

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 884557 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **884557**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/26

C12N 15/70

C12N 1/21

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.02.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.10.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.10.1988**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **08.02.1988** PCT/SU1988/000032
International ansökan - International
application

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

09.02.1987 SU 4191353

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Vsesojuzny Nauchno-Issledovatel'skiy, I Dorozhny proezd, 1, Moskva, U.R.S.S., (SU)

2 • Institut Organicheskogo Sinteza Akademii, Ulitsa Aizkraukles 21 Riga, USSR, U.R.S.S., (SU)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Debabov, Vladimir Georgievich, USSR, U.R.S.S., (SU)

2 • Gren, Elmar Yanovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

3 • Kozlov, Jury Ivanovich, Russian Federation, VENÄJÄN FEDERAATIO, (RU)

4 • Mashko, Sergei Valdimirovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

5 • Strongin, Alexandr Yakovlevich, USSR, U.R.S.S., (SU)

6 • Sterkin, Viktor Emilievich, USSR, U.R.S.S., (SU)

7 • Jurin, Vitaly Lvovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

8 • Kostrov, Sergei Viktorovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

9 • Tsimanis, Alexandr Jurievich, USSR, U.R.S.S., (SU)

10 • Avot, Andris Yanovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

11 • Romanchikova, Nadezhda Viktorovna, USSR, U.R.S.S., (SU)

12 • Kosikov, Alexandr Ivanovich, Moskovskaya oblast, USSR, U.R.S.S., (SU)

13 • Trukhan, Maxim Eduardovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

14 • Mochulsky, Andrei Vladimirovich, USSR, U.R.S.S., (SU)

15 • Chernovskaya, Tatyana Veniaminovna, oblast, Chekhovskiy raion, USSR, U.R.S.S., (SU)

16 • Nosovskaya, Elena Alexeevna, USSR, U.R.S.S., (SU)

17 • Kolevatykh, Marina Alexeevna, USSR, U.R.S.S., (SU)

18 • Mazel, Svetlana Mendelevna, USSR, U.R.S.S., (SU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Ihmisen interleukiini-2:n synteasia koodaava rekombinanttiplasmid-DNA pPR-IL2-19, menetelmä sen valmistamiseksi ja tätä DNA:ta sisältävä, ihmisen interleukiini-2:ta tuottava kanta Bacteria Escherichia coli VNI IGenetika VL 903 (pPR-IL2-19).

Rekombinantplasmid-DNA pPR-IL2-19, som kodas för syntes av människans interleukin-2, förfarande för framställning därav och stammen Bacteri a Escherichia coli VNI IGenetika VL 903 (pPR-19) producerande människans interleukin-2 och innehållandedetta DNA.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

1869 VNIIA

3546 VNIIA

Ihmisen interleukiini-1:n synteesiä koodaava rekombinanttiplasmidi-DNA pPR-IL2-19, menetelmä sen valmistamiseksi ja tätä DNA:ta sisältävä, ihmisen interleukiini-2:ta tuottava bakteerikanta Escherichia coli VNIIGenetica (pPR-IL2-19)

Keksinnön ala

Tämä keksintö kuuluu geeniteknologian alaan ja erityisesti se koskee uutta rekombinanttiplasmidi-DNA:ta pPR-IL2-19, joka koodaa ihmisen interleukiini-2:n synteesiä, menetelmää sen valmistamiseksi sekä tätä DNA:ta sisältävää bakteerikantaa Escherichia coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19), joka tuottaa ihmisen interleukiini-2:ta.

Keksinnön tausta

Luonnollinen ihmisen interleukiini-2 eli T-solujen kasvutekijä on glykoproteiini, jonka polypeptidiketjun molekyylipaino on noin 15 000 Daltonia, ja sitä tuottavat T-solut, kun niitä aktivoidaan lektiinillä tai vastaavalla antigeenillä. Interleukiini-2 on monimutkaisesti vaikuttava immunomodulaattori, joka stimuloi erityisesti T-lymfosyyttien aktivoitumisesta johtuvaa immuunivastetta ja joka lisää tymosyyttien mitogeneesiä, indusoi T-solujen sytotoksista vaikutusta ja vastaavaa. Niinpä interleukiini-2:ta voitaisiin hyvin käyttää immunologisten häiriöiden, kuten pahalaatuisten degeneroitumisten, bakteeri- tai virusinfektioiden, immuunipuutostiloihin liittyvien sairauksien, autoimmuunisairauksien ja vastaavien hoidossa. Luonnollista ihmisen interleukiini-2:ta, jota saadaan suoraan ihmisen seerumista tai Yrkat-solulinjan viljelyväliaineesta, on saatavissa vain hyvin rajoitettuja määriä, jotka eivät riitä sen ominaisuuksien ja kliinisten mahdollisuuksien tutkimiseen. Vaihtoehtoisen interleukiini-2-lähteen voivat tarjota geeniteknologisin menetelmin valmistetut mikro-organismikannat, jotka kantavat interleukiini-2:n geeniä sisältäviä rekombinanttiplasmideja ja

ekspressoivat tätä geeniä tehokkaasti.

Alalla tunnetaan ihmisen interleukiini-2:ta koodaavia rekombinanttiplasmidi-DNA:ita, kuten rekombinanttiplasmidi-DNA pPLcMuHiL 201 ja sitä sisältävä E. coli -kanta K12 Δ HI Δ trp (pPLcMuHiL201) (Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degrave, W., Tavernier, J., Remaut, E., Fiers, W., Nucl. Acid. Res. 11 (1983) 4307-4323).

Tässä yhdistelmä-DNA-molekyyllissä interleukiini-2:n geenin transkriptiota säädellään bakteriofagi λ :n säätelyyksikön $P_L O_L$ avulla ja geenin proteiinituotteen translaation aloittaminen varmistetaan valmistamalla faagin MuSD-sekvenssistä ribosomeja sitovahybridialue. Tuottajakantaa E. coli K12 Δ HI Δ trp (pPLcMuHiL 201) viljelemällä saadun ihmisen interleukiini-2:n maksimisaanto on 5-10 % solun kokonaisproteiinimäärästä.

Yllä mainituilla rekombinanttiplasmidi-DNA:illa ja niitä sisältävällä kannalla on lukuisia huonoja puolia, jotka johtuvat siitä, että P_L -promoottorin varmistama IL-2-geenin kontrolloitu ekspressio vaatii joko ylimääräisen plasmidin, joka sisältää lämpöherkän cI-repressorin (cIts857), tai mutanttialleelia cI kantavan, viallisen profaagin sisältävän kannan käyttöä vastaanottajana. Tämä kaikki johtaa siihen, että vastaanottajakantojen määrä on pieni sekä siihen, että rekombinanttiplasmidit voivat olla pysymättömiä massatuotannon viljelyolosuhteissa, mikä johtuu reCA:sta riippuvaisesta rekombinaatiosta interleukiini-2:n geenin sisältävän plasmidin ja sopivan plasmidin tai viallisen profaagin vastaavien alueiden välillä.

Edelleen suhteellisen lyhyen SD-sekvenssin käyttö ribosomia sitovan hybridialueen muodostamisessa ei mahdollista E. colin translaatiokoneiston kaikkien voimavarojen käyttämistä täydessä laajuudessaan, mikä johtaa suhteellisesti alempaan ihmisen interleukiini-2:n synteesitasoon tuottajakannan soluissa.

Kaikki tämä voi huomattavasti alentaa interleukiini-2-pitoisuutta tuottajakannan biomassassa sen massanviljelyssä ja tämä lopulta vaikeuttaa puhtaan proteiinin talteenottoa ja alentaa halutun tuotteen saantoa.

5 Keksintö

Rekombinanttiplasmidi-DNA pPR-IL-2-19, joka koodaa ihmisen interleukiini-2:n synteesiä, menetelmä sen valmistamiseksi sekä sitä sisältävä bakteerikanta Escherichia coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL-2-19) ovat uusia ja toistaiseksi tuntemattomia kirjallisuudessa.

Tämä keksintö koskee uutta rekombinanttiplasmidi-DNA:ta, joka koodaa ihmisen interleukiini-2:n synteesiä, menetelmää sen valmistamiseksi sekä sitä sisältävää, hyvätuottoista interleukiini-2:n tuottajakantaa, jolla interleukiini-2:ta voidaan tuottaa hyvällä saannolla.

Tämä tavoite saavutetaan siten, että ihmisen interleukiini-2:n synteesiä koodaavan rekombinanttiplasmidi-DNA:n pPR-IL2-19 koko on 3 850 emäsparia ja se muodostuu seuraavista yksiköistä:

20 - 3 400 emäsparia sisältävä, pPR40:stä ja pML24:stä valmistetun vektoriplasmidin pPRI124B BamHI - Bgl II -fragmentti,

 - 450 emäsparia sisältävä Cfr13 - Bgl II -fragmentti plasmidista pAA-1213-23B, joka on valmistettu plasmidista pBR-322 valmistetusta, 5400 emäsparia sisältävästä plasmidista pAA1213-23 korvaamalla StuI:n restriktioalue Bgl II:n restriktioalueella ja joka sisältää ColEI-replikonin, ampisilliiniresistenssigeenin ja κ DNA-kopion ihmisen interleukiini-2:n geenistä, jonka ekspressio varmistetaan promoottorin ja E. colin tryptofaanioperonin SD-sekvenssin avulla ja jolle ovat ominaisia seuraavat piirteet:

 - sisältää replikaation aloitusalueen ColEI-replikonin, faagin λ lämpöherkän repressorin cIts857 geenin, lampisilliiniresistenssigeenin, faagin fd ρ -sta riippumat-

tomien transkription terminaattoreiden kaksoisjakson, säätelyalueen $P_R O_R$, SD-sekvenssin ja faagin λ cro-geenin ATG-aloituskodonin koodaten ihmisen kypsää interleukiini-2:-ta;

- 5 - säätelyalueen $P_R O_R$ ja cro-geenin ATG-kodonin yhdistäminen interleukiini-2:n geenisekvenssiin ja fd:n transkription terminaattoreihin suoritetaan siten, että muodostuu ribosomeja sitova hybridialue, jonka nuklotidisekvenssi on seuraava: 5'-...TAAGGAGGTTGTATGGCC...3', jossa TAAGGAGGT ja ATG-SD-sekvenssi ja cro-geenin aloituskodoni, vastaavasti; GCC-interleukiini-2:n ensimmäinen Ala--kodoni, interleukiini-2:n geenin lopetuskodonin jälkeen on fd:n

10 ρ:sta riippumattomien transkription terminaattoreiden kaksoisjakso;

- 15 - sisältää ainutlaatuiset tunnistusalueet restriktioentsyymeille ClaI, jonka koordinaatti on lukemisen alku (0), XbaI (noin 990), Bgl II (noin 1 250) ja PstI (noin 3070); talletettu 12.1.1987 Collection of Cultures of Microorganisms of the All-Union Research Institute of Antibiotics -talletuslaitokseen ja rekisteröity talletusnumerolla 1869.

20 Tämän keksinnön mukaisen rekombinanttiplasmidi-DNA:n valmistusmenetelmässä plasmidista pBR-322 valmistettu, 5 400 emäsparia sisältävä plasmidi pAA1213-23, joka sisältää ColEI-replikonin, ampisilliiniresistenssigeenin sekä ihmisen interleukiini-2:n κ DNA-kopion, jonka ekspresio on varmistettu promoottorin ja E. colin tryptofaanioperonin SD-sekvenssin avulla, modifioidaan korvaamalla

30 Stu I:n restriktioalue Bgl II:n restriktioalueella; saatua plasmidia pAA1213-23B käsitellään restriktioentsyymillä Cfr13 ja syntyneet yksisäikeiset DNA-molekyylien päät täytetään jälkeinpäin E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenov-fragmentilla, jonka jälkeen plasmidin pAA1213-23B Cfr-

35 fragmentti, joka sisältää interleukiini-2:n geenin, ote-

taan talteen käyttäen preparatiivista geelielektroforeesia
 agarosigeelissä ja integroidaan T4-faagin DNA-ligas-
 avulla plasmideista pPR40 ja pML24 valmistettuun vektori-
 molekyylisiin pPR124B, joka on ensin pilkottu käyttäen re-
 striktioentsyymiä BamHI ja DNA:n yksisäikeiset päät re-
 striktioalueella eliminoidaan SI-endonukleaasin avulla,
 jonka jälkeen saatua seosta käsitellään restriktioentsyy-
 millä BglII ja DNA-molekyylit yhdistetään renkaiksi käyt-
 täen T4-DNA-ligaasia; E. coli C600 -solut transformoidaan
 10 saadulla seoksella; transformantit siirrostetaan ampicil-
 liinia sisältävälle välineelle ja viljellään 28°C:een läm-
 pötilassa, jonka jälkeen valikoidaan alentuneen kasvuno-
 peuden 42°C:een lämpötilassa suhteen, plasmidi pPR-IL2-
 19 otetaan talteen valikoiduista klooneista, joissa frag-
 15 menttien yhdistymistarkkuus varmistetaan palauttamalla
 DNA:n aloitusalueiden liitoksissa aikaisemmin ei läsnäole-
 va restriktioentsyymien Bsp RI tunnistussekvenssi.

Tämän keksinnön mukaiselle plasmidille on luonteen-
 omaista se, että geeni cIts857, bakteriofagi λ :n tran-
 skription aloituksen säätelijä, on molekyylin sisässä ja
 20 että interleukiini-2:n geenin ekspressio on P_R -promootto-
 rin kontrollinen alainen. Nämä olosuhteet tekevät mahdol-
 liseksi välttää mahdollinen recA:sta riippuva yhdistelmä
 interleukiini-2:n geeniä koodaavan plasmidin ja sopivan
 25 residenttiplasmidin tai viallisen profaagin välillä. Re-
 kombinanttiplasmidin pPR-IL2- 19, jossa SD-sekvenssi ja
 bakteriofagi λ :n cro-geenin AUG-kodoni yhdistetään ihmisen
 interleukiini-2:n geenin koodaavaan alueeseen, valmistus-
 menetelmä varmistaa interleukiini-2:n geenin ribosomeja
 30 sitovan hybridialueen muodostumisen, jolla on optimaalinen
 primaarinen ja steerinen rakenne RNA-matriisin 5'-termi-
 naaliseen alueeseen nähden.

Tämä keksintö koskee myös kantaa E. coli VNIIGene-
 tika VL 903 (pPR-IL2-19), joka tuottaa ihmisen interleu-
 35 kiinia ja joka sisältää rekombinanttiplasmidi-DNA:n pPR-

IL2-19, joka tämän keksinnön mukaisesti saadaan geenitek-
nologista valmistusmenetelmää käyttäen viemällä rekombi-
nanttiplasmidi-DNA pPR-IL2-19 Escherichia coli -baktee-
riin. Tämän keksinnön mukainen kanta talletettiin

5 12.1.1987 Collection of Cultures of Microorganisms of the
All-Union Research Institute of Antibiotics -talletuslai-
tokseen ja rekisteröitiin talletusnumerolla 1869. Tämän
keksinnön mukainen kanta mahdollistaa ihmisen interleukii-
ni-2:n jatkuvan kerääntymisen massaviljelyolosuhteissa ja
10 halutun tuotteen saannon $(8-10) \times 10^7$ MU/l saamisen, mikä
vastaa 8 - 12 % solun kokonaisproteiinimäärästä.

Paras keksinnön suoritustapa

Tämän keksinnön mukaisen rekombinanttiplasmidi-
DNA:n rPR-IL2-19 valmistusmenetelmä suoritetaan useissa
15 vaiheissa.

5 400 emäsparia sisältävä plasmidi pAA1213-23, joka
on valmistettu plasmidista pBR-322 ja joka sisältää ColeI-
replikoni, ampisilliiniresistenssigeenin ja ihmisen inter-
leukiini-2:n geenin κ DNA-kopion, jonka ekspressio on var-
mistettu promoottorilla ja E. colin tryptofaanioperonin
20 SD-sekvenssillä, modifioidaan korvaamalla Stu I:n restri-
ktiokohta Bgl II:n restriktiokohdalla, jolloin saadaan
plasmidi pAA1213-23B, jota käsitellään restriktioentsyy-
millä Cfr13 ja syntyneet DNA-molekyylien yksisäikeiset
25 päät täytetään E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenov-frag-
mentin avulla. Tämän jälkeen käyttäen preparatiivista
elektroforeesia alhaisessa lämpötilassa sulavassa agaroo-
sigeelissä interleukiini-2:n geenin sisältävä plasmidin
pAA1213-23B Cfr13-fragmentti eristetään.

30 Sitten valmistetaan vektoriplasmidi pPR124B. Täl-
löin plasmidin pPR40 DNA:han restriktioentsyymin Bgl II
tunnistuskohtaan aiheutetaan deletio eksonukleasia Bal31
käyttäen, jolloin saadaan plasmidi pPR100, jossa BamHI:n
tunnistuskohda on välittömästi faagin λ ribosomien sito-
35 miskohdan jälkeen siten, että AUG-aloituskodonin alueelle

muodostuu sekvenssi:

AUGGATCC

BamHI

5

Myöhemmin käyttäen geeniteknologian tavanomaisia menetelmiä plasmidin pPRI00 pienin PstI-BamHI-fragmentti yhdistetään plasmidin pML24 suurimpaan PstI-BamHI-fragmenttiin, jolloin saadaan plasmidi pPRI24, johon käyttäen
10 oligonukleotidi liittäjää restriktioentsyymien Bgl II tunnistuskohta viedään XbaI:n sijasta, jolloin saadaan plasmidi pPRI24B.

Sitten interleukiini-2:n geenin sisältävä plasmidin pAA1213-23B Cfr13-fragmentti integroidaan faagin T4 DNA-ligaasin avulla vektorimolekyyliin pPRI24B, joka on pilkottu restriktioentsyymien BamHI avulla ja jolla on SI-endonukleaasin avulla täytetyt yksisäikeiset DNA-päät, ja lineaarisista DNA-molekyyleistä muodostetaan rengas T4:n DNA-ligaasin avulla. Näin saadulla seoksella transformoidaan E. coli C600 -solut, transformantit siirrostetaan ampicilliinia sisältävälle väliaineelle ja viljellään 28°C:een lämpötilassa, jonka jälkeen valikoidaan alentuneen kasvunopeuden 42°C:een lämpötilassa suhteen. Näin valikoiduista klooneista otetaan talteen plasmidi-DNA,
20 joka nimetään pPR-IL2-19:ksi, jossa fragmenttien liittymistarkkuus varmistetaan palauttamalla DNA:n aloitusalueiden liitoksissa aikaisemmin ei läsnäoleva restriktioentsyymien BspRI tunnistussekvenssi.

Tämän keksinnön mukainen kanta E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19) tuotetaan transformoimalla vastaanottajabakteeri Escherichia coli käyttäen rekombinanttiplasmidin-DNA:ta pPR-IL2-19. Vastaanottajakantoina voidaan käyttää kantoja E. coli C600, E. coli VNIIGenetika VL-903 (talletettu All-Union Collection of Industrial Microorganisms of the All-Union Research Institute of Genetics and
35

Selection of Industrial Microorganisms -talletuslaitokseen ja rekisteröity talletusnumerolla BKIIMB-3546) sekä muita E. coli K12:n johdannaisia. Transformoinnin jälkeen rekombinanttikloonit valikoidaan ampicilliinia sisältävällä
5 väliaineella lämpötilassa 28°C.

Tämän keksinnön mukaiselle kannalle on luonteenomaista ihmisen interleukiini-2:n syntetisointi P_R-promoottorin repression olosuhteissa, resistenssi ampicillille sekä alentunut kasvu viljeltäessä soluja 42°C:een
10 lämpötilassa.

Tämän keksinnön mukainen kanta mahdollistaa ihmisen interleukiini-2:n jatkuvan kerääntymisen massaviljelyolosuhteissa ja johtaa sen lisääntyneeseen synteesiin E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19) -soluissa ja se muodostaa
15 8 - 12 % solun kokonaisproteiinimäärästä.

Kannalla E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19) on seuraavat piirteet.

Morfologiset piirteet. Solut suorita sauvamaisia, hitaasti liikkuvia, kykenevät muodostamaan lankamaisia
20 muotoja, gram-negatiivisia, eivät tuota itiöitä, yksittäisten solujen koko 3 - 5 µm.

Viljelypiiirteet. Solut kasvavat hyvin kiinteillä ja nestemäisillä tavallisilla synteettisillä, puolisynteettisillä ja monimutkaisilla väliaineilla. Kasvatettaessa
25 agarilla sisältävällä Hottingerin käymisliemellä tai L-käymisliemellä, ne muodostavat sileitä, pyöreitä, hieman mattamaisia, limanpeittämiä pesäkkeitä. Kasvatettaessa nestemäisessä väliaineessa, kuten L-käymisliemessä tai
M9:ssä, joka sisältää kasamiinihappoja, ne muodostavat
30 yhtenäisen suspension.

Fysiologis-biokemialliset piirteet. Solut pystyvät kasvamaan 5 - 40°C:een lämpötilassa (optimi 37°C) pH:ssa 6,7 - 7,5. Hiililähteenä käytetään hiilihydraatteja (kuten sakkaroosia) ja aminohappoja. Ne ovat auksotrofisia
35 metioniinin suhteen. Typpilähteenä käytetään mineraalisuo-

loja niiden ammoniummuodossa samoin kuin orgaanisia yhdisteitä peptonin, tryptonin, hiivauutteen ja aminohappojen muodossa.

5 Antibioottiresistenssi. Kanta on resistentti ampicilliinille pitoisuutena enintään 100 mg/l kasvatettaessa nestemäisessä väliaineessa ja agarissa sisältävillä ravintoväliaineilla.

10 Plasmidin stabiilius. Säilytettäessä soluja agarissa sisältävällä väliaineella, sarjassa peräkkäisiä uudelleen siirrostuksia ja syväviljelyssä antibioottia sisältävässä nestemäisessä väliaineessa ei tapahdu plasmidin häviötä eikä rakenteenmuuttumista.

15 Tätä keksintöä valaistaan edelleen tämän keksinnön mukaisen plasmidin valmistusmentelmää, kannan valmistusta ja sen viljelyä kuvaavien suoritusmuotojen avulla ja sitä valaistaan myös liitteenä olevilla kuvioilla, joissa:

 Kuvio 1 - fysikaalis-geneettinen kartta tämän keksinnön mukaisesta rekombinanttiplasmidista pPR-IL2-19;

20 Kuvio 2 - diagrammi, joka kuvaa tämän keksinnön mukaisen rekombinanttiplasmidin pPR-IL2-19 valmistusta.

Esimerkki 1

 Tämän keksinnön mukaisen rekombinanttiplasmidin valmistus suoritetaan useassa vaiheessa. Ensin valmistetaan vektoriplasmidi pBRI24B.

25 3 µg plasmidin pPR40 DNA:ta pilkotaan käyttäen restriktioentsyymiä Bgl II 60 ul:ssa restriktiopuskuri I, joka sisältää 10 mmol/l Tris-CCl₂:a (pH 8,0), 6 mmol/l MgCl₂:a, 6 mmol/l 2-merkaptotetanolia ja 150 mmol/l NaCl:a. DNA saostetaan uudelleen käyttäen kahta tilavuutta etanolia. Sakka liuotetaan 20 µl:aan H₂O:ta. DNA:ta käsitellään eksonukleasilla Bal 31 kolmen minuutin ajan 30°C:een lämpötilassa 30 µl:ssa puskuria, joka sisältää 30 mol/l NaCl:a, 60 mmol/l CaCl₂:a, 60 mmol/l MgCl₂:a, 100 mmol/l Tris-HCl:a, pH 8,0 ja 5 mmol/l etyleenidiamiinitetraetikkahappoa. DNA saostetaan uudelleen kahdella tilavuudella

35

etanolia. Sakka liuotetaan 10 µl:aan H₂O:ta. Käsittely restriktioentsyymillä BamHI suoritetaan 30 µl:n näytetilavuudessa, joka sisältää yllä mainittua restriktiopuskuria 1. DNA:n yksisäikeiset 3'-pään alueet täytetään E. coliin DNA-polymeraasi I:n Klenov-fragmenttia käyttäen 20 µl:n näytetilavuudessa, joka sisältää 10 mmol/l Tris-HCl:a, (pH 8,0), 10 mmol/l MgCl₂:a, 2 µg DNA-valmistetta, 30 µl jokaista deoksiribonukleosiditrifosfaattia, 5 yksikköä DNA-entsyymiä reaktioseoksesta saostetaan etanolia käyttäen ja liuotetaan 100 µl:aan H₂O:ta. Lineaarisoitun plasmidi-DNA:n liittäminen suoritetaan 16°C:een lämpötilassa 12 tunnin ajan käyttäen faagi T4:n DNA-ligaasia näytteessä, joka sisältää ligaatiopuskuria (60 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l 2-merkaptetaanolia ja 0,4 mmol/l adenosiniitritrifosfaatti) ja 1 µg DNA:ta. Saadulla seoksella transformoidaan E. coli C600 -solut, transformointitehokkuus on jopa 5 x 10⁶ pesäkettä 1 µg:aa natiivia plasmidia pPR40 kohti. Ampisilliinille (100 µg/ml) resistentit kloonit valikoidaan, niistä eristetään plasmidi-DNA käyttäen Birnboimin ja Dalin modifioitua menetelmää, jonka jälkeen se käytetään restriktioanalyysiin. Tuloksena saadaan plasmidi pPRI00, jossa on ainutlaatuinen BamHI:n pilkkomiskohta. Tämän jälkeen muodostetaan plasmidi pPRI124. Tällöin 2 µg plasmidin pML24 DNA:ta pilkotaan yhdessä restriktioentsyymeillä BamHI ja PstI 40 µl:ssa restriktiopuskuria I. Yhdistetään käyttäen faagin T4 DNA-ligaasia 0°C:een lämpötilassa plasmidin pPRI00 DNA:n hydrolyysistä restriktioentsyymejä BamHI ja PstI käyttäen saatuihin fragmentteihin. Saadulla DNA-valmis- teella transformoidaan E. coli C600 -solut ja transformantit valikoidaan ampisilliinia sisältävällä väliaineella, jonka jälkeen valikoidaan Cm^r-kloonit väliaineella, joka sisältää 300 µg/ml kloramfenikolia viljelemällä soluja 42°C:een lämpötilassa. Näin valikoiduista klooneista eristetään plasmidi-DNA ja testataan restriktioanalyysiä käyt-

täen. Tuloksena saadaan plasmidi pPRI24, jossa on restriktioentsyymi BamHI:n pilkkomiskohta.

Sitten 3 µg plasmidin pPRI24 DNA:ta pilkotaan restriktioentsyymillä XbaI 70 µl:ssa restriktiopuskuria I, joka sisältää 10 mmol/l Tris-HCl:a (pH 7,9), 6 mmol/l MgCl₂:a, 6 mmol/l 2-merkapttoetanolia ja 150 mmol/l NaCl:a, DNA saostetaan uudelleen käyttäen kahta tilavuutta etanolia. Sakka liuotetaan 15 µl:aan H₂O:ta. DNA:n yksisäikeiset 3'-pään alueet täytetään käsittelemällä E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenov-fragmentilla 20 µl:n näytetilavuudessa, joka sisältää 10 mmol/l Tris-HCl:a (pH 8,0), 10 mmol/l MgCl₂:a ja 2 µg DNA-valmistetta, 30 µl:lla jokaista deoksiribonukleosiditriforfaattia, 5 yksikköä entsyymiä. DNA reaktioseoksesta saostetaan uudelleen etanolilla ja liuotetaan 100 µl:aan H₂O:ta. Lineaarisoidun plasmidin DNA:n yhdistäminen Blg-liittäjiin suoritetaan 16°C:ssa 12 tunnin ajan käyttäen faagin T4 DNA-ligaasia näytteessä, joka sisältää ligaatiopuskuria (60 mg Tris-HCl:a, pH 7,6, 10 mmol/l MgCl₂:a, 10 mmol/l 2-merkapttoetanolia ja 0,4 mmol/l adensiinitrifosfaattia), 2 µg plasmidi-DNA:ta ja 0,5 µg liittäjiä. Kun liittäminen on tehty reaktioseoksen DNA saostetaan etanolilla, liuotetaan ja hydrolysoidaan entsyymaattisesti käyttäen restriktioentsyymiä Bgl II 40 µl:n näytetilavuudessa, joka sisältää restriktiopuskuria 2 (6 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6, MgCl₂, 6 mmol/l 2-merkapttoetanolia ja 50 µl NaCl:a). DNA saostetaan uudelleen etanolilla, liuotetaan ja tehdään renkaaksi; tällöin 1 µg plasmidi-DNA-valmistetta 240 µl:ssa ligaatiopuskuria käsitellään faagi T4:n DNA-ligaasilla. Saadulla seoksella transformoidaan E. coli C600 -solut.

Transformaatiotehokkuus on jopa 5 x 10⁶ pesäkettä 1 µg:aa natiivia plasmidia pPRI24 kohti. Ampisilliinille (100 µg/ml) resistentit kloonit valikoidaan ja niistä otetaan talteen plasmidi-DNA ja se käytetään restriktioanalyysiin. Tuloksena saadaan plasmidi pPRI24B, jossa päin-

vastoin kuin lähtövektorimolekyyliassa pPRI24 on ainutlaatuinen Bgl II:n pilkkomiskohta aikaisemmin olleen XbaI:n tunnistussekvenssin sijasta (kuvio 2).

Sitten 3 µg plasmidin pPRI2B DNA:ta pilkotaan käyttäen restriktioentsyymiä BamHI 12 m:n näytteessä, joka sisältää restriktiopuskuria I. Reaktio keskeytetään käyttäen DNA:n fenolista deproteiinisaatiota ja nukleinihapon uudelleensaostusta etanolilla. Sakka liuotetaan 20 µl:aan H₂O:ta. Pilkottaessa DNA restriktioentsyymillä syntyneiden yksisäikeisten päiden poisto suoritetaan käyttäen SI-endonukleaasia. Tällön DNA hydrolysoidaan 30 yksiköllä SI-endonukleaasia 50 µl:ssa näytettä, joka sisältää 30 mmol/l CH₃COONa:a, pH 4,4, 4,5 mmol/l ZnSO₄:a ja 250 mmol/l NaCl:a, 20 minuutin ajan 20°C:een lämpötilassa. Reaktio pysäytetään fenolikäsittelyllä ja DNA saostetaan uudelleen etanolilla. Sakka liuotetaan 15 µl:aan H₂O:ta.

Tämän jälkeen tuotetaan plasmidi pAA1213-23B. Tällöin 3 µg DNA:ta 5 400 emäsparia sisältävästä plasmidista pAA1213-23, joka on valmistettu plasmidista pBR-322 ja joka sisältää ColEI-replikonin, ampisilliiniresistenssigeenin ja ihmisen interleukiini-2:n geenin DNA-kopion, jonka ekspressio on varmistettu promoottorilla ja E. colin tryptofaanioperonin SD-sekvenssillä, pilkotaan 10 yksiköllä restriktioentsyymiä Stu I 30 µl:n näytteessä, joka sisältää restriktiopuskuria I (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,9 MgCl₂, 6 mmol/l 2-merkapttoetanolia ja 150 mmol/l NaCl), jonka jälkeen DNA saostetaan reaktioseoksesta etanolia lisäämällä. Sakka erotetaan sentrifugoimalla 20 µl:ssa H₂O:ta. Lineaarisoidun plasmidin liittäminen Bgl II -liittäjiin suoritetaan käyttäen 20 yksikköä T4:n DNA-ligaasia 30 µl:n näytteessä, joka sisältää ligaatiopuskuria (60 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l 2-merkapttoetanolin ja 0,4 mmol/l adenosiinitrifosfaatti), 2 µg plasmidi-DNA:ta ja 0,5 µg liittäjiä. Ligaation jälkeen reaktioseoksen DNA saostetaan etanolilla, liuotetaan ja

hydrolysoidaan entsymaattisesti käyttäen restriktioentsyymiä Bgl II 40 µl:n näytteessä, joka sisältää restriktiopuskuria 2 (6 mmol/l Tris-HCl, pH 7,7, 6 mmol/l MgCl₂, 6 mmol/l 2-merkapttoetanolli ja 50 mmol/l NaCl). DNA saostetaan uudelleen etanolilla, liuotetaan ja DNA-molekyylit tehdään renkaaksi, tällöin 1 µg plasmidi-DNA-valmistetta 240 µl:ssa ligaatiopuskuria käsitellään 2 yksiköllä T4:n DNA-ligaasia. Saadulla seoksella transformoidaan E. coli C600 -solut. Transformaatiotehokkuus on jopa 5×10^6 pesäkettä 1 µg natiivia plasmidia pAA1214-23 kohti. Ampisilliinille (100 µg/ml) resistentit kloonit valikoidaan, plasmidi-DNA otetaan talteen käyttäen modifioitua Birnboimin ja Dalin menetelmää ja käytetään restriktioanalyysiin. Näin valmistettu plasmidi pAA1213-23B, päinvastoin kuin lähtörekombinanttimolekyyli pAA1213-23, sisältää ainutlaatuisuuden Bgl II -pilkkomiskohdan aikaisemmin olleen Stu I:n tunnistuskohdan sijasta (kuvio 2).

30 µg plasmidin pA1213-23B DNA:ta pilkotaan käyttäen restriktioentsyymiä Cfr13 (200 yksikköä aktiivisuutta) 100 µl:n näytteessä, joka sisältää restriktiopuskuria I. Entsymaattisen hydrolyysin tuotteista ajetaan elektroforeesi 1,1 %:ssa, alhaisessa lämpötilassa sulavassa agarosigeelissä Tris-asetaatipuskurisysteemissä kenttävoimakkuudella 5 V/cm. Geelivyöhyke, joka sisältää 750 emäsparia pitkän interleukiini-2:n geenin sisältävän DNA:n, leikataan irti ja DNA eluoidaan. DNA:n yksisäikeisten päiden täyttämiseksi käyttäen E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenov-fragmenttia, geelistä eristetty fragmentti käsitellään 20 µl:n näytteessä, joka sisältää 10 mmol/l Tris-HCl:a, pH 8,0 ja 10 mmol/l MgCl₂:a, 30 µm:lla jokaista deoksiribonukleosiditrifosfaattia. Reaktio pysäytetään kuumentamalla, seoksen DNA saostetaan etanolilla ja liuotetaan 20 µl:aan H₂O:ta.

Sitten aikaisemmin saatu lineaarisoitu plasmidi pBRI24B-valmiste liitetään plasmidi pAA1213-23B-fragment-

tiin. Tällöin 1 µg plasmidi-DNA:ta ja 2 µg fragmenttia käsitellään faagin T4 DNA-ligaasilla ligaatiopuskurissa, jolloin reaktioseoksen tilavuus on 30 µl. DNA:n saostamisen ja sakan liuottamisen 20 µl:aan H₂O:ta jälkeen valmiste käsitellään restriktioentsyymillä Bgl II yllä kuvatulla tavalla, DNA saostetaan uudelleen etanolilla, liuotetaan ja lineaaristen DNA-molekyylien liittäminen rengasmuotoon suoritetaan käyttäen faagi T4 DNA-ligaasia, käsittelemällä entsyymivalmistetta reaktioseoksen tilavuudessa enintään 300 µl. Saadulla valmisteella transformoidaan E. coli C600 -solut, jonka jälkeen transformantit valikoidaan ampisilliinia sisältävässä väliaineessa viljelemällä soluja yhden päivän ajan 28°C:ssa. Saaduista transformanteista valitaan ne lajit, joiden kasvukyky on alentunut 42°C:een lämpötilassa. Näistä klooneista eristetään plasmidi-DNA aikaisemmin kuvatulla tavalla ja niille tehdään restriktioanalyysi. Saadussa plasmidissa pPR-IL2-19 (kuvio 2) faagin λ cro- geenin ensimmäistä kodonia ja ihmisen interleukiini-2:n Ala-kodonia koodaavan DNA:n liitettyjen alueiden liitoskohtaan muodostuu restriktioendonukleaasin BspRI pilkkomiskohta.

Esimerkki 2

Kannan E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19), joka tuottaa ihmisen interleukiini-2:ta, valmistus suoritetaan seuraavalla tavalla. Ihmisen interleukiini-2:n synteesiä koodaava plasmidi pPR-IL2-19, viedään transformoimalla vastaanottajakannan E. coli VNIIGenetika VL 903 -soluihin, joka kanta on talletettu All-Union Collection of Industrial Microorganisms of the All-Union Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms -talletuslaitokseen ja rekisteröity talletusnumerolla BKIIM B-3546. E. coli VNIIGenetika VL 903 -solujen transformaatiotehokkuus on noin 10⁶ kloonia 1 µg:aa natiivia plasmidia pPR-IL2-19 kohti. Transformantit valikoidaan ampisilliinia (100 µg/ml) sisältävällä väliaineella sen

jälkeen, kun soluja on viljelty yhden päivän ajan 28°C:een lämpötilassa. Valikoiduista klooneista otetaan talteen plasmidi-DNA ja sen identtisyys plasmidin pPR-IL2-19 kanssa varmistetaan restriktioanalyysillä. Saadaan kanta E. coli VL 903 (pPR-IL2-19), joka tuottaa ihmisen interleukiini-2:ta.

Esimerkki 3

Kantaa E. coli VL 903 (pPR-IL2-19) kasvatetaan vinopinnoilla 28°C:een lämpötilassa agarilla sisältävällä Hottingerin väliaineella, joka sisältää 50 µg/ml ampisilliinia, 14 tunnin ajan. Vinopinnoilla kasvanutta biologista massaa käytetään siirrostusmateriaalin valmistamiseen. Tällöin solut siirretään 750 ml:n erlenmeyerpulloihin, jotka sisältävät 100 ml 100 µg/ml ampisilliinia sisältävää Hottingerin väliainetta, ja kasvatetaan 28°C:een lämpötilassa ravistelijassa kierrosnopeudella 240 rpm 6 tunnin ajan. Siirrostusviljelmän optinen tiheys on 1,5 - 2,5 yksikköä.

Fermentointi suoritetaan fermenttorissa, joka on varustettu pH:n lämpötilan, sekoitusnopeuden ja ilmaistuksen kontrollonitisteemeillä. Fermentointiin käytetään Hottingerin väliainetta, joka sisältää 100 µg/ml ampisilliinia ja 10 g/l glukosia. Siirrostusviljelmää lisätään 5 - 10 massa-%:a. Viljely suoritetaan pH:ssa 6,6 - 6,8 ja tämä taso pidetään yllä lisäämällä ammoniakki vesiliuosta. Ensimmäinen osa fermentonnista suoritetaan optiseen tiheyteen 3,5 aallonpituudella 550 nm lämpötilassa 28°C, jonka jälkeen suoritetaan lämpöindusointi nostamalla lämpötila 42 - 45°C:een 5 minuutin ajaksi, jonka jälkeen fermentointia jatketaan vielä kahden tunnin ajan.

Kun prosessi on päättynyt ihmisen interleukiini-2-aktiivisuuden määrittämiseksi 1 ml:ssa viljelyliuosta olevat solut saostetaan sentrifugoimalla ja sakka suspendoidaan uudelleen 1 ml:aan 8 mol/l guanidiinikloridiliuosta lämpötilassa 20°C 40 minuutin ajan. Tämän jälkeen jäänös poistetaan sentrifugoimalla ja supernatanttineesteessä

olevan interleukiini-2-fraktion aktiivisuus määritetään. Näin valmistetun interleukiini-2:n biologinen aktiivisuus on $(8-10) \times 10^7$ MU/l.

Syntetisoidun ihmisen interleukiini-2:n osuuden
 5 solun kokonaisproteiinista määrittämiseksi 1 ml:ssa vil-
 jelynestettä olevat solut saostetaan sentrifugoimalla ja
 käsitellään tässä aikaisemmin kuvatulla tavalla. Valmiste
 analysoidaan elektroforeettisesti 15 %:ssa polyakryyliami-
 digeelissä 0,1 %:n natriumdodekyylisulfaattia läsnäolles-
 10 sa. Geelissä erotetut proteiinit värjätään Kumassi R-250
 "Serva" (Saksan Liittotasavalta) -liuoksella normaalia me-
 netelmää käyttäen. Proteiinin määrä vyöhykkeissä määrite-
 tään skannaamalla värjätty geeli densitometrillä. Soluissa
 syntetisoitua kypsää ihmisen interleukiini-2:ta vastaava
 15 vyöhyke identifioidaan vertaamalla merkkiaineproteiinien
 elektroforeettiseen aktiivisuuteen sekä siirtämällä eris-
 tetyt proteiinit nitroselluloosasuodattimille ja sen jäl-
 keen kehittämällä interleukiinivyöhykkeet käsittelemällä
 suodattimia liuoksissa, jotka sisältävät hiiren moniklo-
 20 naalisia vasta-aineita interleukiini-2:ta vastaan ja pi-
 parjuuriperoksidilla konjugoituja kanin antihiiri-vasta-
 aineita. Kun asianmukainen värjäysmenetelmä on suoritettu,
 interleukiinivyöhyke kehittyy ruskeana nauhana nitrosel-
 luloosasuodattimen värjäytymätöntä taustaa vasten. Soluis-
 25 sa syntetisoidun interleukiini-2:n geenin osuus proteii-
 nituotteesta on jopa 12 % solun kokonaisproteiinimäärästä.

Teollinen soveltuvuus

Tämän keksinnön mukaista rekombinanttiplasmidid-
 DNA:ta pPR-IL2-19, joka koodaa ihmisen interleukiini-2:n
 30 synteesiä, voidaan käyttää valmistettaessa ihmisen inter-
 leukiini-2:ta erittäin aktiivisesti tuottavia kantoja.
 kanta E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19) -ihmisen
 interleukiini-2:n tuottaja on erittäin käyttökelpoinen
 mikrobiologisessa ja lääketeollisuudessa valmistettaessa
 35 ihmisen interleukiini-2:ta, jota voidaan käyttää lääketie-
 teessä.

Patenttivaatimukset:

1. Ihmisen interleukiini-2:n synteesiä koodaava rekombinanttiplasmidi-DNA, t u n n e t t u siitä, että
 5 se on kooltaan 3 850 emäsparia ja muodostuu seuraavista yksiköistä:

- pPR40:stä ja pML24:stä valmistetun vektoriplasmidin pPRI24B 3 400 emäsparia sisältävä BamHI - Bgl - II -fragmentti;
- 10 - 450 emäsparia sisältävä Cfr13 - Bgl II - fragmentti plasmidista pM1213-23B, joka on valmistettu plasmidista pBR-322 valmistetusta, 5 400 emäsparia sisältävästä plasmidista pAA1213-23 korvaamalla Stu:n restriktioalue Bgl II:n restriktioalueella ja joka sisältää ColEI-replikonin,
 15 ampisilliiniresistenssigeenin ja κ DNA-kopion ihmisen interleukiini-2:n geenistä, jonka ekspressio on varmistettu promoottorilla ja E. colin tryptofaanioperonin SD-sekvenssillä, ja jolle ovat luonteenomaisia seuraavat piirteet:
- 20 - sisältää replikaation aloitusalueen ColEI-replikoni faagin λ lämpöherkän repressorin cIts857 geenin ampisilliiniresistenssigeenin, faagi fd:n ρ :stä riippumattomien transkription terminaattorien kaksoisjakson, säätelyalueen $P_R O_R$ SD-sekvenssin ja faagi λ :n cro-geenin ATG-kodonin koodaten kypsää ihmisen interleukiini-2:ta;
- 25 - säätelyalueen $P_R O_R$ ja cro-geenin ATG-kodonin liigaatio interleukiini-2:n geenin sekvenssin ja fd:n transkription terminaattorin kanssa suoritetaan siten, että muodostuu ribosomeja sitova hybridialue, jonka nukleotidisekvenssi on seuraava: 5'...TAAGGAGGTGTATGGCC...3',
 30 jossa TAGGAGGT ja ATG-SD-sekvenssi ja cro-geenin aloituskodoni, vastaavasti, GCC-interleukiini-2:n ensimmäinen Ala-kodoni, samalla kun interleukiini-2:n geenin lopetuskodonin jälkeen on fd:n ρ -sta riippumattomien transkription terminaattorien kaksoisjakso;
- 35

- sisältää ainutlaatuiset tunnistusalueet restriktioentsyymeille C1aI, jonka koordinaatti on lukemisen alku (0), XbaI (noin 990), Bgl II (noin 1 250), Pst (noin 3 070); talletettu 12.1.1987 Collection of Cultures of
 5 Microorganisms of the All-Union Research Institute of Antibiotics -talletuslaitokseen ja rekisteröity talletusnumerolla 1869.

2. Menetelmä rekombinanttiplasmidi-DNA:n pPR-IL2-19 valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 5 400 emäsparia sisältävä plasmidi pAA1213-23, joka on valmistettu
 10 plasmidista pBR322 ja joka sisältää ColEI-replikonin, ampisilliiniresistenssigeenin ja _k DNA-kopion ihmisen interleukiini-2:n geenistä, jonka ekspressio on varmistettu promoottorilla ja E. colin tryptofaanioperonin SD-sekvenssillä, modifioidaan korvaamalla StuI:n restriktioalue Bgl
 15 II:n restriktioalueella, saatu plasmidi pAA1213-23B käsitellään restriktioentsyymillä Cfr-13 ja muodostuneet DNA-molekyylien yksisäikeiset päät täytetään E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenov-fragmentilla, jonka jälkeen saatu
 20 plasmidin pAA1213-23B Cfr-13 -fragmentti, joka sisältää ihmisen interleukiini-2:n geenin, eristetään preparatiivisella agaroosigeelielektroforeesilla ja integroidaan faagin T4 DNA-ligaasin avulla plasmideista pPR40 ja pML24 valmistettuun pPRI24B-vektorimolekyyliin, joka ensin pil-
 25 kotaan BamHI:llä, ja restriktioalueella olevat DNA:n yksisäikeiset päät poistetaan SI-endonukleaasin avulla, jonka jälkeen saatua seosta käsitellään restriktioentsyymillä Bgl II ja DNA-molekyylit liitetään renkaaksi T4:n DNA-ligaasia käyttäen; näin saadulla seoksella transformoidaan
 30 E. coli C600 -solut, transformantit siirrostetaan ampisilliinia sisältävälle väliaineelle ja viljellään 28°C:een lämpötilassa, jonka jälkeen suoritetaan valikointi alentuneen kasvunopeuden 42°C:ssa suhteen, valikoiduista kloonista plasmidi pPR-IL2-19 otetaan talteen, jolloin frag-
 35 menttien ligaatiotarkkuus varmistetaan palauttamalla DNA:n

aloitusalueen liittymiskohdassa aikaisemmin ei läsnäoleva restriktioentsyymien BspRT tunnistussekvenssi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen rekombinantti-plasmidi-DNA:n pPR-IL2-19 sisältävä kanta E. coli VNIIGenetika VL 903 (pPR-IL2-19), joka tuottaa ihmisen interleukiini-2:ta, t u n n e t t u siitä, että se valmistetaan käyttäen geeniteknologista menetelmää, jossa rekombinanttiplasmidi-DNA pPR-IL2-19 viedään Escherichia coli -bakteeriin, joka on talletettu 12.1.1987 Collection of Cultures of Microorganisms of the All-Union Research Institute of Antibiotics -talletuslaitokseen ja rekisteröity talletusnumerolla 1869.

1. Rekombinantisk plasmid-DNA pPR-IL2-19, som kodar
människointerleukin-2-syntesen, k ä n n e t e c k n a d
5 därav, att den har en storlek (längd) av 3850 nuukleotid-
par (3,85 kilobaser eller 3,85 kb) och består av följande
element:

- dels av BamHI-Bgl II-fragment (med en längd av
3,4 kb) av en vektorplasmid, som erhållits på basis av
10 plasmider pPR40 och pML24;

- dels ett Cfr12-Bgl II-fragment (med en längd av
0,45 kb) av en plasmid pAA1213-23B, som erhållits genom
ersättning av ett restriktionsavsnitt för restriktasen
StuI med ett restriktionsavsnitt för restriktasen Bgl II
15 i en plasmid pAA1213-23 med en längd av 5,4 kb, som kons-
truerats på basis av en plasmid pBR-322 och innehåller en
ColEI-replikon, en gen för beständighet mot ampicillin och
en cDNA-kopia av människointerleukin-2-genen, vars expres-
sion åstadkommes av en promotor och en SD-följd för en
20 tryptofanoperon av kulturen E. coli, och av att den (den
rekombinantiska plasmid-DNA:n pPR-IL2-19) uppvisar följande
egenskaper:

- dels den innehåller ett replikationsinitierings-
avsnitt eller en s.k. ColEI-replikon, en fags gen cITs857
25 för den temperaturkänsliga repressorn, en gen för bestän-
dighet mot ampicillin, en tandem av en fags fd ρ -oberoende
transkriptionsterminatorer, ett regleringsområde ($P_R O_R$,
en SD-följd (som kodar genföljden eller gensekvensen för
moget människointerleukin-2) och en ATG-initieringskodon
30 för fagens λ gen cro;

- dels regleringsområdet $P_R O_R$ och ATG-kodonen för
fagens gen cro är förbundna med genföljden (gensekvensen)
för interleukin-2 och fagens fd transkriptionsterminatorer
på ett sådant sätt, att ett hybridavsnitt för hoplänkning
35 av ribosomer bildas, vilket hybridavsnitt har följande

nukleotidföljd (sekvens):

5'-...TAAGGAGGTTGTATTGGCC...-3', där TAAGGAGGT och ATG är SD-följden respektive initieringskodonen för fagens gen cro, GCC är den första genkodonen för interleukin-2, under
 5 det att den terminerande genkodonen för interleukin-2 efterföljes av tandemet av fagens fd ρ -oberoende transkriptionsterminatorer;

- dels den (den föreslagna plasmid-DNA:n) uppvisar unika avsnitt för identifiering av restriktaser ClaI (koordinatan för restriktasen claI förinställer origon 0),
 10 Xba I (~990), Bgl II) (~1250) och och Pst (~3070), varvid den plasmiden (DNA:n) (bakteriestammen) har deponerats i en samling av kulturer av mikroorganismer vid Sovjetunionens vetenskaps- och forskningsinstitut för antibiotika
 15 och är registrerad under registreringsnummer 1869 den 12.01.1987.

2. Förfarande för konstruering av den rekombinanta plasmid-DNA:n pPR-IL2-19, k ä n n e t e c k n a t därav, att dels en plasmid pAA1213-23 med en längd av 5,4
 20 kb, som konstruerats utgående från (på basis av) en plasmid pBR-322 och innehåller en s.k. ColEI-replikon, en gen för beständighet mot ampicillin och en cDNA-kopia av människointerleukin-2-genen, vars expression åstadkommes av en promotor och en SD-följd (SD-sekvens) för en tryptofan-operon av kulturen E. coli, modifieras genom ersättning av
 25 ett restriktionsavsnitt för restriktasen Stu I med ett restriktionsavsnitt för restriktasen Bgl II, dels den erhållna plasmiden pAA1213-23B behandlas med restriktasen Cfr12, dels DNA-molekylernas bildade entrådiga ändar (ändavsnitt) efterbyggas medelst ett Klenow-fragment av DNA-polymeras I av kulturen E. coli, dels plasmidens pAA1213-23B bildade Cfr13-fragment med genen för interleukin-2
 30 därefter isoleras genom preparativ elektrofores i ett agarosgelo och integreras - medelst en fags T4 DNA-ligas - in
 35 i en vektormolekyl av en plasmid pPR124B, som konstruerats

på basis av plasmider pPR40 och pML24 och som i förväg spjälkts medelst restriktasen BamHI, dels DNA:ns enkedjiga ändrar i restriktionsavsnittet avlägsnas medelst SI-endo-nukleas, dels den så erhållna blandningen därefter behand-
5 las med restriktasen Bgl II, dels DNA-molekylerna återför-
enas till ringformade former medels fagens T4 DNAligas, dels celler av kulturen *C. coli* C600 transformerar medelst den bildade blandningen, dels transformanterna ympas på ett ampicillinhaltigt näringsmedium och odlas vid en tem-
10 peratur av 28°C med efterföljande selektion med avseende på den minskade tillväxthastigheten vid en temperatur av 42°C och dels plasmiden pPR-IL2-19 isoleras från de uttag-na klonerna, varvid noggrannheten i återförening av frag-
menten i plasmiden pPR-IL2-19 kontrolleras genom att vid
15 skarvstället för de ursprungliga DNA-avsnitten återuppbygga den tidigare frånvarande identifieringsföljden (iden-tifieringssekvensen eller serien) för restriktasen BspRI.

3. Människointerleukin-2-producerande bakteriestam av kulturen *E. coli* VNIIGenetica VL-903 (pPR-IL2-19), som
20 innehåller den rekombinantiska plasmid-DNA:n pPR-IL2-19 enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den erhålles enligt genkonstrueringsteknik genom in-förande av den rekombinantiska plasmid-DNA:n pPR-IL2-19 i bakterier av arten *Escherichia coli*, vilken bakteriestam
25 har deponerats i en samling av kulturer av mikroorganismer vid Sovjetunionens vetenskaps- och forskningsinstitut för antibiotika och är registrerad under nummer 1869 den 12.01.1987.

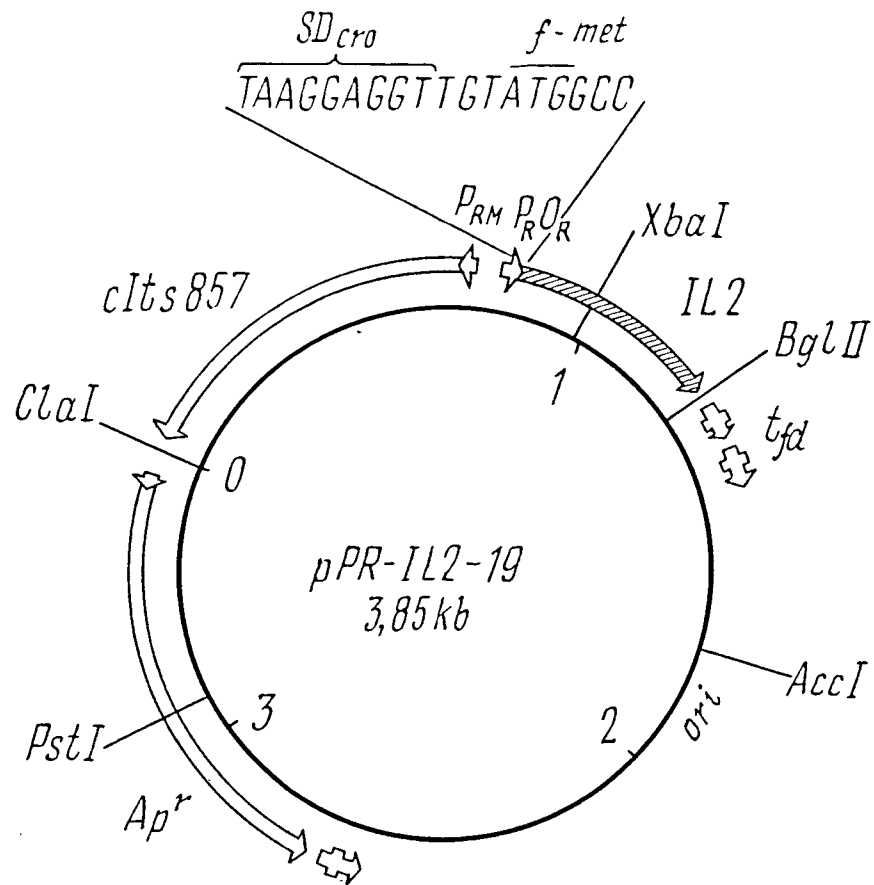


FIG. 1

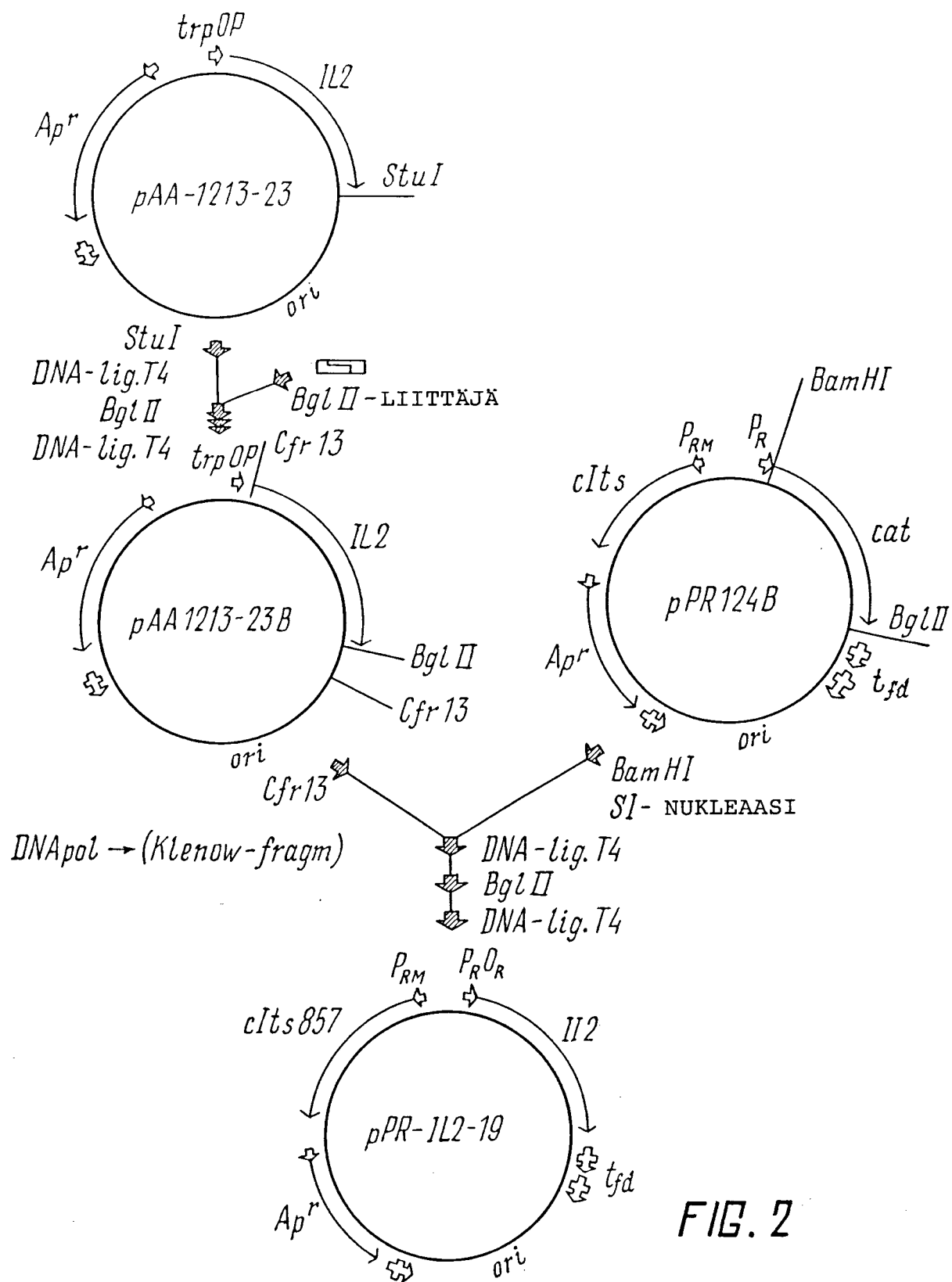


FIG. 2

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

VUTUSNTK. EI SUORITETTU

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga

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

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemus (esim. saksal. Offenlegungspatent) numeron eteen H ja vastaus- tai kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

17.6.51

Spina V. V. V.

Allekirjoitus