista peptidi poistamatta suojaryhmiä, voidaan suojatulle peptidihartsille suorittaa metanolyysi, jolloin saadaan suojattu peptidi, jossa C-terminaalinen karboksyyliryhmä on metyloitu. Metyyliesteri voidaan sitten hydrolysoida lievissä emäksisissä olosuhteissa, jolloin saadaan vapaa C-terminaalinen karboksyyli. Peptidiketjussa olevat suojaryhmät voidaan sitten poistaa käsittelemällä vahvalla hapolla, kuten esimerkiksi nestemäisellä fluorivedyllä. Erityisen käyttökelpoinen metanolyysin tekniikka on G. Mooren et al. julkaisema, Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp., M. Goodman ja J. Meienhofer, toimittajat, John Wiley, N.Y., 1977, s. 518 - 521, jossa suojattua peptidihartsia käsitellään metanolilla ja kaliumsyanidilla kruunueetterin läsnä ollessa.

Eräs toinen menetelmä suojatun peptidin lohkaisemiseksi hartsista on ammonolyysin suorittaminen tai käsittely hydratsiinilla. Haluttaessa voidaan tulokseksi saatu C-terminaalinen amidi tai hydratsidi hydrolysoida vapaaksi C-terminaaliseksi karboksyyliksi ja suojaryhmät voidaan poistaa tavanomaisesti.

Huomataan myös, että N-terminaalisessa α-aminoryhmässä läsnä oleva suojaryhmä voidaan poistaa mieluummin joko ennen suojatun peptidin lohkaisemista kantajahartsista tai samanaikaisesti sen kanssa.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen insuliinin analogien A- ja B-ketjut voidaan myös valmistaa yhdis-

telmä-DNA-metodologian avulla. Niiden valmistuksessa aikaansaadaan nukleotidisekvenssi, joka koodaa A- tai B-ketjun halutun peptidin käyttäen tekniikoita, jotka ovat nykyään tavallisia sellaisessa synteesissä. Näissä menetelmissä valmistetaan yleensä oligonukleotideja, jotka käsittävät sekä halutun koodaavan sekvenssin fragmentteja että sille komplementaarisen sekvenssin fragmentteja. Oligonukleotidit on suunniteltu siten, että aikaansaadaan koodaavan sekvenssin yhden fragmentin limittäinmeno komplementaarisen sekvenssin kahden fragmentin kanssa ja päinvastoin. Oligonukleotidit yhdistetään pareiksi ja liitetään, jolloin lopuksi saadaan haluttu geenisekvenssi.

Sekvenssi liitetään kloonausvektoriin kohtaan, joka sallii sen koodaaman peptidituotteen ilmentyvän. Sopiva kloonausvektori sisältää vähintään osan geenin ilmentämisen säätelysekvenssistä.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettujen insuliinin analogien A- ja B-ketjut voidaan myös valmistaa proinsuliinin kaltaisen edeltäjämolekyylin kautta käyttäen yhdistelmä-DNA-tekniikoita. Katso Frank et al., Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proc. Seventh Am. Pept. Symp., toimittajat D. Rich ja E. Gross (1981), joka liitetään tähän viitteenä.

Vaihe, jossa yhdistetään yksittäiset A- ja B-ketjut, olipa ne tuotettu millä tavalla tahansa, voidaan suorittaa käyttäen Chancen et al. menetelmää, Peptides: Synthesis, Structure and Function: Proc. of Seventh American Peptide Symposium (1981), joka liitetään tähän viitteenä.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että muodostetaan disulfidisilta kaavassa I esitetyn A-ketjun ja B-ketjun väliin, kuten kaavasta I ilmenee.

Seuraavien esimerkkien avulla pyritään valaisemaan tätä keksintöä.

Esimerkki 1

Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

A. Rekombinantista peräisin olevan A-ketjun valmistus

Valmistettiin ihmisen insuliinin A-ketju yhdistelmä-DNA-teknologian avulla syntetisoimalla kemiallisesti A-ketjun koodaava geeni ja ilmentämällä sitä E. colissa. Lyhyesti kuvattuna A-ketjun geeni syntetisoitiin valmistamalla erilaisista trinukleotideista synteettisiä fragmentteja, jotka olivat pituudeltaan deka- - pentadekanukleotideja, käyttäen blokki-fosfotriesterimenetelmää. Geenissä oli yksisäikeiset tarttuvat päät EcoRI- ja BamHI-restriktionukleaaseja varten. Liittämällä se sopivaan ilmentämisvektoriin, joka sisälsi ß-galaktosidaasigeenin (ß-gal), saatiin kimeerinen plasmidi, jossa oli A-ketju liitettynä ß-gal-geeniin metioniinin kodonin kautta. Käytetään mieluummin tryptofaanisyntetaasigeeniä (trp LE') promoottorina ß-gal-geenin asemesta suurempien ilmentymistasojen aikaansaamiseksi. Kimeerinen plasmidi transformoitiin E. coliin, josta oli seurauksena edeltäjäproteiinin, ts. ß-gal-met-A-ketjun (tai trp LE' -met-A-ketjun, kun käytetään trp LE' -promoottorisysteemiä) ilmentyminen. Edeltäjäproteiinin käsitteleminen syaanibromidilla katkaisi metioniinisidoksen, jolloin saatiin puhdistamisen jälkeen ihmisen insuliinin A-ketju. Hapettavan sulfitolyysin avulla saatiin s-sulfonoitu A-ketju, joka käytettiin yhdistämiseen B-ketjun (S-sulfonaatti) kanssa, kuten on kuvattu, infra.

Ihmisen insuliinin A-ketjun geenien kemiallisen synteesin täydelliset yksityiskohdat löytyvät julkaisusta Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 - 5769, 1978 ja siinä mainituista viitteistä, jotka liitetään tähän viitteenä. Ihmisen insuliinin A-ketjun kemiallisesti syntetisoidun geenin E. colissa ilmentämisen täydelliset yksityiskohdat löytyvät julkaisusta Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 101 - 110, 1979 ja siinä mainituista viitteistä, jotka liitetään tähän viitteenä.

B. B-ketjun analogin [Lys(B28), Pro(B29)] valmistaminen

Raaka peptidyylihartsi valmistettiin käyttäen Applied Biosystems 430A -peptidisyntetisoijaa (mukaan lukien ohjelmiston tarkistus 1.4). Käytettiin lähtömateriaalina 0,5 mmoolia kiinteää faasia olevaa hartsia (t-BOC-Thr(Bzl)OCH_2 Pam -hartsi) (0,76 mmol/g x 0,658 g). Kaikki käytetyt aminohapot olivat BOC-suojattuja ja glutamiinihappoa ja histidiiniä lukuun ottamatta kaikki käytettiin suoraan sellaisina kuin ne saatiin (ts. toiminimeltä Applied Biosystems, Inc. saaduissa koteloissa, joista kukin sisälsi suunnilleen 2 mmoolia suojattua aminohappoa). Glutamiinihappo ja histidiini saatiin toiminimeltä Peptides International Corporation ja siirrettiin koteloihin siten, että kukin kotelo sisälsi suunnilleen 2 mmoolia haluttua suojattua aminohappoa. Raa'an peptidyylihartsin kuivaamisen jälkeen (tyhjössä huoneenlämpötilassa yön ajan) määritettiin sen paino ja sitä verrattiin lähtöpainoon hyväksyttävän painonlisäyksen varmistamiseksi. Pienelle näyteannokselle suoritettiin aminohappoanalyysi, jotta varmistettaisiin, että haluttuja aminohappoja oli lisätty oikeina määrinä.

Peptidi lohkaistiin peptidyylihartsista ja sivuketjuista poistettiin suojaus sekoittamalla suunnilleen yhden tunnin ajan 0 °C:ssa liuoksessa, jossa oli 10 osaa (tilavuus/paino) HF:ä (joka sisälsi 5 tilavuus/tilavuus-% etyylimerkaptaania ja 5 tilavuus/tilavuus-% m-kresolia) yhtä osaa kohden peptidyylihartsia. Sen jälkeen kun suurin osa HF:stä oli poistettu tyhjön avulla, peptidi saostettiin etyylieetterissä. Sen jälkeen kun oli huuhdottu useita kertoja etyylieetterillä ja sen jälkeen tyhjösuodatettu, peptidi liuotettiin suunnilleen 200 ml:aan 7 M deionoitua ureaa, joka sisälsi 0,1 M Tris, 0,1 M Na_2SO_3 ja 0,01 M $Na_2S_4O_6$. Liuoksen pH säädettiin 8,5:ksi 5 N NaOH:lla ja sekoitettiin voimakkaasti yön ajan 4 °C:ssa.

Tulokseksi saatu S-sulfonoidun peptidin liuos lisättiin 5 x 215 cm:n Sephadex G 25 (hieno) -pylvääseen huoneenlämpötilassa. Näyte eluoitiin nopeudella 20 ml/min huoneenlämpötilassa käyttäen 50 mM ammoniumbikarbonaattia. Effluenttia tarkkailtiin aallonpituudella 276 nm. Koottiin 20 ml:n fraktioita ja yhdistettiin halutut fraktiot ja niitä puhdistettiin lisäksi korkeapainenestekromatografian (HPLC) avulla seuraavasti.

Haluttujen fraktioiden yhdistelmä pumpattiin 2,5 x 30 cm:n DuPont C8, 9 - 12 µ, HPLC-pylvääseen ja eluoitiin käyttäen lineaarista gradienttia, jossa asetonitriilin määrä suureni 100 mM ammoniumbikarbonaatissa, huoneenlämpötilassa (2,6 ml/min). Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 280 nm. Koottiin 25 ml:n fraktioita. Valituille fraktioille suoritettiin analyyttinen HPLC -analyysejä, jotta saataisiin selville säilytettävät fraktiot. Halutut fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin ja käytettiin seuraavassa yhdistämisessä A-ketjun kanssa, joka oli valmistettu kuten yllä on kuvattu.

C. Lys(B28), Pro(29) - ihmisen insuliinin valmistus

A- ja B-ketjun yhdistäminen suoritettiin käyttäen menetelmää, jonka ovat julkaisseet Change et al., supra. 700 mg yhdistelmä-DNA:n avulla saatua A-ketju-S-sulfonaattia ja 140 mg synteettistä Lys(B28), Pro(B29) -B-ketju-s-sulfonaattia (kummatkin saatu kuten on kuvattu yllä) liuotettiin vastaavasti 700 ml:aan ja 14 ml:aan 0,1 M glysiinipuskuriliuosta ympäristönlämpötilassa, kummankin pH säädettiin 10,5:ksi 5 N NaOH:lla ja sitten jäähdytettiin 5 °C:seen. Valmistettiin 6 ml liuosta, jossa oli ditiotreitolia (DTT) 10,5 mg/ml 0,1 M glysiinipuskurissa ympäristönlämpötilassa, säädettiin pH 10,5:ksi 5 N NaOH:lla ja jäähdytettiin sitten 5 °C:seen.

Yhdistettiin A- ja B-ketjun liuokset ja sitten lisättiin nopeasti 5,21 ml DTT-liuosta (SH/SSO_3^- = 0,90). Reaktioliuosta sekoitettiin 5 °C:ssa avonaisessa 200 ml:n

lasisessa sentrifugipullossa 2,5 tunnin ajan 5 °C:ssa. Lisättiin 45 ml jääetikkaa ja liuosta seisotettiin 5 °C:ssa yön ajan.

Tulokseksi saatua saostunutta seosta sentrifugoitiin 20 minuutin ajan nopeudella 2 000 kierrosta minuutissa 5 °C:ssa. Supernatantti yhdistettiin pelletin 1 M etikkahappopesuliuoksen kanssa ja lisättiin 5 x 200 cm:n Sephadex G-50 (erittäin hieno) -pylvääseen molaarisessa etikkahapossa 5 °C:ssa ja eluoitiin painovoiman avulla. Kootiin 20 minuutin fraktioita kolmen päivän ajan. Fraktiot tutkittiin aallonpituudella 276 nm ja jotkut analyyttisen HPLC:n avulla. Fraktiot, jotka sisälsivät Lys(28), Pro(29) -insuliinin analogisekvenssiä, yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 125 mg:n näyte. Tätä näytettä puhdistettiin lisäksi käänteisfaasi-HPLC:n avulla (käyttäen 2,12 x 25 cm:n DuPont C8 -pylvästä ja eluoiden huoneenlämpötilassa nopeudella 2,6 ml/min käyttäen lineaarista gradienttia, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,1 M NaH_2PO_4:ssa, pH 2,2). Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 276 nm. Valikoituja fraktioita tutkittiin analyyttisen HPLC:n avulla. Halutut fraktiot yhdistettiin ja niitä puhdistettiin lisäksi käytäen pH 7:n HPLC:a seuraavasti.

Alhaisen pH:n valmistavasta HPLC-ajosta saatu yhdistetty liuos laimennettiin suunnilleen 2-kertaiseksi jäähauteessa 0,1 M $(NH_4)_2HPO_4$:lla. pH säädettiin 7:ksi kylmällä 2 N NaOH:lla jäähauteessa. Näyte lisättiin samaan HPLC-pylvääseen ja eluoitiin siitä käyttäen samoja olosuhteita kuin alhaisen pH:n valmistavassa ajossa, paitsi että eluointipuskuri oli 0,1 M pH 7:n $(NH_4)_2HPO_4$/asetonitriili.

pH 7:n valmistavasta HPLC-ajosta saatu yhdistetty liuos jäähdytettiin jäähauteessa ja laimennettiin kaksinkertaiseksi 0,1-%:isen trifluorietikkahapon (TFA) vesiliuoksella. Lisättiin 1 N HCl (kylmää, näyte jäähauteessa) pH:n alentamiseksi 3:een. Näyte lisättiin Vydac C4 tai

vaihtoehtoisesti DuPont C8 -HPLC-pylvääseen (2,12 x 25 cm) ja eluoitiin lineaarisen gradientin avulla, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,1-%:isen TFA:n vesiliuoksessa. Tarkkailtiin effluenttia allonpituudella 214 nm tai 276 nm. Halutut fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin näytteen saannoksi 41 mg haluttua analogia, jonka puhtaus oli yli 97 % käänteisfaasi-HPLC:n mukaan.

Esimerkki 2

Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Toisessa menetelmässä Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin valmistamiseksi käytettiin entsymaattista puolisynteesiä (käänteistä proteolyysiä) des-oktapeptidi-insuliinin (A_{1-21} - B_{1-22}) yhdistämiseksi synteettisen oktapeptidin kanssa. Des-oktapeptidi-insuliini saatiin sian tai ihmisen luonnollisen insuliinin trypsiinihajotteesta, kuten ovat kuvanneet Bromer ja Chance, "Preparation and Characterization of Des-octapeptide-Insulin, Biochin. Biophys. Acta, 133:219 - 223 (1967), joka liitetään tähän viitteenä. Synteettinen oktapeptidi Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Lys-Pro-Thr valmistettiin automaattisen kiinteän faasin synteesina vulla yllä kuvatulla tavalla.

Des-oktapeptidi-insuliini (435 mg) ja 465 mg synteettistä peptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Lys-Pro-Thr yhdistettiin 15 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris-asetaattipuskuria pH 7,3. Peptidit liuotettiin täydellisesti lämmittämällä liuosta kuumalla levyllä. Liuosta inkuboitiin sitten 37 °C:ssa ja lisättiin 90 mg sian trypsiiniä. Liuosta sekoitettiin silloin tällöin 90 minuutin aikana 37 °C:ssa. Reaktio pysäytettiin yhdistämällä liuos 135 ml:n kanssa 0,05 N HCl.

Otsakkeen insuliinin analogi puhdistettiin lisäämällä analogin sisältävä happamaksi tehty liuos 2,5 x 25 cm:n C-8 Zorbax -HPLC-pylvääseen ja eluoimalla se li-

neaarisen gradientin avulla, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,1 M natriumdivetyfosfaattia pH 2,2 -puskurissa. Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 276 nm. Halutut fraktiot yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja lisättiin 1 x 25 cm:n C-8 Ultrasphere -HPLC-pylvääseen. Analogi eluoitiin lineaarisen gradientin avulla, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,5-%:isen TFA:n vesiliuoksessa. Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 276 nm. Yhdistettiin jälleen halutut fraktiot ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 125 mg puhdistettua analogia. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5809,2 (teoria: 5808,7).

Nopea-atomipommitus-massaspektroskopia-analyysit, jotka tässä on esitetty, suoritettiin käyttäen VG-ZAB-25E-kaksoisfokusoivaa massaspektrometriä, jonka resoluutio oli suunnilleen 1 500. Ihmisen insuliinin analogit liuotettiin glyserolin ja tioglyserolin seokseen, joka sisälsi oksaalihappoa. Cesiumjodidin avulla kalibroitiin instrumentti, jolla skannattiin magneettisesti välillä m/z 5 300 - m/z 6 500. Saadut tulokset on esitetty arvona keskimääräinen massa + 1.

Esimerkki 3

Aba(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (384 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Aba-Pro-Thr (362 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan massaspektroskopiaa, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (75 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä sekoitettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 137 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin

käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 59 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5765,7 (teoria: 5765,6).

Esimerkki 4

Ala(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ala-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (60 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä sekoitettiin silloin tällöin 60 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ami-

nohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5752,3 (teoria: 5751,6).

Esimerkki 5

Arg(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Arg-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (60 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 60 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 103 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5836,1 (teoria: 5836,7).

Esimerkki 6 (Vertailuesimerkki)

Asn(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (409 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asn-Pro-Thr (398 mg) yhdistettiin 14 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidio-

lia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (81 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 136 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaattipuskurissa pH 2.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 56 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5794,7 (teoria: 5794,6).

Esimerkki 7

Asp(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (400 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Asp-Pro-Thr (388 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (78 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 miuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 137 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 85 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5795,7 (teoria: 5795,6).

Esimerkki 8

Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

A. Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin B-ketjun valmistus

Valmistettiin raaka peptidyylihartsi käyttäen Applied Biosystems 430A -peptidisyntetisoijaa (mukaan lukien ohjelmiston tarkistus 1,4). Lähtömateriaalina käytettiin 0,5 mmoolia kiinteää faasia olevaa hartsia (t-BOC-Thr(Bzl)OCH_2 Pam -hartsi) (0,72 mmol/g x 0,705 g). Kaikki käytetyt aminohapot olivat BOC-suojattuja ja glutamiinihappoa, asparagiinihappoa ja histidiiniä lukuun ottamatta kaikki käytettiin suoraan sellaisina kuin ne saatiin (ts. toiminimeltä Applied Biosystems, Inc. saaduissa koteloissa, joista kukin sisälsi suunnilleen 2 mmol suojattua aminohappoa). Glutamiinihappo, asparagiinihappo ja histidiini saatiin kaupallisista lähteistä ja siirrettiin koteloihin ja siten että kukin kotelo sisälsi suunnilleen 2 mmoolia haluttua suojattua aminohappoa. Raakaa peptidyylihartsia kuivattiin tyhjössä huoneenlämpötilassa yön ajan ja sen painoa verrattiin lähtöpainoon hyväksyttävän painonlisäyksen varmistamiseksi. Pienelle näyteannokselle suoritettiin aminohappoanalyysi, jotta varmistettaisiin, että haluttuja aminohappoja oli lisätty oikeissa suhteissa.

Peptidi lohkaistiin peptidyylihartsista ja sivuketjuista poistettiin suojaus sekoittamalla suunnilleen tunnin ajan 0 °C:ssa liuoksessa, jossa oli 10 osaa (tilavuus/paino) HF:ä (joka sisälsi 5 tilavuus/tilavuus-% p-tiokresolia ja 5 tilavuus/tilavuus-% m-kresolia) yhtä osaa kohden peptidyylihartsia. Sen jälkeen kun suurin osa HF:stä oli poistettu tyhjön avulla, peptidi saostettiin etyylieetterissä. Sen jälkeen kun oli suoritettu useita huuhteluja etyylieetterillä ja sen jälkeen tyhjösuodatettu, peptidi liuotettiin suunnilleen 120 ml:aan 8 M guanidiini-HCl, pH 11, joka sisälsi 0,1 M tris, 35 mg/ml Na_2SO_3 ja 25 mg/ml $Na_2S_4O_6$. Liuoksen pH säädettiin 8,8:ksi 5 N NaOH:lla ja sekoitettiin voimakkaasti kolmen tunnin ajan huoneenlämpötilassa.

Tulokseksi saatu S-sulfonoidun peptidin liuos lisättiin 5 x 215 cm:n Sephadex G-25 (keskilaatu) -pylvääseen huoneenlämpötilassa. Näyte eluoitiin nopeudella 21 ml/min huoneenlämpötilassa käyttäen 50 mM ammoniumbikarbonaattia. Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 276 nm. Koottiin 25 ml:n fraktioita ja yhdistettiin halutut fraktiot ja niitä puhdistettiin lisäksi korkeapainenestekromatografian (HPLC) avulla seuraavasti.

Haluttujen fraktioiden yhdistelmä pumpattiin 2,5 x 30 cm:n DuPont C8, 9 - 12 µ, -HPLC-pylvääseen ja eluoitiin käyttäen lineaarista gradienttia, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 100 mM ammoniumbikarbonaatissa huoneenlämpötilassa (2,6 ml/min). Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 280 nm. Koottiin fraktioita (kukin 25 ml). Valikoiduille fraktioille suoritettiin analyyttinen HPLC -analyysejä säilytettävien fraktioiden selville saamiseksi. Halutut fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin ja käytettiin seuraavassa yhdistämisessä A-ketjun kanssa.

B. Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin B-ketjun yhdistäminen ihmisen insuliinin A-ketjun kanssa

A- ja B-ketjujen yhdistäminen suoritettiin käyttäen menetelmää, jonka ovat julkaisseet Chance et al., supra. Kaksi g yhdistelmä-DNA:n avulla saatua A-ketju-S-sulfonaattia ja 400 mg synteettistä Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) -B-ketju-S-sulfonaattia liuotettiin vastaavasti 200 ml:aan ja 40 ml:aan 0,1 M glysiinipuskuriliuosta ympäristönlämpötilassa, kummankin pH säädettiin 10,5:ksi 5 N NaOH:lla ja sitten jäähdytettiin 5 °C:seen. Valmistettiin liuos, jossa oli ditiotreitolia (DTT) 15,5 mg/ml 0,1 M glysiinipuskurissa ympäristönlämpötilassa, säädettiin sen pH 10,5:ksi 5 N NaOH:lla ja se jäähdytettiin sitten 5 °C:seen.

A- ja B-ketjujen liuokset yhdistettiin ja sitten lisättiin nopeasti 15,9 ml DTT-liuosta (SH/SSO_3^- = 1,0). Reaktioliuosta sekoitettiin avonaisessa 200 ml:n lasisessa sentrifugipullossa 19,6 tunnin ajan 4 °C:ssa. Lisättiin jääetikkaa (129 ml) ja liuosta seisotettiin 4 °C:ssa yhden tunnin ajan.

Tulokseksi saatua saostunutta seosta sentrifugoitiin 30 minuutin ajan nopeudella 2 000 kierrosta minuutissa 4 °C:ssa. Supernatantti yhdistettiin 292 ml:n kanssa milli-Q-vettä ja 73 ml:n kanssa asetonitriiliä ja puhdistettiin lisäksi käänteisfaasi-HPLC:n avulla (käyttäen 2,5 x 30 cm:n Vydac C18 -pylvästä ja eluoiden huoneenlämpötilassa nopeudella 2,6 ml/min käyttäen lineaarista gradienttia, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,1 M NaH_2PO_4:ssa, pH 2,1). Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 280 nm. Valikoituja fraktioita tutkittiin analyyttisen HPLC:n avulla ja halutut fraktiot yhdistettiin ja laimennettiin kaksinkertaiseksi 0,1-%:iseen trifluorietikkahappoon (TFA) vesiliuoksella ja lisättiin sitten Ultrasphere-oktyyli-HPLC-pylvääseen (1,0 x 25 cm) ja

eluoitiin käyttäen lineaarista gradienttia, jonka muodosti suureneva määrä asetonitriiliä 0,1-%:isen TFA:n vesiliuoksessa. Tarkkailtiin effluenttia aallonpituudella 280 nm. Valikoituja fraktioita tutkittiin analyyttisen HPLC:n avulla ja halutut fraktiot yhdistettiin ja puhdistettiin uudelleen käyttäen samaa pylvästä ja olosuhteita kuin yllä, mutta hiukan erilaista asetonitriiligradienttia. Asianmukaiset fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin saannoksi 65 mg insuliinin analogia, jonka puhtaus oli yli 93 % käänteisfaasi-HPLC:n mukaan. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5786,1 (teoria: 5786,7).

Esimerkki 9

Cya(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Suoritettiin permuurahaishappohapetus oktapeptidin kysteiinin muuttamiseksi kysteiinihappomuotoon. Synteettinen oktapeptidi Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Cys-Pro-Thr (363 mg) liuotettiin 36 ml:aan juuri valmistettua permuurahaishappoa jäällä jäähdytetyssä kolvissa ja sekoitettiin lievästi yhden tunnin ajan. Hapetettu materiaali laimennettiin kymmenkertaiseksi vedellä ja lyofilisoitiin. Lyofilisaatti käytettiin puolisynteesiin.

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (222 mg) ja synteettistä oktapeptidiä peptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Cya-Pro-Thr (225 mg) yhdistettiin 18 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (45 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 242 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vyac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 16 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5831,5 (teoria: 5831,7).

Esimerkki 10

Gln(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Gln-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan massaspektroskopiaa, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (60 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 60 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 87 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5809,4 (teoria: 5808,6).

Esimerkki 11

Glu(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (402 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Glu-Pro-Thr (398 mg) yhdistettiin 14 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (80 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 136 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 59 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5809,6 (teoria: 5809,6).

Esimerkki 12

Gly(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (412 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Gly-Pro-Thr (376 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (79 mg). Liuos sekoitettiin hy-

vin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 180 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 147 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 11 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5737,2 (teoria: 5737, 6).

Esimerkki 13

His(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (400 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-His-Pro-Thr (398 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (79 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 237 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin ne-

linkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 79 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5816,9 (teoria: 5817,7).

Esimerkki 14

Ile(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (409 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ile-Pro-Thr (398 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (81 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 136 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n c-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 57 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5793,7 (teoria: 5793,7).

Esimerkki 15

Leu(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (418 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Leu-Pro-Thr (410 mg) yhdistettiin 14 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (83 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 136 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 74 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5793,8 (teoria: 5793,7).

Esimerkki 16

Nle(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Nle-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (60 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 60 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 54 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5794,6 (teoria: 5793,7).

Esimerkki 17 (Vertailuesimerkki)

D-Lys(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (392 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-D-Lys-Thr (387 mg) yhdistettiin 13,5 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (78 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 136,5 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat,

eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 94 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5809,0 (teoria: 5808,7).

Esimerkki 18

Met(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (350 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Met-Pro-Thr (366 mg) yhdistettiin 12 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (71 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 118 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorpax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 72 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5811,8 (teoria: 5811,7).

Esimerkki 19

Orn(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Orn-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n c-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaattia pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväässä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 89 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5795,2 (teoria: 5794,7).

Esimerkki 20

Phe(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (290 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Phe-Pro-Thr (310 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (60 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 80 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 90 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250

mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaattigradientti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 17 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5827,9 (teoria: 5827,7).

Esimerkki 21

Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (339 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Pro-Thr (363 mg) yhdistettiin 9 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (70 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 80 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 108 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 10 x 250 mm:n C-8 Ultrasphere -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua

insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 97 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5778,6 (teoria: 5777,6).

Esimerkki 22 (Vertailuesimerkki)

Ser(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (412 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Ser-Pro-Thr (390 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (80 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 137 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 37 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5768,1 (teoria: 5767,6).

Esimerkki 23

Thr(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (437 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Thr-Pro-Thr

(420 mg) yhdistettiin 14,5 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (86 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 135,5 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 78 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5781,9 (teoria: 5781,6).

Esimerkki 24 (Vertailuesimerkki)

Trp(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (310 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Trp-Pro-Thr (325 mg) yhdistettiin 10,5 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (64 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 140 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen

matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta oli poistettu suolat, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 47 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5866,2 (teoria: 5866,7).

Esimerkki 25

Tyr(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (391 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Tyr-Pro-Thr (400 mg) yhdistettiin 13 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (79 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 137 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoi-

tiin, jolloin saatiin 30 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5843,7 (teoria: 5843,7).

Esimerkki 26

Val(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (400 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Val-Pro-Thr (383 mg) yhdistettiin 12 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yhden osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (78 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 238 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin nelinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,1-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 74 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5780,0 (teoria: 5779,6).

Esimerkki 27

Nva(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Sian des-oktapeptidi-insuliinia (292 mg) ja synteettistä oktapeptidiä Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Nva-Pro-Thr (279 mg) yhdistettiin 10 ml:ssa liuosta, joka sisälsi yh-

den osan dimetyylisulfoksidia, kaksi osaa 1,4-butaanidiolia ja yhden osan 0,25 M tris pH 7,3 -puskuria 37 °C:ssa. Lisättiin sian trypsiiniä (57 mg). Liuos sekoitettiin hyvin ja sitä hämmennettiin silloin tällöin 120 minuutin aikana 37 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin tämän ajan kuluttua lisäämällä seos 240 ml:aan 0,05 N HCl. Koko liuos pumpattiin 21 x 250 mm:n C-8 Zorbax -pylvääseen ja tuotteet eluoitiin käyttäen matalaa asetonitriiligradienttia 0,1 M natriumdivetyfosfaatti pH 2 -puskurissa.

Asianmukaiset fraktiot, jotka oli määritetty analyyttisen HPLC:n avulla, yhdistettiin, laimennettiin kaksinkertaiseksi vedellä ja pumpattiin 25 x 300 mm:n C-18 Vydac -pylvääseen. Proteiini, josta suolat oli poistettu, eluoitiin pylväästä käyttäen asetonitriiligradienttia 0,5-%:isessa trifluorietikkahapossa. Puhdistettua insuliinin analogia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 51 mg. Rakenne varmistettiin aminohappoanalyysin (taulukko I) ja massaspektroskopian (MS) avulla.

MS: 5780,0 (teoria: 5779,6).

Esimerkki 28

Käyttäen tässä esitettyjä menetelmiä, valmistettiin lisäksi seuraavat insuliinin analogit:

(a) des(Phe-B1), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(b) des(Phe-B1), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(c) des(Phe-B1, Val-B2), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(d) des(Phe-B1, Val-B2), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(e) Ala(A21), Asp(B10), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(f) des(Thr-B30), Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(g) Asp(B10), Arg(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

(h) Ala(A21), Arg(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Esimerkki 29

Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini

Rekombinanttivektorien ja -isäntien muodostaminen

A. Plasmidin pCZR126S kokoonpaneminen

1. Plasmidin pKC283 eristäminen

E. coli K12 BE1201/pKC283 -lyofiilisaatteja hankittiin laboratoriolta the Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604 talletusnumeron NRRL B-15830 omaavina. Lyofilisaatit dekantoitiin putkiin, jotka sisälsivät 10 ml LB-elatusainetta (10 g Bacto-tryptonia, 5 g Bacto-hiivauutetta ja 10 g NaCl litraa kohden; pH oli säädetty 7,5:een) ja inkuboitiin kahden tunnin ajan 32 °C:ssa, jonka ajan kuluttua viljeltiin lisättiin ampisilliinia pitoisuudeksi 50 µg/ml ja sitten inkuboitiin 32 °C:ssa yön ajan. E. coli K12 BE1201/pKC283 -soluja viljeltiin 32 °C:ssa, koska soluissa oli lämmölle herkkä cI-repressorigeeni integroituneena solu-DNA:han. Kun tässä plasmidineristysmenetelmässä käyteteään soluja, joissa on villin tyypin lambda-pL-repressorigeeni tai joissa ei ole lambda-pL-promoottoria, kuten on kuvattu tässä myöhemmissä esimerkeissä, on inkubaatiolämpötila 37 °C.

Pieni osa yli yön kasvatettua viljelmää sijoitettiin LB-agar (LB-elatusaine, jossa on Bacto-agaria 15 g/l) -levyille, jotka sisälsivät ampisilliinia 50 µg/ml, sillä tavoin, että saataisiin yhden ainoan kolonian isolaatti E. coli K12 BE1201/pKC283:a. Saatu yksi ainoa pesäke siirrostettiin 10 ml:aan LB-elatusainetta, joka sisälsi ampisilliinia 50 µg/ml ja inkuboitiin yön ajan 32 °C:ssa ravistaen voimakkaasti. Yön ajan kasvatettu 10 ml:n viljelmä siirrostettiin 500 ml:aan LB-elatusainetta, joka sisälsi ampisilliinia 50 µg/ml ja inkuboitiin 32 °C:ssa ravistaen

voimakkaasti, kunnes viljelmä saavutti stationaarisen vaiheen.

Seuraava menetelmä on sovellutus teoksesta Maniatis et al., 1982 Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory).

Solut koottiin sentrifugoimalla nopeudella 4 000 g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa ja supernatantti heitettiin pois. Solupelletti pestiin 100 ml:ssa jääkylmää STE-puskuriliuosta (0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; ja 1 mM EDTA). Pesun jälkeen solupelletti uudelleensuspendoitiin 10 ml:aan liuosta 1 (50 mM glukoosi; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; ja 10 mM EDTA), joka sisälsi lysotsyymiä 5 mg/ml ja jätettiin huoneenlämpötilaan 10 minuutin ajaksi. Sitten lisättiin 20 ml liuosta 2 (0,2 N NaOH ja 1 % SDS) lysotsyymillä käsitellyille soluille ja liuos sekoitettiin varovaisesti kääntelemällä ylösalaisin. Seosta inkuboitiin jään päällä 10 minuutin ajan.

Liuotettujen solujen seokseen lisättiin 15 ml jääkylmää 5 M kaliumasetaattia, pH 4,8 ja liuos sekoitettiin kääntelemällä ylösalaisin. Liuosta inkuboitiin jään päällä 10 minuutin ajan. Valmistettiin 5 M kaliumasetaattiliuos lisäämällä 11,5 ml jääetikkaa 28,5 ml:aan vettä ja 60 ml:aan 5 M kaliumasetaattia; tulokseksi saatu liuos on kaliumin suhteen 3 M ja asetaatin suhteen 5 M.

Liuotettua soluseosta sentrifugoitiin käyttäen Beckman SW27:ä (tai sen vastinetta) nopeudella 20 000 kierrosta minuutissa 20 minuutin ajan 4 °C:ssa. Solu-DNA ja -jätteet muodostivat pelletin putken pohjalle. Noin 36 ml supernatanttia otettiin talteen ja lisättiin 0,6 tilavuutta isopropanolia, sekoitettiin ja tulokseksi saatu liuos jätettiin huoneenlämpötilaan 15 minuutin ajaksi. Plasmidi-DNA koottiin sentrifugoimalla nopeudella 12 000 g 30 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Supernatantti heitettiin pois ja DNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla huoneenlämpötilassa. Etanoli dekantoitiin pois ja pel-

letti kuivattiin tyhjöeksikkaattorissa. Pelletti suspendoitiin sitten uudelleen 8 ml:aan TE-puskuriliuosta (10 mm Tris-HCl, pH 8,0 ja 1 mM EDTA).

DNA-liuokseen lisättiin 8 g CsCl. Noin 0,8 ml liuosta, jossa oli etidiumbromidia 10 mg/ml vedessä, lisättiin kutakin 10 ml kohden CsCl-DNA-liuosta. Liuoksen lopullinen tiheys oli noin 1,55 g/ml ja etidiumbromidin konsentraatio oli noin 600 µg/ml. Liuos siirrettiin Beckman tyyppi 50 -sentrifugiputkeen, täytettiin aivan täyteen parafiiniöljyllä, suljettiin ja sentrifugoitiin nopeudella 45 000 kierrosta minuutissa 24 tunnin ajan 20 °C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen voitiin nähdä tavallisessa valossa kaksi DNA-vyöhykettä. Kun oli poistettu kansi putkesta, alempi DNA-vyöhyke poistettiin käyttäen ruiskua, johon kuului ihon alle työnnettävä nro 21:n neula, joka työnnettiin sisään sentrifugiputken kyljen kautta.

Etidiumbromidi poistettiin uuttamalla useita kertoja vedellä kyllästetyllä 1-butanolilla. CsCl poistettiin dialysoimalla TE-puskuriliuosta vastaan. Sen jälkeen kun oli suoritettu uuttoja puskuroidulla fenolilla ja sitten kloroformilla, DNA saostettiin, pestiin 70-%:isella etanolilla ja kuivattiin. Saatiin noin 1 mg plasmidia pKC283 ja se säilytettiin 4 °C:ssa TE-puskurissa konsentraationa noin 1 µg/µl. Plasmidin pKC283 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 1.

2. Plasmidin pKC283PX kokoonpaneminen

Noin 10 µl esimerkissä 1 valmistettua plasmidi-pKC283-DNA:ta sekoitettiin seoksen kanssa, jossa oli 20 µl 10 X keskinkertaisen suolapitoisuuden omaavaa restriktiopuskuriliuosta (500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM $MgCl_2$; ja 10 mM DTT), 20 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA-liuosta, 5 µl restriktioentsyymiä PvuII (noin 50 yksikköä, kuten Bethesda Research Laboratories (BRL) on määritellyt, jolta laboratoriolta kaikki tässä käytetyt res-

triktioentsyymit hankittiin) ja 145 µl vettä ja tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Tässä kuvatut restriktioentsyymireaktiot lopetettiin tavallisesti fenolin avulla ja suorittamalla sitten kloroformiuuttoja, joita seurasi DNA:n saostaminen, etanolipesu ja DNA:n uudelleensuspendointi TE-puskuriliuokseen. Sen jälkeen kun PvuII:lla pilkkominen oli päätetty yllä kuvatulla tavalla, PvuII:lla pilkottu plasmidi-pKC283-DNA saostettiin ja uudelleensuspendoitiin sitten 5 µl:aan TE-puskuriliuosta.

Noin 600 pikomoolille (pM) XhoI-"linker"-kappaleita (5'-CCTCGAGG-3') suoritettiin kinaasikäsittely seoksessa, joka sisälsi 10 µl 5 X kinaaripuskuria (300 mM Tris-HCl, pH 7,8; 50 mM $MgCl_2$; ja 25 mM DTT), 5 µl 5 mM ATP, 24 µl H_2O, 0,5 µl T4-polynukleotidikinaasia (noin 2,5 yksikköä, kuten P-L-Biochemicals on määritellyt), 5 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA-liuosta ja 5 µl 10 mM spermidiiniä, inkuboimalla seosta 37 °C:ssa 30 minuutin ajan.

Noin 12,5 µl kinaasilla käsiteltyjä XhoI-"linker"-kappaleita lisättiin 5 µl:n joukkoon PvuII:lla pilkottua plasmidi-pKC283-DNA:ta ja sitten lisättiin DNA:n joukkoon 2,5 µl 10 X ligaasipuskuria (300 mM Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM $MgCl_2$; ja 50 mM DTT), 2,5 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA:a, 7 µl 5 mM ATP, 2,5 µl (noin 2,5 yksikköä kuten P-L Biochemicals on määritellyt) T4-DNA-ligaasia, 2,5 µl 10 mM spermidiiniä ja 3 µl vettä. Tulokseksi saatua ligaatioreaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa yön ajan. Ligaatioreaktion jälkeen reaktioseokselle järjestettiin runsassuolaisen puskuriliuoksen koostumus (0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5; 10,0 mM $MgCl_2$; ja 1 mM DTT). Seokseen lisättiin noin 10 µl (100 yksikköä) restriktioentsyymiä XhoI ja tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan.

Reaktio lopetettiin ja XhoI:llä pilkottu DNA saostettiin, suspendoitiin uudelleen ja sille suoritettiin

ligaatio kuten yllä on kuvattu, paitsi että ligaatioseokseen ei lisätty XhoI-"linker"-kappaleita. DNA, jolle oli suoritettu ligaatio, muodosti halutun plasmidin pKC283PX. Plasmidin pKC283PX restriktiokohtia ja tehtäviä kuvaava kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 2.

3. E. coli K12 MO(λ⁺)/pKC283PX:n kokoonpaneminen

E. coli K12 MO(λ⁺):a voidaan saada laboratoriolta the Northern Regional Research Laboratories lyofilisoidussa muodossa talletusnumeron NRRL B-15993 omaavana. E. coli K12 MO(λ⁺) sisältää villin tyypin lambda-pL-cI-repressorigeenin, niin että transkriptiota tämän keksinnön mukaisesta hybridi pL-lpp -promoottorista ei tapahdu E. coli K12 MO(λ⁺) -soluissa. Lyofiilit kunnostettiin, eristettiin yksittäisiä MO(λ⁺)-kolonioita ja valmistettiin MO(λ⁺)-solujen yön ajan kasvatettu 10 ml:n viljelmä olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmän mukaisesti, paitsi että inkubaatiolämpötila oli 37 °C ja elatusaineissa ei käytetty ampisilliinia.

Siirrostettiin 50 µl yön ajan kasvatettua viljelmää 5 ml:aan LB-elatusainetta, joka sisälsi myös 10 mM $MgSO_4$ ja 10 mM $MgCl_2$. Viljelmää inkuboitiin 37 °C:ssa yön ajan ravistaen voimakkaasti. Seuraavana aamuna viljelmä laimennettiin 200 ml:ksi LB-elatusaineella, joka sisälsi 10 mM $MgSO_4$ ja 10 mM $MgCl_2$. Laimennettua viljelmää inkuboitiin 37 °C:ssa ravistaen voimakkaasti, kunnes absorbanssi aallonpituudella 550 nm (A_{550}) oli noin 0,5, joka osoitti solutiheyttä noin 1 x 10^8 solua/ml. Viljelmää jäähdytettiin 10 minuutin ajan jäävesihauteessa ja solut koottiin sitten sentrifugoimalla nopeudella 4 000 g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa. Solupelletti uudelleensuspendoitiin 100 ml:aan kylmää 10 mM $MgSO_4$ ja uudelleenpelletoitiin sitten välittömästi sentrifugoimalla. Solupelletti uudelleensuspendoitiin 100 ml:aan 30 mM $CaCl_2$ ja inkuboitiin jään päällä 20 minuutin ajan.

Solut koottiin taas sentrifugoimalla ja uudelleensuspendoitiin 10 ml:aan 30 mM $CaCl_2$. Lisättiin 0,5 ml:n näyte soluja esimerkissä 29A2 valmistetun ligatoidun DNA:n joukkoon; DNA oli $CaCl_2$:ssa pitoisuutena 30 mM. Solujen ja DNA:n seosta inkuboitiin jään päällä yhden tunnin ajan, annettiin lämpöshokki 42 °C:ssa 90 sekunnin aikana ja sitten jäähdytettiin jään päällä noin kahden minuutin ajan. Solujen ja DNA:n seos laimennettiin 10 ml:ksi LB-elatusaineella 125 ml:n pulloissa ja inkuboitiin 37 °C:ssa yhden tunnin ajan. Sijoitettiin 100 µl:n näytteitä levyviljelmiksi LB-agarmaljoihin, jotka sisälsivät ampisilliinia ja inkuboitiin 37 °C:ssa, kunnes ilmaantui kolonioita.

Kolonioita viljeltiin yksitellen ja yksittäisten kolonioiden plasmidi-DNA tutkittiin restriktioentsyymianalyysin ja geelielektroforeesin avulla. Suoritettiin plasmidi-DNA:n eristäminen pienemmässä mittakaavassa esimerkin 29A1 menetelmän mukaisesti, mutta CsCl-gradienttivaihe jätettiin pois, kunnes oli identifioitu halutut E. coli K12 MO(λ^+)/pKC283PX -transformantit. Plasmidin pKC283PX restriktiokohtia ja tehtäviä kuvaava kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 2.

4. E. coli K12 MO(λ^+)/pKC283-L:n kokoonpaneminen

10 µl esimerkin 29A1 menetelmän mukaan valmistettua plasmidi-pKC283PX-DNA:ta liuotettiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X runsassuolaista puskuria, 20 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA-liuosta, 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä BglII, 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä XhoI ja 150 µl vettä ja tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Reaktio lopetettiin ja sen jälkeen kun BglII:lla ja XhoI:llä pilkottu DNA oli saostettu, DNA suspendoitiin uudelleen 5 µl:aan TE-puskuriliuosta.

Syntetisoitiin "linker"-DNA, jossa oli BglII- ja XhoI-restriktioentsyymien katkaisukohdille tunnusomaiset yksisäikeiset DNA-päätteet ja sille suoritettiin kinaasi-

käsittely. "Linker"-kappaleen kinaasikäsittely suoritettiin noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. "Linker"-DNA:n rakenne oli seuraavanlainen:

```
5'-GATCTATTAACTCAATCTAGAC-3'
     ||||||||||||||||||
   3'-ATAATTGAGTTAGATCTGAGCT-5'
```

Yllä kuvattu "linker" syntetisoitiin yksisäikeisistä deoksioligonukleotideista käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä. Yksisäikeiset deoksioligonukleotidit voidaan syntetisoida käyttäen kaupallisesti saatavissa olevia laitteita, kuten esimerkiksi 380A DNA-syntetisoijaa, jota myy Applied Biosystems (850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404), jossa käytetään hyväksi fosforiamidiittikemiaa. Alalla tunnetaan myös muita menetelmiä DNA:n syntetisoimiseksi. Tavanomainen muunnettu fosfotriesterimenetelmä yksisäikeisen DNA:n syntetisoimiseksi on kuvattu julkaisuissa Itakura et al., 1977, Science 198:1056 ja Crea et al., 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:5765. Lisäksi on eräs erityisen hyvänä pidetty menetelmä DNA:n syntetisoimiseksi esitelty julkaisuissa Hsiung et al., 1983, Nucleic Acid Research 11:3227 ja Narang et al., 1980, Methods in Enzymology 68:90.

"Linker"-kappaleelle ja BglII:lla ja XhoI:llä pilkotulle plasmidille pKC283PX suoritetaan ligaatio noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. Ligaation avulla saatu DNA muodosti halutun plasmidin pKC283-L. Plasmidin pKC283-L restriktiokohtia ja tehtäviä kuvaava kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 3. Plasmidin pKC283-L DNA:lla transformoitiin E. coli K12 MO(λ⁺) ja tulokseksi saadut E. coli K12 MO(λ⁺)/pKC283-L -transformantit identifioitiin noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää.

5. E. coli K12 MO(λ⁺)/pKC283-LB:n kokoonpaneminen

Noin 10 µg plasmidi pKC283-L-DNA:ta, joka oli eristetty noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmiä,

liuotettiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X runsassuolaista puskuria, 20 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA-liuosta, 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä XhoI ja 155 µl H_2O ja tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. XhoI:llä pilkottu plasmidin pKC283-L DNA saostettiin sitten reaktioseoksesta lisäämällä kolme tilavuutta 95 % etanolia ja yksi kymmenesosatilavuus 3 M natriumasetaattia, inkuboimalla hiilihappojääetanolihauteessa viiden minuutin ajan ja sentrifugoimalla. Tulokseksi saatu DNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin seokseen, jossa oli 2 µl 10 X lovi (nick) translaatiopuskuria (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2; 0,1 M $MgSO_4$; ja 1 mM DTT), 1 µl liuosta, jossa oli 2 mM kutakin deoksinukleotiditrifosfaattia, 15 µl H_2O, 1 µl (noin 6 yksikköä kuten P-L Biochemicals on määritellyt) Klenowia, joka on E. coli - DNA-polymeraasi I:n suuri kappale ja 1 µl pitoisuuden 1 mg/ml omaavaa BSA-liuosta. Tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 25 °C:ssa 30 minuutin ajan; reaktio lopetettiin inkuboimalla liuosta 70 °C:ssa viiden minuutin ajan.

BamHI-"linker"-kappaleita (5'-CGGGATCCCG-3') käsiteltiin kinaasilla ja yhdistettiin ligaation avulla XhoI:llä pilkottuun, Klenowilla käsiteltyyn plasmidin pKC283-L DNA:han noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. Ligaatioreaktion jälkeen DNA:ta pilkottiin noin 100 yksiköllä BamHI:tä noin kahden tunnin ajan 37 °C:ssa runsassuolaisessa puskuriliuoksessa. BamHI:llä pilkkomisen jälkeen DNA valmistettiin ligaatiota varten noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää.

Noin 5,9 kiloemäksen BamHI-restriktiokappale saatettiin rengasmuotoon ligaation avulla ja transformoitiin E. coli K12 MO(λ^s):aan noudattaen olennaisesti esimerkkien 29A2 ja 29A3 menetelmiä. Identifioitiin E. coli K12 MO(λ^s)/pKC283-LB -transformantit ja sitten eristettiin plasmidin pKC283-LB DNA noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 mene-

telmää. Plasmidin pKC283-LB restriktiokohtia ja tehtäviä kuvaava kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 4.

6. E. coli K12 MO(λ⁺)/pL32:n kokoonpaneminen

Noin 10 µl plasmidia pKC283PX pilkottiin restriktioentsyymillä SalI runsassuolaisessa puskurissa, käsiteltiin Klenowilla ja yhdistettiin ligaation avulla EcoRI-"linker"-kappaleisiin (5'-GAGGAATTCCTC-3') noudattaen olennaisesti esimerkin 29A5 menetelmää, käytettyä lähtöplasmidia, restriktioentsyymejä ja "linker"-kappaleita lukuun ottamatta. Restriktioentsyymillä EcoRI pilkkomisen jälkeen, mikä johtaa noin 2,1 kiloemäksen DNA:ta poisleikkaamiseen, noin 4,0 kiloemäksen EcoRI-restriktiokappale saatettiin rengasmuotoon ligaation avulla, jolloin saatiin plasmidi pKC283PRS. Ligaation avulla yhdistetyllä DNA:lla transformoitiin E. coli K12 MO(λ⁺) noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää. Sen jälkeen kun oli identifioitu E. coli K12 MO(λ⁺)/pKC283PRS -transformantit, eristettiin plasmidi pKC283PRS -DNA noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmää. Plasmidin pKC283PRS restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on oheisten piirrosten kuviossa 5.

Noin 10 µl plasmidia pKC283PRS pilkottiin 200 µl:ssa runsassuolaista puskuria noin 50 yksiköllä kumpaakin restriktioentsyymeistä PstI ja SphI. Sen jälkeen kun reaktioseosta oli inkuboitu 37 °C:ssa noin kahden tunnin ajan, reaktioseokselle suoritettiin elektroforeesi 0,6 % alhaisen geeliytymislämpötilan omaavassa agaroosissa (FMC Corporation, Marine Colloids Division, Rockland, Maine 04841) -geelissä 2,3 tunnin aikana käyttäen noin 130 V ja noin 75 mA Tris-asetaattipuskurissa.

Geeli värjättiin laimeassa etidiumbromidiliuoksessa ja DNA-vyöhyke, joka käsitti noin 0,85 kiloemäksen PstI - SphI-restriktiokappaleen ja joka saatiin silminnähtäväksi pitkäaaltoisen UV-valon avulla, leikattiin irti geelistä pienessä lohkossa. Lohkon tilavuus määritettiin lohkon

painon ja tiheyden avulla ja lisättiin yhtä suuri tialvuus 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, lohkon sisältävään putkeen. Lohko sulatettiin sitten inkuboimalla 72 °C:ssa. Noin 1 µl plasmidin pKC283PRS noin 0,85 kiloemäksen PstI - SphI-restriktiopalasta saatiin noin 100 µl:n tilavuudessa. Vastaavalla tavalla plasmidia pKC283-LB pilkottiin ja restriktioentsyymeillä PstI ja SphI ja tulokseksi saatu noin 3,0 kiloemäksen restriktiopalanen eristettiin agaroosigeelielektroforeesin avulla ja valmistettiin ligaatiota varten.

Plasmidin pKC283PRS noin 0,85 kiloemäksen PstI - SphI-restriktiopalanen yhdistettiin ligaation avulla plasmidin pKC283-LB noin 3,0 kiloemäksen PstI - SphI-restriktiopalaseen noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. Ligaation avulla yhdistetty DNA muodosti halutun plasmidin pL32. Plasmidin pL32 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 6. Plasmidi pL32 transformoitiin E. coli K12 MO(λ^+) -soluihin noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää. Plasmidin pL32 DNA eristettiin E. coli K12 MO(λ^+)/pL32 -transformanteista noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmää. Plasmidin pL32 DNA:n analyysi osoitti, että useampi kuin yksi EcoRI-"linker"-kappale oli kiinnittynyt plasmidin pKC283PX Klenowilla käsiteltyihin SalI-päihin. Useamman kuin yhden EcoRI-"linker"-kappaleen läsnäolo ei vaikuta plasmidin pL32 tai plasmidin pL32 johdannaisten hyödyllisyyteen ja se voidaan todeta XhoI-restriktiokohdan läsnäolon perusteella, joka restriktiokohta syntyy aina kun kaksi EcoRI-"linker"-kappaletta yhdistyy ligaatiossa. Vaihtoehtoisesti voidaan plasmidi pL32 kokoonpanna suorittamalla tämän esimerkin ensimmäisen kappalen SalI - EcoRI-poisleikkaaminen ja ligaatio plasmidille pKC283-LB.

7. E. coli K12 MO(λ^+)/pL47:n muodostaminen

E. coli K12 RV308/pNM789:ää voidaan saada laboratoriolta the Northern Regional Research Laboratories lyofilisoidussa muodossa talletusnumeron NRRL B-18216 omaavana.

pNM789:n restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 7. Plasmidi-DNA eristetään viljelmästä olennaisesti esimerkin 1 menettelyn mukaisesti, paitsi että inkubaatiolämpötila on 37 °C. 10 µg pNM789:ää suspendoidaan 200 µl:aan PvuII-puskuria (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 60 mM NaCl ja 6 mM $MgCl_2$). Lisätään yksi yksikkö PvuII:ta ja reaktioseosta inkuboidaan viiden minuutin ajan 37 °C:ssa. Entsyymi inaktivoidaan kuumentamalla 10 minuutin ajan 65 °C:ssa. Seuraavaksi lisätään 30 µl 10 X BamHI-puskuria (200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl ja 70 mM $MgCl_2$), 70 µl H_2O ja 10 yksikköä BamHI:tä ja reaktioseosta inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:ssa. Tämän jälkeen lisätään viisi yksikköä alkalista fosfataasia ja inkuboidaan yhden tunnin ajan 65 °C:ssa. DNA-palaset erotellaan 1-%:isessa agaroosigeelissä ja puhdistetaan DNA-palanen (kuvio 8), joka on kooltaan yhden ainoan leikkauksen palanen.

Syntetisoidaan "linker"-DNA, jossa on tasapää ja BamHI-pää, noudattaen olennaisesti esimerkin 29A4 menettelyä. Tällä "linker"-kappaleella (esitetty kuviossa 8) on seuraava rakenne:

```
5'-CTGTGCCTTCTAG-3'
   ||||||||||||
3'-GACACGGAAGATCCTAG-5'
```

"Linker"-kappaleelle suoritetaan kinaasikäsittely ja se yhdistetään ligaation avulla BamHI:llä ja PvuII:lla pilkottuun plasmidiin pNM789 noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menettelyä. Tämä ligaatioseos käytetään E. coli K12 RV308 -solujen transformointiin ja suoritetaan plasmidien eristys näistä transformanteista noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menettelyä. Valitaan useita plasmideja, jotka sisältävät sopivan kokoisen PvuII-kappaleen (494 emäsparia) ja XbaI - BamHI-kappaleen (628 emäsparia). Vähintään kahden näistä sekvenssi määritetään sekvenssoimalla BamHI-kohdasta lähtien kohti ainoaa SmaI-kohtaa ja va-

litaan yksi klooni, jolla on haluttu sekvenssi. Tälle välituoteplasmidille on annettu nimitys plasmidi 120. Kaavioesitys tästä menetelmästä ja plasmidin 120 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 8.

EK-BGH:n koodaavan DNA:n eristämiseksi noin 10 µl plasmidia 120 pilkottiin 200 µl:ssa runsassuolaista puskuria, joka sisälsi noin 50 yksikköä kumpaakin restriktioentsyymeistä XbaI ja BamHI. Pilkontatuotteet eroteltiin agaroosigeelielektroforeesin avulla ja noin 0,6 kiloemäksen XbaI - BamHI-restriktiokappale, joka koodasi EK-BGH:n, eristettiin ja valmistettiin ligaatiota varten noudattaen olennaisesti esimerkin 29A6 menetelmää.

Plasmidia pL32 pilkottiin myös restriktioentsyymeillä XbaI ja BamHI ja noin 3,9 kiloemäksen restriktiokappale eristettiin ja valmistettiin ligaatiota varten. Plasmidin pL32 noin 3,9 kiloemäksen XbaI - BamHI-restriktiopalanen yhdistettiin ligaation avulla plasmidin 120 noin 0,6 kiloemäksen XbaI - BamHI-restriktiopalaseen noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää, jolloin saatiin plasmidi pL47. Plasmidin pL47 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 9. Plasmidi pL47 transformoitiin E. coli K12 MO(λ$^+$):aan noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää ja identifioitiin E. coli K12 MO(λ$^+$)/pL47 -transformantit. Plasmidi pL47 -DNA eristettiin transformanteista noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmiä.

8. E. coli K12 RV208/pPR12AR1:n muodostaminen

Plasmidi pPR12 sisältää lämmölle herkän pL-repressorin geenin c1857 ja plasmidin pBR322 tetrasykliiniresistenssin antavan geenin. Plasmidi pPR12 on esitelty patenttivaatimuksissa US-patentissa nro 4 436 815, joka on julkaistu 13. maaliskuuta 1984. Plasmicin pPR12 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 10.

Noin 10 µg plasmidia pPR12 pilkottiin noin 50 yksiköllä restriktioentsyymiä EcoRI µl:ssa runsassuolaista puskuria 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. EcoRI:llä pilkottu plasmidi pPR12 -DNA saostettiin ja sitä käsiteltiin Klenowilla noudattaen olennaisesti esimerkin 29A5 menetelmää. Klenow-reaktion jälkeen EcoRI:llä pilkottu, Klenowilla käsitelty plasmidi pPR12 -DNA saatettiin uudelleen rengasmuotoon ligaation avulla noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. Ligaation avulla yhdistetty DNA, joka muodosti halutun plasmidin pPR12ΔR1, käytettiin E. coli K12 RV308:n transformointiin noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää, paitsi että selektio perustui tetrasykliini (5 µg/ml) -resistenssiin eikä ampisilliiniresistenssiin. E. coli K12 RV308:a on saatavissa NRRL:ltä tulonumeron NRRL B-15624 omaavana. Sen jälkeen kun oli identifioitu E. coli K12 RV308/pPR12ΔR1 -transformantit, plasmidi pPR12ΔR1 -DNA eristettiin transformanteista noudattaen olennaisesti esimerkin 29A11 menetelmää.

Noin 10 µg plasmidia pPR12ΔR1 pilkottiin noin 50 yksiköllä restriktioentsyymiä AvaI 200 µl:ssa keskinkertaisen määrän suolaa sisältävässä puskurissa 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. AvaI:llä pilkottu plasmidi pPR12ΔR1 -DNA saostettiin ja sitä käsiteltiin Klenowilla noudattaen olennaisesti esimerkin 29A5 menetelmää. Klenow-reaktion jälkeen AvaI:llä pilkottu, Klenowilla käsitelty plasmidi pPR12ΔR1 -DNA yhdistettiin ligaation avulla EcoRI-"linker"-kappaleisiin (5'-GAGGAATTCCTC-3') noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. "Linker"-kappaleiden ligaation jälkeen DNA saostettiin ja uudelleensuspendoitiin sitten noin 200 µl:aan runsassuolaista puskuria, joka sisälsi noin 50 yksikköä restriktioentsyymiä EcoRI. Tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa noin kahden tunnin ajan. EcoRI:llä pilkkomisen jälkeen reaktioseos lisättiin agaroosigeeliin ja noin 5,1 kiloemäksen EcoRI-restriktiopalanen puhdistettiin noudattaen olennaisesti

esimerkin 29A6 menetelmää. Noin 5,1 kiloemäksen EcoRI-restriktiopalanen saatettiin uudelleen rengasmuotoon ligaation avulla noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menetelmää. Ligaation avulla yhdistetty DNA muodosti halutun plasmidin pPR12AR1. Plasmidi pPR12AR1 -DNA transofmoitiin e. coli K12 RV308:aan noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää, paitsi että selektio perustui tetrasykliiniresistenssiin eikä ampisilliiniresistenssiin. E. coli K12 RV308/pPR12AR1 -transformanttien identifioinnin jälkeen eristettiin plasmidi pPR12AR1 -DNA noudattaen olennaisesti esimerkin 29A1 menetelmää. Plasmidin pPR12AR1 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 11.

9. E. coli K12 RV308/pL110:n muodostaminen

Noin 10 µg plasmidi pPR12AR1 -DNA:ta suspendoitiin noin 200 µl:aan runsassuolaista puskuria, joka sisälsi noin 50 yksikköä kumpaakin restriktioentsyymeistä PstI ja EcoRI ja pilkkomisreaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa noin kahden tunnin ajan. Reaktioseos lisättiin sitten agaroosigeeliin ja plasmidin pPR12AR1 noin 2,9 kiloemäksen PstI - EcoRI-restriktiopalanen eristettiin ja valmistettiin ligaatiota varten noudattaen olennaisesti esimerkin 29A6 menetelmää.

Noin 10 µg plasmidia pL47 pilkottiin restriktioentsyymeillä PstI ja BamHI 200 µl:ssa runsassuolaista puskuria 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. PstI:llä ja BamHI:llä pilkottu DNA lisättiin agaroosigeeliin ja noin 2,7 kiloemäksen PstI - BamHI-restriktiopalanen, joka sisälsi replikaation aloituskohdan ja osan ampisilliiniresistenssin antavasta geenistä, eristettiin ja valmistettiin ligaatiota varten noudattaen olennaisesti esimerkin 29A6 menetelmää. Erillisessä reaktiossa pilkottiin noin 10 µg plasmidi pL47 -DNA:ta restriktioentsyymeillä EcoRI ja BamHI 200 µl:ssa runsassuolaista puskuria 37 °C:ssa kahden tunnin ajan ja noin 1,03 kiloemäksen EcoRI - BamHI-restriktiopalanen,

joka sisälsi uuden transkription ja translaation aktivointisekvenssin ja EK-BGH:n koodaavan DNA:n, eristettiin ja valmistettiin ligaatiota varten noudattaen olennaisesti esimerkin 29A6 menetelmää. Noin 2 µg saatua noin 1,03 kiloemäksen EcoRI - BamHI-restriktiopalasta käytettiin plasmidin pL110 muodostamiseen.

Plasmidin pL47 noin 2,7 kiloemäksen PstI - BamHI- ja noin 1,03 kiloemäksen EcoRI - BamHI-restriktiopalaset yhdistettiin ligaation avulla plasmidin pPR12AR1 noin 2,9 kiloemäksen PstI - EcoRI-restriktiopalaseen plasmidin pL110 muodostamiseksi ja ligaation avulla yhdistetyllä DNA:lla transformoitiin E. coli K12 RV308 noudattaen olennaisesti esimerkkien 29A2 ja 29A3 menetelmää, paitsi että transformanttien selektio perustui tetrasykliiniresistenssiin eikä ampisilliiniresistenssiin.

EK-BGH:n koodaavalla alueella on läsnä kaksi PstI-restriktioentsyymin tunnistuskohtaa, joita ei ole esitetty oheisissa piirroksissa olevissa restriktiokohtia ja tehtäviä esittävissä kartoissa. Plasmidin pL110 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 12.

10. E. coli K12 RV308/pL110C:n muodostaminen

a. E. coli K12 RV308/pL110A:n muodostaminen

Noin 1 µg plasmidi pL110 -DNA:ta pilkottiin restriktioentsyymillä NdeI 20 µl:n kokonaistilavuudessa, joka sisälsi 2 µl 10 X runsassuolaista puskuria (1,0 M NaCl; 0,50 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,10 M $MgCl_2$; ja 10 mM ditiotreitoli) ja kolme yksikköä NdeI-entsyymiä, yhden tunnin ajan 37 °C:ssa. Reaktioseos uutettiin fenoli/kloroformilla ja DNA saostettiin etanolilla. NdeI:llä pilkottu plasmidi pL110 -DNA liuotettiin 50 µl:aan 1X Klenow-puskuria (40 mM KPO_4, pH = 7,5; 6,6 mM $MgCl_2$; 1,0 mM 2-merkaptoetanolia; 33 µM dATP; 33 µM TTP). Lisättiin 2 µl (noin 10 yksikköä, New England Biolas) E. coli - DNA-polymeraasi I:n suurta kappaletta, joka tunnetaan nimityksellä Klenow ja se sekoi-

tettiin DNA:n kanssa ja tulokseksi saatua reaktioseosta inkuboitiin 16 °C:ssa yhden tunnin ajan. Reaktio pysäytettiin suorittamalla fenoliuutto ja DNA puhdistettiin tavanomaisesti. NdeI:llä pilkotulle, Klenowilla käsitellylle DNA:lle suoritettiin sitten ligaatio käyttäen T4-DNA-ligaasia 4 °C:ssa 16 tunnin aikana. Tulokseksi saadulla DNA:lla transformoitiin tavanomaisesti E. coli K12 -kanta RV308 (NRRL B-15624). Transformantteja valittiin L-agarlevyillä, jotka sisälsivät 100 µg/ml ampisilliinia ja resistenteistä kolonioista eristettiin plasmideja käyttäen nopean alkalisen uuton menetelmää, jonka ovat kuvanneet Birnboim ja Doly. Valittiin plasmidi (pL110A kuviossa 13), josta puuttui NdeI-kohta.

b. Faagin pL110B aikaansaaminen kohdennetun mutageneesin avulla

Menettelyohje tetrasykliiniresistenssin antavassa geenissä olevan BamHI-kohdan poistamiseksi kohdennetun mutageneesin avulla on esitetty oheisten piirrosten kuvion 13 oikealla puolella.

b(i) Faagin M13Tc3 muodostaminen

Plasmidia pL110 käytettiin tetrasykliiniresistenssin antavan geenin lähteenä. Noin 50 µg plasmidia pL110 50 µl:ssa TE-puskuria lisättiin seokseen, jossa oli 25 µl 10 X HindIII-puskuria ja 170 µl H_2O. Plasmidi pL110 -DNA:n liuokseen lisättiin noin 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä HindIII ja saatua reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Noin 13 µl 2 M Tris-HCl, pH 7,4 ja 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä EcoRI lisättiin HindIII:lla pilkotun plasmidi pL110 -DNA:n jouk-koon ja reaktioseosta inkuboitiin vielä kahden tunnin ajan 37 °C:ssa. Reaktio pysäytettiin uuttamalla reaktioseosta TE:llä kyllästetyllä fenolilla; fenoli poistettiin kloroformiuuttojen aulla. EcoRI:llä ja HindIII:lla pilkottu plasmidi pL110 -DNA koottiin sitten saostamalla ja sentrifugoimalla, lisättiin 1 % agaroosigeeliin ja suuri, noin

4,3 kiloemäksen EcoRI - HindIII-restriktiopalanen eristettiin ja puhdistettiin.

Noin 5 µg faagia m13mp18 (New England Biolabs) liuotettiin 50 µl:aan TE-puskuria ja sitten pilkottiin HindIII:lla ja EcoRI:llä kuten yllä on kuvattu. HindIII:lla ja EcoRI:llä pilkottu faagi M13mp18 -DNA puhdistettiin kuten on kuvattu pL110:tä varten, paitsi että eristettiin ja puhdistettiin noin 7,25 kiloemäksen restriktiopalanen.

Sekoitettiin noin 100 nanogrammaa plasmidin pL110 noin 4,3 kiloemäksen HindIII - EcoRI-palasta seoksen kanssa, jossa oli noin 100 nanogrammaa faagin M13mp18 noin 7,25 kiloemäksen HindIII - EcoRI-palasta, 2 µl 10 X ligaasipuskuria, 1 µl (noin 100 yksikköä) T4-DNA-ligaasia ja 14 µl H_2O. Ligaatioreaktioseosta inkuboitiin 15 °C:ssa 1,5 tunnin ajan; ligaation avulla yhdistetty DNA muodosti halutun faagi m13Tc3 -DNA:n. Faagin m13Tc3 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 13.

Yksi ml E. coli K12 JM109:n (E. coli K12 JM101:tä, jota on saatavissa toiminimeltä New England Biolabs, voidaan käyttää E. coli K12 JM109:n asemesta) yli yön kasvatettua viljelmää istutettiin 50 ml:aan L-lientä ja tulokseksi saatua viljelmää inkuboitiin 37 °C:ssa ilmastaen, kunnes A_{660} oli välillä 0,3 - 0,4. Solut uudelleensuspendoitiin 25 ml:aan 10 mM NaCl, inkuboitiin jään päällä 10 minuutin ajan ja koottiin sentrifugoimalla. Solut uudelleensuspendoitiin 1,25 ml:aan 75 mM $CaCl_2$; poistettiin 200 µl:n näyte soluja, se lisättiin 10 µl:n joukkoon yllä valmistettua ligaation avulla yhdistettyä DNA:ta ja inkuboitiin jään päällä noin 40 minuutin ajan. Solujen ja DNA:n seosta inkuboitiin sitten 42 °C:ssa kahden minuutin ajan ja poistettiin erilaisia näytteitä (1, 10 ja 100 µl) ja ne lisättiin 3 ml:aan päällysagaria (L-liemi, jossa oli 0,5 % agaria pidettynä sulana 45 °C:ssa), joka sisälsi myös 50 µl 2 % X-Gal:a, 50 µl 100 mM IPTG:a ja 200 µl E. coli K12

JM109:ää, joka oli logaritmisessa kasvuvaiheessa. Solujen ja päällysagarin seos sijoitettiin sitten maljaviljelmäksi L-agar-levyille, jotka sisälsivät 40 µl/ml X-Gal:a (5-bromi-4-kloori-3-indolyyli-ß-D-tiogalaktosidi) ja 0,1 mM IPTG:a (isopropyyli-ß-D-tiogalaktosidi) ja maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa yön ajan.

Seuraavana aamuna useita kirkkaita, vastakohtana sinisille, plakkeja istutettiin yksitellen kulloinkin 2 ml:aan L-lientä ja tulokseksi saatuja viljelmiä inkuboitiin 37 °C:ssa ilmastaen kahden tunnin ajan. Sinisen värin puuttuminen osoittaa, että halutun DNA:n lisäys on tapahtunut. Sitten viljelmät sentrifugoitiin ja 200 µl tulokseksi saatua supernatanttia lisättiin 10 ml:n E. coli K12 JM109 -viljelmiin (A_{550} = 0,5), jotka kasvoivat 37 °C:ssa ilmastettuna. Näitä viljelmiä inkuboitiin vielä 30 minuutin ajan 37 °C:ssa; sitten solut pelletoitiin sentrifugoimalla ja käytettiin niiden sisältämän rekombinanttifaagin replikatiivisen muodon eristämiseen. Kaksisäikeinen, replikatiivista muotoa oleva faagi-DNA eristettiin soluista käyttäen pienemmän mittakaavan versiota esimerkissä 1 kuvatusta menetelmästä. Faagi m13Tc3 -DNA:n sisältävät transformantit identifioitiin niiden faagi-DNA:n restriktioentsyymianalyysin avulla.

b(ii) Yksisäikeisen faagi m13Tc3 -DNA:n valmistaminen

Sentrifugoitiin 1,5 ml yli yön kasvatettua E. coli K12 JM109/m13Tc3 -viljelmää ja 100 µl faagi m13Tc3:a sisältävää supernatanttia siirrostettiin 25 ml:n E. coli JM109 -viljelmään, jonka A_{660} oli noin 0,4 - 0,5. Viljelmää inkuboitiin kuuden tunnin ajan 37 °C:ssa ilmastaen, jonka ajan kuluttua viljelmä sentrifugoitiin ja saatu supernatantti, noin 20 ml, siirrettiin uuteen putkeen. Supernatanttiin lisättiin noin 2 ml liuosta, joka sisälsi 20 % polyeteeniglykoli (PEG) 6000:ta ja 14,6 % NaCl ja supernatanttia inkuboitiin sitten jään päällä 20 minuutin ajan.

Supernatanttia sentrifugoitiin 25 minuutin ajan nopeudella 7 000 kierrosta minuutissa ja tulokseksi saatu pelletti, joka sisälsi yksisäikeisen faagi m13Tc3 -DNA:n, uudelleensuspendoitiin 500 µl:aan TE-puskuria. DNA-liuosta uutettiin kaksi kertaa TE:llä kyllästetyllä fenolilla ja kaksi kertaa kloroformilla. Yksisäikeinen DNA saostettiin sitten käyttäen NaOCc:a ja etanolia ja sentrifugoitiin. Saatu pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla, kuivattiin ja liuotettiin sitten 60 µl:aan H_2O.

b(iii) Mutageneesi

Mutageneesissä käytetty yksisäikeinen DNA-kappale syntetisoitiin käyttäen automaattista DNA-syntetisoijaa. Palasen sekvenssi on 5'-CCCGTCCTGTGGATACTCTACGCCGA-3' ja se on homologinen sen alueen kanssa, joka ympäröi BamHI-kohtaa (5'-GGATCC-3') plasmidista pBR322 peräisin olevassa tetrasykliiniresistenssin antavassa geenissä, paitsi että 5'-päästä lähtien toisena oleva (tai 3'-päästä lähtien kolmantena oleva) A-jäännös on plasmidissa pBR322 C. Tämä vaihdos ei muuta tetrasykliiniresistenssin antavan proteiinin aminohappokoostumusta, mutta poistaa BamHI-kohdan.

Noin 10 pikomoolia mutageenistä aluketta (primer) ja M13-yleistä aluketta (Bethesda Research Laboratories (BRL), P.O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20760) käsiteltiin erikseen 10 yksiköllä (BRL) T4-polynukleotidikinaasia 20 µl:ssa 1 X kinaasipuskuria (60 mM Tris-HCl, pH = 7,8; 15 mM 2-merkaptoetanoli; 10 mM $MgCl_2$; ja 0,41 µM ATP) 30 minuutin ajan 37 °C:ssa. Kinaasilla käsiteltyjä DNA:ita käytettiin alla kuvatussa mutageneesimenetelmässä.

Lämmittäen ja jäähdyttäen yhdistämis (annealing) -reaktio suoritettiin sekoittamalla keskenään 300 nanogrammaa (1,2 µl) yksisäikeistä faagi m13Tc3:a, 1 pikomooli (2 µl) yleistä aluketta, 1 pikomooli (2 µl) mutageenistä aluketta, 2 µl 10 X "annealing"-puskuria (100 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 1 mM EDTA; ja 500 mM NaCl) ja 12,8 µl H_2O. Reaktioseosta inkuboitiin 80 °C:ssa kahden minuutin ajan, 50

°C:ssa viiden minuutin ajan ja sen annettiin sitten jäähtyä huoneenlämpötilaan.

Pidentämisreaktio suoritettiin lisäämällä lämmitys-jäähdytyskäsittelyllä yhdistetyn DNA:n seokseen 5 µl 10 X pidentämispuskuria (500 mM Tris-HCl, pH = 8; 1 mM EDTA; ja 120 mM $MgCl_2$); 5 µl 2 mM dATP; 1 µl liuosta, joka oli 6 mM kunkin yhdisteistä dGTP, TTP ja dCTP suhteen; 1 µl (noin kaksi yksikköä, Pharmacia P-L Biochemicals, 800 Centennial Avenue, Piscataway, NJ 08854) Klenow-entsyymiä; 1 µl (100 yksikköä) T4-DNA-ligaasia; ja 17 µl H_2O. Pidentämisreaktioseosta inkuboitiin huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan, sitten 37 °C:ssa 2,5 tunnin ajan ja sitten yön ajan 4 °C:ssa.

Reaktio pysäytettiin suorittamalla kaksi uuttoa TE:llä kyllästetyllä fenolilla, mitä seurasi kaksi uuttoa $CHCl_3$:lla. DNA saostettiin etanolilla ja NaOAc:lla. DNA koottiin sentrifugoimalla ja uudelleensuspensoitiin 50 µl:aan H_2O ja sitten lisättiin DNA-liuokseen 6 µl 10 X S1-puskuria.

DNA-liuos jaettiin tasan kolmeen putkeen. Kahteen putkista lisättiin noin 200 yksikköä (Miles Laboratories) S1-nukleaasia. Yhtä S1-reaktioseosta inkuboitiin huoneenlämpötilassa viiden minuutin ajan, toista 10 minuutin ajan. Reaktiot pysäytettiin uuttamalla reaktioseosta kaksi kertaa TE:llä kyllästetyllä fenolilla. Fenoliuuttoja seurasi kaksi uuttoa kloroformilla; sitten DNA saostettiin reaktioseoksesta NaOAc:lla ja etanolilla. Käsittelemätön DNA-näyte toimi negatiivisena kontrollina. S1:llä käsitellyt näytteet pidettiin toisistaan erillään koko menetelmän jäljellä olevan osan ajan, mutta niillä saatiin samankaltaiset tulokset.

DNA-pelletit uudelleensuspendoitiin 20 µl:aan H_2O ja 10 µl saatua liuosta käytettiin E. coli K12 JM109:n (E. coli K12 JM101:tä voitaisiin myös käyttää) transformointiin noudattaen menetelmää, jota käytettiin faagin m13Tc3

muodostamisen aikana, paitsi että kasvualustoihin ei lisätty IPTG:a eikä X-Gal:a.

Eristettiin kaksisäikeinen replikatiivisessa muodossa oleva DNA noin 48 plakista yllä kuvatulla tavalla ja seulottiin BamHI-restriktiokohdan läsnäolon suhteen. Isolaatteja, joissa ei ollut BamHI-kohtaa, seulottiin lisäksi valmistamalla yksisäikeinen DNA kuten yllä on kuvattu. Yksisäikeinen DNA sekvenssoitiin käyttäen dideoksisekvenssointimenetelmää (J.H. Smith, 1980, Methods in Enzymology 65: 560 - 580). Halutulle isolaatille annettiin nimitys pL110B (kuvio 13).

c. Plasmidin pL110C kokoonpaneminen

Noin 50 µl faagi pL110B -DNA:n replikatiivista muotoa pilkottiin 250 µl:ssa 1 X NheI-puskuria (50 mM NaCl; 6 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 6 mM $MgCl_2$; ja 6 mM ß-merkaptoetanoli), joka sisälsi noin 50 yksikköä NheI-restriktioentsyymiä, 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Sitten lisättiin 5 µl 5 M NaCl NheI:llä pilkotun faagi pL110B -DNA:n joukkoon ja sen jälkeen 5 µl (noin 50 yksikköä) SalI-restriktioentsyymiä. Pilkkomista jatkettiin kahden tunnin ajan 37 °C:ssa. Haluttu noin 422 emäsparin NheI-SalI-palanen, joka sisälsi tetrasykliiniresistenssin antavan geenin mutaation omaavan alueen, eristettiin sitten akryyliamidigeelistä käyttäen tunnettuja yleisiä menetelmiä.

Plasmidi pL110A -DNA:ta pilkottiin NheI:llä ja SalI:llä identtisissä olosuhteissa, paitsi että faagi pL110B korvattiin plasmidilla pL110A. Plasmidin pL110A noin 6,1 kiloemäksen NheI - SalI-restriktiopalanen puhdistettiin agaroosista.

Haluttu plasmidi pL110C kokoonpantiin yhdistämällä ligaation avulla pL110A:n NheI - SalI-palanen (noin 6,1 kiloemästä) ja pL110B:n NheI - SalI-palanen (noin 422 emäsparia), 100 nanogrammaa kumpaakin, käyttäen tavanomaisia menetelmiä. Plasmidin pL110C restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten ku-

viossa 13. Haluttu plasmidi pL110C antaa tetrasykliiniresistenssin pitoisuutta 10 µl/ml tetrasykliiniä kohtaan E. colissa, mutta siitä puuttuu BamHI-kohta tetrasykliiniresistenssin antavasta geenistä.

11. Plasmidin pCZR111 kokoonpaneminen

Plasmidi pL110C sisältää yhden ainoan ClaI-restriktiokohdan, joka poistettiin suorittamalla seuraavat reaktiot. Noin 1 µg plasmidia pL110C pilkottiin ClaI:llä noudattaen olennaisesti esimerkin 29A2 menettelyä, paitsi että käytettiin restriktioentsyymiä ClaI ja 10 X ClaI-puskuria (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 7,9) ja 100 mM $MgCl_2$). ClaI:llä pilkottua DNA:ta käsiteltiin sitten Klenowilla noudattaen olennaisesti esimerkin 29A5 menettelyä, paitsi että lisättiin ainoastaan dCTP:a eikä kaikkia neljää dNTP:a.

DNA saostettiin sitten ja uudelleensuspendoitiin 500 µl:aan mungopapu-nukleaasipuskuria (50 mM natriumasetaatti (pH 5,0), 30 mM NaCl ja 1 mM $ZnSO_4$). Lisättiin yksi yksikkö mungopapu-nukleaasia (saatavissa kaupallisesti toiminimeltä New England Biolabs) ja reaktioseosta inkuboitiin 30 °C:ssa 30 minuutin ajan. Putki sijoitettiin sitten jäihin ja lisättiin NaCl:a pitoisuudeksi 0,2 M, sitten suoritettiin seokselle fenoli/kloroformiuuttoja, saostettiin etanolilla ja uudelleensuspendoitiin 10 mM Tris-HCl-liuokseen (pH 8,0). Sitten DNA:lle suoritettiin itseligaatio ja se transformoitiin E. coli -soluihin noudattaen olennaisesti esimerkkien 29A3 ja 29A4 menettelyjä. Tulokseksi saadulle plasmidille annettiin nimitys plasmidi pCZR111.

12. Plasmidin pCZR126S kokoonpaneminen

Noin 26 µg plasmidia pCZR111 pilkottiin XbaI:llä seuraavasti. 10 X XbaI-puskurin muodostavat 600 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 1 M NaCl ja 10 mM 2-merkaptoetanoli, pH 7,5 (37 °C:ssa). 50 µl 10 X XbaI-puskuria, 15 µl XbaI:tä (10 U/µl) ja 185 µl H_2O lisättiin 250 µl:aan vettä, joka

sisälsi noin 25 µg plasmidia pL110. Pilkkominen tapahtui 37 °C:ssa yhden tunnin aikana. XbaI:llä pilkottu pL110 uutettiin sitten fenoliin, lisättiin 1/10 tilavuus 3 M CH_3COONa ja kolme tilavuutta etanolia; seosta inkuboitiin hiilihappojää-etanolihauteessa viiden minuutin ajan ja se sentrifugoitiin sitten. Saostunut DNA uudelleensuspendoitiin 50 µl:aan H_2O.

XbaI:llä pilkottua plasmidia pCZR111 pilkottiin BamHI:llä seuraavasti. 0,2 µl BamHI:tä (10 U/µl), 10 µl BamHI-puskuria (100 mM Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$, 1 M NaCl ja 10 mM 2-merkaptoetnaoli, pH 8,0 [37 °C:ssa]) ja 90 µl H_2O lisättiin 50 µl:n joukkoon yllä saatua XbaI:llä pilkottua pL110:tä. Pilkkomista suoritettiin viiden minuutin ajan 37 °C:ssa. Pilkottu pCZR111 uutettiin fenoliin, lisättiin 1/10 tilavuus CH_3COONa, minkä jälkeen lisättiin kolme tilavuutta etanolia. Saostunut DNA uudelleensuspendoitiin 50 µl:aan puskuria, jonka muodostivat 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0.

XbaI:llä ja BamHI:llä pilkottu pCZR111 lisättiin sitten agaroosigeeliin ja eristettiin DNA-vyöhyke kohdalta noin 5,8 kiloemästä. Plasmidi pCZR126S aikaansaatiin yhdistämällä ligaation avulla pCZR111:n noin 5,8 kiloemäksen palanen XbaI - NdeI-"linker"-kappaleeseen ja synteettiseen geeniin, joka koodasi EK-naudan kasvuhormonin ja joka sisälsi NdeI-kohdan 5'-päässään ja BamHI-kohdan 3'-päässään. XbaI - NdeI-sekvenssi valmistettiin käyttäen yleistä oligonukleotidisekvenssimetodologiaa ja se käsitti seuraavan sekvenssin:

```
5' CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAATAAGGAGGAATAATCA 3'
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     TCCCATAATTATTACATATAACTAAAATTATTCCTCCTTATTAGTAT 5'
```

Yllä oleva sekvenssi kokoonpantiin syntetisoimalla kemiallisesti kummatkin säikeet, mitä seurasi sekoittaminen hybridisoitumisen aikaansaamiseksi. EK-bGH:n koodaava geeni kokoonpantiin 16 kemiallisesti syntetisoidusta yksi-

säikeisen DNA:n kappaleesta, jotka olivat pituudeltaan 71 - 83 nukleotidia ja jotka yhdessä käsittävät koko geenin kummatkin komplementaariset säikeet. Synteesi suoritettiin käyttäen Applied Biosystems (ABS) -laitetta ja se käsitti seuraavan sekvenssin:

```
5' TATGTTCCCATTGGATGATGATGATAAGTTCCCAGCCATGTCCTT
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     ACAAGGGTAACCTACTACTACTATTCAAGGGTCGGTACAGGAA

GTCCGGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTGCATCAGCTGGCTGCTGA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CAGGCCGGACAAACGGTTGCGACACGAGGCCCGAGTCGTGGACGTAGTCGACCGACGACT

CACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCCGGAGGGACAGAGATACTCCATCCAGAA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GTGGAAGTTTCTCAAACTCGCGTGGATGTAGGGCCTCCCTGTCTCTATGAGGTAGGTCTT

CACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GTGGGTCCAACGGAAGACGAAGAGACTTTGGTAGGGCCGGGGGGTGCCCGTTCTTACTCCG

CCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTCCTCATCCAGTCGTGGCT
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGTCGTCTTTAGTCTGAACCTCGACGAAGCGTAGAGTGACGAGGAGTAGGTCAGCACCGA

TGGGCCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCTTGGTGTTTGGCACCTCGGA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ACCCGGGGACGTCAAGGAGTCGTCTCAGAAGTGGTTGTCGAACCACAAACCGTGGAGCCT

CCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGAGCT
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGCACAGATACTCTTCGACTTCCTGGACCTCCTTCCGTAGGACCGGGACTACGCCCTCGA

GGAAGATGGCACCCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CCTTCTACCGTGGGGGGCCCGACCCGTCTAGGAGTTCGTCTGGATACTGTTTAAACTGTG

AAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTCAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
TTTGTACGCGTCACTGCTGCGCGACGAGTTCTTGATGCCAGACGAGAGGACGAAGGCCTT

GGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGC
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CCTGGACGTATTCTGCCTCTGCATGGACTCCCAGTACTTCACGGCGGCGAAGCCCCTCCG

CAGCTGTGCCTTCTAG 3'
||||||||||||||||
GTCGACACGGAAGATCCTAG 5'
```

Plasmidi pCZR126S kokoonpantiin suorittamalla ligaatio seuraaville komponenteille: noin 0,28 µg 5,8 kiloemäksen palasta, joka oli saatu plasmidista pL110 sen jälkeen kun oli pilkottu täydellisesti XbaI:llä ja osittain pilkottu BamHI:llä, kokonaistilavuudessa 2 µl, noin 0,18 µg naudan kasvuhormonin johdannaisen koodaavaa synteettistä geeniä, jossa oli XbaI-kohtaa vastaava 5'-pääte ja BamHI-kohtaa vastaava 3'-pääte, kokonaistilavuudessa 2,5 µl, 8,75 pikomoolia kemiallisesti syntetisoitua XbaI - NdeI-"linker"-kappaletta 1 µl:ssa. Plasmidin komponentit lisättiin seokseen, jossa oli 6 µl 5x ligaatiopuskuria: 250 mM Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 tilavuus/tilavuus-% polyetyleeniglykoli 8000, pH 7,6, 2 µl ligaasia ja 16,5 µl H_2O. Ligaatioseosta inkuboitiin yön ajan 16 °C:ssa. Rengasmuotoon saatetulla plasmidilla pCZR126S transformoitiin E. coli RV308 -soluja noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menetelmää. Plasmidin pCZR126S restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 14.

B. Ihmisen proinsuliinin ilmentämisplasmidin pRB172 kokoonpaneminen

1. Plasmidin pRB145 kokoonpaneminen

Ihmisen proinsuliinigeeni syntetisoitiin ensin erikoistilauksesta ja kloonattiin PUC18-plasmidiin (kaupallisesti saatavissa BRL:lta). Geeni syntetisoitiin käyttäen yleisiä tekniikoita ja se käsittää sekvenssin:

```
   HindIII  NdeI                                                DraIII
5' |AGCTTCAT|ATGTATTTTGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCACCTG|GTGGAAGCTCT
        AGTA TACATAAAACAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTGGAC CACCTTCGAGA

    GTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCCCGAAGACCCGCCGTGAGGCA
    CATGGACCACACGCCACTTGCACCGAAGAAGATGTGGGGCTTCTGGGCGGCACTCCGT
     AvaII                                      XmaI
    GAG|GACCTGCAGGTGGGTCAGGTGGAGCTGGGCGGTGGC|CCGGGTGCAGGCAGCCTGC
    CTC CTGGACGTCCACCCAGTCCACCTCGACCCGCCACCG GGCCCACGTCCGTCGGACG

    AGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTAC
    TCGGCGACCGGGACCTCCCAAGGGACGTCTTCGCACCGTAACACCTTGTTACGACATG
                                                BamHI
    CAGCATCTGCTCCCTGTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG|GATCCG          3'
    GTCGTAGACGAGGGACATGGTCGACCTCTTGATGACGTTGATC CTAGGCTTAA|     5'
                                                          EcoRI
```

Yksi oikean sekvenssin omaavista klooneista valittiin cesiumkloridipuhdistetun DNA:n tuottamista varten. Plasmidi eristettiin käyttäen yleistä menetelmää [ks. esimerkiksi Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (1982), toim. Maniatis, T; Fritsch, E.F. ja Sambrook, J., Cold Spring Harbour Laboratory Publications, New York, jonka koko opetus liitetään tähän viitteenä]. Noin 6 µl (20 µg) tätä plasmidi-DNA:ta lisättiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X NdeI-puskuria (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 6 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µg/ml BSA:a), 5 µl NdeI-restriktioentsyymiä (noin 40 yksikköä) ja 169 µl H_2O. Sekoittamisen jälkeen reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. DNA saostettiin lisäämällä seokseen NaOAc pitoisuudeksi 0,3 M lisäämällä kolme tilavuutta etanolia, sekoittamalla ja jäähdyttämällä -70 °C:seen ja sentrifugoimalla. DNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla (1 ml), kuivattiin ja liuotettiin seokseen, jossa oli 20

µl 10 X BamHI-puskuria (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7,9), 6 mM $MgCl_2$, 100 µg/ml BSA:a), 2 µl BamHI-restriktioentsyymiä (40 yksikköä) ja 178 µl H_2O. Sen jälkeen kun oli sekoitettu varovaisesti, reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. DNA saostettiin jälleen kolmella tilavuudella etanolia kuten yllä ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa, alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä (FMC, "sea plaque" -agaroosi). Haluttu DNA-palanen, joka vastasi noin 270 emäsparia, leikattiin viipaleena geelistä ja DNA saatiin sitten talteen sulattamalla agaroosi ja antamalla kulkea Elutip-d-pylvään (Schleicher asetonitriili Schuell, Keene, N.H.) lävitse myyjän suositteleman menetelmän mukaan. soastamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Noin 15 µg plasmidia pCZR126S (esimerkistä 29A12) suspendoitiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X NdeI-puskuria, 5 µl NdeI-restriktioentsyymiä (40 yksikköä) ja H_2O (175 µl), sekoitettiin varovaisesti ja inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin kolmella tilavuudella etanolia kuten yllä, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin sitten seokseen, jossa oli 20 µl 10 X BamHI-puskuria, 2 µl BamHI-restriktioentsyymiä (40 yksikköä) ja 178 µl vettä. Varovaisen sekoittamisen jälkeen reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. DNA saostettiin jälleen kolmella tilavuudella etanolia ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Vektori-DNA:ta vastaava suurempi palanen leikattiin viipaleena tästä geelistä ja DNA otettiin talteen yllä kuvatun Elutip-d-pylväsmenetelmän avulla. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen vektori-DNA:ta säilytettiin 35 µl:ssa 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Noin 2,5 µl vektori-DNA:ta sekoitettiin sellaisen seoksen kanssa, jossa oli 12 µl edellä saatua puhdistettua

ihmisen insuliinigeenin palasta, 4 µl 10 mM ATP, 0,5 µl 1 M ditiotreitolia, 5 µl 10 X ligaasipuskuria (500 mM Tris-HCl pH 7,6 ja 100 mM $MgCl_2$), 26 µl vettä ja 0,5 µl T4-DNA-ligaasia (Pharmacia, 3,5 yksikköä). Reaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa 16 tunnin ajan. Seos, jolle ligaatio oli suoritettu, laimennettiin 50 µl:lla 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) ja 3 µl:lla 1 M $CaCl_2$ ja transformoitiin sen jälkeen E. coli K12 RV308:aan noudattaen olennaisesti esimerkin 29A3 menettelyä. Solut sijoitettiin maljaviljelmiksi TY-levyille, joihin oli lisätty tetrasykliiniä 5 µg/ml ja sitten inkuboitiin yön ajan 32 °C:ssa.

Tetrasykliinille resistenteistä pesäkkeistä saaduista 3 ml:n viljelmistä eristettiin plasmidit käyttäen nopean alkalisen uuton menetelmää, joka on kuvattu teoksessa Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1982) toim. Maniatis, T., Fritsch, E.F. ja Sambrook, J. Cold Spring Harbour publications, New York (s. 368 - 369). Oikean ihmisen proinsuliinigeenin palasen läsnäolo todettiin pienoisseulontamenetelmän avulla käyttäen polyakryyliamidigeelielektroforeesia XbaI:llä/BamHI:llä pilkotun palasen analysoimiseksi. Plasmidit, joissa oli oikean kokoinen (noin 315 emäsparia) insertti, valittiin monistamista ja puhdistamista varten. Ihmisen proinsuliinigeenin sisältävä plasmidi oli pBR145. Plasmidin pRB145 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 16.

2. Plasmidin pRB164A kokoonpaneminen

Noin 30 µg plasmidia pRB145 suspendoitiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X NdeI-puskuria, 5 µl NdeI-restriktioentsyymiä (New England Biolabs, 40 yksikköä) ja 175 µl H_2O, sekoitettiin varovaisesti ja inkuboitiin 37 °C:ssa yhden tunnin ajan. Sitten lisättiin reaktioseokseen 2 µl BamHI-restriktioentsyymiä (New England Biolabs, 40 yksikköä) ja inkubointia 37 °C:ssa jatkettiin vielä kahden tunnin ajan. DNA saostettiin käyttäen kolmea tilavuutta etan-

olia ja 0,3 M NaOAc ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Pienempi (noin 270 emäsparia) NdeI/BamHI-restriktiopalanen, joka koodasi ihmisen proinsuliinigeenin, leikattiin viipaleena geelistä ja DNA otettiin talteen antamalla kulkea Elutip-d-pylvään lävitse kuten aikaisemmin on kuvattu. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris pH 8,0.

Tämän DNA:n (30 µl) joukkoon lisättiin sitten 20 µl 10 X AvaII-puskuria (50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 6 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µg/ml BSA), 5 µl AvaII-restriktioentsyymiä (New England Biolabs, 20 yksikköä) ja 175 µl H_2O. Sen jälkeen kun oli varovaisesti sekoitettu, reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. DNA saostettiin käyttäen kolmea tilavuutta etanolia ja 3 M NaOAc (20 µl) ja sille suoritettiin sitten elektroforeesi 1,2 % alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Suurempi AvaII/BamHI-restriktiopalanen (noin 156 emäsparia) leikarriin viipaleena geelistä ja DNA otettiin sitten talteen johtamalla Elutip-d-pylvään lävitse kuten aikaisemmin on kuvattu. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris pH 8,0.

Valmistettiin synteettisesti ihmisen proinsuliinigeenin NdeI/AvaII-restriktiopalasta vastaava DNA (noin 115 emäsparia). Ensimmäinen vaihe käsitti neljän yksisäikeisen deoksiribo-oligonukleotidin synteesin DNA-syntetisoijan (Applied Biosystems, malli 380B) avulla. Näiden neljän oligonukleotidin nukleotidisekvenssit ovat

1. TATGCGTATGTTTGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCACCTG
   GTGGAAGCTCTGTACCT (60-meeri)

2. GGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCAAGCCGACC
   CGCCGTGAGGCAGAG (55-meeri)

3. CACCAGGTACAGAGCTTCCACCAGGTGGGAGCC
GCACAGGTGTTGGTTAACAAACATACGCA (62 -meeri)

4. GTCCTCTGCCTCACGGCGGGTCGGCTTGGTGTAGAA
GAAGCCACGTTCACCGCA (54 -meeri)

Sen jälkeen kun kukin oligonukleotidi oli puhdistettu polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla, oligonukleotidit kaksi ja kolme fosforyloitiin noudattaen ohjeita julkaisusta Brown, E.L., Belagaje, R., Ryan, M.J. ja Khorana, H.G. (1979) Methods in Enzymology, toim. Wu, R., Academic Press, N.Y. 68, 109 - 151, jonka koko opetus liitetään tähän viitteenä. Fosforyloidut oligonukleotidit kaksi ja kolme (kumpaakin noin 715 pmol) sekoitettiin sitten oligonukleotidien yksi ja kaksi (noin 860 pmol) kanssa, suoritettiin lämmitys-jäähdytyskäsittely ja yhdistettiin ligaation avulla puskuriliuoksessa (200 µl), joka sisälsi 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DDT, 50 µM ATP ja 20 yksikköä T4-DNA-ligaasia (Pharmacia), 16 tunnin aikana 4 °C:ssa. Ligaatiotuote puhdistettiin 15-%:isessa polyakryyliamidigeelissä. DNA otettiin talteen geeliviipaleesta elektroforeesin avulla, mitä seurasi suolojen poisto käyttäen Sephadex G-50 -pylvästä. Halutun, ligaation avulla yhdistetyn tuotteen saanto oli 485 pmoolia.

Noin 100 pmoolia tätä DNA:ta fosforyloitiin puskuriliuoksessa (50 µl), joka sisälsi 50 mM Tris (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT ja ATP, kuten on kuvattu julkaisussa Brown, E.L. et al., (1979), Methods in Enzymology 68, 109-151, jonka opetus liitetään tähän viitteenä. Sen jälkeen kun oli suodatettu Sephadex G-50 -pylvään lävitse, DNA:ta säilytettiin 50 µl:ssa 10 mM Tris, pH 8,0.

Noin 2,5 µl vektori-DNA:ta (NdeI - BamHI - pilkottu pCZR126S) sekoitettiin 18 µl:n kanssa AvaII/BamHI-restriktiopalasta, joka oli peräisin plasmidista pRB145 ja 10 µl:n (10 pmol) kanssa NdeI/AvaII-synteettistä "linker"-

kappaletta, joka oli juuri kokoonpantu, puskuriliuoksessa (50 µl), joka sisälsi 50 mM Tris (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 800 µl ATP ja 3,5 yksikköä T4-DNA-ligaasia. Reaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa yön ajan ja se transformoitiin sitten E. coli K12 RV308:aan noudattaen esimerkin 29A3 menetelmää. Haluttu transformantti E. coli K12 RV308/pRB164A identifioitiin sen plasmidi-DNA:n analyysin avulla. Asianmukaista transformanttia kasvatettiin 30 °C:ssa TY-elatusaineessa, joka sisälsi tetrasykliiniä 5 µg/ml, kunnes A_{550} oli noin 0,3 (varhainen log-vaihe) ja sitten siirrettiin 42 °C:seen 3 - 3,5 tunnin ajaksi ihmisen proinsuliinin synteesin aiheuttamiseksi. Solut pelletoitiin ja niille aiheutettiin lyysi lisäämällä näytepuskuria (0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 30 % glyseroli, 1 M 2-merkaptoetanoli, 6 M urea). Näytteitä kuumennettiin 97 °C:seen kahden minuutin ajan ennen lisäämistä akryyliamidigeeliin. Vyöhykkeet saatiin helposti silmin nähtäviksi värjäämällä Coomassie Brilliant Blue -värillä. Käytettiin skannaavaa geelin densitometriä soluproteiinin prosenttimäärien määrittämiseksi. Plasmidin pRB164A restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 17.

3. Plasmidin pRB172 kokoonpaneminen

Noin 25 µg plasmidia pRB145 suspendoitiin seokseen, jossa oli 15 µl 10 X DraIII-puskuria (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 µg/ml BSA), 6 µl DraIII-restriktioentsyymiä (Boehringer Mannheim, 27 yksikköä) ja 129 µl H_2O, sekoitettiin varovaisesti ja inkuboitiin 37 °C:ssa kuuden tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin seokseen, jossa oli 10 µl 10 X XbaI-puskuria (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM $MgCl_2$, 7 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µg/ml BSA), 3 µl XbaI-restriktioentsyymiä (Boehringer Mannheim, 36 yksikköä) ja 77 µl H_2O. Reaktioseos sekoitettiin varovaisesti ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa neljän

tunnin ajan. DNA saostettiin jälleen käyttäen kolmea tilavuutta etanolia ja NaOAc:a ja sille suoritettiin elektroforeesi 5-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Alempi vyöhyke, joka vastasi ihmisen proinsuliinigeenin noin 85 emäsparin XbaI/DraIII-restriktiopalasta, leikattiin viipaleena geelistä ja DNA otettiin talteen Elutip-d-pylväsmenetelmän avulla. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris pH 8,0.

Noin 15 µg plasmicia pRB164A pilkottiin restriktioentsyymeillä DraIII ja SbaI noudattaen yllä kuvattua menetelmää. Ylempi vyöhyke, joka vastasi XbaI/DraIII-vektorikappaletta, eristettiin agaroosigeelistä Elutip-d-pylväsmenetelmän avulla. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris pH 8,0.

Noin 5 µl XbaI:llä/DraIII:lla pilkotun pRB164A:n vektori-DNA:ta sekoitettiin 5 µl:n kanssa plasmidista pBR145 peräisin olevaa XbaI/DraIII-restriktiopalasta puskurissa (50 µl), joka sisälsi 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 800 µM ATP ja kuusi yksikköä T4-DNA-ligaasia. Reaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa yön ajan ja se käytettiin sellaisten E. coli K12/RV308 -solujen transformointiin, jotka oli tehty kompetenteiksi normaalin $CaCl_2$-käsittelyn avulla.

Transformantteja valittiin TY-agarlevyillä, jotka sisälsivät tetrasykliiniä 5 µg/ml. Tetrasykliinille resistenteistä pesäkkeistä eristettiin plasmidit käyttäen nopean alkalisen uuton menetelmää ja ne analysoitiin pilkkomalla XbaI- ja BamHI-restriktioendonukleaaseilla. Positiivisista klooneista peräisin oleva DNA sekvenssoitiin käyttäen sekvenaasisysteemiä (U.S. Biochemicals). Oikean halutun sekvenssin omaavat plasmidit valittiin monistamista ja puhdistamista varten. Tällä tavalla eristettiin E. coli K12 RV308/pRB172 -transformantti. Ihmisen proinsuliinin ilmentymistä ja kertymistä tämän plasmidin sisältävillä

soluilla analysoitiin tekemällä solun kokonaisproteiini silmin nähtäväksi sen jälkeen kun oli eroteltu elektroforeesin avulla 15 % polyakryyliamidimatriisissa. Plasmidin pRB172 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 18.

C. Escherichia coli RV308/pRB173:n ja pRB174:n muodostaminen

Noin 20 µg plasmidia pRB172 tai pRB145 suspendoitiin 20 µl:aan 10 X XbaI-puskuria (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,9, 6 mM $MgCl_2$, 7 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µl/ml BSA), lisättiin 2 µl XbaI-restriktioentsyymiä (Boehringer Mannheim, 24 yksikköä), sekoitettiin varovaisesti ja inkuboitiin 37 °C:ssa neljän tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin seokseen, jossa oli 10 µl 10 X BamHI-puskuria (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µl/ml BSA), 5 µl BamHI-restriktioentsyymiä (Boehringer Mannheim, 40 yksikköä) ja 75 µl H_2O. Reaktioseos sekoitettiin varovaisesti ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa neljän tunnin ajan. DNA saostettiin jälleen etanolilla ja NaOAc:lla ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:Isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Noin 320 emäsparin XbaI/BamHI-restriktiopalanen, joka vastasi ihmisen proinsuliinigeeniä, eristettiin geelistä Elutip-d-pylväsmenetelmän avulla. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA uudelleensuspendoitiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X XmaI-puskuria (25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µg/ml BSA), 10 µl XmaI-restriktioentsyymiä (New England Biolabs, 10 yksikköä) ja 170 µl vettä. Reaktioseos sekoitettiin varovaisesti ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa neljän tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin etanolilla ja NaOAc:lla ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Suurempi DNA, joka vastasi noin 200 emäsparin

XbaI/XmaI-restriktiopalasta, leikattiin viipaleena geelistä ja DNA otettiin talteen Elutip-d-pylvään avulla kuten aikaisemmin on kuvattu. DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris pH 8,0.

Ihmisen proinsuliinigeenin XmaI/BamHI-restriktiopalasta vastaava 51 emäsparin DNA kokoonpantiin synteettisesti seuraavasti. Syntetisoitiin kaksi yksisäikeistä deoksiribo-oligonukleotidia:

CCGGGTGCAGGCAGCCTGCAGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCCTGCAGTAG (51 -meeri) ja

GATCCTACTGCAGGGAACCCTCCAGGGCCAGCGGCTGCAGGCTGCCTGCAC (51 -meeri)

käyttäen Applied Biosystems -DNA-syntetisoijaa (malli 380B) ja puhdistettiin polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla 7 M urean läsnä ollessa. Eristämisen jälkeen kyseiset kaksi oligonukleotidia fosforyloitiin noudattaen ohjeita julkaisusta Brown, E.L., Belagaje, R., Ryan, M.J. ja Khorana, H.G. (1979) Methods in Enzymology, toim. Wu, R., Academic Press, N.Y. 68, 109 - 151 ja suoritettiin lämmitys-jäähdytyskäsittely halutun "linker"-kappaleen muodostamiseksi.

Noin 10 µg plasmidia pCZR126S (esimerkistä 29A12) suspendoitiin seokseen, jossa oli 20 µl 10 X XbaI-puskuria (150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7,9), 6 mM $MgCl_2$, 7 mM 2-merkaptoetanoli, 100 µg/ml BSA), 2 µl XbaI-restriktioentsyymiä (Boehringer Mannheim, 24 yksikköä) ja 178 µl vettä. Reaktioseos sekoitettiin varovaisesti ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa kahden tunnin ajan. Tämän inkuboinnin jälkeen lisättiin 4 µl 5 M NaCl ja 2 µl BamHI-restriktioentsyymiä (New England Biolabs, 20 yksikköä) ja inkubointia jatkettiin vielä kahden tunnin ajan 37 °C:ssa. DNA saostettiin sitten etanolilla ja NaOAc:lla tavanomaisen menetelmän mukaan ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Ylempi vyöhyke, joka vastasi XbaI/BamHI-vektori-DNA:ta, eristettiin Elutip-d-pylvään avulla. Saostamisen ja kuivaamisen jälkeen DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris, pH 8,0.

Noin 5 µl XbaI:llä/BamHI:llä pilkotun pCZR126S:n vektori-DNA:ta sekoitettiin 10 µl:n kanssa pRB145:stä tai pRB172:sta saatua XbaI/XmaI-restriktiopalasta ja 4 µl:n kanssa yllä valmistettua kinaasilla käsiteltyä XmaI/BamHI-"linker"-kappaletta puskuriliuoksessa (50 µl), joka sisälsi 50 µM Tris (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 800 µM ATP ja kuusi yksikköä T4-DNA-ligaasia. Reaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa yön ajan ja se käytettiin E. coli K12 RV308 -kannan transformointiin noudattaen esimerkin 29A3 menetelmää. Halutut transformantit E. coli K12 RV308/pRB173 (jos se oli valmistettu käyttäen pRB172:n vektorikappaletta) ja E. coli K12 RV308/pRB174 (jos valmistuksessa oli käytetty pRB145:n vektorikappaletta) identifioitiin analysoimalla niiden plasmidi-DNA ja proteiinin tuotanto ennen induktiota 42 °C:ssa tai sen jälkeen. Plasmidin pRB173 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 19.

Noin 200 ng pienoisvalmistuksesta saatua plasmidi-DNA:ta transformoitiin myös E. coli L201 -soluihin ja transformantteja valittiin 2 x TY -agarlevyillä, jotka sisälsivät tetrasykliiniä 15 µg/ml. Transformanttien ilmentämät proteiinit analysoitiin ja halutut transformantit varmistettiin oikeiksi niiden ihmisen proinsuliinin tuotannon perusteella. Tällä tavalla eristettiin E. coli L201/pRB173 ja E. coli L201/pRB174.

D. Escherichia coli K12 RV308/pRB175:n, pRB176:n, pRB177:n ja pRB178:n muodostaminen

Noin 12 µg plasmidia pRB172 suspendoitiin seokseen, jossa oli 15 µl 10 X NdeI-puskuria (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA), 2,5 µl NdeI-restriktioentsyymiä (20 yksikköä) ja 133 µl vettä. Reaktioseos sekoitettiin varovaisesti ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa yön ajan. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin etanolilla ja NaOAc:lla tavanomaisen menetelmän mukaan, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin seokseen,

jossa oli 15 µl 10 X DraIII-puskuria (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT), 5 µl DraIII-restriktioentsyymiä (20 yksikköä) ja 130 µl H_2O. Sen jälkeen kun oli sekoitettu varovaisesti, reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa yön ajan. DNA saostettiin jälleen etanolilla ja NaOAc:lla kuten yllä ja sille suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroosigeelissä. Haluttu suurempi restriktiopalanen leikattiin viipaleena geelistä ja DNA otettiin talteen Elutip-d-pylväsmenetelmän avulla. DNA:ta säilytettiin 30 µl:ssa 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

Syntetisoitiin kemiallisesti seuraavat DNA-"linker"-kappaleet käyttäen Applied Biosystems -DNA-syntetisoijaa (malli 380B):

(i) 5' TATGTACGACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' pRB175:tä varten

(ii) 5' TATGTACGACGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCTGCAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' pRB176:ta varten

(iii) 5' TATGTATAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' pRB177:ää varten

(iv) 5' TATGTACGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCATCTG 3'
3' ACATGCAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTA 5' pRB178:aa varten

Sen jälkeen kun kukin oligonukleotidi oli puhdistettu polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla, ne fosforyloitiin noudattaen aikaisemmin mainittuja ohjeita ja niille suoritettiin lämmitys-jäähdytyskäsittely, jotta helpotettaisiin ihmisen proinsuliinigeenin analogin koodaavien DNA-palasten ligaatiota ja kokoonpanemista. "Linker"-kappaleita (i) - (iv) käytettiin vastaavasti plasmidien pRB175, pRB176, pRB177 ja pRB178 kokoonpanemiseen.

Noin 3 µl NdeI:llä/DraIII:lla pilkotun pRB172:n vektori-DNA-palasta sekoitettiin 4 µl:n kanssa kutakin erillisistä kinaasilla käsitellyistä "linker"-kappaleista (i-iv) puskuriliuoksessa (50 µl), joka sisälsi 50 µM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 800 µM ATP ja kuusi yksikköä T4-DNA-ligaasia. Reaktioseosta inkuboitiin 4 °C:ssa yön ajan ja tämä seos käytettiin E. coli K12 RV308 -solujen transformointiin noudattaen esimerkin 29A3 menetelmää. Halutut transformantit E. coli K12 RV308/pRB175, E. coli K12 RV308/pRB176, E. coli RV308/pRB177 ja E. coli K12 RV308/pRB178 identifioitiin analysoimalla niiden plasmidi-DNA ja proteiinin tuotanto ennen solujen indusointia 42 °C:ssa ja sen jälkeen. Plasmidin pRB175 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta on annettu oheisten piirrosten kuviossa 20.

Taulukko I

Ihmisen proinsuliinin analogeja

Analogi	Plasmidi	% proteiinia
Met-Tyr-ihmisen proinsuliini (HPI)	pRB145	11,3
Met-Arg-Met-[Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB164A	10,5
Met-Tyr-[Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB172	7,3
Met-Tyr[Lys(B28),Pro(B29)B-ketju]-Q*	pRB173	ND
Met-Tyr-[B-ketju]-Q*	pRB174	ND
Met-Tyr-[Des(B1),Des(B2),Asp(B3), Lys(B28),Pro(B29)HPI]	pRB175	8,5
Met-Tyr-[Asp(B1),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB176	9,3
Met-Tyr-[Des(B1),Des(B2),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB177	9,4
Met-Tyr-[Des(B1),Lys(B28), Pro(B29)HPI]	pRB178	8,5

*Q = -Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-;

E. E. coli K12 RV308/pRB172:n kantaviljelmästä muodostettiin pysyvä kantaviljelmä seuraavalla tavalla

Eristettyjä pesäkkeitä sijoitetaan seuraaville fenotyyppimaljoille: L-Agar + 5 µg/ml Tc (tetrasykliiniä), L-agar + Sm (Streptomysiinisulfaatti), M-9 - elatusaineagar (suolaperustainen elatusaine, joka sisälsi $MgSO_4$, tiamiinia, HYCASEa ja glukoosia) ja M-9 - elatusaineagar, jossa ei ole glukoosia ja on laktoosia. Yhtä L-agar/Tc-maljaa inkuboidaan 42 °C:ssa ja muita maljoja inkuboidaan 30 °C:ssa 24 tunnin ajan. 30 °C:n L-agar/Tc-maljalta valittu fenotyypiltään oikea pesäke siirrostetaan pulloon, joka sisältää 50 ml L-liemi (sisältää tryptonia, hiivauutetta, NaCl ja glukoosia) -elatusainetta, jossa on 5 µg/ml Tc. Pulloa inkuboidaan 30 °C:ssa ravistaen seitsemän tunnin ajan. Pullossa oleva materiaali (1,2 ml) jaetaan biojäädytyspulloihin ja jäädytetään höyryfaasin nesteytetyssä typessä. Materiaali sulatetaan sitten ja 1 ml istutetaan pulloon, joka sisältää 50 ml L-lientä plus 5 µg/ml Tc. Pulloa inkuboidaan 30 °C:ssa ravistaen neljän tunnin ajan. Kahteen pulloon, jotka sisältävät 500 ml BG-7 - elatusainetta (sisältää $MgSO_4$, tiamiinia, glukoosia, Tc ja hivensuoloja), istutetaan kumpaankin 1 ml edellä olevasta ja pulloja inkuboidaan ravistaen yhdeksän tunnin ajan 30 °C:ssa.

150 litran fermentoriin, joka sisältää 80 litraa elatusainetta (sisältää sitruunahappoa, rauta(2)ammoniumsulfaattia, K_2HPO_4, NH_4Cl, NaH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgSO_4$, glukoosia ja epäorgaanisia hivensuoloja), istutetaan 1 litra yllä olevaa BG-7-elatusainekasvulientä. Fermentoria käytetään 30 °C:ssa, kunnes hiilidioksidin kehityksen nopeus saavuttaa arvon 1,0 mM/litra/min. Tuona ajankohtana siirretään 50 litraa kasvulientä tuotantofermentoriin solujenistutusmateriaaliksi.

2 500 litran fermentoria, joka sisältää 1 500 litraa samaa elatusainetta, jota on käytetty 150 litran fer-

mentorissa, käytetään 30 °C:ssa, kunnes hiilidioksidin kehityksen nopeus saavuttaa arvon 1,0 mM/litra/min ja lämpötila nostetaan sitten 40 °C:seen. Työvaihetta jatketaan vielä kahdeksan tunnin ajan. Kasvuliemi inaktivoidaan sitten kuumuuden avulla pitäen 61 °C:ssa seitsemän minuutin ajan. Kuumuudella inaktivoidusta kasvuliemestä saatiin seuraavat saantotulokset: Solusaanto 13,1 g/l, kuivapainoa; tuotantoteho 273 µg des-formulaattia/ml lientä; spesifinen aktiivisuus (esim. grammoja tuotetta/gramma soluja) 2,1 %; prosenttia formuloitua tuotetta 13 %.

Fermentaatioliemi siirretään ruostumatonta terästä olevaan säiliöön ja lämpötila pidetään välillä 2 - 8 °C. Sitten sentrifugoidaan tai suodatetaan koko liemi E. coli -solujen kokoamiseksi, niin että saadaan kiinteiden aineiden kuivapainoksi suunnilleen 15 - 20 %. Koottu solususpensio sekoitetaan uudelleen lietteeksi prosessiveteen. Solut rikotaan sitten käyttäen suurpainehomogenointai tai muita sopivia menetelmiä, jotta aikaansaataisiin 90 - 99 %:n soluista lyysi. Homogenoitu liete laimennetaan 5 %:ksi kuivapainoa prosessivedellä. Laimennetun hajotettujen solujen lietteen pH säädetään välille 7 - 10 lisäämällä natriumhydroksidia. Inkluusiokappaleet (jyväset) erotetaan solujätteistä differentiaalisentrifugoinnin avulla. Tulokseksi saadussa konsentraatissa on 15 - 20 % kiinteitä aineita.

Inkluusiokappaleet liuotetaan alkalisessa pH:ssa kysteiinin ja urean läsnä ollessa. Näille liuotetuille jyväsille suoritetaan kationinvaihtokromatografia käyttäen SP Sepharose-superflow -pylvästä proinsuliinin analogin sekadisulfidimuodon erottamiseksi rakeisen materiaalin kokonaismäärästä.

Proinsuliinin analogin aminopään metionyyli-tyrosiinijatke poistetaan inkuboimalla katepsiini C:n kanssa, joka on dipeptidyyliaminopeptidaasi. Katepsiinin lohkaisureaktio päätetään suorittamalla sulfitolyysi käyttäen ka-

liumtetrationaattia ja kysteiiniä pH:ssa 8,8. Sen jälkeen kun on suoritettu liuottimen vaihto Sephadex G-25:n kautta, tulokseksi saadun proinsuliinin analogin s-sulfonaatin annetaan laskostua inkuboimalla pH:ssa 10,6 kysteiinin läsnä ollessa. Laskostumisprosessi pysäytetään säätämällä pH 2,4:ksi. Oikein laskostunut proinsuliinin analogi erotetaan väärin laskostuneesta materiaalista sekä katepsiini C:llä lohkaisun vaiheesta jäljelle jääneistä epäpuhtauksista suorittamalla hydrofobisen vuorovaikutuksen kromatografia käyttäen SP20SS-hartsia. Tämä erottelu tapahtuu asetonigradientin avulla, niin että orgaaninen liuotin täytyy poistaa eluentin yhteisliuoksesta haihduttamalla ennen lisäkäsittelyä.

Sen jälkeen kun orgaaninen liuotin on haihdutettu, oikein laskostunut proinsuliinin analogia inkuboidaan trypsiinin ja karboksipeptidaasi B:n kanssa. Nämä entsyymit leikkaavat ipois proinsuliinin analogin C-peptidin ja aikaansaavat Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin. Tätä insuliinin analogia puhdistetaan sitten lisäksi kationinvaihtokromatografian avulla käyttäen S-Sepharosea ja sen jälkeen korkeapainekäänteisfaasikromatografian avulla käyttäen 10 µm:n C-8-hartsia. Asetonitriili poistetaan käänteisfaasieluentista suorittamalla liuottimen vaihto Sephadex G-25:n kautta ja tulokseksi saatu materiaali konsentroidaan käyttäen kierukkaultrasuodatussysteemiä. Konsentroidulle materiaalille suoritetaan kokoon perustuva ekskluusiokromatografia käyttäen Sephadex G-50 -hartsia ja lyofilisoidaan kuivaksi.

Seuraavassa taulukossa II on esitetty edellä olevien esimerkkien yhdisteiden aminohappoanalyysit.

Taulukko II

Ihmisen insuliinin analogien aminohappoanalyysi[1,2]

Esimerkki nro	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aminohappo-jäännös									
Asp	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	4,00(4)	4,00(4)	4,00(4)	3,00(3)	3,00(3)
Thr	2,82(3)	2,81(3)	2,64(3)	2,80(3)	2,80(3)	2,94(3)	2,81(3)	2,71(3)	2,73(3)
Ser	2,76(3)	2,73(3)	2,70(3)	2,75(3)	2,71(3)	2,46(3)	2,71(3)	2,74(3)	2,72(3)
Glu	7,16(7)	7,05(7)	6,93(7)	7,08(7)	7,01(7)	6,69(7)	7,18(7)	6,99(7)	7,94(8)
Pro	1,02(1)	1,11(1)	0,92(1)	0,98(1)	1,01(1)	0,98(1)	1,02(1)	1,09(1)	0,98(1)
Gly	3,93(4)	4,00(4)	3,85(4)	3,99(4)	4,02(4)	3,97(4)	4,01(4)	3,95(4)	3,90(4)
Ala	1,01(1)	1,04(1)	1,93(2)	1,02(1)	1,05(1)	1,05(1)	1,03(1)	1,03(1)	1,02(1)
Cys(1/2)	5,13(6)	-(6)[3]	5,13(6)	5,17(6)	5,32(6)	4,91(6)	5,53(6)	5,23(6)	5,33(6)
Val	3,45(4)	3,44(4)	3,49(4)	3,51(4)	3,41(4)	3,67(4)	3,54(4)	3,45(4)	3,48(4)
Ile	1,47(2)	1,47(2)	1,49(2)	1,58(2)	1,44(2)	1,65(2)	1,68(2)	1,48(2)	1,47(2)
Leu	6,04(6)	6,01(6)	5,86(6)	6,19(6)	6,06(6)	5,67(6)	5,99(6)	6,02(6)	5,98(6)
Tyr	3,83(4)	3,74(4)	3,52(4)	4,19(4)	3,90(4)	3,55(4)	3,82(4)	3,73(4)	3,58(4)
Phe	2,84(3)	2,85(3)	2,64(3)	2,85(3)	2,84(3)	3,02(3)	2,86(3)	2,72(3)	2,73(3)
His	2,35(2)	2,10(2)	2,02(2)	2,14(2)	1,60(2)	2,09(2)	1,07(1)	2,02(2)	2,10(2)
Lys	0,97(1)						0,97(1)		
Arg	0,99(1)	0,90(1)	0,88(1)	1,96(2)	0,91(1)	0,81(1)	0,91(1)	0,89(1)	0,98(1)
Aba		-(1)[3]							
Cya								0,90(1)	
Nle									
Orn									
Nva									
Met									
Trp									

[1]Mooliykkönen perustuu asparagiinihappoon

[2]Suluissa oleva luku on teoreettinen aminohappopitoisuus

[3]Kystiininpuolikas plus aminovoihappo olivat yhteensä 6,49.

95915

Taulukko II (jatkoa)

Ihmisen insuliinin analogien aminohappoanalyysi[1,2]

Esimerkki nro	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Aminohappo-jäännös									
Asp	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)
Thr	2,76(3)	3,59(3)	2,80(3)	2,80(3)	2,70(3)	2,83(3)	2,85(3)	3,03(3)	2,80(3)
Ser	2,69(3)	2,64(3)	2,43(3)	2,78(3)	2,87(3)	2,78(3)	2,97(3)	2,68(3)	2,72(3)
Glu	8,04(8)	6,84(7)	6,89(7)	7,09(7)	7,04(7)	7,08(7)	6,94(7)	6,99(7)	7,01(7)
Pro	1,11(1)	1,48(1)	1,09(1)	1,12(1)	0,93(1)	1,16(1)	1,10(1)	1,14(1)	1,02(1)
Gly	4,04(4)	5,70(5)	3,89(4)	4,03(4)	3,98(4)	4,00(4)	4,12(4)	4,08(4)	3,92(4)
Ala	1,05(1)	1,14(1)	1,04(1)	1,05(1)	1,08(1)	1,04(1)	1,09(1)	1,07(1)	1,03(1)
Cys(1/2)	5,26(6)	4,54(6)	4,57(6)	5,19(6)	5,00(6)	4,75(6)	5,20(6)	4,82(6)	5,30(6)
Val	3,60(4)	3,52(4)	3,58(4)	3,43(4)	3,41(4)	3,51(4)	3,49(4)	3,63(4)	3,51(4)
Ile	1,62(2)	1,82(2)	1,70(2)	2,36(3)	1,44(2)	1,51(2)	1,52(2)	1,75(2)	1,55(2)
Leu	5,99(6)	5,79(6)	5,95(6)	5,98(6)	6,89(7)	6,10(6)	5,95(6)	5,98(6)	6,11(6)
Tyr	3,73(4)	3,89(4)	3,75(4)	3,74(4)	3,64(4)	3,86(4)	3,74(4)	3,80(4)	3,84(4)
Phe	2,88(3)	3,47(3)	3,01(3)	2,85(3)	2,71(3)	2,86(3)	2,87(3)	3,13(3)	2,89(3)
His	2,08(2)	2,24(2)	3,39(3)	2,07(2)	2,30(2)	2,48(2)	2,20(2)	2,29(2)	2,10(2)
Lys							0,99(1)		
Arg	0,91(1)	0,80(1)	0,95(1)	0,89(1)	0,86(1)	1,00(1)	0,87(1)	0,80(1)	1,03(1)
Aba									
Cya									
Nle						0,93(1)			
Orn									0,96(1)
Nva									
Met								0,98(1)	
Trp									

959 15

Taulukko II (jatkoa)

Ihmisen insuliinin analogien aminohappoanalyysi[1,2]

Esimerkki nro	20	21	22	23	24	25	26	27
Aminohappo-jäännös								
Asp	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)	3,00(3)
Thr	2,51(3)	3,04(3)	2,76(3)	3,73(4)	2,70(3)	2,80(3)	3,16(3)	2,75(3)
Ser	2,55(3)	2,69(3)	3,60(4)	2,74(3)	2,76(3)	2,78(3)	2,75(3)	2,63(3)
Glu	7,25(7)	7,06(7)	6,99(7)	7,07(7)	7,01(7)	7,04(7)	6,98(7)	7,02(7)
Pro	0,93(1)	2,20(2)	0,95(1)	1,00(1)	0,95(1)	1,11(1)	1,22(1)	1,16(1)
Gly	3,92(4)	3,93(4)	3,91(4)	3,97(4)	3,94(4)	3,97(4)	4,26(4)	3,98(4)
Ala	1,09(1)	1,02(1)	1,07(1)	1,03(1)	1,08(1)	1,04(1)	1,14(1)	1,03(1)
Cys(1/2)	4,53(6)	5,57(6)	4,31(6)	5,01(6)	4,05(6)	5,17(6)	4,81(6)	5,16(6)
Val	3,72(4)	3,61(4)	3,37(4)	3,42(4)	3,41(4)	3,43(4)	4,80(5)	3,59(4)
Ile	1,72(2)	1,56(2)	1,42(2)	1,48(2)	1,44(2)	1,48(2)	1,67(2)	1,59(2)
Leu	6,01(6)	6,09(6)	5,95(6)	6,02(6)	6,01(6)	5,98(6)	5,96(6)	5,99(6)
Tyr	3,55(4)	3,93(4)	3,60(4)	3,72(4)	3,78(4)	4,67(5)	3,77(4)	3,75(4)
Phe	3,59(4)	3,13(3)	2,76(3)	2,85(3)	2,74(3)	2,83(3)	3,28(3)	2,87(3)
His	2,14(2)	2,10(2)	2,55(2)	2,32(2)	2,82(2)	2,08(2)	2,25(2)	2,02(2)
Lys								
Arg	0,87(1)	1,02(1)	0,85(1)	0,92(1)	1,05(1)	0,86(1)	1,02(1)	0,87(1)
Aba								
Cya								
Nle								
Orn								
Nva								0,98(1)
Met								
Trp					0,89(1)			

959 15

Tämän keksinnön mukaisten insuliinin analogien fysiologiset vaikutukset osoitettiin seuraavassa in vivo -koejärjestelmässä.

Koe-eläiminä käytettiin normaaleja urospuolisia Sprague Dawley -rottia, jotka oli hankittu laboratoriolta Charles River Laboratories (Portage, MI). Ne painoivat saataessa 160 - 180 g ja niitä pidettiin yhden viikon ajan eläinhuoneissa 24 °C:ssa käyttäen säädettyä valosykliä (valot päällä 7:00 - 19:00, valot pois 19:00 - 7:00). Eläimille syötettiin Purina-rotan ravintoa 5001 mielinmäärin. Kuhunkin kokeeseen käytettävien rottien annettiin paastota 16 tunnin ajan ennen käyttöä. Ne painoivat noin 200 g, kun niitä käytettiin ensimmäisen kerran. Eläinten saavutettua paaston jälkeisen painon noin 275 g (kolmen viikon kuluessa) niitä ei enää käytetty. Yhtä 10 urospuolisen rotan ryhmää käytettiin kunakin päivänä kutakin testattavaa yhdistettä varten (ts. biosynteettinen ihmisen insuliini, sian insuliini ja ihmisen insuliinin analogi). Kutakin ryhmää käytettiin ainoastaan kerran viikon aikana. 10 rottaa jaettiin kahdeksi ryhmäksi, joissa oli kummassakin viisi rottaa. Toinen ryhmä toimi kontrollina ja sille annettiin ainoastaan vehikkeliä subkutaanisesti. Toiselle viiden rotan ryhmälle annettiin testattavaa yhdistettä. Proteiinit liuotettiin 0,05 N HCl:oon (pH 1,6) kantaliuokseksi, joka sisälsi 100 µg ml:aa kohden. Tästä valmistettiin normaaliin suolaliuokseen muutamia laimennoksia, jotka ruiskutettiin rottiin subkutaanisesti. Otettiin 100 µl:n verinäyte kunkin rotan häntälaskimosta ajankohtana nolla ja 30 minuuttia, yksi tunti, kaksi tuntia, kolme tuntia ja neljä tuntia antamisen jälkeen. Glukoosi määritettiin kolorimetrisesti käyttäen glukoosioksidaasimenetelmää (Sigma Chemical Co.). Prosenttinen muutos veren glukoosimäärässä nollahetken arvosta laskettiin kullekin rotalle ja lopulliset tulokset ilmaistiin keskimääräisenä prosenttisena muutoksena ± keskiarvon keskivirhe koeryh-

mässä korjattuna kontrolliryhmässä sinä päivänä saadulla keskimääräisellä muutoksella.

Kokeiden perusteella laadittiin annos-vastekäyrä käyttäen testattavan yhdisteen 4 - 7 erilaista konsentraatiota ja käyttäen maksimaalista vastausta määrättynä ajankohtana (tavallisesti yksi tai kaksi tuntia proteiinin antamisen jälkeen). Tältä käyrältä määritettiin ED_{50}-arvo proteiinin ihon alle annettuna annoksena (µg/kg), jolla saatiin puolet maksimaalisesta hypoglykeemisesta vastauksesta. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa III.

Taulukko III[a]

Yhdiste	Maksimivaikutus (%)	ED_{50}[b]	Biologinen aktiivisuus
Ihmisen insuliini (HI)[d]	66	7,95	100
Sian insuliini	60	7,70	103
Lys(B28),Pro(B29)HI	66	6,8	117
Ala(B28),Pro(B29)HI	71	15,0	53
Asp(B28),Pro(B29)HI	64	10,2	78
Asp(B10),Lys(B28), Pro(B29)HI	53	10,7	74
Gln(B28),Pro(B29)HI	69	6,6	120
Gly(B28),Pro(B29)HI	58	10,5	76
Met(B28),Pro(B29)HI	51	14,6	54
Nle(B28),Pro(B29)HI	54	7,0	114
Orn(B28),Pro(B29)HI	60	12,7	63
Pro(B29)HI	63	8,7	91
Phe(B28),Pro(B29)HI	57	9,7	82
Val(B28),Pro(B29)HI	53	8,7	91

[a]Kaikki esitetyt arvot tarkoittavat verinäytteitä, jotka on otettu yksi tunti ilmoitetun yhdisteen antamisen jälkeen

[b]Ilmaistu yksikköinä µg/kg, subkutaanisesti

[c]Verrattuna ihmisen insuliiniin

[d]Biosynteettinen ihmisen insuliini

Kuten aikaisemmin on mainittu, on tämän keksinnön mukaisesti valmistetuilla insuliinin analogeilla vähentynyt taipumus dimeroitua tai muuten liittyä keskenään suuremman molekyylipainon omaaviksi muodoiksi. Annettaessa yhtä tai useampaa mainittua analogia aikaansaadaan siten nopea aktiivisuuden alkaminen. Tässä valmistetut insuliinin analogit ovat tehokkaita veren liikasokerisuuden hoitamisessa antamalla sitä tarvitsevalle potilaalle tehokas määrä kaavan I mukaista insuliinin analogia. Tässä käytettynä ilmaus "tehokas määrä" tarkoittaa sellaista määrää yhtä tai useampaa tämän keksinnön mukaista insuliinin analogia, joka tarvitaan alentamaan tai ylläpitämään veren sokeritasoja joko terapeuttisesti tai ennalta ehkäisevästi. Tämä määrä voi tyypillisesti olla noin 10 yksiköstä noin 60 yksikköön tai enemmän päivää kohden (tai noin 0,3 - noin 2 mg olettaen, että on suunnilleen 29 yksikköä mg:aa kohden). Kuitenkin on selvää, että insuliinin analogin (analogien) todellisuudessa annettavan määrän ratkaisee lääkäri ottaen huomioon asiaankuuluvat seikat mukaan lukien hoidettava tila (ts. veren liikasokerisuuden syy), annettava nimenomainen analogi, valittu ruoansulatuskanavan ulkopuolinen antamisreitti, kysymyksessä olevan potilaan ikä, paino ja reagointi ja potilaan oireiden vakavuus. Sen vuoksi yllä olevien annostuksen rajojen ei ole tarkoitus rajoittaa keksinnön piiriä millään tavoin.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja insuliinin analogeja annetaan niitä tarvitsevalle potilaalle (ts. veren liikasokerisuudesta kärsivälle potilaalle) sellaisten farmaseuttisten valmisteiden avulla, jotka sisältävät tehokkaan määrän vähintään yhtä kaavan I mukaista insuliinin analogia yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän täyte- tai kantaja-aineen kanssa. Tätä tarkoitusta varten voidaan farmaseuttiset valmisteet tyypillisesti sekoittaa sellaisiksi, että ne sisältävät noin 100 yksikköä ml:aa kohden tai samankaltaisia konsentraatioita,

jotka sisältävät tehokkaan määrän insuliinin analogia (analogeja). Nämä valmisteet ovat tyypillisesti, vaikkakaan eivät välttämättä, luonteeltaan ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettavia ja ne voidaan valmistaa käyttäen mitä tahansa monista eri tekniikoista ja tavanomaisia alalla tunnettuja ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettavissa tuotteissa käytettäviä täyte- tai kantaja-aineita. Katso esimerkiksi Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. painos, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA (1985), joka liitetään tähän viitteenä. Esimerkiksi ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettavia annostusmuotoja voidaan valmistaa suspendoimalla tai liuottamalla haluttu määrä vähintään yhtä kaavan I mukaista insuliinin analogia sellaiseen ei-myrkylliseen nestemäiseen vehikkeliin, joka sopii ruiskeeseen, kuten esimerkiksi vesiväliaineeseen ja steriloimalla suspensio tai liuos. Vaihtoehtoisesti voidaan panna mitattu määrä yhdistettä pulloon ja pullo ja sen sisältö steriloida ja sulkea. Voidaan tarjota mukana pullo tai vehikkeli ennen antamista tapahtuvaa sekoittamista varten. Ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettaviksi sopivissa farmaseuttisissa valmisteissa käytetään sellaisia laimennus-, täyte- ja kantaja-aineita kuin esimerkiksi vesi ja sellaiset veteen sekoittuvat orgaaniset liuottimet kuin glyseroli, seesamiöljy, maapähkinäöljy, vesipitoinen propeeniglykoli, N,N'-dimetyyliformamidi ja vastaavat. Esimerkkejä sellaisista farmaseuttisista valmisteista ovat kaavan I mukaisten insuliinin analogien steriilit, isotoniset suolavesiliuokset, jotka voivat olla puskuroituja farmaseuttisesti hyväksyttävällä puskuriaineella ja jotka ovat pyrogeenittömiä. Lisäksi ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti annettava farmaseuttinen valmiste voi sisältää säilytysaineita, kuten esimerkiksi metakresolia tai muita aineita lopullisen tuotteen pH:n säätämiseksi, kuten esimerkiksi natriumhydroksidia tai kloorivetyhappoa.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettuja insuliinin analogeja voidaan myös sekoittaa farmaseuttisiksi valmisteiksi, jotka sopivat annettaviksi nenän sisään. Sellaisia valmisteita esitellään yksityiskohtaisesti EP-patenttihakemuksessa 0 200 383 A3, joka liitetään tähän viitteenä. Lyhyesti kuvattuna sellaisia valmisteita sekoitetaan käyttäen yhtä tai useampaa farmaseuttisesti hyväksyttävää laimennusainetta, farmaseuttisesti hyväksyttävää määrää olennaisesti sinkittömän insuliinin alkalimetallisuolaa, ammoniumsuolaa tai vapaata happoa ja valinnaisesti imeytymistä lisäävää määrää vähintään yhtä imeytymistä lisäävää ainetta, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (1) öljyhappo tai sen esteri tai suola, (2) nestemäistä muotoa oleva sorbitaanin rasvahappoesteri, (3) nestemäistä muotoa oleva sorbitaanin rasvahappoesterin polyoksieteenijohdannainen ja (4) nestemäistä muotoa oleva hydroksipolyoksieteeni-polyoksipropeeni-polyoksieteenikopolymeeri.

Tarkoituksena osoittaa insuliinin analogin Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini tehokkuus verrattuna ihmisen natriuminsuliiniin nenän sisään annettaessa suoritettiin seuraava tutkimus. Urospuolisten jäniskoirien, jotka painoivat 10 - 12 kg, terveydentila pidettiin erinomaisena ennen koetta ja sen aikana. Koirien annettiin paastota 16 tunnin ajan, mutta niillä oli saatavilla vettä, jotta vältettäisiin insuliinitasojen odottamattomat vaihtelut. Koko tutkimuksen ajan koirat olivat nukutettuina natriumpentobarbitolilla ja niiden ruumiin lämpötilaa pidettiin yllä lämmitystyynyjen avulla, jotta saataisiin mahdollisimman vähäiseksi glukoosimäärän vaihtelu. Insuliinikoenäytteet (ts. Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliini ja ihmisen natriuminsuliini) liuotettiin tislattuun veteen ja liuoksen pH säädettiin 7,5:ksi natriumhydroksidilla. Lopullinen insuliinin konsentraatio oli 70 yksikköä ml:aa kohden. Insuliiniannos, jossa oli 0,8 yksikköä Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinia kg:aa kohden, an-

nettiin kullekin kahdeksasta koirasta ja samalla tavoin annettiin annos, jossa oli 0,8 yksikköä ihmisen natriuminsuliinia kg:aa kohden, kullekin neljästä koirasta. Kaikki annokset annettiin nenäonteloon antamalla yksi suihke sierainta kohden kalibroidun annoksen sumuttimella ja modifioidulla nenäänantamislaitteella. Otettiin verinäytteitä kaulalaskimosta 30, 15 ja 0 minuuttia ennen antamista ja 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 ja 240 minuuttia antamisen jälkeen veren glukoosimäärän vähentymisen mittaamista varten. Tämän tutkimuksen tulokset on esitetty taulukossa IV.

Taulukko IV[a]

Aika (min)	Lys(B28),Pro(B29) - ihmisen insuliini (% alkuperäisestä)	Ihmisen natriuminsuliini (% alkuper.)
-30	95,4 ± 2,5	101,6 ± 2,4
-15	98,2 ± 2,8	102,4 ± 2,9
0	100	100
10	95,4 ± 2,1	100,8 ± 1,9
20	83,5 ± 3,3	96,0 ± 2,1
30	72,2 ± 4,5	91,6 ± 2,8
45	61,6 ± 6,9	89,1 ± 2,3
60	60,0 ± 6,0	93,6 ± 4,5
90	71,6 ± 4,6	92,2 ± 1,6
120	76,1 ± 3,7	91,3 ± 2,8
180	91,2 ± 1,8	93,8 ± 1,8
240	85,4 ± 2,7	90,7 ± 2,8

[a]Veren glukoositasot: keskiarvo ± keskiarvon keskivirhe

Käyttäen yllä kuvattua ohjelmaa verrattiin Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin verenglukoosinvähentämisprofiilia nenän sisään annettaessa sekä analogin laskimoon että ihon alle antamisen tapaukseen seuraavasti. Laskimoon antamisen tapauksessa insuliiniliuos, joka sisälsi Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinin analogia, annettiin kertaruiskeena (0,1 yksikköä kg:aa kohden) kullekin neljästä koirasta jalkavarren iholaskimoon. Otettiin verinäytteitä 30, 15 ja 0 minuuttia ennen antamista ja 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 ja 240 minuuttia an-

tamisen jälkeen. Ihon alle antamisen tapauksessa insuliiniliuos, joka sisälsi Lys(B28), Pro(B29) - ihmisen insuliinianalogia, annettiin kullekin kuudesta koirasta kupeen ulkopuolen orvaskeden alle (0,2 yksikköä kg:aa kohden). Otettiin verinäytteitä noudattaen samaa ohjelmaa kuin on kuvattu nenään antamisen jälkeen yllä. Tämän vertailevan tutkimuksen tulokset on esitetty taulukossa V.

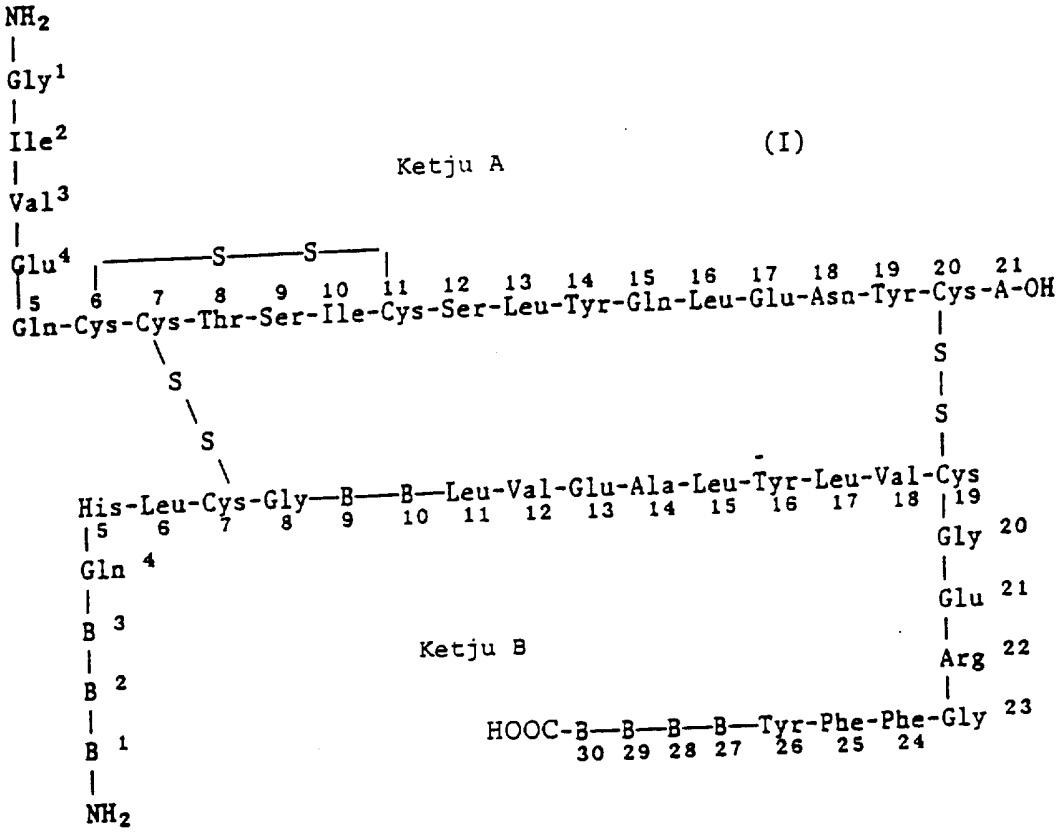
Taulukko V[a]

Aika (min)	I.V. (% alkuperäis.)	S.C. (% alkuperäis.)	Nenään (% alkuperäis.)
-30	96,6 ± 6,5	95,6 ± 2,1	95,4 ± 2,5
-15	101,3 ± 1,5	98,7 ± 2,7	98,2 ± 2,8
0	100	100	100
5	99,9 ± 2,5	-	-
10	84,8 ± 4,0	99,2 ± 4,8	95,4 ± 2,1
15	68,1 ± 2,7	-	-
20	54,5 ± 3,3	91,9 ± 2,4	83,5 ± 3,3
30	43,3 ± 2,8	81,6 ± 3,0	72,2 ± 4,5
45	-	55,8 ± 3,5	61,6 ± 6,9
60	55,3 ± 3,1	35,3 ± 3,1	60,6 ± 6,0
90	77,2 ± 6,4	39,5 ± 3,4	71,6 ± 4,6
120	85,2 ± 4,7	36,1 ± 2,6	76,1 ± 3,7
180	97,1 ± 6,4	64,5 ± 7,0	91,2 ± 1,8
240	100,0 ± 9,6	81,3 ± 2,4	85,4 ± 2,7

[a]Veren glukoositasot: keskiarvo ± keskiarvon keskivirhe

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen, kaavan I mukaisen insuliinin analogin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi



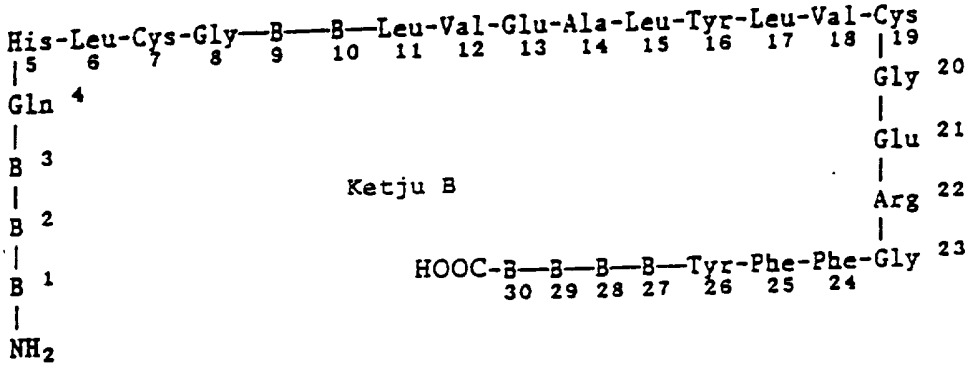
jossa A21 on asparagiini tai alaniini, B1 on fenyylialaniini tai puuttuu, B2 on valiini tai voi puuttua, kun B1 puuttuu, B3 on asparagiini tai asparagiinihappo, B9 on seriini, B10 on histidiini tai asparagiinihappo, B27 on treoniini, B28 on asparagiinihappo, valiini, leusiini, isoleusiini, norleusiini, proliini, argiiini, histidiini, sitrulliini, ornitiini, lysiini, fenyylialaniini, alaniini, glysiini, alfa-aminovoihappo, kysteiinihappo, glutamiini, glutamiinihappo, metioniini, treoniini, tyrosiini tai norvaliini, B29 on L-proliini, D-proliini, L-hydroksiproliini tai D-hydroksiproliini ja B30 on treoniini, ala-

niini tai puuttuu, t u n n e t t u siitä, että muodostetaan disulfidisilta kaavassa I esitetyn A-ketjun ja B-ketjun väliin, kuten kaavasta I ilmenee.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan Lys(B28), Pro(B29) ihmisen insuliini.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan Pro(B29) ihmisen insuliini.

4. Välituote, joka on käyttökelpoinen patenttivaatimuksen 1 mukaisessa menetelmässä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää B-ketjun



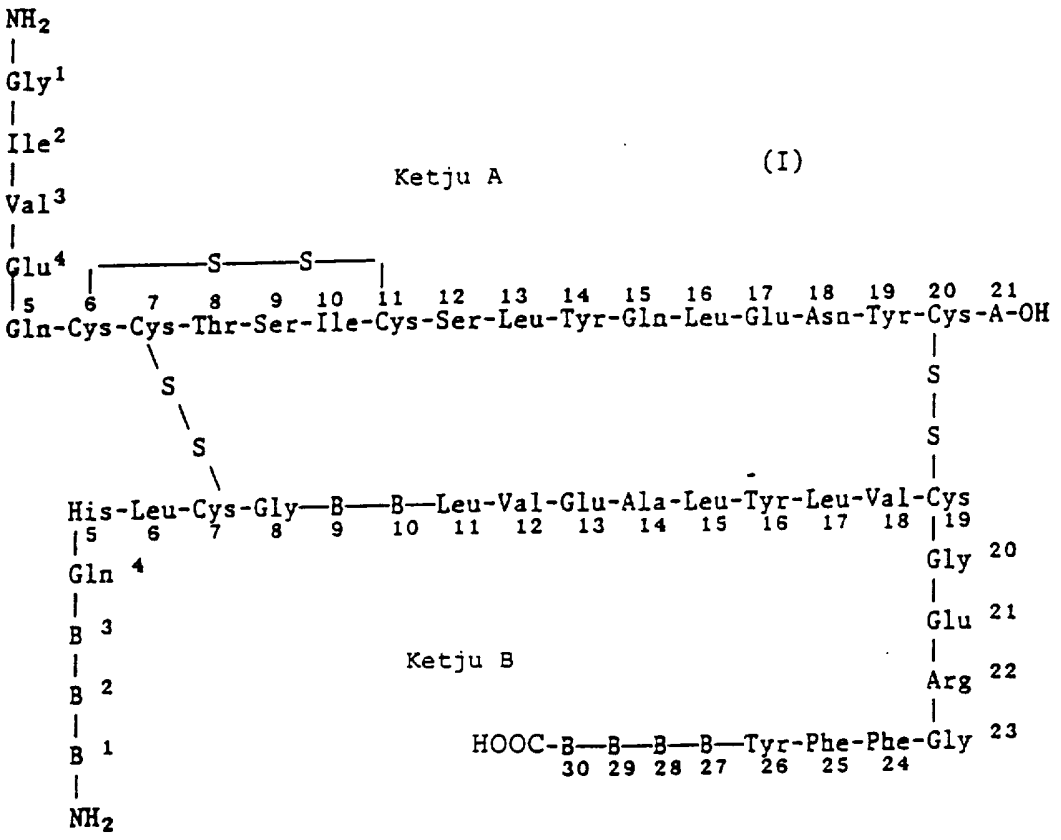
jossa B1 on fenyylialaniini tai puuttuu, B2 on valiini tai voi puuttua, kun B1 puuttuu, B3 on asparagiini tai asparagiinihappo, B9 on seriini, B10 on histidiini tai asparagiinihappo, B27 on treoniini, B28 on asparagiinihappo, valiini, leusiini, isoleusiini, norleusiini, proliini, arginiini, histidiini, sitrulliini, ornitiini, lysiini, fenyylialaniini, alaniini, glysiini, alfa-aminovoihappo, kysteiinihappo, glutamiini, glutamiinihappo, metioniini, treoniini, tyrosiini tai norvaliini, B29 on L-proliini, D-proliini, L-hydroksiproliini tai D-hydroksiproliini ja B30 on treoniini, alaniini tai puuttuu.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen välituote, t u n n e t t u siitä, että B28 on lysiini ja B29 on L-proliini.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen välituote, t u n n e t t u siitä, että B29 on proliini.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en terapeutiskt användbar insulinanalog med formeln I eller ett farmakologiskt godtagbart salt därav,



där A21 är asparagin eller alanin, B1 är fenylalanin eller saknas, B2 är valin eller kan saknas, då B1 saknas, B3 är asparagin eller asparaginsyra, B9 är serin, B10 är histidin eller asparaginsyra, B27 är treonin, B28 är asparaginsyra, valin, leucin, isoleucin, norleucin, prolin, arginin, histidin, citrullin, ornitin, lysin, fenylalanin, alanin, glycin, alfa-aminosmörsyra, cysteinsyra, glutamin, glutaminsyra, metionin, treonin, tyrosin eller norvalin, B29 är L-prolin, D-prolin, L-hydroxiprolin eller D-hydroxiprolin och B30 är treonin, alanin eller saknas,

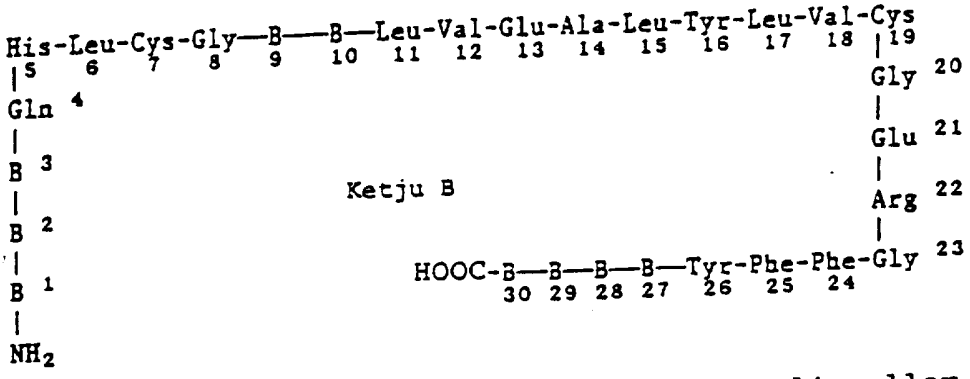
k ä n n e t e c k n a t därav, att man bildar en disul-

fidbrygga mellan A-kedjan och B-kedjan som visas i formel I, såsom framgår av formel I.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer Lys(B28), L-Pro(B29) humaninsulin.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer Pro(B29) humaninsulin.

4. Mellanprodukt, som är användbar i förfarandet enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller B-kedjan



där B1 är fenylalanin eller saknas, B2 är valin eller kan saknas, då B1 saknas, B3 är asparagin eller asparaginsyra, B9 är serin, B10 är histidin eller asparaginsyra, B27 är treonin, B28 är asparaginsyra, valin, leucin, isoleucin, norleucin, prolin, arginin, histidin, citrullin, ornitin, lysin, fenylalanin, alanin, glycin, alfa-aminosmörsyra, cysteinsyra, glutamin, glutaminsyra, metionin, treonin, tyrosin eller norvalin, B29 är L-prolin, D-prolin, L-hydroxiprolin eller D-hydroxiprolin och B30 är treonin, alanin eller saknas.

5. Mellanprodukt enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att B28 är lysin och B29 är L-prolin.

6. Mellanprodukt enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att B29 är prolin.

FIG.I

Plasmidin pKC283 (~9,1 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

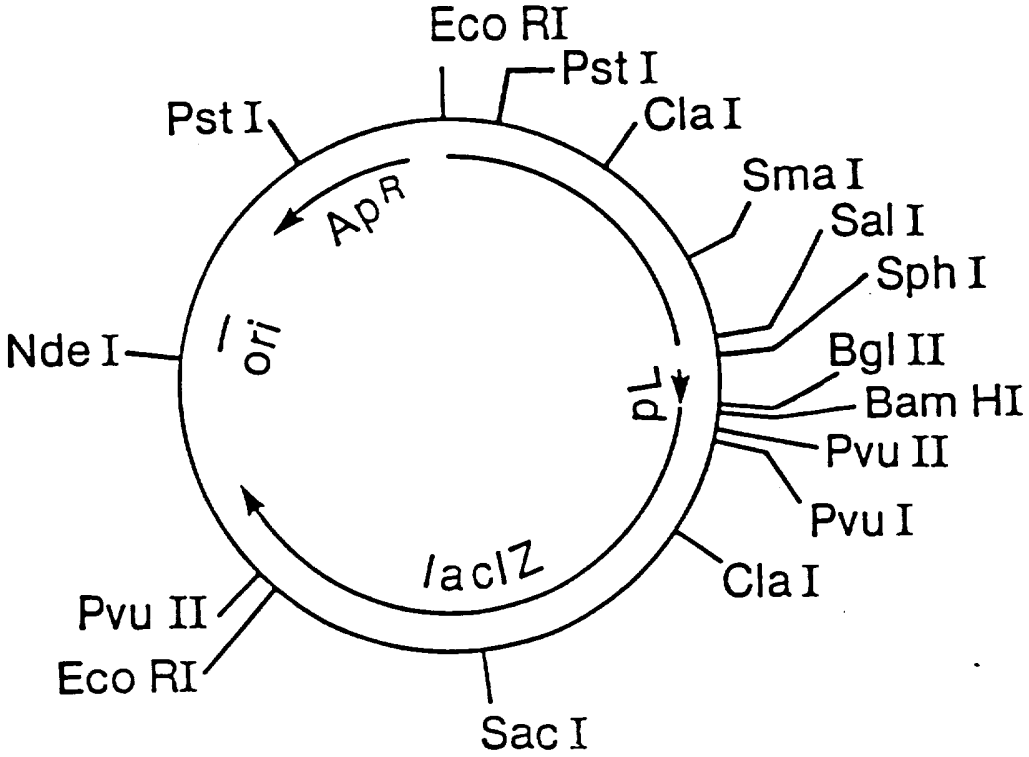


FIG.2

Plasmidin pKC283PX (~6,1 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

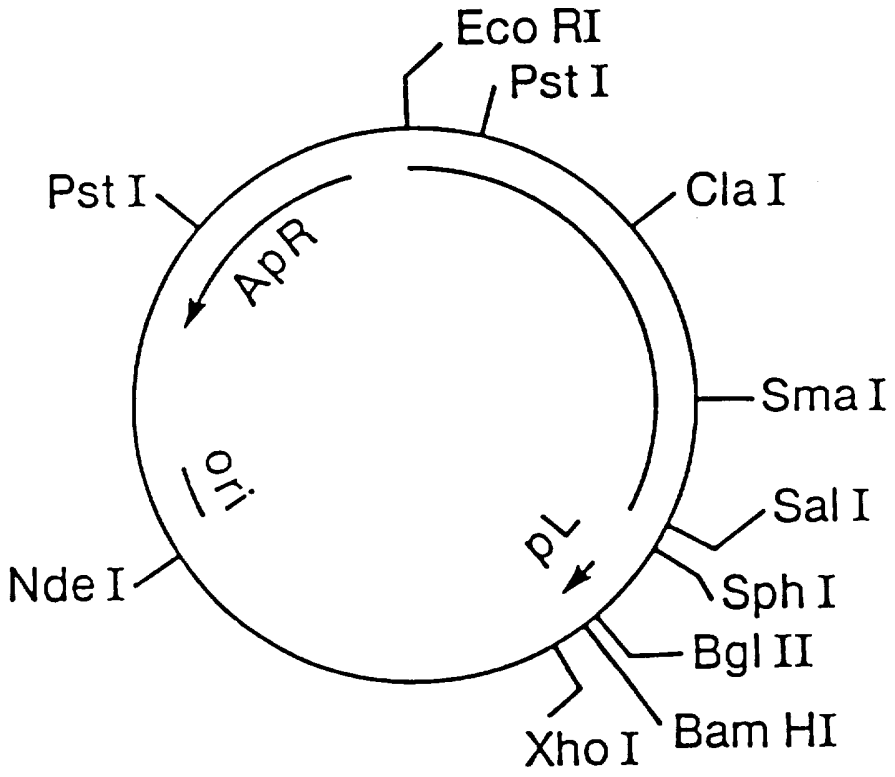


FIG.3

Plasmidin pKC283-L (~5,9 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

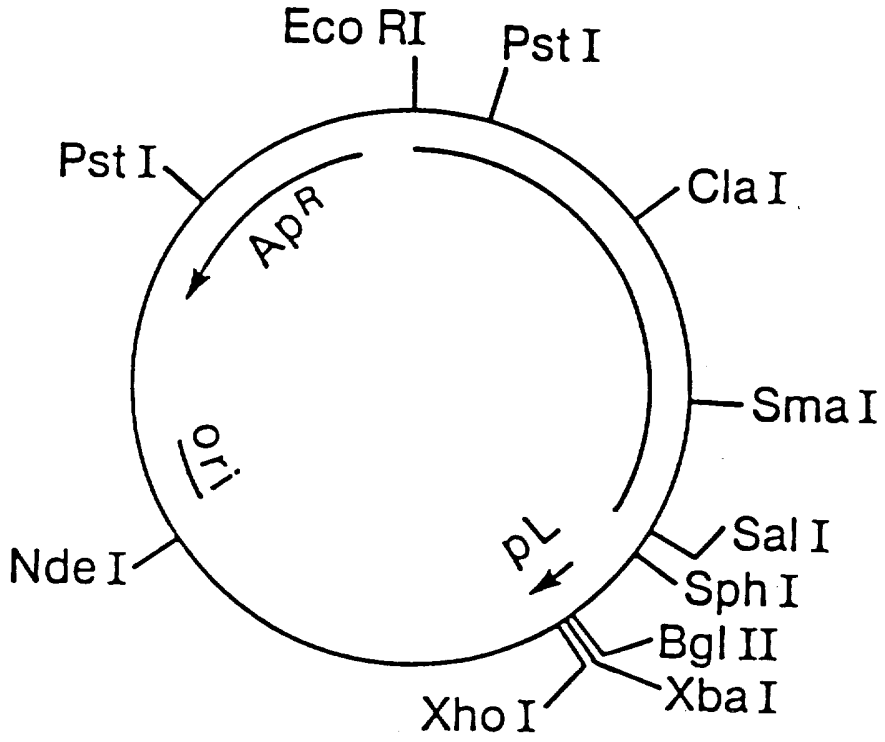


FIG. 4

Plasmidin pKC283-LB (∿5,9 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

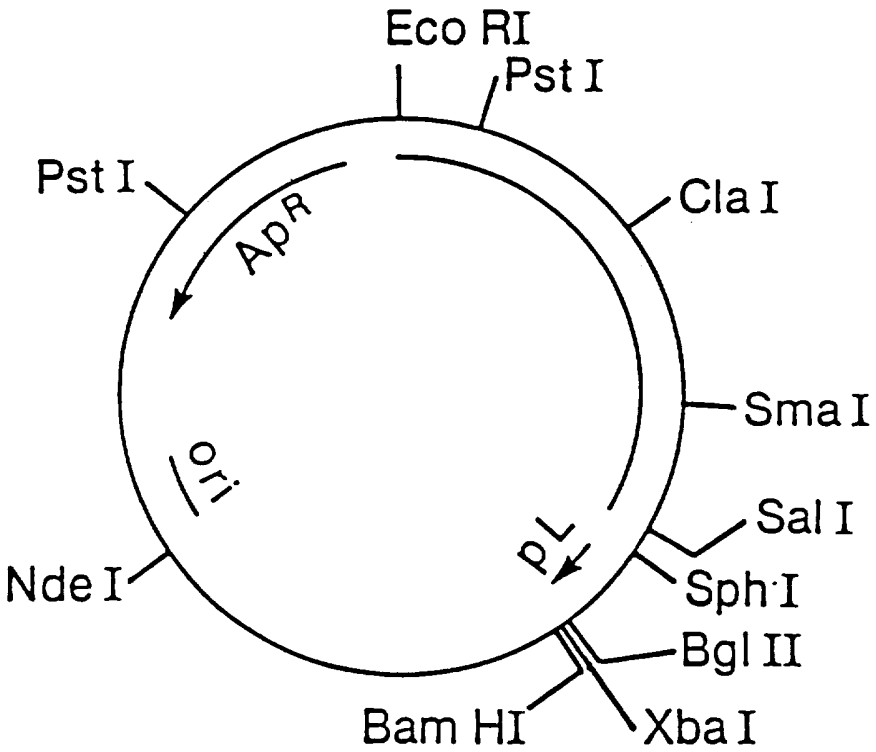


FIG. 5

Plasmidin pKC283PRS (~4,0 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

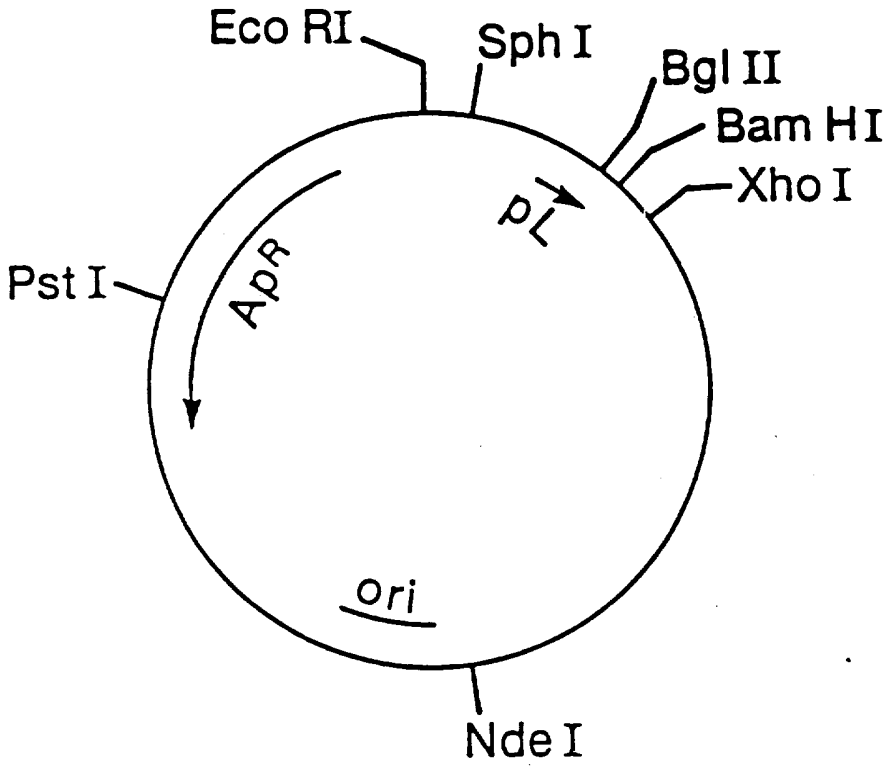


FIG.6

Plasmidin pL32 (~3,9 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

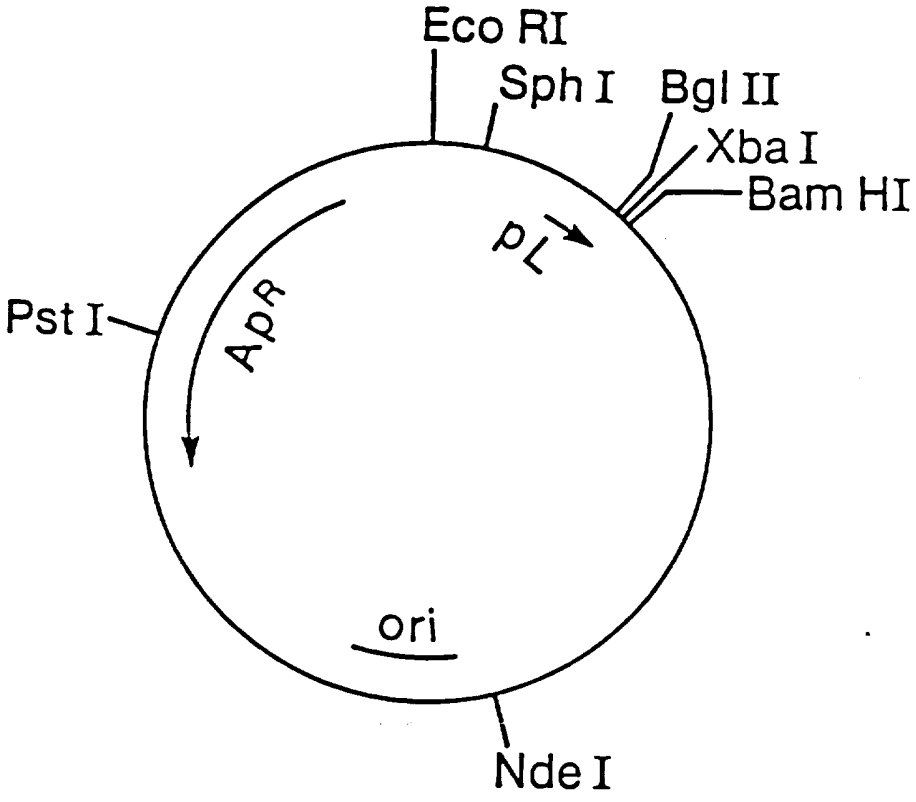


FIG.7

Plasmidin pNM789 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

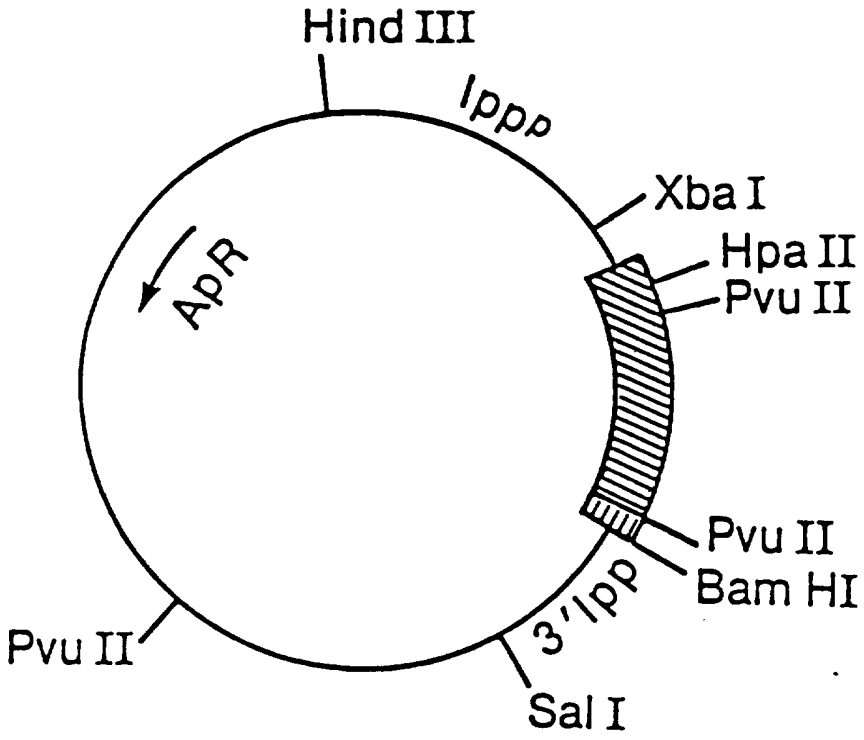


FIG.8

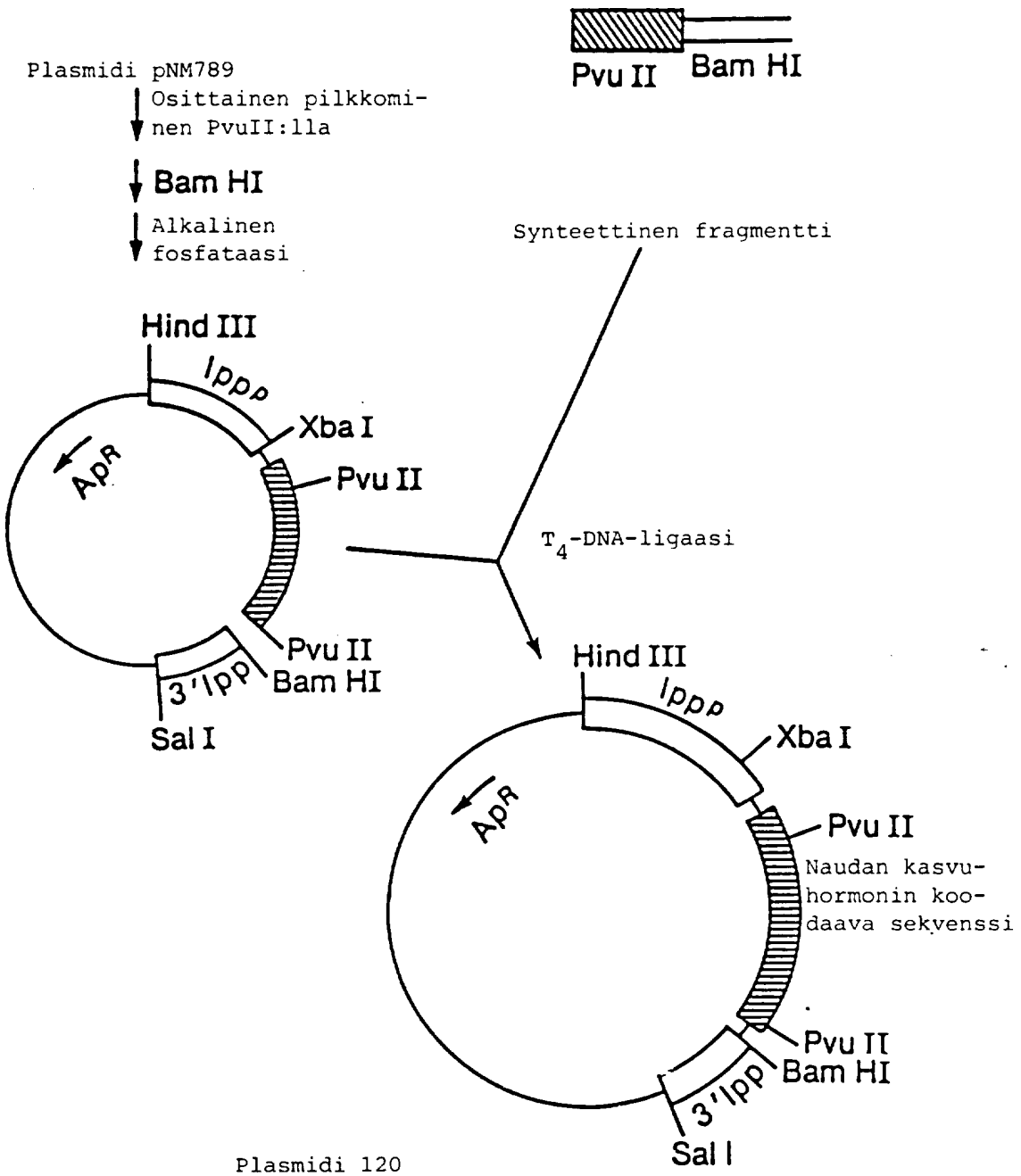

Pvu II
Bam HI
Plasmidi pNM789
Osittainen pilkkomi-
nen PvuII:lla
Bam HI
Alkalinen
fosfataasi
Synteettinen fragmentti
Hind III
lppp
Xba I
ApR
Pvu II
T4-DNA-ligaasi
Pvu II
3'lpp
Bam HI
Sal I
Hind III
lppp
Xba I
ApR
Pvu II
Naudan kasvu-
hormonin koo-
daava sekvenssi
Pvu II
Bam HI
3'lpp
Sal I
Plasmidi 120

FIG. 9

Plasmidin pL47 (~4,5 kiloemästä) restriktiokohta ja tehtäviä esittävä kartta

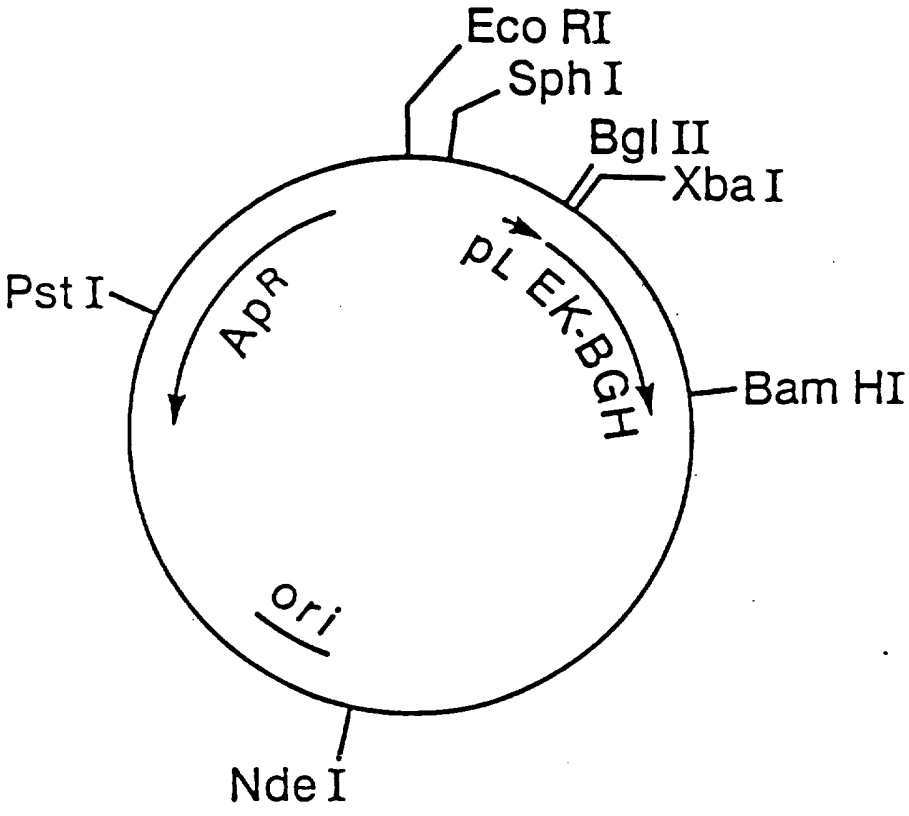


FIG. 10

Plasmidin pPR12 (~5,1 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

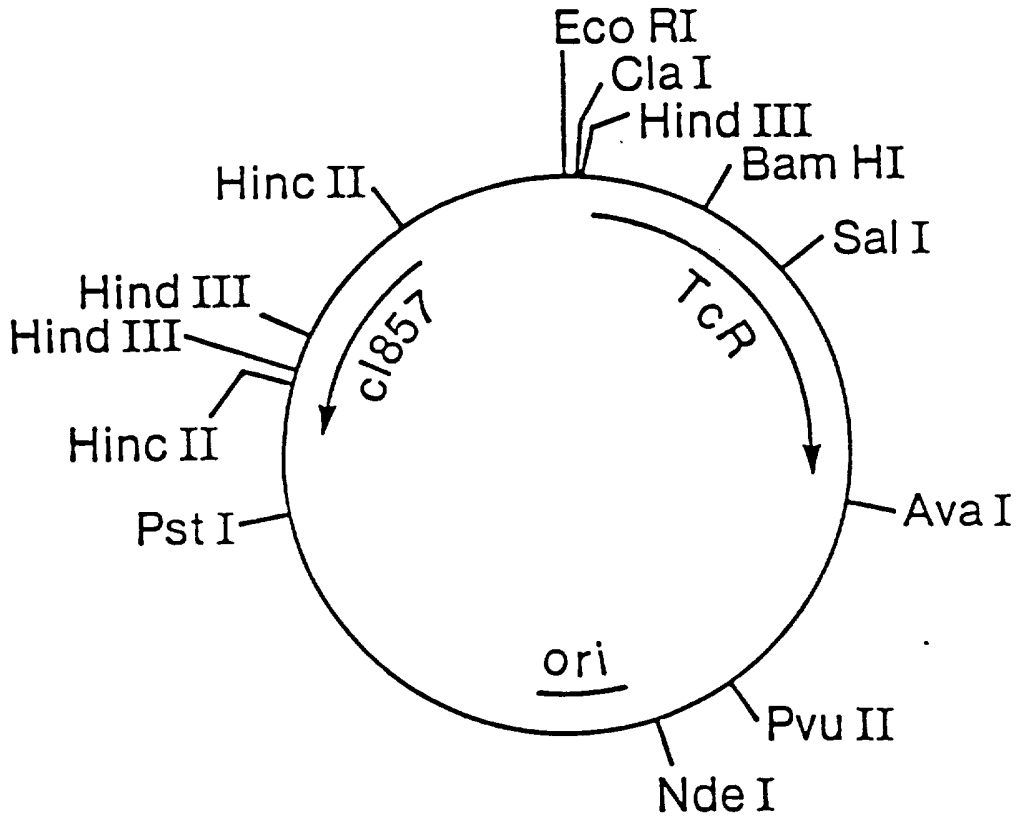


FIG. II

Plasmidin pPR12AR1 (~5,1 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

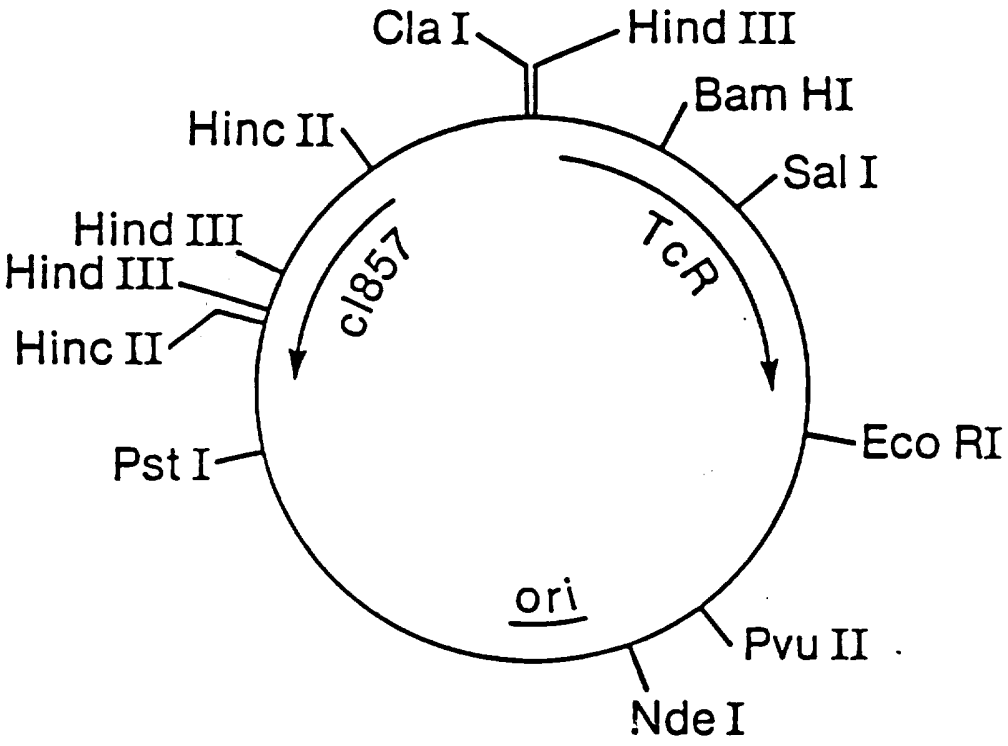


FIG. 12

Plasmidin pL110 (~6,6 kiloemästä) restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta

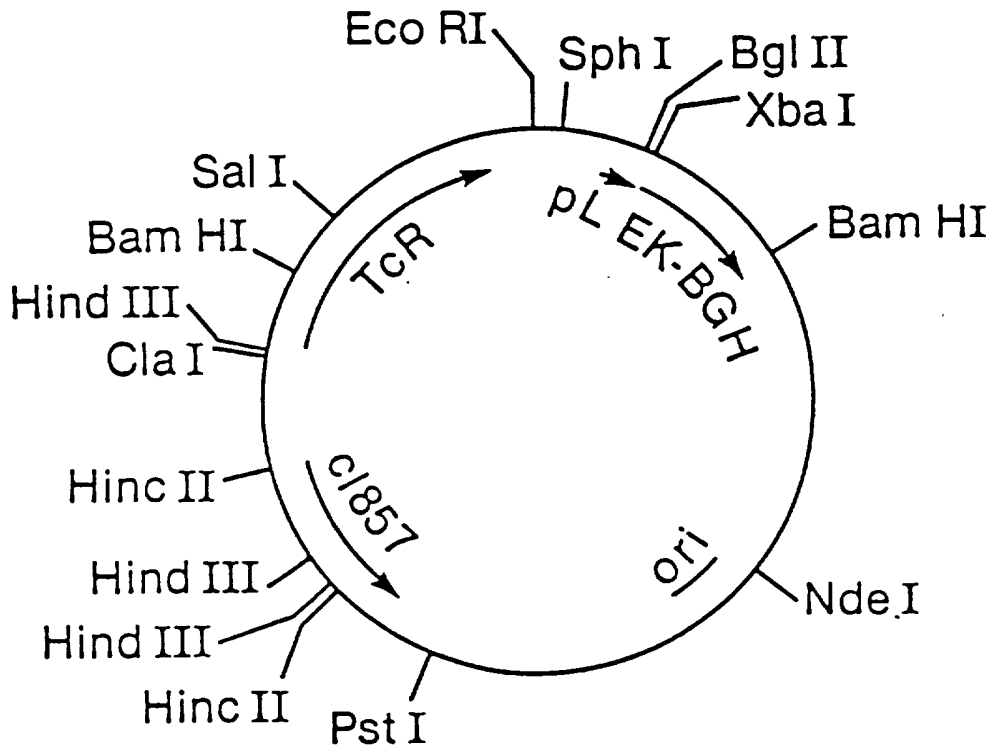


FIG.13

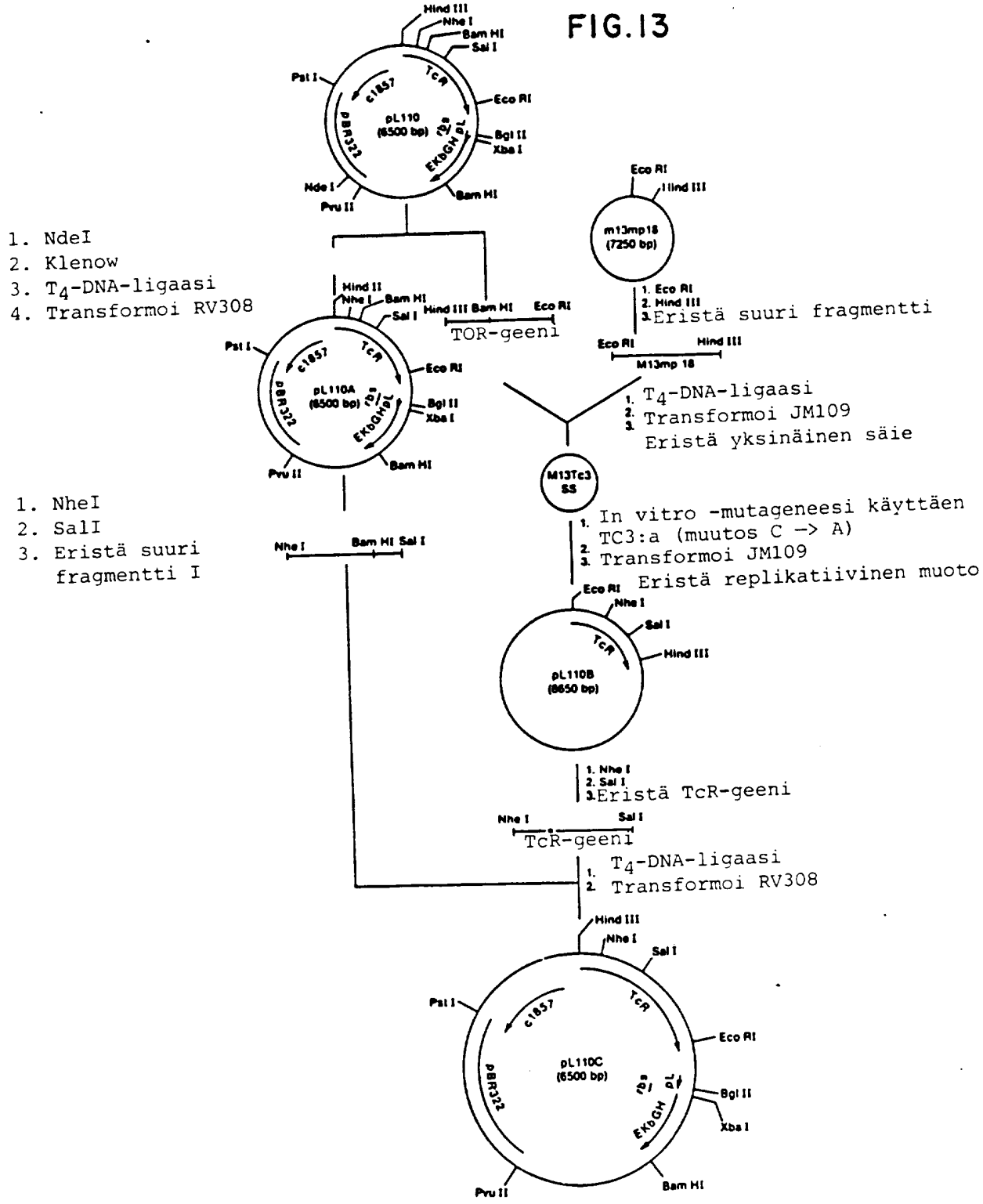
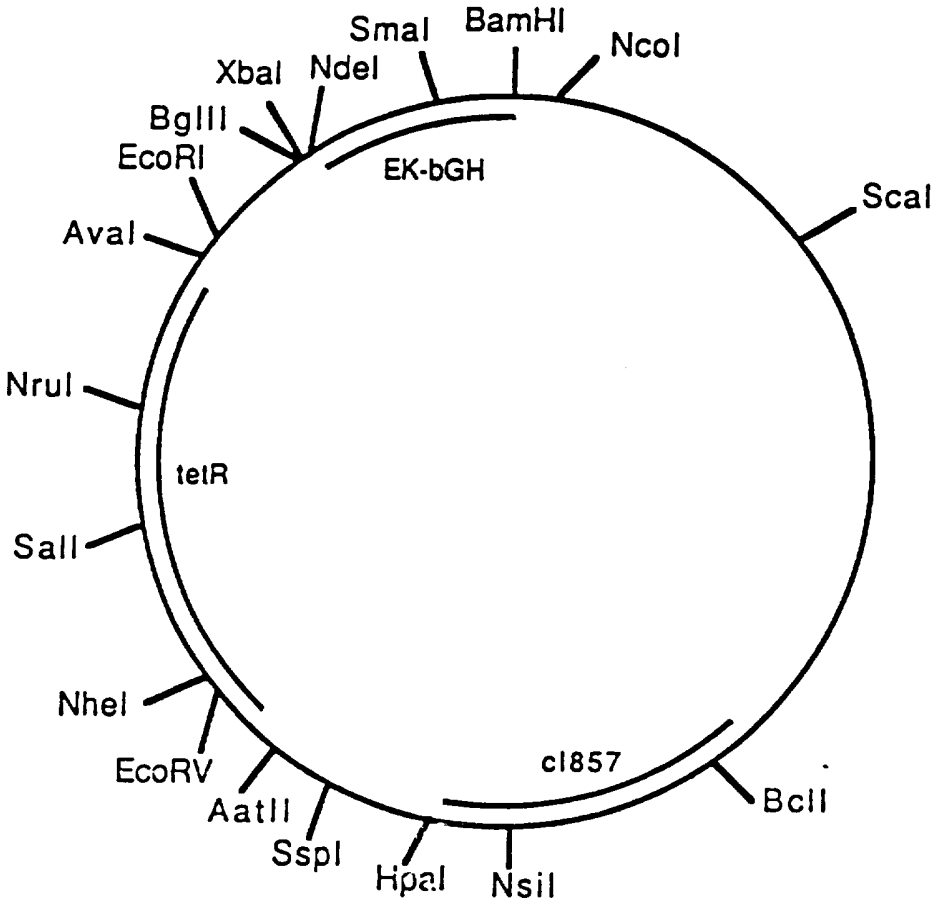

1. NdeI
2. Klenow
3. T4-DNA-ligaasi
4. Transformoi RV308
TOR-geeni
1. T4-DNA-ligaasi
2. Transformoi JM109
3. Eristä yksinäinen säie
1. NheI
2. SalI
3. Eristä suuri fragmentti I
1. In vitro -mutageneesi käyttäen TC3:a (muutos C -> A)
2. Transformoi JM109
3. Eristä replikatiivinen muoto
1. Nhe I
2. Sal I
3. Eristä TcR-geeni
TcR-geeni
1. T4-DNA-ligaasi
2. Transformoi RV308
pL110
(6500 bp)
pL110A
(6500 bp)
m13mp18
(7250 bp)
M13mp 18
M13Tc3
SS
pL110B
(6650 bp)
pL110C
(6500 bp)
Hind III
Nhe I
Bam HI
Sal I
Pst I
Eco RI
Bgl II
Xba I
Nde I
Pvu II
TcR
c1857
pBR322
rbs
pL
EKbGH

FIG. 14

Plasmidin pCZR126S restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pCZR126S

FIG. 15

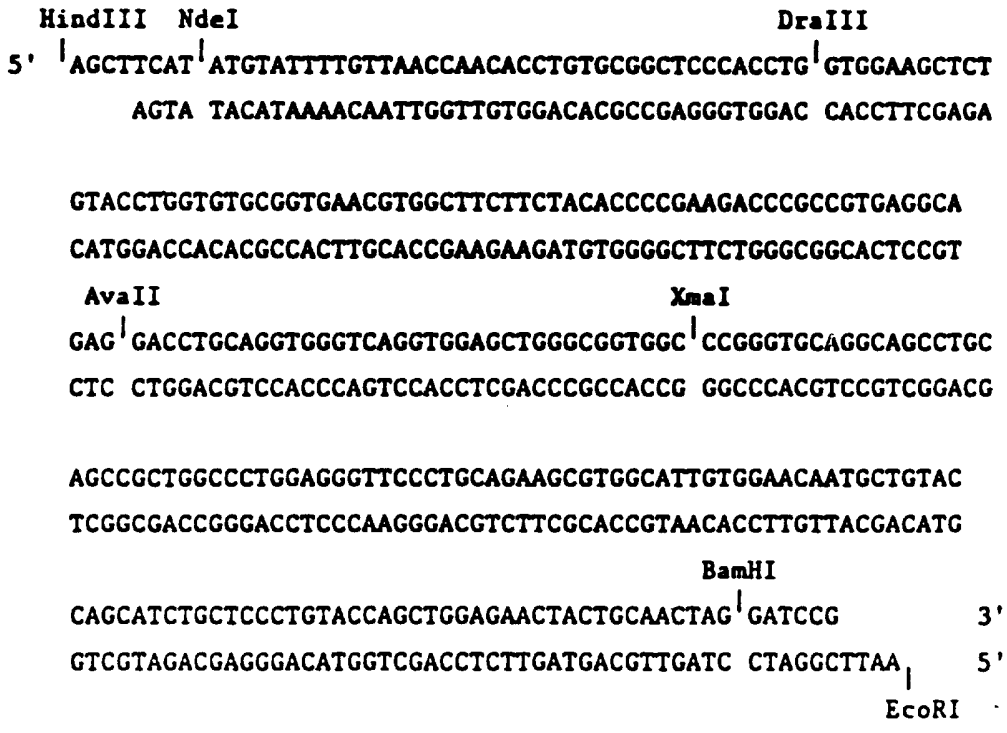
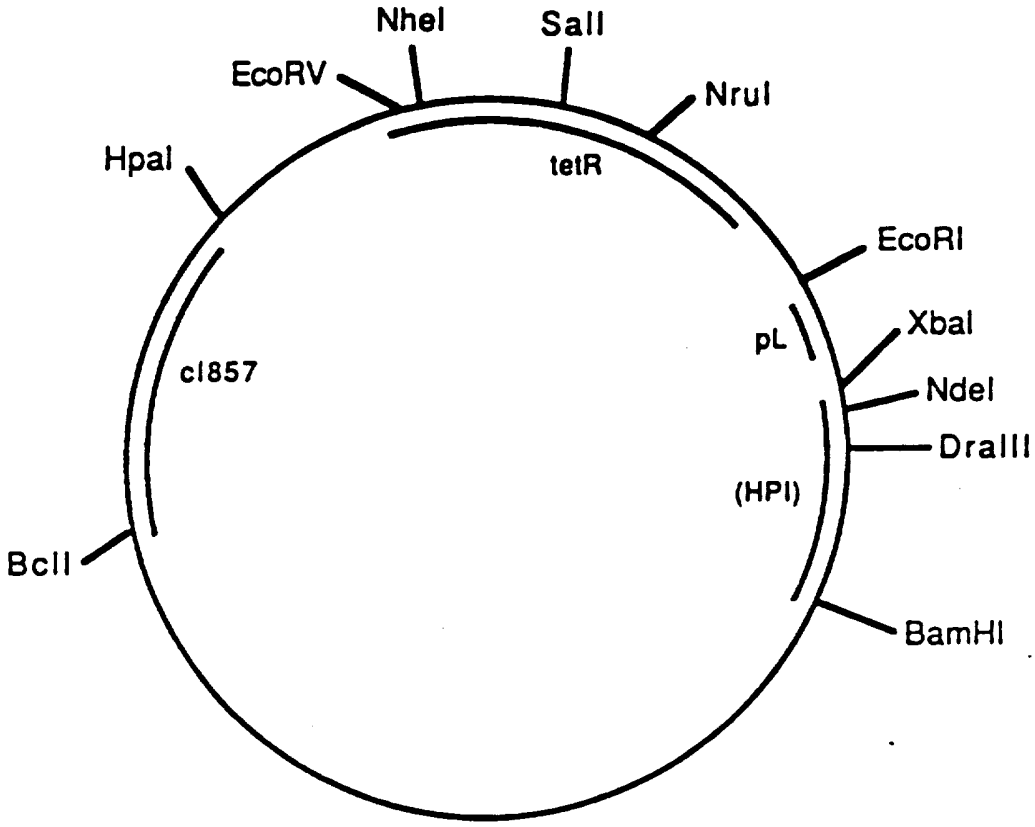

HindIII NdeI DraIII
5' AGCTTCAT ATGTATTTTGTTAACCAACACCTGTGCGGCTCCCACCTG GTGGAAGCTCT
AGTA TACATAAAACAATTGGTTGTGGACACGCCGAGGGTGGAC CACCTTCGAGA
GTACCTGGTGTGCGGTGAACGTGGCTTCTTCTACACCCCGAAGACCCGCCGTGAGGCA
CATGGACCACACGCCACTTGCACCGAAGAAGATGTGGGGCTTCTGGGCGGCACTCCGT
AvaII XmaI
GAG GACCTGCAGGTGGGTCAGGTGGAGCTGGGCGGTGGC CCGGGTGCAGGCAGCCTGC
CTC CTGGACGTCCACCCAGTCCACCTCGACCCGCCACCG GGCCCACGTCCGTCGGACG
AGCCGCTGGCCCTGGAGGGTTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGCTGTAC
TCGGCGACCGGGACCTCCCAAGGGACGTCTTCGCACCGTAACACCTTGTTACGACATG
BamHI
CAGCATCTGCTCCCTGTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG GATCCG 3'
GTCGTAGACGAGGGACATGGTCGACCTCTTGATGACGTTGATC CTAGGCTTAA 5'
EcoRI

FIG.16

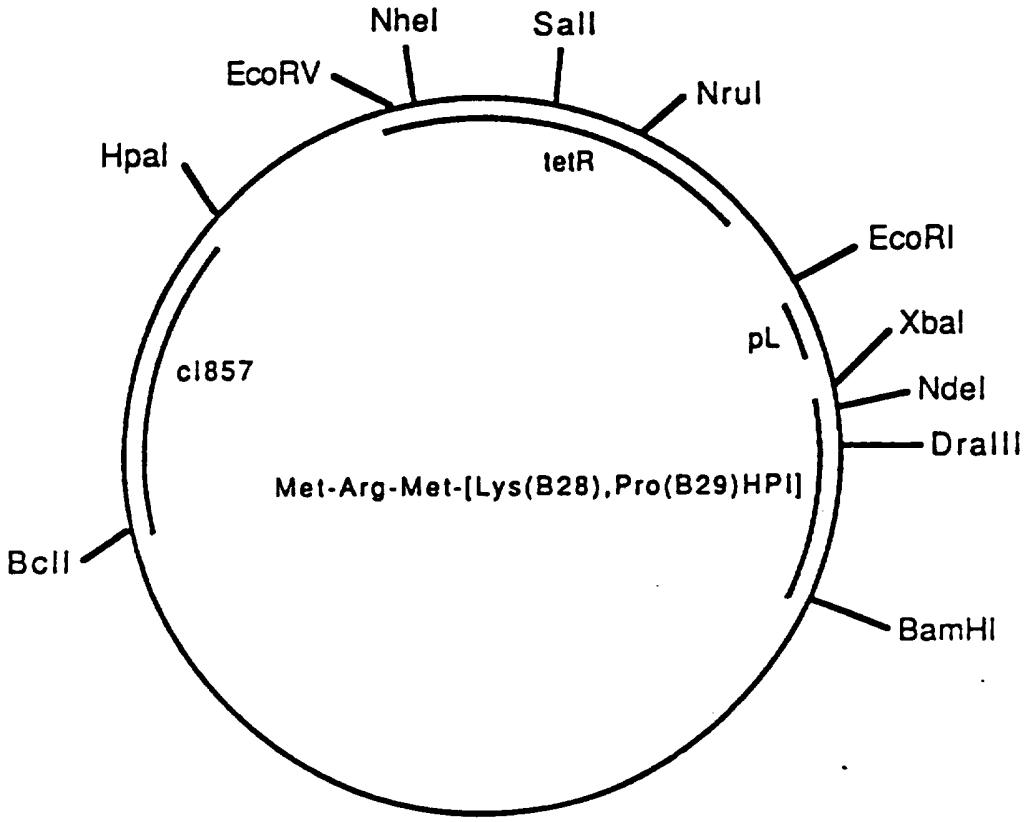
Plasmidin pRB145 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pRB145

FIG.17

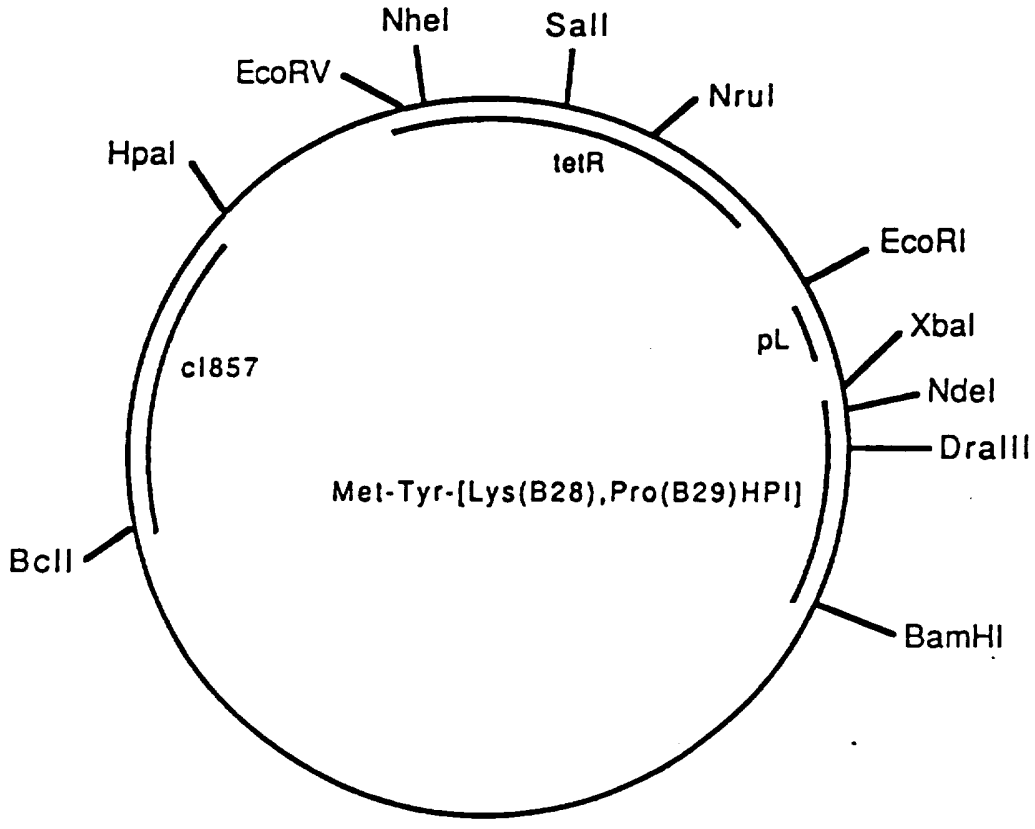
Plasmidin pRB164A restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pRB164A

FIG.18

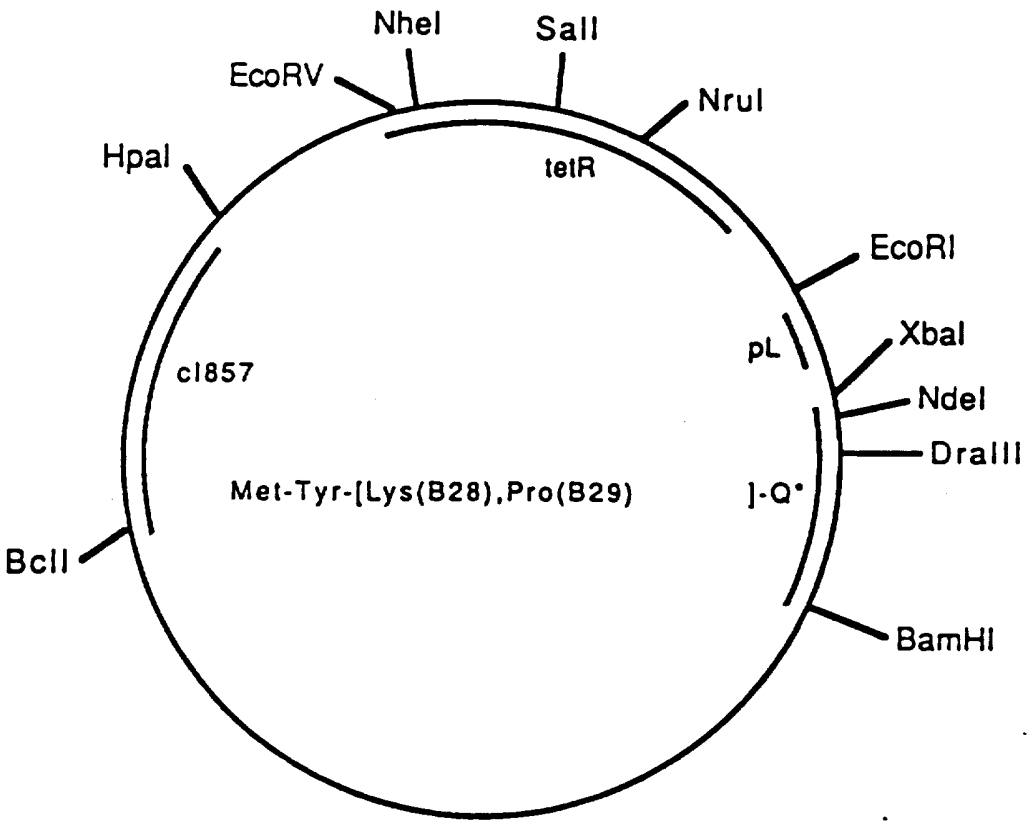
Plasmidin pRB172 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pRB172

FIG.19

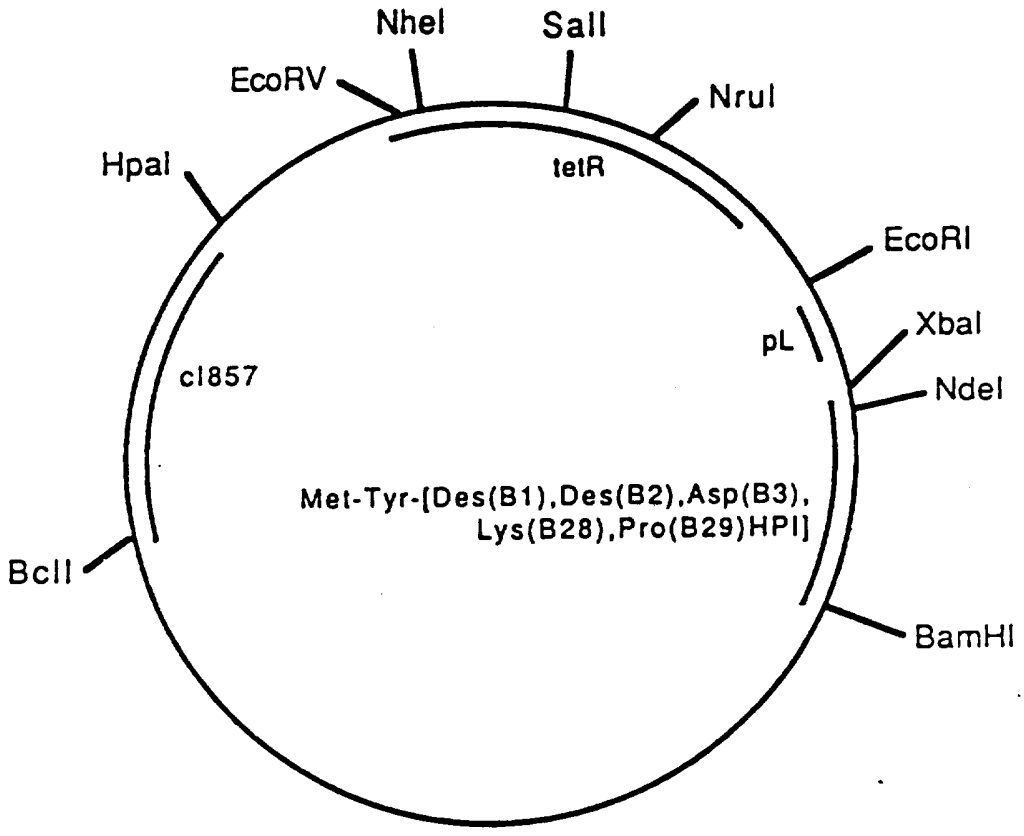
Plasmidin pRB173 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pRB173

FIG. 20

Plasmidin pRB175 restriktiokohtia ja tehtäviä esittävä kartta



pRB175