

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

197350

Bejelentés napja: (22) 1983.08.12. (21) (2842/83)

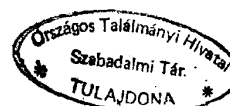
Elsőbbsége: (32) 1982.08.12.
(31) (PF 5352/92)
(33) AU

Közzététel napja: (41) (42) 1984.06.28.

Megjelent: (45) 1990.01.10.

Nemzetközi
osztályozás:

(51) NSZ04
C 12 N 15/00
C 12 P 21/02



Feltalálók: (72)

Hudson Peter John, Bulleen, Shine John,
Swinger Hill, Niall Hugh David, Elwood,
Tregear Geoffrey William, Hawthorn, Victoria, AU

Szabadalmas: (73)

Howard Florey Institute of
Experimental Physiology and
Medicine, Melbourne, AU

(54) ELJÁRÁS HUMÁN RELAXINT KÓDOLO GÉN MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁSÁRA ÉS JELLEMZÉSÉRE, VALAMINT HUMÁN H1 RELAXIN ELŐÁLLÍTÁSÁRA

1

(57) KIVONAT

A találmány humán preprorelaxin kifejezésére képes gének és DNS transzfer vektorok, valamint ezek alegységei, beleértve a humán prorelaxinnak és az ebben található A, B és C peptid láncoknak egyedi kifejezésére képes géneket és transzfer vektorokat; valamint az összes fenti gének ekvivalensei molekuláris jellemzésére és ez alapján a fenti peptidek szintézisére vonatkozik.

197350

A találmány tárgya egy humán relaxin kódoló gén szekvencia molekuláris klónozása és jellemzése. A találmány tárgya a humán 41 relaxin, prorelaxin és preprorelaxin előállítására.

Részletesebben: a találmány tárgya egy izolált és tisztított („klónozott”) humán gén, amely prorelaxint, preprorelaxint, valamint a humán relaxin A és/vagy B és/vagy C peptid láncát kódolja, valamint eljárások a gén izolálására és tisztítására, eljárások a gén átvitelére a gazdasejtbe és azok replikálására a gazdasejtben. A klónozott géneket a gazdasejt akkor fejezi ki, amikor azok egyesültek a gazdasejt kifejeződni képes prokarióta vagy eukarióta sejtjeivel. A gén így felhasználható a gyógyászati célokra alkalmas humán relaxin előállításához.

A találmány tárgyához tartoznak a humán relaxin, prorelaxin peptidek, valamint egyes peptid láncok, amelyek tartalmazzák ezeket a szekvenciákat és ezeknek a peptideknek módosított formáit.

A találmány tárgyához tartoznak még azok a módosított gének, amelyek az egyes relaxin-láncokat és a fent említett módosított formájú peptideket kódolják.

Hisaw, F. L. úttörő munkája [Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 661-663 (1926)] vetette fel a relaxin peptid fontos szerepét az emlőszekben, amely az ágyéktáji szimfizis tágitó hatása révén jelentkezik, ilyen módon könnyítve meg a szülési folyamatot. A relaxin a petefészek sárgatestjében képződik és tárolódik a terhesség folyamán, és a véráramba a szülés előtt kerül. A rendelkezésre álló petefészkek lehetővé tették a relaxin izolálását és aminosav-összetételének megállapítását sertésben [Schwabe, C., McDonald, J. K. és Steinetz, B. C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 503-510 (1977); James, R., Niall, H., Kwok, S. és Bryant-Greenwood, G.: Nature, 267, 544-546 (1977)], patkányban [John, M. J., Walsh, J. R., Borjesson, B. W. és Niall, H. D.: Endocrinology 108, 726-729 (1981)], és cápában [Schwabe, C., Gowan, L. K. és Reinig, J. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 380, 6-12 (1982)]. A biológiailag aktív hormon két peptidláncból áll, amelyeket A és B láncokként ismerünk, és amelyeket diszulfid hidak kötnek össze, kettő a láncok között és egy a láncban belül. A szerkezet így rendkívül hasonlít az inzulinra a diszulfid kötések elhelyezkedésében, amely ezeknek a hormonoknak a közös ősgénjére utaló feltételezésekhez vezet (lásd Schwabe ill. James, fentebb idézett irodalmi helyek).

A rekombináns DNS technikát alkalmaztuk a cDNS klónok izolálására mind a patkány, mind a sertés relaxinhoz [Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J. és Niall, H.: Nature, 291, 127-131 (1981); 11834/83 (PF 2696/82) ausztrál szabadalmi közrebocsátási irat. Szintetikus undekamer (11 tagú) nukleotidokat - amelyeket a rendelkezésre álló aminosav-szekvenciák alapján készítettünk - 65

alkalmaztuk primer mintaként a relaxin cDNS szekvenciákban erősen feldúsított cDNS minták szintéziséhez, amelyek azonosnak tekinthetők azokkal a relaxin cDNS klónokkal, amelyek a petefészek-szövetből származó gén „könyvtár”-ban találhatók.

A relaxin struktúrájáról úgy találtuk, hogy egy egyedi láncból álló prekursor kódol, amely hasonlít a preproinzulinra általános konfigurációjában, azaz: szignál-peptid-(B-lánc/C-peptid)A-lánc.

A sertés és patkány preprorelaxinok egy meglepően nagy összekapcsoló peptidet tartalmaznak (105 ill. 104 gyök), összehasonlítva a patkány inzulinnal, amely mintegy 30 gyökös C peptiddel rendelkezik. A patkány és sertés relaxin C peptidjének nagy mértékű szekvencia-homológiája feltételezi, hogy szerepük több, mint egyszerűen biztosítani a korrekt diszulfid kötés képzését az A és B láncok között. Az a véleményünk alakult ki, hogy a szerkezeti mozgás a szekvencia-eltérésben, amely az evolúció során alakult ki, a C-peptid részben eredményezett változást, amely C peptid hasonlóképpen nagy mértékű szekvencia homológiával bír a humán relaxin génben. Következésképpen, amint ezt korábban már leírtuk, mi olyan mintákat alkalmaztunk a humán relaxin gén kiválasztásában, amely inkább a sertés, mint a patkány C-peptid területen alapszik, mivel a fehérje szekvencia adatok összegyűjtése azt jelezte, hogy a humán fehérjék általában kevésbé térnek el a sertés, mint a patkány fehérjéiből [Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., Chen, H. R., Hunt, L. T., Barker, W. C. és Orcutt, B. C.: DNA 1, 51-58 (1981)].

Bár számtalan csoportnak hosszútávú célja volt meghatározni a humán relaxin szerkezetét és így megállapítani a klinikai beavatkozás útját nehéz szülés esetén, a terhesség időszakából származó emberi petefészkek korlátozott hozzáférhetősége megakadályozta a közvetlen aminosav szekvencia meghatározását. A mi megközelítésünk az volt, hogy sorozatvizsgálatokat végeztünk közvetlen emberi relaxin génre egy genom-„könyvtár”-ban, a sertés relaxin cDNS egy-egy területét alkalmazva mintaként. Ez a megközelítés azt eredményezte, hogy sikeresen azonosítottuk azt a genom-klónt, amelyből a preprorelaxin teljes kódoló területének szerkezetét meghatároztuk.

Úgy véljük, hogy az itt leírt gének egyike vagy mindkettő, amelyeket „H1” és „H2” gén jelzéssel láttunk el, és amelyeket a PF 7247/82 számú ausztrál szabadalmi bejelentésben leírtunk, fejeződik ki a humán reprodukció szövetekben, pl. a petefészkekben vagy a méhlepényben és/vagy más szövetekben, beleértve (de nem korlátozva ezeket) a beleket, agyat, bőrt, mivel mindkét gén kifejez relaxin-szerű aktivitást mutató peptideket.

A petefészkek sárgatestje, valamint a petefészkek és placenta szövetek a legvalószínűbb helyei a relaxinnal kapcsolatos gének kifejeződésének. A legtöbb peptid-hormon széleskörű elterjedésére való tekintettel azonban nagyon valószínű, hogy a relaxin-gén kifejeződik a nem-reproduktív szövetekben, pl. az agyban és az emésztő-traktusban is. A relaxin egy növekedési faktor általános tulajdonságaival bír és képes megváltoztatni a kötőszövetek természetét és befolyásolni a simaizom összehúzódást. Úgy hisszük, hogy a jelen szabadalmi bejelentésben és a PF 7247/82. sz. ausztrál szabadalmi bejelentésben leírt génszerkezetek egyike vagy mindkettő széles körben elterjedt a testben. Az a véleményünk, hogy az ezekből a génekből kifejezett relaxin-peptidek fontos fiziológiai szerepet játszanak a reprodukció során végzett jól dokumentált hormon-funkciójukon túl is.

Ebben a leírásban a következő rövidítéseket használjuk:

H1 = az itt leírt relaxin gén, amely a genom-klónból van visszavezetve

H2 = a PF 7247/82. sz. szabadalmi bejelentésben leírt relaxin-gén, amely a cDNS klónból van visszavezetve

DNS = dezoxiribonukleinsav

RNS = ribonukleinsav

cDNS = komplementer DNS (enzimatiszusan szintetizálva egy mRNS szekvenciából)

mRNS = messenger (hírvivő) RNS

A = adenin

T = timin

G = guanin

C = citozin

U = uracil

A kódoló kapcsolatok a DNS nukleotid szekvencia és a fehérje aminosav szekvencia között együttesen mint „genetikai kód” ismertek, amelyet az alábbiakban ismertetünk.

Első helyzet (5' vég)	U	C	Második helyzet A	G	Harmadik helyzet (3' vég)
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
C	Leu	Pro	Gln	Arg	G

	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Az egyes aminosavakra használt rövidítések a következő táblázatban láthatók:

Fenilalanin (Phe)	Hisztidin (His)
Leucin (Leu)	Glutamin (Gln)
Izoleucin (Ile)	Aszparagin (Asn)
Metionin (Met)	Lizin (Lys)
Valin (Val)	Aszparaginsav (Asp)
Szerin (Ser)	Glutaminsav (Glu)
Prolin (Pro)	Cisztein (Cys)
Treonin (Thr)	Triptofán (Trp)
Alanin (Ala)	Arginin (Arg)
Tirozin (Tyr)	Glicin (Gly)

Minden három betűs kódon (más néven dezoxinukleotid triplet vagy nukleotid triplet), amely a táblázatban megtalálható (pl. AUG, CAU), egy mRNS trinukleotidnak felel meg, az 5' véggel a bal és 3' véggel a jobb oldalon. A betűk purin vagy pirimidin bázisokat jelentenek, amelyek nukleotid szekvenciát alkotják. Minden itt megadott DNS szekvencia a száznak az a DNS szekvenciája, amely megfelel az mRNS szekvenciának, csak éppen timinnel (T) helyettesítve az uracilt (U).

Az ezt követő részletes tárgyalásban utalások lesznek az ábrákra, az ábrák a következők:

Az 1. ábra a két alább említendő genom-klón restrikciós enzim-térképe;

a 2. ábra a humán relaxin gén kódoló területének mRNS szekvenciáját és a humán preprorelaxin aminosav szekvenciáját mutatja be; és

a 3. ábra mutatja be a humán preprorelaxin és a hozzá tartozó mRNS szekvenciák összehasonlítását a megfelelő sertés preprorelaxin szekvenciákkal.

A genetikai anyag eredeti forrása a humán genom klónok „könyvtár”-a volt. A „könyvtár” szűrővizsgálata sertés relaxin cDNS mintákkal két olyan klónt adott ki, amely humán relaxint kódoló szekvenciákat tartalmazott.

A 2. és 3. ábrában bemutatott mRNS szekvenciákat a később leírt módszerrel határoztuk meg. Az látható az ábrából, hogy egy egyedi, 3,4 kb-s intron szakítja meg a c kapcsoló peptid kódoló területét. A humán preprorelaxin szerkezetét a genom-szekvenciából következtettük ki, összehasonlítva a sertés és patkány relaxin homológ szerkezetével. Az A és B peptid lánc szerkezetének bizonyítására szintézissel és in vitro lánc-rekombinációval olyan anyagot termeltünk,

amely biológiailag aktív a méh-összehúzóerő vizsgálataiban.

A preprorelaxin *in vitro* termelésének módja még nem teljesen ismert, de a sertés relaxinról a szignál peptid lehasításának analógiája alapján az a valószínű, hogy ez a hasítás az Ala⁻¹ Lys⁻¹ kötésnél történik. Hasonlóképpen valószínűsíthető, hogy a C peptid hasítása a Leu³²-Ser³³ és Arg¹³⁶-Arg¹³⁷ helyen történik, így adódik ki a B lánc 32 és az A lánc 24 gyökkel.

Amint a sertés relaxinnal kapcsolatos tanulmányainkban megjegyeztük, a sertés relaxin B és A láncainak vannak olyan lényeges belső szekvenciái, amelyek a biológiai aktivitás összes lényeges elemét tartalmazzák. A humán relaxin láncokkal kapcsolatos szintetikus tanulmányaink hasonló eredményeket mutatnak, amint ez későbbi részletes ismertetésünkben kiderül.

A jelen találmány egyik tárgya tehát egy gén előállítása, amely a humán preprorelaxint fejezi ki.

Részletesebben a jelen találmány egyik tárgya egy kettős szálú DNS fragmens előállítása, amely humán preprorelaxint fejez ki, és amely egy kódoló szálból és egy komplementer szálból áll, amely annak teljes a mRNS szekvenciának (-25-től 160-ig terjedő kodonok) felel meg, amely a 2. ábrában látható.

A találmány magába foglalja a preprorelaxin gén szekvencia bármilyen alegységét, vagy az említett szekvencia vagy alegység bármilyen ekvivalensét. Az ebben a megállapításban említett alegységek között lehetnek olyan gének, amelyekben nem szerepelnek olyan nem-kódoló területek, amelyek a 3. ábra szerint láthatók, vagy olyan gének, amelyek a humán preprorelaxin A, B és C láncait vagy szignál peptid láncát (lásd 3. ábra) vagy ezek bármilyen kombinációját kódoló egyedi struktúrgéneket tartalmaznak. Ilyen kombináció lehet pl. egy A és B peptid láncot elkülönítve vagy preprorelaxin-szerűen (vagyis C láncsal összekapcsolva) kifejező gén.

A jelen találmány egy másik tárgya egy gén előállítása, amely a humán prorelaxint fejezi ki.

Részletesebben, a jelen találmány egyik tárgya egy kettős szálú DNS fragmens előállítása, amely humán prorelaxint fejez ki, és amely egy kódoló szálból és egy komplementer szálból áll, amely annak a kodonnak felel meg, amely 1-160 számmal látható a 2. ábra szerinti mRNS szekvenciában.

A jelen találmány további tárgya olyan gének előállítása, amelyek elkülönítetten ki tudják fejezni a humán relaxin A, B és C láncait, vagy az említett láncokból kettőnek vagy többnek a kombinációját.

Részletesebben a jelen találmány tárgya olyan kettős szálú DNS fragmensek előállítása, amelyek elkülönítetten tudják kifejezni a

humán relaxin A és/vagy B és/vagy C láncait, és amelyek a 2. ábrán látható mRNS szekvenciák 1-32, 33-136 és 137-160 számai közti kodonjainak megfelelő kódoló szálát és egy komplementer szálát tartalmazzák.

A fentebb leírt gének a fajlagos kodonon kívül magukba foglalhatják a megfelelő „start” és „stop” kodonokat is, vagyis AUG-t és UGA-t (-26 és 161 kodonok a 2. ábrán).

A szakmában járatosak tisztában vannak azzal, hogy a géneknek polimorf módosulatai is lehetnek. Az ilyen módosulatok is beletartoznak a találmány körébe.

A találmány magába foglalja a fenti szekvenciák komplementjeit és az alegységeket vagy ekvivalenseket is.

A jelen találmány egy további tárgya egy DNS transzfer vektor előállítása, amely a fentebb meghatározott génnek megfelelő dezoxinukleotid szekvenciát tartalmazza.

Amint fentebb láttuk, a genetikai kód tartalmaz redundanciákat, vagyis bizonyos aminosavakat több, mint egy kodon kódol. Ennek megfelelően a találmány magába foglalja azokat a dezoxinukleotid szekvenciákat is, amelyekben az ábrákban bemutatott kodonok vagy cDNS ekvivalensei más kodonokkal vannak helyettesítve, olyan kodonokkal, amelyek szintén tudják kódolni ugyanazt az aminosavat.

Továbbmenve, amint ezt korábban jeleztük, relaxin aktivitással rendelkező peptidet lehet előállítani, amelyek a B és/vagy A lánc szerkezetében különböznek a természetes relaxintól. Az ilyen eltérések maguk után vonhatják egy vagy több aminosav törlését (delécióját) és/vagy további aminosavak hozzáadását és/vagy különböző aminosavak helyettesítését a természetes láncban.

Igy a találmány magában foglal olyan géneket és DNS transzfer vektorokat is, amelyekben - ahogyan ezt korábban leírtuk - egy vagy több természetes kodon törölve van és/vagy helyettesítve van olyan kodonnal, amely más aminosavat kódol, mint amilyent a természetes kodon kódol és/vagy további kodonok vannak hozzáadva a természetes szekvenciához.

A találmány szerinti transzfer vektorok magukban foglalhatnak többek között olyan genetikai információkat is, amelyek biztosítják azok replikációját, amikor átkerülnek egy gazdasejtbe. Ilyen sejtek lehetnek pl. prokarióta mikroorganizmus sejtek, mint pl. baktériumok, élesztők és gombák, valamint eukarióta sejtek, beleértve az emlős sejteket és sejtvonalakat is.

A baktérium-genetikában leginkább használt transzfer vektorra jó példa a plazmid és bizonyos bakteriofágok DNS-ei. Mind a fág DNS-t, mind a bakteriális plazmidokat használjuk transzfer vektorként a jelen munkában. Meg kell érteni azonban, hogy más típusú transzfer vektorokat is lehet alkalmazni. Az ilyen transzfer vektorok képzé-

sének és a mikroorganizmusba transzformálásának általános technikája jól ismert a szakirodalomban.

A találmány kiterjed azokra a prokarióta vagy eukarióta sejtekre is, amelyek a fentebb leírt transzfer vektorok bármelyikével transzformálva vannak.

Egy előnyös mikroorganizmus a jól ismert *Escherichia coli*, de bármilyen más alkalmas mikroorganizmust is lehet használni.

A jelen találmány egy további tárgya eljárás egy DNS transzfer vektor előállítására, amely vektort a humán preprorelaxint kódoló dezoxinukleotid szekvenciák replikálásában és fenntartásában alkalmazunk, és amelyre az jellemző, hogy egy humán preprorelaxint kódoló dezoxinukleotid szekvenciának és egy restrikciós enzim hasítással készített DNS molekulának összekapcsolásával készül.

A humán prorelaxint, valamint a humán relaxin A és B láncait kódoló dezoxinukleotid-szekvenciák replikálására és fenntartására alkalmas DNS transzfer vektorokat hasonlóképpen készíthetjük el megfelelő dezoxinukleotidokból.

Az A és B peptid láncokat, valamint a prorelaxint és preprorelaxint a gén kifejeződés szokásos módszereivel készíthetjük el, azaz a megfelelően transzformált transzfer vektort tartalmazó sejt növesztésével és a sejt által termelt kívánt peptid(ek) kinyerésével és tisztításával.

Igy a találmány magában foglalja azt az eljárást is, amelyben egy kapcsolt fehérjét állítunk elő, amely a humán preprorelaxin aminosav-szekvenciáját tartalmazza, mint C-terminális szekvenciát és a prokarióta vagy eukarióta fehérje egy részét, mint N-terminális szekvenciát; az eljárást az jellemzi, hogy egy humán preprorelaxint kódoló dezoxinukleotid szekvenciát tartalmazó kifejeződni képes transzfer vektorral transzformált sejt tenyésztését inkubáljuk, mindezekben a műveletekben a fentebb leírt eljárást követve.

A humán relaxin A és B láncainak, valamint a humán prorelaxinnak az aminosav-szekvenciát tartalmazó kapcsolt fehérjéket hasonló módon lehet előállítani.

Az így előállított kapcsolt peptid termék egy olyan kapcsolt fehérje formájában van jelen, amelyben a kívánt peptid kapcsolva van a gazdasejtre jellemző prokarióta vagy eukarióta fehérje egy részletével. Az ilyen fehérjék szintén részei ennek a találmánynak.

A találmány magában foglalja az egymástól C peptiddel elválasztott A és B peptidet tartalmazó humán prorelaxint szintetizáló eljárást, az eljárás azzal jellemezhető, hogy az említett emberi prorelaxint kódoló, a fentebb jellemzett eljárással előállított dezoxinukleotid szekvenciát tartalmazó, kifejeződni képes transzfer vektorral transzformált sejtek tenyésztését inkubáljuk az említett humán

prorelaxint kódoló szekvencia kifejeződéséhez alkalmas körülmények között, és az említett sejtek tenyésztéséből vagy lizátumából a humán prorelaxint elválasztjuk és megtisztítjuk.

A számunkra érdekes peptidet a kapcsolt termékből bármilyen alkalmas, ismert hasítási eljárással ki lehet nyerni.

Amint ezt már fentebb jeleztük, a transzfer vektort lehet módosítani kodon helyettesítéssel, törléssel (delécióval) és hozzáadással, és az ilyen módosítások módosított kapcsolt peptidekhez is vezethetnek. Ilyen módon megfelelő módosításokkal el lehet érni a kapcsolt peptidek hasításának megkönnyítését pl. a B/C vagy C/A láncnak elágazásánál, vagy a peptid lánc viselkedésének módosítását az ez után következő kémiai vagy biológiai műveleteknél.

Amint fentebb jeleztük, a találmány szerinti módszerrel elő lehet állítani humán relaxint, prorelaxint és preprorelaxint.

A relaxint az egyedi A és B láncok közvetlen kombinációjával elő lehet állítani, bármely olyan módszert alkalmazva, amely jelenleg ismeretes és alkalmazott az inzulin készítésénél.

Az inzulinhoz hasonló módon relaxint lehet készíteni prorelaxinból oxidációval vagy bármilyen módszerrel, amely a relaxin fentebb ismertetett módszerekkel előállított A és B peptidjeinek merkaptó-csoportjait diszulfid keresztkötéssé alakítja az A és B peptidek között, majd a C peptid lehasításával, pl. olyan enzim-katalizált hidrolízissel, amely fajlagos a C peptidet az A és B peptidekkel összekötő kötésekre.

Következésképpen a jelen találmány humán relaxin szintéziséhez olyan módszert szolgáltat, amely a teljes hosszúságú, rövidített vagy módosított formájú relaxin A és B láncainak kombinálásából áll; a módszer a humán inzulin esetében az A és B láncok kombinációjánál önmagában ismeretes.

Egy ilyen módszer az S-szulfonált A és B láncok keverékének redukciójából, majd a keveréknek oxidáció céljából levegőn tartásából áll.

Úgy találtuk, hogy a fenti eljárás hatékonysága javul, ha az A és B láncok egyike vagy mindkettő S-tioetil-cisztein származék formájában van jelen S-szulfó forma helyett.

Az általunk benyújtott 15413/83 (PF 4385/82) számú ausztrál közrebecsátási iratban bemutattuk, hogy a relaxin A és B láncok egyikét vagy mindkettőt le lehet rövidíteni az amino- vagy karboxi-végénél anélkül, hogy a biológiai aktivitás jelentősen csökkenne, ugyanakkor a kombináció kitermelése nő. Ezek a technikák ugyanúgy használhatók a humán relaxin előállításához.

A találmány egy további tárgya egy olyan humán relaxinanalóg előállítása, amely lényegében a természetes B és/vagy A peptid láncok rövidített vagy módosított formáit tartalmazza.

A találmánynak célja az is, hogy módszerrel szolgáljon humán relaxin analógok előállításához, amely módszer a B és/vagy A láncok rövidített vagy módosított formájának kialakítási lépéséből és azok bármely fentebb említett módszerrel történő összekapcsolásából áll.

Vizsgálataink mind sertés, mind humán relaxinnal megmutatták, hogy a relaxin-aktivitás még jelen lehet az A láncnál az A (10-24) lerövidítésig és a B láncnál a B (10-22) lerövidítésig, bár a várható gyakorlati minimum A (4-24) illetve B (4-23).

Általában az A lánc variálható A (1-24)-től A (10-24)-ig és a B lánc B (1-32)-től B (10-22)-ig.

Az előnyös kombinációk a következő összeállításokból származnak:

A	B
(1-24)	(1-23)-től az
(2-24) bármelyike a	(1-32)-ig terjedő
(3-24)	peptidek bármelyikével.

A B és/vagy A láncok módosítása a jelen találmány értelmében „genetikai” módosítást, amint ezt a fentiekben leírtuk, vagy a B és/vagy A láncok (vagy teljes hosszban, vagy rövidített formában) a találmány szerinti módszerrel történő kombinációja előtti kémiai módosítását jelentheti. Két típusú módosítást alkalmazhatunk: egyedi vagy a kombinált módosítást.

Az első típus magában foglalja egy vagy több aminosav módosítását, azok közül, amelyek a természetes vagy rövidített B és/vagy A láncban előfordulnak. Az ilyen módosítások lehetnek pl.: az aktív csoportok védelme egy vagy több aminosavon önmagában ismert módszerrel, és szükség esetén a védőcsoport eltávolítása a (módosított) A és B láncok kombinálása után.

Az ilyen típusú módosítások jelenthetnek acetilezést, formilezést vagy a szabad aminocsoportok beleértve az N-terminális is másfajta védelmét; a C terminális csoport amidálását, vagy a hidroxil- vagy karboxil-csoportokon az észterképzést. A formil-csoport egy jellemző példa egy könnyen eltávolítható védőcsoportra.

A módosítások második csoportja az A vagy B láncban egy vagy több természetes aminosav más aminosavakkal (beleértve a természetes aminosavak D-formáit is) történő helyettesítését jelenti. A módosításnak ez az általános típusa magában foglalhatja egy természetes aminosav törlését a láncból vagy egy vagy több többlet-aminosav hozzáadását a láncba.

Az ilyen módosítások célja az A és B lánc kombináció kitermelését növelni úgy, hogy a terméknek, vagyis a relaxinnak vagy analógjának az aktivitása megmaradjon, vagy növelni, illetve módosítani a termék aktivitását az adott kombináció-kitermeléshez. Az ilyen módosítás kiterjedhet azokra a szinteti-

kus analógokra is, amelyeknek relaxin-blokkoló vagy -antagonista hatása van.

Az első típusú módosításnak jellegzetes példája a triptofán (Trp) gyök módosítása a B 2 helyen formil-csoport bevezetésével.

A második típusú módosításra példák: a Met rész helyettesítése a B 24-nél norleucin-nal (Nle), valinnal (Val), alaninnal (Ala), glicinnel (Gly), szerinnel (Ser) vagy homoszerinnel (HomoSer).

A találmány tehát kiterjed azokra a humán relaxin analógokra, amelyek a találmány szerint fentebb leírt módon módosított természetes vagy rövidített B és/vagy A láncokból képződnek.

Az A és B peptid láncokat, valamint a prorelaxint és preprorelaxint a gén kifejeződés szokásos módszerével lehet előállítani, vagyis a megfelelő transzformált transzfervektort tartalmazó mikroorganizmus növesztésével és a mikroorganizmus által termelt kívánt peptid(ek) kinyerésével és tisztításával.

Az így előállított peptid termék lehet kapcsolt fehérje formájában, amelyben a kívánt peptid egy prokarióta fehérje egy részével van összekapcsolva.

A találmányt a továbbiakban az alkalmazott kísérleti eljárások és az ilyen módon elért eredmények leírásával illusztráljuk.

A.) KÍSÉRLETI ELJÁRÁSOK

1.) Baktérium- és fág törzsek

E. coli RR1-et használunk, mint baktérium gazdasejtet a rekombináns plazmidokhoz (pBR 322), amelyek sertés relaxin cDNS beiktatott részt (inzerit) tartalmaznak, amint ezt korábban leírtuk [Haley, J., Hudson, H.: DNA 1, 155-162 (1982)].

A humán genom klónok „könyvtár”-át T. Maniatis szívesen bocsátotta rendelkezésünkre. A humán DNS részleges Hae III/Alu I fragmentációjából eredő, mintegy 15-20 kb-s genom DNS fragmensek [Lawn, R. M., Fritsch, E. F., Parker, R. C., Blake, G. és Maniatis, T.: Cell, 15, 1157-1174 (1978)] kapcsolókkal vannak klónozva a Charon 4 A lambda fág vektorba [Maniatis, T., Hardison, R. E., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C. és Quon, D.: Cell 15, 687-701 (1978)] és szaporítva E. coli LE 392 sejtekben.

A fág DNS-t (a klón-szelekció után) az 1 liter E. coli DP 50 sup F sejtenyészetének lizisét követően állítjuk elő.

A fág DNS fragmentációjából eredő kis DNS fragmenseket szubklónozzuk a szekvenancia analízishez az M 13 bakteriofág vektorokba (mp 7,1 mp 8 és mp 9), amelyeket Dr. J. Messing bocsátott szívesen rendelkezésünkre, és transzformáljuk JM 101 sejtekbe.

2.) A hibridizációs vizsgálati minták (sertés DNS) előállítása

Radioaktívan jelzett vizsgálati mintákat készítünk primer-képző szintézissel különböző DNS fragmensekre, a borjú timusz DNS denaturált véletlenszerű primer mintáit használva (3 vagy 4 bázis) [Taylor, J. M., Illmersee, R. és Summers, J.: Biochim. Biophys. Acta 442, 324-330 (1976)]. A sertés DNS templátot (100-200 ng) denaturáljuk a véletlenszerű primer mintákkal együtt, 20 µl vízben forralva 2 percen át. A szintézist 30 µl reakciókeverék hozzáadásával indítjuk be, a reakciókeverék összetétele: 50 mmól/liter Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmól/liter NaCl, 1 mmól/liter ditiotritol (DTT), 10 mmól/liter MgCl₂, 5 egység *E. coli* DNS polimeráz 1, 500 µmól/l dCTP, dGTP, dTTP mindegyikéből, és 0,3 mól/liter α[32p]dATP-ből (kb. 3000 Ci/mmól, Amersham gyártmány). 37 °C hőmérsékleten 30 percen át inkubálunk, majd a reakciót 300 µl pufferral történő hígítással leállítjuk; a puffer összetétele: 0,3 mól/liter NaCl, 10 mmól/liter Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmól/liter EDTA. A keveréket Sephadex G-50 oszlopon visszük át, ugyanazt a puffert használva. A radioaktívan jelzett vizsgálati mintát összegyűjtjük a csúcsfrakciókból üres térfogatnál, és két térfogat etanollal kicsapjuk -20 °C hőmérsékleten, LRNS-t (10 µg) használva hordozóként.

3.) Szűrővizsgálati eljárások

Genom DNS fragmenseket tartalmazó lambda fágot növesztünk lágy agaron 10⁵ fág/13 cm átmérőjű lemez mennyiségben, és nitrocellulóz szűrőkre visszük át (Schleicher és Schüll B A 85), amint ezt Benton és Davis leírták [Benton, W. D. és Davis, R.: Science 196, 180-183 (1977)]. A szűrőket hibridizáljuk radioaktívan jelzett vizsgálati mintákkal 40 °C hőmérsékleten 18 órán át módosított Denhardt oldatban [Denhardt, D. T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646 (1966)], amely 5 x SSC-t és 25% formamidot tartalmaz. A szűrőket 2 x SSC-ben mossuk 30 °C hőmérsékleten 1 órán át, majd röntgensugár-filmre exponáljuk (Kodak XS-5) 24 órán át. A lemeznek azokat a területeit, amelyek pozitív hibridizációt mutatnak, újból tenyésztjük, és újból szűrővizsgálatnak vetjük alá - többször is ismételve, amíg egyedi pozitív tarfoltokat tudunk szelektálni. A fágokat *E. coli* I DP 50 sup F sejtek 1 liternyi tenyészetének lizise után kinyerjük és a DNS-t Maniatis [Maniatis, T., Hardison, R. E., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., és Quon, D.: Cell, 15, 687-701 (1978)], valamint Yamamoto és Alberts által leírt módszerrel kiperaráljuk [Yamamoto, K. R. és Alberts, B. M.: Virology 40, 734-744 (1970)].

4.) DNS szekvencia analízis

A kiválasztott rekombináns fág restriktációs fragmenseit közvetlenül az M 13 mp 8 fág Eco R 1, Pst 1, vagy Sma 1 helyeire szubklónozzuk. A kapcsolásokat 20 µl reakciókeverékben végezzük, a reakciókeverék 10 mmól/liter Tris-HCl-t (pH 8,0), 10 mmól/liter MgCl₂-t, 1 mmól/liter DDT-t, 1 mmól/liter ATP-t, 1 egység T₄ DNS-ligázt, 100 ng DNS-t és az M 13 fág vektorból 50 ng-ot tartalmaz. 40 °C hőmérsékleten egy éjszakán át tartó inkubálás után a rekombináns DNS-t *E. coli* JM 101 sejtekbe transzformáljuk [Sanger, F., Coulson, A. R. Barrell, B. G., Smith, A. J. A. és Rue, B. A.: J. Mol. Biol. 143, 161-178 (1980)]. A kódoló területeket tartalmazó tarfoltokat hasonló technikával szelektáljuk, amint ezt fentebb a genom szűrővizsgálatoknál leírtuk, azzal a különbséggel, hogy az M 13 fágot kisebb sűrűségben (10³ fág/9 cm átmérőjű lemez) szélesztjük. A pozitív tarfoltokat vagy egyszálú templát, vagy replikálódó kettős szálú (rf) forma preparatív kitermelése érdekében növesztjük (lásd Sanger és munkatársai, fentebb idézett irodalom). Az egyszálú templátokat közvetlenül vetjük alá szekvencia-analízisnek [Sanger, F., Nicklen, S. és Coulson, A. R.: Proc. Natn. Acad. Sci. 74, 5463-5467 (1977)], mégpedig vagy M13 fajlagos primer mintát (Collaborative Research) alkalmazva, vagy olyan szintetikus primereket alkalmazva, amelyek komplementerek a kódoló területen levő különböző szekvenciákra. A szubklónok teljes szekvencia analízisét az rf forma különböző helyeken, különböző restriktációs enzimekkel történő hasításával nyerjük, amelyet tompa végű [Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. A. és Roe, B. A.: J. Mol. Biol. 143, 161-178 (1980)] vagy közvetlenül vég-jelzett fragmensekkel való kapcsolással történő szubklonozás, valamint a Maxam és Gilbert szerinti [Maxam, A. M. és Gilbert, N.: Proc. Natn. Acad. Sci. 74, 560-564 (1977)] szekvencia-analízis követ. A DNS szekvenciákat analizáljuk és komputer programok segítségével [Staden, R.: Nucl. Acids. Res. 6, 2601-2610 (1979)] összehasonlítjuk a sertés és patkány relaxin szekvenciákkal.

B) EREDMÉNYEK

Az itt következő tárgyalásban utalásokat teszünk az ábrákra. Az 1. ábra a genom klónoknak egy rövidített restriktációs enzimterképét mutatja.

A méreteket kilo-bázispárban (kb) adjuk meg és a hasítási helyeket Eco R 1-nél (R), Pst 1-nél (P) és Hpa 11-nél (H) jellel jelöljük. A AH 5 genom klón egy Eco R 1 kapcsó-

lónál ér véget, amely az Alu 1 helyhez van kapcsolva a C peptidben (exon II) (A* az 1. ábrában). A meghatározott nukleotid szekvenciát a kódoló területnél a $\Delta H 7$ genom klónból állítjuk össze az Eco R 1 és Pst 1 fragmensek szubklonozásával M 13 mp 8-ba, majd vagy

- (1) közvetlenül szekvencia-analízissel, amelyet az 1. ábrában a szaggatott vonal (---) mutat az M 13 templáton, vagy
- (2) közvetlen szekvencia-analízissel, szintetikus nukleotid primer mintákat használva, amelyet a pontozott vonalak mutatnak be (....), vagy
- (3) a DNS fragmensek vég-jelzésével és szekvencia-analízisével a kémiai lebontás módszerével, ezt folytonos vonal (—) mutatja be.

A szekvencia-analízishez használt primer minták a következők voltak:

- a: 5' TTCGAATAGGCA és
- b: 5' GCACATTAGCT

A 2. ábra mutatja be a humán relaxin gén kódoló területét. A humán preprorelaxin aminosav- és mRNS szekvencia összehasonlítása (lásd fent) a megfelelő sertés relaxin szekvenciákkal (lent) van bemutatva a 3. ábrában. A szekvenciák sorba vannak állítva a homológia kiemelése érdekében a nukleotid-azonosságoknál (amelyeket csillagokkal jelölünk) és az aminosav homológiáknál (amelyeket bekeretezett területekkel jelölünk). Az aminosavakat a B-lánc kezdetétől számozzuk. Az intron szekvenciát az exon(intron)exon határoknál kisbetűs DNS jelöléssel mutatjuk be.

1.) A genom klónok izolálása és jellemzése

A humán genom klónokat a könyvtárnak a sertés relaxin cDNS klón egy rövid - a C peptidben levő 45-95 aminosavaknak megfelelő [Haley, J., Hudson, P., Scanlon, D., John, M., Cronk, M., Shine, J., Tregear, G. és Niall, H.: DNA 1, 155-162 (1982)] - fragmenséből (150 bp) készült vizsgálati mintákkal végzett szűrővizsgálatával azonosítottuk, amint ez a 3. ábrában látható. Ezt a fragmenst a Hpa II-vel és Hinf I-el történő emésztéssel vágjuk ki a klónból és ez a terület maximális homológiát mutat (71% a nukleotid szinten) a patkány és a sertés relaxin szekvenciák között. A genom klón bankból két erősen pozitív fagot, $\Delta H 5$ és $\Delta H 7$ jelzésűt, izolálunk. A pozitív klónokat tovább jellemezzük restrikciós enzim analízissel, vizsgálati mintaként az 5', illetve a 3' exon területekre (amelyeket exon I-nek és exon II-nek nevezünk) fajlagos sertés relaxin cDNS két elkülönített fragmensét alkalmazva. A két fragmenst a sertés relaxin cDNS klón hasításával hozzuk létre egy egyedi Hpa II helynél, amely megfelel (néhány bázison belül) egy intron hely-

nek a homológ patkány relaxin génben [Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J. és Niall, H.: Nature, 291, 127-131 (1981)]. A $\Delta H 5$ és $\Delta H 7$ klónok Sonthon folt analízise felfedi, hogy humán relaxin gén kódoló területet egy 3,4 kb-s egyedi intron szakítja meg (lásd 1. ábra).

2.) A genom klónok szekvencia analízise

Az alkalmazott stratégia szerint a $\Delta H 5$ és $\Delta H 7$ teljes, restrikciós enzimekkel emésztett anyagát szubklonozzuk M 13 vektorokba, majd szűrővizsgálatnak vetjük alá, exon I-re és exon II-re fajlagos sertés relaxin vizsgálati mintákat alkalmazva. A pozitív szubklónokat az A. rész 4. fejezetében leírt módszereknek egy kombinációjával szekvencia-analízisnek vetjük alá.

A $\Delta H 7$ klón exon II. területét egy 2,0 kb-s Eco R 1 fragmens tartalmazza, amely egy Eco R 1 helynél kezdődik a C peptidben és folytatódik az A lánc teljes kódoló területén át a befejező kodonig (lásd 1. ábra). Ennek a fragmensnek a szekvencia-analízisét jelentősen elősegíti az A lánc körüli területekre fajlagos nukleotid primer minták szintézise, amelyeket arra használunk, hogy közvetlenül szolgáljanak mintaként a teljes 2,0 kb fragmenst tartalmazó M 13 templáton. A C peptid megmaradó 53 bp részét tartalmazó szubklonozott Eco R 1 fragmenst az exon II-ben nem tudjuk azonosítani a vizsgálati mintaként használt sertés cDNS-el. A szekvenciát erről a területről egy szubklonozott Pst 1 fragmenssel nyerjük a $\Delta H 7$ -ből, amely tartalmazza a teljes exon II területet.

A $\Delta H 5$ exon II terület szekvencia vizsgálata felfed egy rendkívül rövid 70 bp-s fragmenst, amely ugyanazon az Eco R 1 helyen kezdődik a C peptidben, mint a $\Delta H 7$ -nél (lásd 1. ábra), de egy Eco R 1 kapcsolónál végződik, ez a kapcsoló egy Alu 1 helyre van kapcsolva az eredeti genom DNS-ben a genom „könyvtár” kialakulása folyamán. Így a $\Delta H 5$ -öt a relaxin gén inkomplett klónjának minősítjük, és nem vizsgáljuk tovább.

Az exon I terület szekvencia analízise egy kicsit komplikáltabb a szignál peptidben egy Eco R 1 hely jelenléte miatt, amely szükségessé teszi a két Eco R 1 fragmens szubklón független szekvencia analízisét. Az átfedés az Eco R 1 helyeken alátámasztja a $\Delta H 7$ -ből származó Alu 1 szubklón azonosítását, amely az átlapoló szekvenciákat tartalmazza.

C.) A módosított humán relaxin (hRLX) A (1-24)-B(1-25) szintézise

1.) A humán relaxin A-lánc [hRLX A(1-24)] szintézise

A humán relaxin A-lánc 1-24 gyökeinek megfelelő aminosav szekvenciáját, amelyet a

fentiekben leírt módon a genom klón nukleotid szekvenciájából következtettünk ki, szilárd fázisú módszerrel szintetizáljuk, a Merrifield által leírt általános elvek szerint, pl. (Barany, G. és Merrifield, R. B.: *The Peptides*, 1-284 oldal, szerkesztette E. Gross és J. Meienhofer, Academic Press kiadás, New York).

N- α -tercier-butil-oxi-karbonil*-4-metil-benzil-L-ciszteint (* a továbbiakban „BOC”) 0,30 mmól/g mennyiségben véve kapcsolunk egy 1% keresztkötéssel ellátott polisztirol gyantára, fenil-acetamido-metil (PAM) kötéssel TAM és munkatársai módszere szerint [Synthesis 12, 955-957, (1979)]. A BOC-L-CYS-PAM gyantát (8,0 g) egy Beckman 990 Modell-típusú peptid-szintetizáló edénybe visszük át és az aminosav-szekvenciát a 23. gyóktól az 1-ig elkészítjük az egyes megfelelően védett aminosavak lépésenkénti beadagolásával. Az egyes aminosavak amino-végéről a BOC védőcsoportot olyan módon távolítjuk el, hogy a gyantát 30 percen át 35%-os metilén-kloridos trifluor-ecetsav oldattal kezeljük, majd semlegesítjük 15 percen át 5%-os metilén-kloridos diizopropil-etilamin oldattal. A gyantát minden kezelés után alaposan átmoszuk metilén-kloriddal. A szekvenciában következő aminosavat (amelynek α -amino-csoportja BOC csoporttal és ahol szükséges, az oldalláncok funkciós csoportjai is megfelelően védettek) összekapcsoljuk a gyantával, diciklohexil-karbodiimidet (DCC) alkalmazva. A gyantát és az aminosavat keverjük metilén-kloridban 10 percen át, mielőtt a DCC-t adagoljuk, amelyet szintén metilén-kloridban oldunk. 2,5-szörös moláris aminosav- és DCC felesleget (6,0 mmól) használunk minden egyes kötéshez. 1 órás keverés után a gyantából mintát veszünk és megvizsgáljuk szabad aminosavakra, Kaiser és munkatársainak ninhidrines módszerét alkalmazva (Anal. Biochem., 34, 595-598, 1970). Ha a ninhidrines vizsgálat negatív, ez jelzi, hogy a kapcsolat teljes, és a reakció-ciklus folytatódhat a következő aminosav BOC védőcsoport eltávolításával, semlegesítésével és kapcsolásával. Pozitív ninhidrin reakció esetén a kapcsolási reakciót meg kell ismételni további aminosavval és DCC-vel.

Az oldalláncban funkciós csoportokkal rendelkező aminosavak közül a következő védett termékeket alkalmazzuk:

N- α -BOC-2,6-diklór-benzil-L-tirozin;

N- α -BOC- ξ -klór-benzil-oxi-karbonil-L-lizin;

N- α -BOC-L-szerin-O-benzil-éter;

N- α -amil-oxi-karbonil-N^G-tozil-L-arginin

N- α -BOC-L-treonin O-benzil-éter

N- α -BOC-S-etil-merkaptó-L-cisztein (az A lánc 15., 11. és 10. szekvencia-helyén levő ciszteinekhez);

N- α -BOC-L-glutaminsav- γ -benzil-észter.

Az 1-24 peptid elkészítését követően a végső BOC csoportot az amin-terminálison le-

vő arginről eltávolítjuk, a védőcsoport-eltávolító semleges ciklust használva, majd a peptidet tartalmazó gyantát (17 g) vákuumban szárítjuk. A peptidet tartalmazó gyanta egy részét (2 g) vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeljük anizol (2 ml) jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 30 percen át. A peptidet tartalmazó gyanta hidrogén-fluoriddal (HF) történő teljes érintkezési idejét a minimumon kell tartani (ne legyen több, mint 70 perc) ezért a HF-ot olajszivattyús vákuum segítségével gyorsan eltávolítjuk. A peptidet tartalmazó gyantát azután többször átmoszuk etil-acetáttal az anizol eltávolítása érdekében, majd a peptidet 1 mól/literes ecetsavval extraháljuk, és az oldatot liofilezzük. A nyers peptid kezdeti tisztítása gél-szűrőssel történik Biogel P-10-en, 0,1 mól/literes ecetsavban. Erről az oszlopról a főcsúcsot reprezentáló frakciókat, amelyeket a kb. 3000 molekulásúlynak megfelelő helynél eluálunk, összegyűjtjük és liofilezzük. Ennek a peptidnek az aminosav-elemzése jelzi, hogy az 1-24 szekvencia összes aminosavai a helyes arányban vannak jelen.

Az (S-tioetil-Cys^{10,11,15})-hRLXA(1-24) peptid további tisztítását preparatív fordított fázisú HPLC-vel (nagy nyomású folyadékkromatográfia) végezzük Waters C-18 Bondapak oszlopon, 0,1% trifluorecetsav (TFA)-(viz)acetonnitril oldószert-rendszer alkalmazva.

A gél-szűrőssel tisztított peptid egy 160 mg-os mintáját S-szulfonáljuk nátrium-szulfít és nátrium-tetratónát keverékével (teljes reakcióidő: 3 óra), Du és munkatársai módszerével [Scientia Sinica, 101, 84-104 (1961)]. Az S-szulfonálás folyamán képződött csapadékot szűrőssel elkülönítjük, és mind a csapadékot, mind a felülúszó oldatot dializáljuk vízzel szemben 4 °C hőmérsékleten 48 órán át. A dializáló cső tartalmát liofilezzük, így a felülúszó oldatból 81,4 mg, míg az S-szulfonálási reakció során keletkezett csapadékból 53,2 mg peptidet nyerünk. Az „oldható” (S-szulfo Cys^{10,11,15,24})hRLX A(1-24) peptid egy mintáját ioncserélő kromatográfiával tisztítjuk DEAE cellulózon Tris-HCl pufferben (pH 8,3). A peptidet az oszlopról Tris-HCl pufferben levő NaCl lineáris gradiensevel oldjuk le, 3,0 mS-től 85,0 mS vezetőképességi tartományt alkalmazva. A fő csúcsot jelentő frakciókat, amelyeket 20 és 30 mS között eluálunk az ioncserélő oszlopról, dializáljuk és a peptidet liofilezással kinyerjük. Preparatív HPLC-t használunk az S-szulfonált peptid további tisztításához.

2.) A rövidített humán relaxin B lánc [hRLX B(1-25)] szintézise

A humán relaxin B lánc 1-25 gyókeinek megfelelő aminosav-szekvenciát a fentebb leírt eljárással szintetizáljuk, 7,0 g N- α -tercier-butil-oxi-karbonil-O-benzil-L-szerin-fenil-acetamido-metil polisztirol gyantával kezdve,

0,1 mól Ser/g terheléssel. Ugyanazokat az oldallánc-védő csoportokat használjuk a B láncához, mint amelyeket az A láncnál alkalmazunk, beleértve a cisztein S-etil származékokat is a 10. és 22. helyeken. A 4. és 5. helyeken levő aszparaginsav gyököket N- α -BOC-benzil-észter származékokként adagoljuk. A glutamint a 18. helyen aktiv észteres eljárással kapcsoljuk, N- α -BOC-L-glutamin-p-nitrofenil-észtert használva dimetil-formamidban. A 2. helyzetben levő triptofán kapcsolása után 0,1% indolt adunk a trifluor-ecetsav védőcsoport-eltávolító reagenshez és az ezt követő metilén-klorid mosófolyadékhoz.

A peptidet tartalmazó gyanta végső súlya 12,2 g, miután a BOC csoportot az amin-terminális lizin-gyökéről eltávolítottuk, és vákuumszáritást végeztünk. A peptidet tartalmazó gyanta egy részletét (5 g) vízmentes hidrogén-fluoriddal kezeljük 2 ml anizol jelenlétében 0 °C hőmérsékleten 30 percen át, és a B peptid láncot izoláljuk az A láncnál leírt módszer szerint. A nyers (S-tioetil-Cys^{10,22})hRLX B(1-25)-öt (1,40 g) gél-szűrővel tisztítjuk Bio-Gel P 10-en 0,1 mól/literes ecetsav oldattal, majd preparatív HPLC-vel.

A gél szűrővel tisztított peptid egy 150 mg-os mintáját S-szulfonáljuk 8,3 pH-nál 3 órán át, a reakciókeveréket szűrjük, és mind a csapadékot, mind a felülúszó-oldatot dializáljuk desztillált vízzel szemben. Az „oldható” peptid mennyisége liofilezés után 92 mg, az „oldhatatlan” peptidé 55 mg.

Az S-szulfonált B-peptid láncokat tovább tisztítjuk preparatív HPCL-vel, C-18 fordított fázisú oszlopot és 0,1% trifluorecetsav-(viz)acetonnitril oldószer rendszert alkalmazva.

3.) Lánc-kombináció

A szintetikus hRLX A(1-24) és hRLX B(1-25) peptideket azzal a módszerrel kombináljuk, amelyet Chance és Hoffmann írtak le 68844/81 sz. ausztrál szabadalmi közzétételi iratban az inzulin láncokhoz, ahol az S-szulfonált peptideket A:B 2:1 arányban keverték 10 mg/ml peptid koncentrációnál 10,5 pH-jú glicin pufferben. Glicin pufferben levő ditiotreitolt adunk ez után olyan mennyiségben, hogy összesen 1,0 merkaptó-csoport jusson minden egyes S-szulfó-csoportra. A reakciókeveréket ez után nyitott edényben 24 órán át kevertetjük.

Ennek az eljárásnak további módosításaként arra jöttünk rá, hogy a biológiailag aktív relaxin képződéséhez vezető lánc-kombinációs reakciót úgy lehet hatásosan végrehajtani, ha egyik vagy előnyösen mindkét peptid láncot S-tioetil-Cys származékként alkalmazunk az S-szulfó-származék helyett, amelyet Chance és Hoffmann (lásd fentebb) inzulin esetében előírtak. Az S-tioetil Cys

peptidek alkalmazásával kiküszöbölünk egy reakciót és egy tisztítási lépést, amely a peptideknek az S-szulfó-származékká történő átalakításához szükséges. Tapasztalataink szerint a relaxin peptidek S-szulfonálási reakciója mellékreakciókkal együtt megy végbe, amelyek nehezítik az S-szulfó-peptidek tisztítását, ez pedig alacsony kitermeléshez vezet.

A fenti körülményeket alkalmazva a lánc-kombinációban 0,24-3% kitermelést érünk el, Wiqvist és Paul [Acta Endocrinol., 29, 135-136 (1958)] patkány-méh összehúzódban jelentkező biológiai aktivitás vizsgálatának módszerével mérve.

Példa a lánc-kombinációs reakcióra

Humán relaxin (S-tioetil Cys^{10,11,15}) A(1-24)-et [3,60 mg száraz tömeg, 2,0 mg (0,68 mól) peptidtartalom aminosav-elemzés alapján] feloldunk 200 μ l 0,1 mól/literes glicin-pufferben (pH 10,5), egy 3 ml-es, dugóval ellátott műanyag centrifuga csőben. 100 μ l 0,1 mól/literes glicin pufferben (pH 10,5) oldott humán relaxin (S-szulfó-Cys^{10,11}) B(1-25)-öt (1,89 mg, 1,0 mg peptidtartalom aminosav-analízis alapján) adunk hozzá és a keveréket keverjük. 0,1 mól/literes glicin-pufferben (pH 10,5) készített ditiotreitolt (DTT) törzsoldat (1,15 μ mol DTT 10 ml-ben) egy alikvot részét (15,2 μ l, 1,73 μ mol DTT) adjuk hozzá a peptid-oldathoz, és rövid keverés után a reakciókeveréket 4 °C hőmérsékleten 24 órán át állni hagyjuk nyílt levegőn. A keveréket ez után centrifugáljuk és a felülúszó oldat egy alikvotját relaxin biológiai aktivitásra mérjük patkány-méh összehúzódbási vizsgálattal. A reakciókeverék alikvotjai gátolják a patkány-méh spontán összehúzódbását dózis-függő módon. Egy 75 μ l-es alikvot, amely teljesen meggátolja a méhösszehúzódbást, ekvivalens egy 0,70%-os lánc-kombinációs kitermeléssel, amint ez a természetes sertés relaxin standarddal (A 22-B 31) összehasonlítható.

H 1 gén szekvencián alapuló további szintetikus humán relaxin peptidek

A következő táblázatban felsorolt szintetikus relaxin peptideket a 2. ábrában bemutatott H 1 humán relaxin gén szekvenciából származó A és B láncokhoz tartozó aminosav-szekvenciából készítjük. Az egyedi peptid láncokat a fentebb A(1-24) és B(1-25) peptidek előállításához leírt módszer szerint állítjuk elő és tisztítjuk. Ezeknek a módszereknek egy módosítását alkalmazunk a B(3-25) amid és B(1-25)amid peptidekhez, ahol a PAM gyantakötést benzidril-amin(BHA)-polisztirol gyantával helyettesítjük. A BHA gyanta használata olyan peptidek keletkezését

eredményezi, amelyeknél a C végződésnél inkább amid, mint karboxi-forma található.

Hacsak másképpen nem jelezzük, a lánc-kombinációs reakciót ugyanúgy végezzük, amint azt korábban leírtuk, vagyis az A lánc S-tio-etil-Cys származékával és a B lánc S-szulfo-Cys származékával.

A következő táblázatban szereplő összes szintetikus analóg relaxin-szerű biológiai aktivitást mutat a patkány-méh összehúzódnási vizsgálatban. Az egyedi peptid láncok kombinációjának kitermelését a biológiai vizsgálatok eredményeiből számítjuk, természetes sertés relaxin A(1-22)-B(1-31)-et használva standardként.

TÁBLÁZAT

Szintetikus H 1 humán relaxin analógok	A kombináció kitermelése (a B-lánc mennyiségére alapozva)
A(1-24) + B(1-23)	0.24%
A(1-24) + B(1-25)	0.70%
A(1-24) + (Ala ²⁴)B(1-26)	0.92%
A(1-24) + B(1-32)	2.00%

GCA	GAA	ACC	ATG	CCA	TCC	TCC	ATC	ACC	AAA	GAT	GCA	GAA	ATC
TTA	AAG	ATG	ATG	TTG	GAA	TTT	GTT	CCT	AAT	TTG	CCA	CAG	GAG
CTG	AAG	GCA	ACA	TTG	TCT	GAC	AGG	CAA	CCA	TCA	CTG	AGA	GAG
CTA	CAA	CAA	TCT	GCA	TCA	AAG	GAT	TCG.					

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás az alábbi mRNS szekvenciának megfelelő kettősszalú DNS vagy ennek a DNS szekvenciának a természetes triplett-degenerációjá-

A(1-24) + B(1-25)amid	0.80%
A(1-24) + B(1-25)amid, mindkét láncban S-tioetil formát alkalmazva a kombinációs reakcióban	3.10%
A(1-24) + B(3-25)amid	0.68%
A(1-24) + (N-formil Trp ²) B(2-25)	0.43%

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás humán H1 preprorelaxint kódoló DNS vagy még relaxin-hatású fehérjét kódoló alegysége előállítására, azzal jellemezve, hogy humán genom klón készletet, vizsgáló mintaként alkalmazott humán relaxin gén vagy sertés relaxin gén alegységgel végzett hibridizációval átvizsgálunk, és az alkalmas hibridizáló DNS szekvenciákat kiválasztjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy vizsgáló mintaként a sertés relaxin C peptid 45-95. aminosavának megfelelő, alábbi képletű gént alkalmazzuk:

ból eredő variánsai vagy mindezek még relaxin-hatású fehérjéket kódoló alegységei előállítására:

AUG	CCU	CGC	CUG	UUC	UUG	UUC	CAC	CUG	CUA	GAA	UUC	UGU	UUA
CUA	CUG	AAC	CAA	UUU	UCC	AGA	GCA	GUC	GCG	GCC	AAA	UGG	AAG
GAC	GAU	GUU	AUU	AAA	UUA	UGC	GGC	CGC	GAA	UUA	GUU	CGC	GCG
CAG	AUU	GCC	AUU	UGC	GGC	AUG	AGC	ACC	UGG	AGC	AAA	AGG	UCU
CUG	AGC	CAG	GAA	GAU	GCU	CCU	CAG	ACA	CCU	AGA	CCA	GUG	GCA
GAA	AUU	GUA	CCA	UCC	UUC	AUC	AAC	AAA	GAU	ACA	GAA	ACU	AUA
AUU	AUC	AUG	UUG	GAA	UUC	AUU	GCU	AAU	UUG	CCA	CCG	GAG	CUG
AAG	GCA	GCC	CUA	UCU	GAG	AGG	CAA	CCA	UCA	UUA	CCA	GAG	CUA
CAG	CAG	UAU	GUA	CCU	GCA	UUA	AAG	GAU	UCC	AAU	CUU	AGC	UUU
GAA	GAA	UUU	AAG	AAA	CUU	AUU	CGC	AAU	AGG	CAA	AGU	GAA	GCC
GCA	GAC	AGC	AAU	CCU	UCA	GAA	UUA	AAA	UAC	UUA	GGC	UUG	GAU
ACU	CAU	UCU	CAA	AAA	AAG	AGA	CGA	CCC	UAC	GUG	GCA	CUG	UUU
GAG	AAA	UGU	UGC	CUA	AUU	GGU	UGU	ACC	AAA	AGG	UCU	CUU	GCU
AAA	UAU	UGC	UGA										

azzal jellemezve, hogy a tárgyi kör szerinti DNS szekvenciákat választjuk ki.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás az alábbi mRNS szekvenciának megfelelő kettőss-

zalú DNS vagy ennek a DNS szekvenciának a természetes triplett-degenerációjából eredő variánsai vagy mindezek még relaxin-hatású fehérjéket kódoló alegységei előállítására:

AAA	UGG	AAG	GAC	GAU	GUU	AUU	AAA	UUA	UGC	GGC	CGC	GAA	UUA
GUU	CGC	GCG	CAG	AUU	GCC	AUU	UGC	GGC	AUG	AGC	ACC	UGG	AGC
AAA	AGG	UCU	CUG	AGC	CAG	GAA	GAU	GCU	CCU	CAG	ACA	CCU	AGA
CCA	GUG	GCA	GAA	AUU	GUA	CCA	UCC	UUC	AUC	AAC	AAA	GAU	ACA
GAA	ACU	AUA	AUU	AUC	AUG	UUG	GAA	UUC	AUU	GCU	AAU	UUG	CCA
CCG	GAG	CUG	AAG	GCA	GCC	CUA	UCU	GAG	AGG	CAA	CCA	UCA	UUA
CCA	GAG	CUA	CAG	CAG	UAU	GUA	CCU	GCA	UUA	AAG	GAU	UCC	AAU
CUU	AGC	UUU	GAA	GAA	UUU	AAG	AAA	CUU	AUU	CGC	AAU	AGG	CAA
AGU	GAA	GCC	GCA	GAC	AGC	AAU	CCU	UCA	GAA	UUA	AAA	UAC	UUA
GGC	UUG	GAU	ACU	CAU	UCU	CAA	AAA	AAG	AGA	CGA	CCC	UAC	GUG
GCA	CUG	UUU	GAG	AAA	UGU	UGC	CUA	AUU	GGU	UGU	ACC	AAA	AGG
UCU	CUU	GCU	AAA	UAU	UGC	UGA							

azzal jellemezve, hogy a tárgyi kör szerinti DNS szekvenciákat választjuk ki.

5. Eljárás humán H1 preprorelaxint vagy alegységét kódoló DNS szekvencia fenntartására és replikálására alkalmas transzfer vektor előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított, megfelelő restrikciós enzimmel hasított DNS szakaszt egy, megfelelő restrikciós enzimmel hasított bakteriofágba iktatunk be.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy bakteriofágként λ -fágot használunk.

7. Eljárás humán H1 preprorelaxint vagy alegységét kódoló DNS szakaszt tartalmazó E. coli sejt előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely, az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárással előállított bakteriofággal E. coli törzset fertőzünk.

8. Eljárás humán H1 relaxin Arg-Pro-Tyr-Val-Ala-Leu-Phe-Glu-Lys-Cys-Leu-Ile-Gly-Cys-Thr-Lys-Arg-Ser-Leu-Ala-Lys-Tyr-Cys aminosav-sorrendű A láncának, illetve legalább a 10-24. aminosavat tartalmazó részeinek megfelelő polipeptidek előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő, védőcsoportokkal ellátott aminosavakat a peptidkémiai szokásos módszerekkel összekapcsoljuk, majd a védőcsoportokat eltávolítjuk.

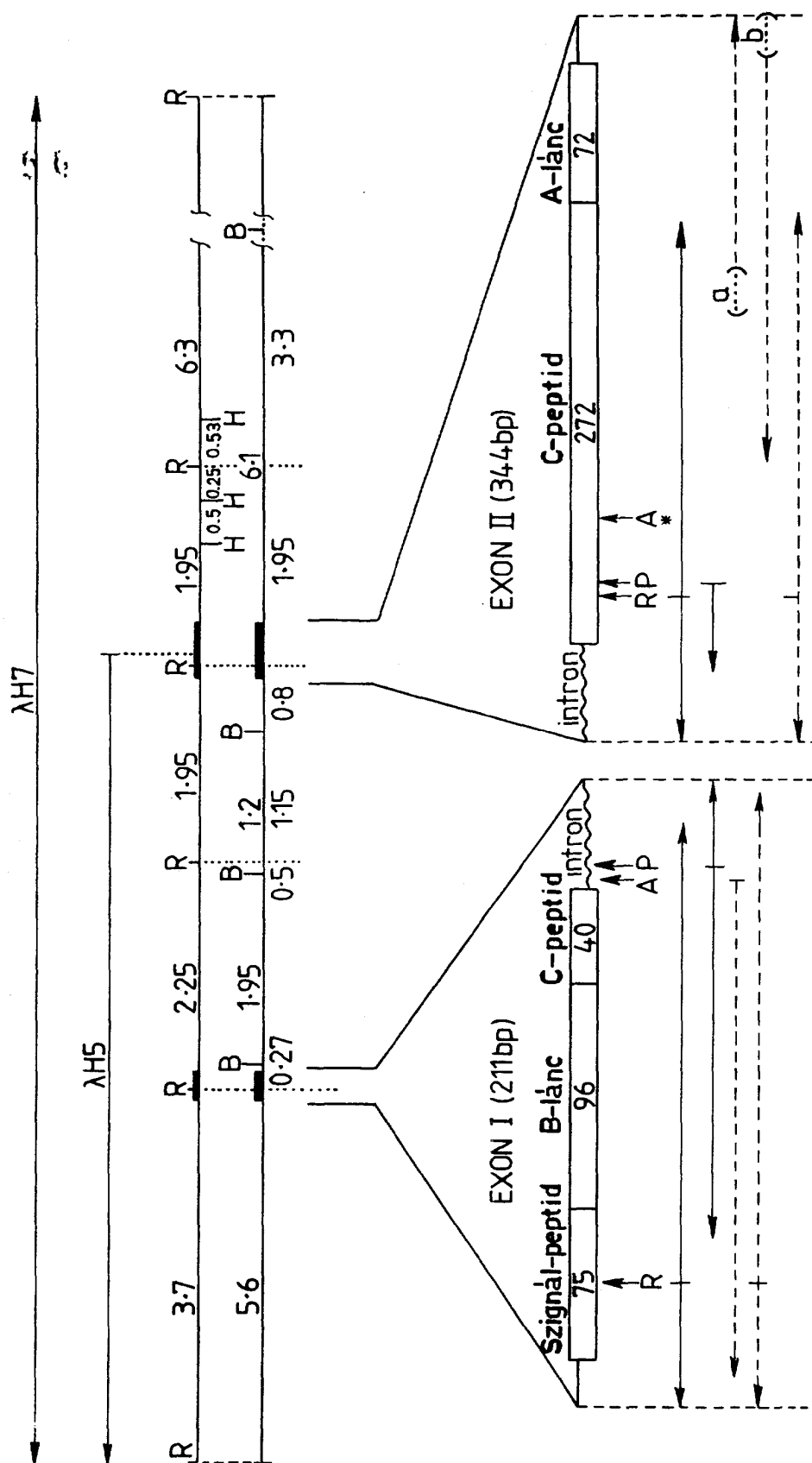
9. Eljárás humán H1 relaxin Lys-Trp (vagy N-formil Trp)-Lys-Asp-Val-Ile-

15 -Lys-Leu-Cys-Gly-Arg-Glu-Leu-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Ala-Ile-Cys-Gly-Met (vagy Ala)-Ser-Thr-Trp-Ser-Lys-Arg-Ser-Leu aminosav-sorrendű B láncának, illetve legalább a 3-23. aminosavat tartalmazó részeinek, illetve mindezek variánsainak megfelelő polipeptidek előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő, védőcsoportokkal ellátott aminosavakat a peptidkémiai szokásos módszerekkel összekapcsoljuk, majd a védőcsoportokat eltávolítjuk.

10. Eljárás humán H1 relaxin A láncát és humán H1 relaxin B láncát vagy a B lánc alábbi részei vagy variánsai valamelyikét tartalmazó humán H1 relaxin és analógjai előállítására: B(1-23), B(1-25) vagy ennek amidja, (Ala²⁴)B(1-26), B(3-25) vagy ennek amidja, (N-formil Trp²)B(2-25), azzal jellemezve, hogy a 7. igénypont szerinti eljárással előállított A láncot és a 8. igénypont szerinti eljárással előállított B láncot vagy a B lánc valamely, tárgyi kör szerinti részét vagy variánsát összekapcsoljuk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az A lánc és a B lánc vagy annak része vagy variánsa S-szulfonált és/vagy S-tioalkilezett formáinak keverékét redukáljuk, a redukciós keveréket levegőn állni hagyva oxidáljuk, és a humán H1 relaxint vagy H1 relaxin analógot az oxidált keverékből kinyerjük.

8 ábra oldal



1. ábra

Az ábrák elrendezése

2A. ábra	2B. ábra
----------	----------

2. ábra

3A. ábra	3B. ábra
3C. ábra	3D. ábra

3. ábra

—Szignál-peptid—

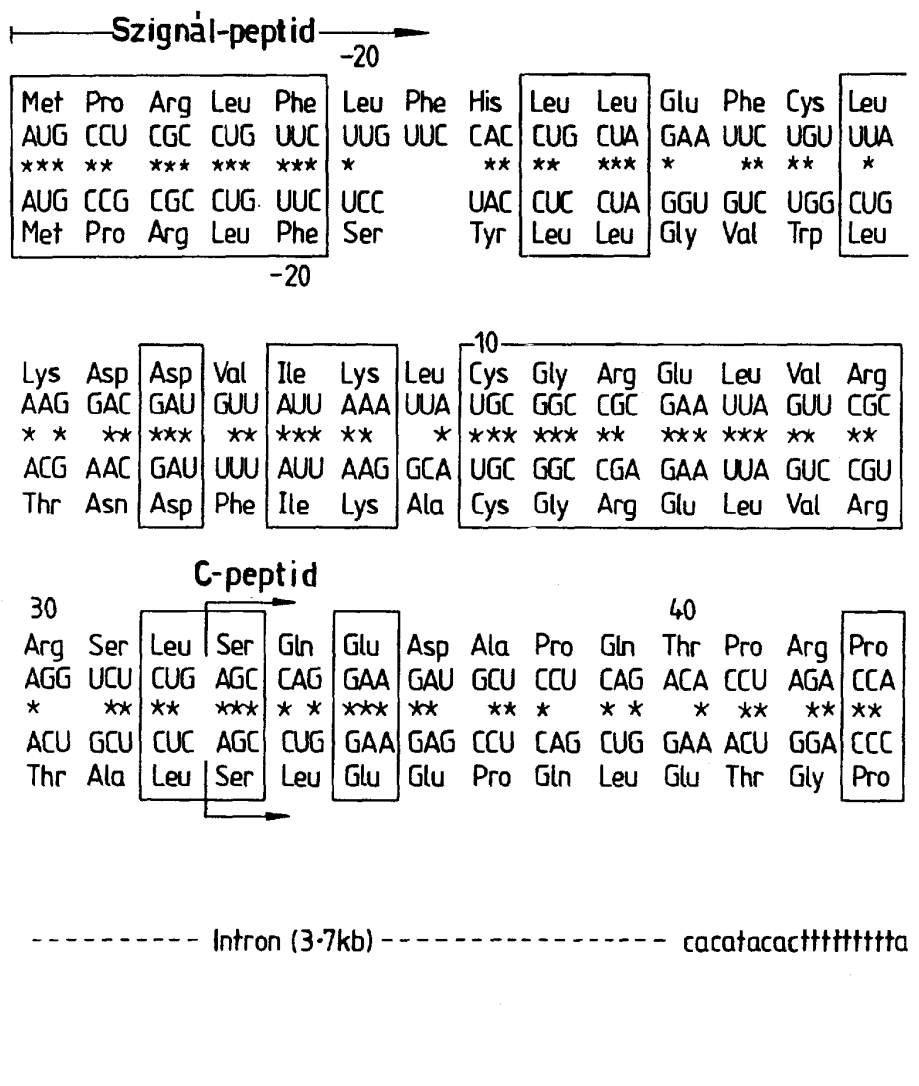
															-20	
Met	Pro	Arg	Leu	Phe	Leu	Phe	His	Leu	Leu	Glu	Phe	Cys	Leu	Leu		
AUG	CCU	CGC	CUG	UUC	UUG	UUC	CAC	CUG	CUA	GAA	UUC	UGU	UUA	CUA		
															10	
Val	Ile	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Ala	Gln	Ile	Ala		20
GUU	AUU	AAA	UUA	UGC	GGC	CGC	GAA	UUA	GUU	CGC	GCG	CAG	AUU	GCC		
															40	
Asp	Ala	Pro	Gln	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Ala	Glu	Ile	Val	Pro	Ser		50
GAU	GCU	CCU	CAG	ACA	CCU	AGA	CCA	GUG	GCA	GAA	AUU	GUA	CCA	UCC		
															70	
Ile	Ala	Asn	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Arg		80
AUU	GCU	AAU	UUG	CCA	CCG	GAG	CUG	AAG	GCA	GCC	CUA	UCU	GAG	AGG		
															100	
Asp	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Lys	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn		110
GAU	UCC	AAU	CUU	AGC	UUU	GAA	GAA	UUU	AAG	AAA	CUU	AUU	CGC	AAU		
															130	
Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	His	Ser	Gln	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Tyr	Val		140
UUA	GGC	UUG	GAU	ACU	CAU	UCU	CAA	AAA	AAG	AGA	CGA	CCC	UAC	GUG		
															160	
Leu	Ala	Lys	Tyr	Cys	***											
CUU	GCU	AAA	UAU	UGC	UGA											

2A. ábra

C 12 P 21/02

Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Cys	Cys	Leu	Ile	Gly	Cys	Thr	Lys	Arg	Ser
GCA	CUG	UUU	GAG	AAA	UGU	UGC	CUA	AUU	GGU	UGU	ACC	AAA	AGG	UCU

2B. ábra



3A. ábra

												B-lanc		
-10												-1	1	
Leu	Leu	Asn	Gln	Phe	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Lys	Trp		
CUA	CUG	AAC	CAA	UUU	UCC	AGA	GCA	GUC	GCG	GCC	AAA	UGG		
**	***	* *	***	**	**	***	* *	**	*	**	*	*		
CUC	CUG	AGC	CAA	CUU	CCC	AGA	GAA	AUC	CCA	GGC	CAG	AGU		
Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro	Gly	Gln	Ser		
												-1	1	
												→		
20														
Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Ser	Thr	Trp	Ser	Lys		
GCG	CAG	AUU	GCC	AUU	UGC	GGC	AUG	AGC	ACC	UGG	AGC	AAA		
*	*	*	*	**	**	***		*	**	***	*	* *		
CUG	UGG	GUG	GAG	AUC	UGU	GGC	UCC	GUC	UCC	UGG	GGA	AGA		
Leu	Trp	Val	Glu	Ile	Cys	Gly	Ser	Val	Ser	Trp	Gly	Arg		
45														
Val	Ala	G												
GUG	GCA	G	gtgagagctcccgcccccctccggccttccc										-----	
*	***	*												
CCG	GCA	G												
Pro	Ala	G												
50														
aacttaacag	Ile	Val	Pro	Ser	Phe	Ile	Asn	Lys	Asp	Thr				
AA	AUU	GUA	CCA	UCC	UUC	AUC	AAC	AAA	GAU	ACA				
**	*	*	***	***	* *	***	* *	***	***	**				
AA	ACC	AUG	CCA	UCC	UCC	AUC	ACC	AAA	GAU	GCA				
lu	Thr	Met	Pro	Ser	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Ala				
50														

3B. ábra

60										70									
Glu	Thr	Ile	Ile	Ile	Met	Leu	Glu	Phe	Ile	Ala	Asn	Leu	Pro						
GAA	ACU	AUA	AUU	AUC	AUG	UUG	GAA	UUC	AUU	GCU	AAU	UUG	CCA						
***	*	**	*	**	***	***	***	**	**	**	***	***	***						
GAA	AUC	UUA	AAG	AUG	AUG	UUG	GAA	UUU	GUU	CCU	AAU	UUG	CCA						
Glu	Ile	Leu	Lys	Met	Met	Leu	Glu	Phe	Val	Pro	Asn	Leu	Pro						
90																			
Leu	Pro	Glu	Leu	Gln	Gln	Tyr	Val	Pro	Ala	Leu	Lys	Asp	Ser						
UUA	CCA	GAG	CUA	CAG	CAG	UAU	GUA	CCU	GCA	UUA	AAG	GAU	UCC						
*	*	***	***	**	**			**	***	*	***	***	**						
CUG	AGA	GAG	CUA	CAA	CAA			UCU	GCA	UCA	AAG	GAU	UCG						
Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Gln			Ser	Ala	Ser	Lys	Asp	Ser						
120																			
Arg	Gln	Ser	Glu	Ala	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys						
AGG	CAA	AGU	GAA	GCC	GCA	GAC	AGC	AAU	CCU	UCA	GAA	UUA	AAA						
**	***	* *	***	**	* *	***	*	* *	* *	* *	***	***	***						
AGA	CAA	AAU	GAA	GCA	GAA	GAC	AAA	AGU	CUU	UUA	GAA	UUA	AAA						
Arg	Gln	Asn	Glu	Ala	Glu	Asp	Lys	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Lys						
140										150									
Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Phe	Glu	Lys	Cys	Cys	Leu	Ile	Gly	Cys						
CCC	UAC	GUG	GCA	CUG	UUU	GAG	AAA	UGU	UGC	CUA	AUU	GGU	UGU						
*		**	**	***		***	***	***	**	* *	*	***	***						
UUC	CGU	AUG	ACA	CUG	AGC	GAG	AAA	UGU	UGU	CAA	GUA	GGU	UGU						
Phe	Arg	Met	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Cys	Gys	Gln	Val	Gly	Cys						
A-lánc																			

3C. ábra

													80
Pro	Glu	Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Arg	Gln	Pro	Ser	
CCG	GAG	CUG	AAG	GCA	GCC	CUA	UCU	GAG	AGG	CAA	CCA	UCA	
* *	***	***	***	***	*	*	***	***	***	***	***	***	
CAG	GAG	CUG	AAG	GCA	ACA	UUG	UCU	GAG	AGG	CAA	CCA	UCA	
Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Arg	Gln	Pro	Ser	

Asn	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Phe	Lys	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn	110
AAU	CUU	AGC	UUU	GAA	GAA	UUU	AAG	AAA	CUU	AUU	CGC	AAU	
***	***	* *	***	***	***	***	***	***	**	***	*	**	
AAU	CUU	AAC	UUU	GAA	GAA	UUU	AAG	AAA	AUU	AUU	CUU	AAC	
Asn	Leu	Asn	Phe	Glu	Glu	Phe	Lys	Lys	Ile	Ile	Leu	Asn	

Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Thr	His	Ser	Gln	Lys	Lys	Arg	Arg	
UAC	UUA	GGC	UUG	GAU	ACU	CAU	UCU	CAA	AAA	AAG	AGA	CGA	
**	***	**	**	***	*	***	**	*	***	***	***	*	
AAC	UUA	GGU	UUA	GAU	AAA	CAU	UCC	AGA	AAA	AAG	AGA	CUG	
Asn	Leu	Gly	Leu	Asp	Lys	His	Ser	Arg	Lys	Lys	Arg	Leu	

Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Ala	Lys	Tyr	Cys	***				
ACC	AAA	AGG	UCU	CUU	GCU	AAA	UAU	UGC	UGA				
* *	* *	*	*	**	***	* *	*	***	***				
AUC	AGA	AAA	GAU	AUU	GCU	AGA	UUA	UGC	UGA				
Ile	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Arg	Leu	Cys	***				

3D. ábra