



C (15) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 05 08 1985  
(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12N 15/17, C 12P 21/02, C 07K 7/40

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	852135
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	29.05.85
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	29.05.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	01.12.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	14.05.93
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
30.05.84 DK 2665/84 P	08.02.85 DK 582/85 P

(71) Hakija - Sökande

1. Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Markussen, Jan, Kikudbakken 7, 2730 Herlev, Danmark, (DK)
2. Fiil, Niels, Fuglebakkevej 5, 2000 Koebenhavn F, Danmark, (DK)
3. Ammerer, Gustav, 2617 Boyer, East Seattle, Wash. 98112, USA, (US)
4. Hansen, Mogens Trier, Vinkelvej 21, 3650 Oelstykke, Danmark, (DK)
5. Thim, Lars, Skiftevej 22, 2820 Gentofte, Danmark, (DK)
6. Norris, Kjeld, Eskemosegårdsalle 18, 3460 Birkerød, Danmark, (DK)
7. Voigt, Hans Ole, Hvidegårdsparken 36, 2800 Lyngby, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Insuliinin prekursoreja koodaava DNA-sekvenssi, tällaisen sekvenssin sisältävät vektorit, insuliinin prekursorit ja menetelmä niiden valmistamiseksi sekä menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi  
DNA-sekvens som kodar för insulinprekursorer, vektorer innehållande denna sekvens, insulinprekursorer och förfarande för framställning av dessa samt förfarande för framställning av humaninsulin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 37255 (C 07C 103/52), EP A 26598 (C 12N 15/00), EP A 37723 (C 12N 15/00),  
EP A 40466 (C 12N 15/00), EP A 55945 (C 12N 15/00), EP A 68701 (C 12N 15/00),  
EP A 70632 (C 12N 15/00), EP A 90433 (C 12N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Ihmisen insuliinin prekursoreja, jotka sisältävät ihmisen insuliinin peptidiketjun B(1-29)-A(1-21), ja niiden johdannaisia, joissa on siltaketju yhdistämässä toisiinsa B(1-29)-ketjun karboksyyli-päätä ja A(1-21)-ketjun aminopäätä, valmistetaan viljelemällä hiivaisäntäsolua, joka on transformoitunut replikoitumis-kykyisellä ilmentämisvektorilla, joka kykenee ilmentämään insuliinin prekursoria koodittavan DNA-sekvenssin. Siltaketju on mielellään suhteellisen lyhyt sisältäen mielellään 2-8 aminohappotähdetä. Siltaketju ei saa sisältää kahta vierekkäistä emäksistä aminohappotähdetä (Lys tai Arg) ja siinä on yksi Lys tai Arg liittyneenä A(1-21)-ketjun aminopäähän. Ihmisen insuliini valmistetaan insuliinin prekursoreista in vitro-muuntamisella.

89183

Humaninsulinprekursorer innehållande humaninsulinets peptidkedja B(1-29)-A(1-21) och deras derivat med en bryggkedja förbindande med varandra B(1-29)-kedjans karboxyländgrupp och A(1-21)-kedjans aminoändgrupp, framställes genom att odla en jästvärdcell, som är transformerad med en replikerbar expressionsvektor med förmåga att expressera en insulinprekursor kodande DNA-sekvens. Bryggkedjan är företrädesvis relativt kort och innehåller företrädesvis 2-8 aminosyrarester. Bryggkedjan får inte innehålla två närliggande basiska aminosyrarester (Lys eller Arg) och har en Lys eller Arg kopplad till A(1-21)-kedjans aminoändgrupp. Humaninsulin framställes från insulinprekursorerna genom in vitro-omvandling.

Insuliinin prekursoreja koodaava DNA-sekvenssi, tällaisen sekvenssin sisältävät vektorit, insuliinin prekursorit ja menetelmä niiden valmistamiseksi sekä menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee biosynteettisiä insuliinin prekursoreja koodaavia DNA-sekvenssejä, tällaisia sekvenssejä sisältäviä vektoreita, menetelmää tällaisten insuliinin prekursorien valmistamiseksi ja menetelmää ihmisen insuliinin valmistamiseksi sekä ihmisen insuliinin prekursoreja.

Ennestään insuliinia on syntetisoitu (synteettisestä A- ja B-ketjusta) tai uudelleensyntetisoitu (luonnosta johdetusta A- ja B-ketjusta) yhdistämällä kyseiset kaksi ketjua hapettamalla niin, että pelkistyneiden ketjujen 6 kysteiniin sulfhydryyliryhmää (4 A-ketjussa, 2 B-ketjussa) muuttuvat disulfididisidoksiksi. Tässä menetelmässä disulfididisidokset muodostuvat suurelta osin satunnaisesti, mikä merkitsee sitä, että saadaan erittäin pienellä saannolla sellaista insuliinia, jossa disulfididisillat sijaitsevat oikein kysteiniintähteiden A-6 ja A-11, A-7 ja B-7 ja A-20 ja B-19 välillä vastaavasti.

Sen jälkeen, kun oli keksitty, että proinsuliini on insuliinin biologinen prekursori, havaittiin, että suoraketjuisen, täysin pelkistyneen proinsuliinin A- ja B-polypeptidiosat (ne, jotka vastaavat insuliinin A- ja B-ketjua) voitiin yhdistää hapetuksen kautta paljon vähemmän satunnaisia disulfididisidoksia synnyttäen niin, että saatiin oikealla tavalla ryhmittynyttä proinsuliinia oleellisesti ottaen suuremmalla saannolla kuin saatiin vapaiden A- ja B-ketjujen yhdistämisellä [D.F. Steiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 60 (1968), 622]. Vaikkakin suuria saantoja saatiin vain niin pienillä proinsuliiniväkevyyksillä, ettei menetelmä ollut toteuttamiskelpoinen preparatiivisessa mittakaavassa, tuli proinsu-

liinin B-C-A-polypeptidisekvenssin C-osan (so. liitospeptidi) eli osan, joka tuo 6 kysteinitähdettä proinsuliiniksi hapettumisen kannalta oikeisiin avaruusasemiin, selvästi osoitetuksi.

Saatu proinsuliini voi toimia insuliinin prekursorina in vitro, sillä liitospeptidi on poistettavissa entsyymaattisin keinoin [W. Kemmler et al., J. Biol. Chem. 246, (1971), 6786].

Sittemmin on osoitettu, että proinsuliinin kaltaiset yhdisteet, joissa on C-peptidiä lyhemmät liitososat, joiden kummassakin päässä on spesifinen entsyymaattinen tai kemiallinen katkaisukohta [ns. miniproinsuliinit (A. Wollmer et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974), 1471-1476 ja Dietrich Brandenburg et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973), 1521-1524)] voivat myös toimia insuliinin prekursoreina.

Yrityksissä saada aikaan biosynteettisiä insuliineja, jotka ovat erityisesti identtisiä ihmisinsuliinin kanssa, on noudatettu samoja strategisia keinoja kuin synteettisten insuliinien valmistuksessa. Insuliinin A- ja B-ketjut on ilmenetty erillisissä isäntäorganismeissa, eristetty niistä ja liitetty sen jälkeen yhteen edellä kuvatulla tavalla [R.E. Chance et al.: Diabetes Care 4 (1982), 147]. Mikro-organismit on transformoitu preproinsuliinia tai proinsuliinia koodittavilla kloonauksvektoreilla, joiden tuotteet voivat erittyä sellaisinaan (W. Gilbert et al.: EP-patenttijulkaisu n:o 6694) tai kertyä solun sisään yhdistelmägeenituotteiksi (D.V. Goeddel et al.: EP-patenttijulkaisu n:o 55 945). Mini-proinsuliinikeinoa on myös kokeiltu (D.V. Goeddel, supra).

A- ja B-ketjujen valmistaminen erillisillä fermentointimenetelmillä ja ketjujen yhdistäminen sen jälkeen on sinänsä epäkäytännöllistä. Kaksoisfermentoinnin epämukavuus voidaan välttää valitsemalla proinsuliini- tai miniproinsuliinistra-

tegia. Kuitenkin proinsuliinin käytöstä biosynteettisen insuliinin prekursorina voi seurata tiettyjä haittoja. Proinsuliinilla, joka erittyy fermentointiliemeen sellaisenaan tai kertyy isäntäorganismiin solunsisäisesti, mahdollisesti yhdistelmägeenituotteena, on taipumus sisältää oleellisesti satunnaisia disulfididisidoksia. Tällaisen "sotkuisen" tuotteen järjestäminen oikein ryhmitellyksi proinsuliiniksi voidaan suorittaa joko suoraan (H.-G. Gattner et al.: DK-patenttihakemus n:o 4523/83) tai käyttämällä yksiketjuista heksa-S-sulfonaattia (F.B. Hill: EP-patenttijulkaisu n:o 37 255). Uudelleenryhmittely johtaa tavallisesti jonkinasteiseen polymeroitumiseen ja tästä seuraa tarve käyttää työläitä puhdistusvaiheita talteenotossa.

Lisäksi proinsuliinityyppisillä insuliinin prekursoreilla on taipumus hajota entsyymaattisesti joko isäntäsolujen sisällä tai fermentointiliemeen erittymisen jälkeen. Hiivoissa on osoitettu, että ihmisen proinsuliini on erityisen herkkä entsyymaattiselle katkeamiselle kahdessa kaksiemäksisessä sekvenssikohdassa (Arg31-Arg32 ja Lys64-Arg65). Ilmeisesti nämä katkeamiset tapahtuvat ennen S-S-siltojen syntymistä ja muodostuu C-peptidi, A-ketju ja B-ketju.

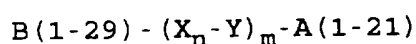
Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on välttää nämä haitat tarjoamalla biosynteettisiä insuliinin prekursoreja, joissa on syntyessään suurelta osin oikein sijaitsevat disulfidisillat A- ja B-osien välillä ja jotka ovat lisäksi oleellisesti vastustuskykyisempiä proteolyttiselle hajoamiselle kuin tähän mennessä tunnetut biosynteettiset insuliinin prekursorit.

Ennestään tunnetaan yksiketjuinen insuliinin prekursori, joka sisältää insuliinin lyhennetyn B-ketjun aminohaposta Phe<sup>B1</sup> aminohappoon Lys<sup>B29</sup>, joka jatkuu täydellisenä A-ketjuna aminohaposta Gly<sup>A1</sup> aminohappoon Asn<sup>A21</sup>, B(1-29)-A(1-21) (Jan Markussen, "Proteolytic degradation of proinsulin and of the intermediate forms", Proceedings of the Symposium on Proin-

sulin, Insulin and C-peptide, Tokushima, 12.-14. heinäkuuta, 1978, Toim.: S. Baba et al.). Tämä insuliinin prekursori B(1-29)-A(1-21) valmistetaan puolisynteettisesti sian insuliinista. Ensin valmistettiin insuliinin B(1-29)- ja A(1-21)-ketju ja liitettiin ne yhteen niin, että saatiin lineaarinen peptidi B(1-29)-A(1-21). Tämä heksatiolimudossa oleva yhdiste hapetettiin in vitro niin, että saatiin yksiketjuinen des-(B30)-insuliinimolekyyli.

Esillä oleva keksintö perustuu siihen yllättävään havaintoon, että edellä mainittu yksiketjuinen insuliinin prekursori B(1-29)-A(1-21) ja sen johdannaiset, joissa siltaketju yhdistää B(1-29)-ketjun karboksyyliin A(1-21)-ketjun aminopäähän, ilmentyvät suurilla saannoilla ja oikein sijaitsevin disulfidisilloin, kun viljellään tällaisia insuliinin prekursoreja koodittavilla DNA-sekvensseillä transformoituneita hiivakantoja.

Ensinnäkin tämä keksintö tarjoaa DNA-sekvenssin käytettäväksi hiivavektorissa, joka sekvenssi muodostuu sellaista insuliinin prekursoria koodaavasta nukleotidiyhdistelmästä, jolla on kaava



I

jossa kaavassa  $X_n$  on peptidiketju, jossa on  $n$  luonnonmukaisesti esiintyvää aminohappotähdettä,  $Y$  on Lys tai Arg,  $n$  on kokonaisluku 0-33,  $m$  on 0 tai 1, B(1-29) on ihmisen insuliinin lyhennetty B-ketju ulottuen aminohaposta Phe<sup>B1</sup> aminohappoon Lys<sup>B29</sup> ja A(1-21) on ihmisen insuliinin A-ketju edellyttäen, että peptidiketju  $-X_n - Y-$  ei sisällä kahta vierekkäistä emäksistä aminohappotähdettä.

Edullisia edellä mainitun kaavan I mukaisia insuliinin prekursoreja ovat B(1-29)-A(1-21), so.  $m = 0$  kaavassa I, ja yhdisteet, joissa on suhteellisen lyhyt siltaketju B(1-29)- ja A(1-21)-ketjun välillä.

Kun  $m = 1$ , on  $n$  mielellään 1-33, mieluummin 1-15, vielä mieluummin 1-8 tai 1-5 ja mieluimmin 1-3 tai 1-2.  $X$  voidaan mielellään valita joukosta Ala, Ser ja Thr ja yksittäiset  $X$ :t voivat olla samoja tai erilaisia. Tällaisia edullisia yhdisteitä ovat esimerkiksi B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21) ja B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21).

Toiseksi keksintö tarjoaa hiivassa replikoituvan vektorin, joka kykenee ilmentämään kaavan I mukaista insuliinin prekursoria koodittavan DNA-sekvenssin.

Vektori on plasmidi, joka kykenee replikoitumaan hiivassa.

Kolmanneksi esillä oleva keksintö tarjoaa menetelmän kaavan I mukaisten insuliinin prekursorien tuottamiseksi hiivassa siten, että transformoitunutta hiivakantaa, joka sisältää insuliinin prekursoreja ilmentämään kykenevän plasmidin, viljellään sopivassa ravintoväliaineessa ja sen jälkeen eristetään insuliinin prekursorit.

Neljänneksi keksintö tarjoaa uusia ihmisen insuliinin prekursoreja, joilla on kaava

B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) tai  
B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21).

joissa kaavoissa symbolit ovat edellä määriteltyjä.

Keksinnössä käytetään hiivakantaa, joka on transformoitunut vektorilla, joka kykenee ilmentämään hiivassa insuliinin prekursoreja koodittavan DNA-sekvenssin.

Insuliinin prekursorit voivat ilmentyä siten, että niissä on lisäproteiini insuliinin prekursorin edessä. Lisäproteiini voi suojata insuliinin prekursoria esim. endogeenisten entsyymien hajottavalta vaikutukselta in vivo tai se voi sisältää informaatiota, joka on tarpeen halutun proteiinin siir-

tämisessä periplasmiseen tilaan ja lopulta solun seinän läpi kasvualustaan.

Lisäproteiinissa on selektiivinen katkaisukohta insuliinin prekursorin B(1-29)-ketjun N-pään vieressä, joka tekee mahdolliseksi lisäproteiinin lohkaisemisen mikro-organismin itsensä toimesta tai myöhemmässä vaiheessa entsyymaattisesti tai kemiallisesti.

Kun insuliinin prekursori ilmentyy hiivassa, lisäaminohapposekvenssi voi sisältää kaksi emäksistä aminohappoa (esim. Lys-Lys, Arg-Arg, Lys-Arg tai Arg-Lys) insuliinin prekursorin B(1-29)-ketjun N-pään vieressä, koska hiiva kykenee katkaisemaan peptidisidoksen, joka on emäksisten aminohappojen ja prekursorin välissä. Myös halutun proteiinin vieressä oleva Glu-Ala- tai Asp-Ala-katkaisukohta mahdollistaa lisäaminohapposekvenssin erottamisen hiivan itsensä toimesta hiivan tuottaman dipeptidaasientsyymin avulla.

Insuliinin prekursorit voivat erittyä prekursorien B(1-29)-ketjuun liittyneen aminohapposekvenssin avulla edellyttäen, että tämä aminohapposekvenssi sisältää selektiivisen katkaisukohtan B(1-29)-ketjun vieressä ylimääräisen aminohapposekvenssin myöhempää lohkaisua varten. Jos insuliinin prekursorit eivät sisällä metioniinia, toimii katkaisu halutun proteiinin viereisessä metioniinissa syanogeenibromidilla. Samoin halutun proteiinin vieressä olevat arginiini- ja lyysiinikatkaisukohdat mahdollistavat katkaisun trypsiinin kaltaisilla proteaaseilla.

Eritymistarkoituksia varten voidaan insuliinin prekursoreja koodittavaan DNA-sekvenssiin liittää signaalipeptidiä koodittava lisäsekvenssi. Transformoitunut mikro-organismi katkaisee signaalipeptidin irti ilmentyneen proteiinituotteen erittyessä solusta, josta syystä halutun tuotteen erottaminen on helpompaa. Erittynyt tuote voi olla insuliinin



prekursori tai se voi sisältää N-päässä lisäaminohapposekvenssin, joka poistetaan myöhemmin, kuten edellä on selostettu.

Erittyminen voidaan saada aikaan sisällyttämällä vektoriin hiivan MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi [Kurjan, J. ja Herskowitz, I., Cell 30, (1982), 933-943].

Halutun DNA-sekvenssin ilmentyminen on promoottorisekvenssin ohjauksessa, joka sijaitsee oikeassa paikassa haluttua proteiinia koodittavan sekvenssin suhteen niin, että haluttu proteiini ilmentyy isäntäorganismissa. Mielellään käytetään promoottorina isäntäorganismille synnynnäisen geenin promoottoria. Halutun proteiinin DNA-sekvenssin perässä on transkription lopetussekvenssi, joka on mielellään isäntäorganismien synnynnäisen geenin transkription lopetussekvenssi. Edullisia promoottori- ja lopetussekvenssejä ovat triosifosfataasi-isomeraasigeenin (TPI) promoottori ja lopettaja vastaavasti.

Voidaan käyttää muitakin promoottoreja, kuten fosfoglyseraattikinaasin (PGK1) ja MF $\alpha$ 1:n promoottoria.

Edelleen keksintö koskee menetelmää ihmisen insuliinin valmistamiseksi siten, että hiivakantaa, joka on transformoitu replikoituvalla vektorilla, joka sisältää edellä olevan kaavan I mukaisia insuliinin prekursoreja koodittavan DNA-sekvenssin, viljellään sopivassa ravintoväliaineessa, insuliinin prekursorit otetaan talteen kasvuväliaineesta ja muunnetaan ihmisen insuliiniksi in vitro.

Tämän keksinnön mukaiset insuliinin prekursorit voidaan muuntaa kypsäksi ihmisen insuliiniksi suorittamalla transpeptidaatio

L-treoniiniesterillä trypsiinin tai trypsiinijohdannaisen läsnäollessa, kuten DK-patenttihakemuksessa 574/80 (julkaisu sisällytetään tähän patenttihakemukseen viitteeksi) on selostettu, jonka jälkeen ihmisen insuliinin treoniiniesteri muunnetaan ihmisen insuliiniksi ennestään tunnetuilla menetelmillä.

Jos insuliinin prekursorit erittyvät sellaisessa muodossa, että niissä on lisäaminohappoketju B(1-29)-ketjun N-päässä, pitäisi tällainen aminohapposekvenssi joko poistaa in vitro ennen transpeptidaatiota tai sen pitäisi sisältää vähintään yksi emäksinen aminohappo B(1-29)-ketjun N-pään vieressä, koska trypsiini katkaisee emäksisen aminohapon ja Phe<sup>B1</sup>-aminoryhmän välisen sidoksen transpeptidaation aikana.

Liitteenä olevat piirrokset esittävät keksinnön edullista toteutustapaa.

Kuva 1 esittää plasmidin pMT344 valmistusta,  
kuva 2 esittää plasmidin pMT475 valmistusta,  
kuva 3 esittää plasmidin pMT212 valmistusta,  
kuva 4 esittää plasmidin pMT479 valmistusta,  
kuva 5 esittää plasmidin pMT319 valmistusta,  
kuva 6 esittää plasmidin pMT598 valmistusta,  
kuva 7 esittää plasmidin pMT610 valmistusta,  
kuva 8 esittää plasmidin pT5 valmistusta ja  
kuva 9 esittää plasmidin pMT639 valmistusta.

Kuvissa ja osassa seuraavaa selostusta käytetään merkintää B' tarkoittamaan samaa kuin B(1-29) ja merkintää A tarkoittamaan samaa kuin A(1-21). Näin ollen merkintä B'A tarkoittaa samaa kuin B(1-29)-A(1-21).

#### 1. Ihmisen proinsuliinia B-C-A koodittavan geenin valmistus

Ihmisen haimasta puhdistettu kokonais-RNA /Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., McDonald, R.J. & Rutter, W.J., Biochemistry 18, (1979) 5294-5299/ käänteiskopioitiin /Boel, E., Vuust, J.,

Norris, F., Norris, K., Wind, A., Rehfeld, J.F. & Marcker, K.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, (1983), 2866-2869<sup>7</sup> AMV-käänteiskopioijaentsyymillä käyttämällä 1. säikeen aluketta d(GCTTTATTCATCTCTC). Ihmisen proinsuliinin cDNA puhdistettiin preparatiivisella urea-polyakryyliamidigeelillä ja toinen säie syntetisoitiin tällä templaatilla käyttämällä DNA-polymeraasin suurta osaa ja 2. säikeen aluketta d(CAGATCACTGTCC). cDNA pilkottiin S1-nukleaasilla, puhdistettiin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, hännitettiin terminaalisella transferaasilla ja kloonattiin pBR327:n /Sorberon et al., Gene 9, (1980), 287-305<sup>7</sup> PstI-kohtaan E.colissa. Oikea kloni, jossa oli ihmisen proinsuliinia B-C-A koodittava geeni, tunnistettiin yhdistelmäplasmideista suorittamalla restriktioendonukleasianalyysi ja varmistettiin nukleotidien sekventoinnilla /Maxam, A., & Gilbert, W., Methods in Enzymology, 65 (1980), 499-560. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, (1977), 5463-5467<sup>7</sup>.

## 2. Ihmisen insuliinin prekursoreja koodittavien geenien valmistaminen

Ihmisen insuliinin rakennetta B(1-29)-A(1-21) koodittava geeni valmistettiin suorittamalla ihmisen proinsuliinisekvenssille paikkaspesifinen mutatointi poistamalla 75 emäsparia C-peptidiä koodittavasta alueesta liitettynä yksisäikeiseen M13-bakteriofaagivektoriin. Käytettiin muunnettua menetelmää /K. Norris et al., Nucl. Acids. Res. 11 (1983) 5103-5112<sup>7</sup>, jossa kemiallisesti syntetisoitu 19-meerinen deleetioalue pariutettiin M13-templaattiin. Lyhyen entsyymattisen jatkamisreaktion jälkeen lisättiin "universaalinen" 15-meerinen M13-dideoksisekventointialue ja sen jälkeen suoritettiin entsyymattinen jatkaminen ja yhteenliittäminen. Osittain kaksisäikeisestä rengasmaisesta DNA:sta leikattiin irti kaksisäikeinen restriktiojakso (BamHI-HindIII) ja leikattu jakso liitettiin plasmidiin pBR322, joka oli sitä ennen katkaistu restriktioentsyymeillä BamHI ja HindIII.

Näin saadulla yhteenliittämisellä transformoitiin E.coli ja tunnistettiin transformantit, joissa oli ihmisen insuliinin

osaa B(1-29)-A(1-21) koodittavan geenin sisältävä plasmidi pMT319.

Geenit, jotka koodittavat yhdistettä B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) ja yhdistettä B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21), valmistettiin vastaavasti sijoittamalla MF $\alpha$ 1-B-C-A:ta koodittava jakso M13-bakteriofaagiin ja suorittamalla paikkaspesifinen mutatointi ihmisen proinsuliinisekvenssille käyttämällä kemiallisesti syntetisoitua 30-meeristä ja 27-meeristä deletioaluketta vastaavasti ja edellä mainittua "universaalista" 15-meeristä M13-dideoksisekventointialuketta. Osaksi kaksisäikeisestä rengasmaisesta DNA:sta leikattiin irti kaksisäikeinen restriktiojakso (Xba1-EcoR1) ja liitettiin plasmidiin pUC13 ja pT5 vastaavasti. Transformoimalla ja uudelleentransformoimalla E.coli saatiin transformantit, joissa oli plasmidi pMT598 sisältäen B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):tä koodittavan geenin tai plasmidi pMT630 sisältäen B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):tä koodittavan geenin vastaavasti.

Yhdistettä B(1-29)-Thr-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Lys-A(1-21) koodittava geeni valmistettiin edellä kuvatulla tavalla sijoittamalla MF $\alpha$ 1-B(1-29)-A(1-21):tä koodittava geeni M13 mp11-bakteriofaagiin ja suorittamalla B(1-29)-A(1-21):n paikkaspesifinen mutatointi käyttämällä kemiallisesti syntetisoitua 46-meeristä deletioaluketta (5'-CACACCCAAGACTAAAGAAGCTGAAGACTTGCAAAGAGGCATTGTG-3') ja "universaalista" aluketta. Samalla tavalla rakennettiin myös yhdistettä B(1-29)-Thr-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-A(1-21) koodittava geeni.

### 3. Plasmidien rakentaminen

Ihmisen insuliinin jaksoa B(1-29)-A(1-21) (B'A) koodittava geeni eristettiin restriktiojaksona plasmidista pMT319 ja yhdistettiin TPI-promoottoria (TPI<sub>p</sub>) koodittaviin jaksoihin  $\overline{T}$ . Alber ja G. Kawasaki. Nucleotide Sequence of the Triose Phosphate Isomerase Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. J.Mol.Applied Genet. 1 (1982)

419-4347, MF $\alpha$ 1-johtosekvenssiin [J. Kurjan ja I. Herskowitz, . Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF $\alpha$ ): A Putative  $\alpha$ -Factor Precursor Contains four Tandem Copies of Mature  $\alpha$ -Factor. Cell 30 (1982) 933-9437 ja S. cerevisiae:n TPI:n transkription lopetus-sekvenssiin (TPI<sub>T</sub>). Nämä jaksot antavat sekvenssejä, jotka takaavat B'A:ta koodittavan geenin suuren transkriptiotehon ja antavat myös presekvenssin, joka pystyy saamaan aikaan B'A:n hakeutumisen erittymismekanismiin ja viimein erittymisen kasvualustaan. Tämä B'A:n ilmentymisyksikkö (TPI<sub>P</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi-B'A-TPI<sub>T</sub>) sijoitettiin sen jälkeen plasmidivektoriin, joka sisälsi hiivan 2 $\mu$ -replikoitumisen alkukohdan ja valintamerkin LEU2, ja saatiin plasmidi pMT344, joka on hiivassa toimiva B'A:n ilmentämisektori.

Kun  $\alpha$ -tekijä kypsyy hiivassa in vivo, MF $\alpha$ 1-johtopeptidin viimeiset (C-pään) kuusi aminohappoa (Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala) poistuvat  $\alpha$ -tekijän prekursorista, kun Lys-Arg-sekvenssin tunnistava endopeptidaasi ja Glu-Ala-tähteet poistava aminodipeptidaasi toimivat peräkkäin [Julius, D. et al. Cell 32 (1983) 839-8527]. Jotta ei tarvittaisi hiivan aminodipeptidaasia, MF $\alpha$ 1-johtosekvenssin C-pään Glu-Ala-Glu-Ala-ketjua koodittava sekvenssi poistettiin in vitro mutatoinnilla. Näin saatu hiivan ilmentämisektori pMT475 sisältää liitännäisen, joka koodittaa yhdistettä TPI<sub>P</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi (miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B'A-TPI<sub>T</sub>.

Edullisessa rakentamisessa muunnettu ilmentämisyksikkö siirrettiin stabiiliin, suuren kopiomäärän tuottavaan hiivan plasmidiin CPOT (ATCC n:o 39685), joka voidaan valita vain sen perusteella, että kasvualusta sisältää glukoosia. Näin saadulle vektorille, joka ilmentää hiivassa yhdistettä B'A, annettiin nimi pMT479.

Jakso, joka koodittaa MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi (miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):tä, eristettiin restriktiojaksona plasmidista pMT598 ja siihen yhdistettiin TPI-promootoria ja TPI-lopettajaa koodittavat jaksot ja siirrettiin edellä mainittuun suuren kopiomäärän tuottavaan hiivaplasmiidiin CPOT.

Näin saadulle ilmentämisvektorille, joka ilmentää yhdistettä B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) hiivassa, annettiin nimi pMT610.

Jakso, joka sisälsi liitännäisen TPI<sub>P</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi (miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21)-TPI<sub>T</sub>, eristettiin restriktiojaksona plasmidista pMT630 ja siirrettiin CPOT:hen. Näin saatiin vektori, joka ilmentää yhdistettä B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21) hiivassa, ja vektorille annettiin nimeksi pMT639.

Jakso, joka sisälsi liitännäisenä TPI<sub>P</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi (miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Thr-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Lys-A(1-21)-TPI<sub>T</sub>:n, sijoitettiin suuren kopiomäärän tuottavaan hiivaplasmiin DPOT, joka on CPOT:n johdannainen sisältäen pBR322:n SphI-BamHI-jakson liitettynä CPOT:n SphI-BamHI-jaksoon. Näin saadulle vektorille, joka ilmentää yhdistettä B(1-29)-Thr-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Lys-A(1-21) hiivassa, annettiin nimi pll26.

#### 4. Transformointi

Plasmideilla pMT344 ja pMT475 suoritettiin *S. cerevisiae* leu2-mutanttien transformointi ja suoritettiin valinta leusiini-prototrofian suhteen Hinnen et al:n kuvaamalla tavalla  $\bar{A}$ . Hinnen, J.B. Hicks ja G.R. Fink. Transformation of Yeast. Proc.Nat.Aca. Sci. 75 (1978) 1929<sup>7</sup>.

Plasmideilla pMT479, pMT610, pMT639 ja pll26 transformoitiin *S. cerevisiae*-kannat, joissa oli deletio TPI-geenissä, ja suoritettiin valinta glukoosilla kasvun suhteen. Tällaiset kannat eivät normaalisti kykene kasvamaan, jos glukoosi on ainoa hiililähde, ja ne kasvavat hyvin hitaasti galaktoosilaktaatti-alustassa. Puute johtuu mutaatiosta trioosifosfaatti-isomeraasi-geenissä, joka on saatu aikaan poistamalla suurin osa tätä geeniä ja korvaamalla se *S. cerevisiae* LEU2-geenillä. Kasvukyvyn vajavuuden vuoksi tapahtuu suuri valinta sellaisen plasmidin hyväksi, joka sisältää TPI:tä koodittavan geenin. pMT479 sisältää Schizo. pombe TPI-geenin.

### 5. Ihmisen insuliinin prekursorien ilmentäminen hiivassa

Ihmisen insuliinin tyyppiset ilmentymistuotteet mitattiin insuliinille tarkoitettulla radioimmunomäärityksellä (Heding, L., Diabetologia 8, 260-66, 1972) kuitenkin niin, että kyseisenä standardina käytettiin insuliinin prekursoria eikä insuliinia. Standardien puhtaus oli noin 98 % HPLC:llä mitattuna ja peptidin todellinen pitoisuus standardissa määritettiin aminohappoanalyysillä. Transformoituneiden hiivakantojen ilmentämät ihmisen immunoreaktiivisen insuliinin pitoisuudet on esitetty yhteenvedona taulukossa 1.

Taulukko 1

Hiivan ilmentämien ihmisen immunoreaktiivisten insuliinin prekursorien pitoisuudet

Hiivakanta	Plasmidi	Rakenne	Immunoreaktiivinen insuliini prekursori nmol/l emäliuosta
MT 350 (DSM 2957)	pMT 344	B(1-29)-A(1-21)	100
MT 371 (DSM 2958)	pMT 475	B(1-29)-A(1-21)	192
MT 519 (DSM 2959)	pMT 479	B(1-29)-A(1-21)	2900
MT 620 (DSM 3196)	pMT 610	B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)	1200-1600
MT 649 (DSM 3197)	pMT 639	B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21)	1600
ZA 426	pl126	B(1-29)-Thr-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Lys-A(1-21)	200

Ilmentymistuotteiden eristäminen ja tunnistaminen on selostettu esimerkeissä 7-9 ja 12-13.

### 6. Ihmisen insuliinin prekursorin muuntaminen ihmisen insuliinin B30-estereiksi

Ihmisen insuliinin prekursorien muuttumista ihmisen insuliinin estereiksi voidaan seurata kvantitatiivisesti HPLC:llä (korkeapainenestekromatografia) käänteisfaasissa. Käytettiin 4 x 300 mm "uBondapak C18 column"-pylvästä (Waters Ass.) ja eluinnissa puskuria, jossa oli 0,2 M ammoniumsulfaattia (pH säädetty rikkihapolla arvoon 3,5) ja 26-50 % asetonitriiliä. Optimaalinen

asetonitriilipitoisuus riippuu siitä, mikä esteri insuliinin prekursorista halutaan saada erotetuksi. Esimerkiksi ihmisen insuliinin metyyliesteri voidaan erottaa käyttämällä noin 26 tilavuus-% asetonitriiliä.

Ennen HPLC-pylvääseen sijoittamista reaktioseoksen proteiinit saostettiin lisäämällä 10 tilavuutta asetonia. Sakka sentrifugoitiin talteen, kuivattiin vakuumissa ja liuotettiin 1 M etikkahappoon.

#### Esimerkki 1

##### B(1-29)-A(1-21)-insuliinia koodittavan geenin rakentaminen

"Universaalinen" 15-meerinen M13-dideoksisekventointialue d(TCCCAGTCACGACGT), T4 DNA-ligaasi ja restriktioentsyymit saatiin New England Biolabs-yhtiöstä. DNA-polymeraasi I:n Klenow-jakso ja T<sub>4</sub>-polynukleotidikinaasi saatiin P-L Biochemicals-yhtiöstä. ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-ATP (7500 Ci(mmol)) saatiin New England Nuclear-yhtiöstä. Oligonukleotidisynteesissä käytetty kantaja-aine oli 5'-O-dimetoksitriityyli-N<sup>2</sup>-isobutyryylideoksiganosiini sidottuna 3'-O-sukkinyyliiryhmän kautta aminometyloituihin 1 % silloittuneisiin polystyreenihelmiin (Bachem).

##### M13 mp10 insHXΔPst-faagin rakentaminen:

M13 mp10:sta johdettu faagi mp10 insHX rakennettiin kloonaamalla faagista p285 eristetty 284 emäsparin proinsuliinia koodittava HindIII-XbaI-jakso HindIII-XbaI:llä katkaistuun M13 mp10 RF-faagiin. M13 mp10 RF on saatavissa P-L Biochemicals, Inc.-yhtiöstä, Milwaukee, Wis. (luettelonumero 1541).

M13 mp10 insHXΔPst rakennettiin mp10 insHX,RF:stä siten, että suoritettiin täydellinen katkaisu PstI:llä, liitettiin yhteen ja transformoitiin E. coli JM103. Näin saatu faagi sisältää ihmisen proinsuliinia koodittavia sekvenssejä siten, että C-peptidiä koodittavalla alueella on 75 emäsparin kehysdeleetio. Yksisäikeinen faagi valmistettiin menetelmällä Messing, J. ja Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276.



Oligodeoksiribonukleotidisynteesi:

19-meerinen deleetioalue d(CACACCCAAGGGCATTGTG) syntetisoitiin triesterimenetelmällä 1-prosenttisesti silloittuneella polystyreenikantaja-aineella [Ito, H., Ike, Y., Ikuta, S., ja Itakura K. (1982) Nucl. Acids Res. 10, 1755-1769]. Polymeeri pakattiin lyhyeen pylvääseen ja liuottimet ja reagenssit tuotiin puoliautomaattisesti HPLC-pumpun ja ohjausmoduulin avulla. Oligonukleotidi puhdistettiin suojauksen poiston jälkeen HPLC:llä LiChrosorb RP18-pylväässä [Chrompack (Fritz, H.-J., Belagaje, R., Brown, E.L., Fritz, R.H., Jones, R.A., Lees, R.G., ja Khorana, H.G. (1978) Biochemistry 17, 1257-1267)].

Oligodeoksiribonukleotidin 5'-<sup>32</sup>P-leimaus

19-meeri leimattiin 5'-päätä 60 µl:ssa reaktioseosta, jossa oli 50 mM Tris-HCl pH 9,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,4 % glyserolia, 120 pmol ATP, 50 µCi (γ-<sup>32</sup>P)-ATP (10 pmol), 120 pmol oligonukleotidia ja 30 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Reaktio suoritettiin 37°C:ssa 30 minuutissa ja keskeytettiin kuumentamalla 100°C:ssa 3 minuuttia. Leimattu oligonukleotidi erotettiin reagoimattomasta (γ-<sup>32</sup>P)-ATP:stä kromatografiapylväässä (Sephadex G50 superfine, 1 x 8 cm) 0,05 M trietyyliammoniumbikarbonaatissa pH 7,5.

Pesäkehybridisointia varten oligonukleotidi leimattiin lisäämättä "kylmää" ATP:tä, kuten on selostettu julkaisussa [Boel, E., Vuust, J., Norris, F., Norris, K., Wind, A., Rehfeld, J., ja Marcker, K. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2866-2869].

Oligodeoksiribonukleotidialukkeella suoritettu DNA:n synteesi:

Yksisäikeistä M13 mp10 insHXPst:tä (0,4 pmol) inkuboitiin 19-meerisen 5'-(<sup>32</sup>P)-leimatun oligodeoksiribonukleotidialukkeen (10 pmol) kanssa 20 µl:ssa reaktioseosta, jossa oli 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> ja 1 mM DDT, 5 minuuttia 55°C:ssa ja paritettiin 30 minuuttia 11°C:ssa. Sitten lisättiin 9 µl d-NTP-seosta, jossa oli dATP, dCTP, dGTP ja dTTP 2,2 mM kutakin, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM

NaCl ja 1 mM DDT, ja sen jälkeen 7 yksikköä E. colin DNA-polymeraasi I:tä (Klenow). Saatua seosta pidettiin 30 minuuttia 11°C:ssa ja kuumennettiin 10 minuuttia 65°C:ssa. 15-meerinen universaalinen aluke dideoksisekventointia varten (4 pmol) lisättiin ja saatua seosta kuumennettiin 65°C:ssa vielä minuutti. Jäähdytettiin 11°C:een ja sen jälkeen lisättiin 26  $\mu$ l liuosta, jossa oli 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, dATP, dCTP, dGTP ja dTTP 0,8 mM kutakin, 2,4 mM ATP ja 10<sup>3</sup> yksikköä T4-ligaasia, ja sen jälkeen 9,5 yksikköä E. colin DNA-polymeraasi I:tä (Klenow). Seoksen lopullinen tilavuus oli 64  $\mu$ l. Kun oli inkuboitu 3 tuntia 11°C:ssa, lisättiin 20  $\mu$ l 4 M natriumasetaattia ja tilavuus säädettiin 200  $\mu$ l:ksi TE-puskurilla (10 mM Tris-HCl pH 8,9 1 mM EDTA).

Seos uutettiin kahdesti fenoli/kloroformilla. Lisättiin 0,9  $\mu$ g (0,3 pmol) puhdistettua BamHI:llä ja HindIII:lla katkaistua pBR322:n suurta jaksoa kantaja-DNA:ksi. Vesifaasi uutettiin eetterillä ja DNA erotettiin etanolisaostuksella.

#### Hajotus endonukleaaseilla

Edellä kuvatulla tavalla valmistettu DNA hajotettiin vastavasti 16 ja 20 yksiköllä restriktioendonukleaaseja BamHI ja Hind III 22  $\mu$ l:n kokonaistilavuudessa puskuria (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 4 mM spermiidiiniä). Seos uutettiin fenoli/kloroformilla ja sen jälkeen eetterillä ja DNA erotettiin etanolisaostuksella ja liuotettiin sen jälkeen 12  $\mu$ l:aan vettä. 2  $\mu$ l käytettiin elektroforeesissa 7 M ureassa, joka oli tehty 6 % polyakryyliamidigeeliin.

#### Yhteenliittäminen:

Osaan DNA:ta (5  $\mu$ l) lisättiin uutta BamHI:llä ja HindIII:lla leikattua puhdistettua pBR322:n suurta jaksoa (0,38  $\mu$ g) ja 400 yksikköä T4 DNA-ligaasia 41  $\mu$ l:n kokonaistilavuudessa, jossa oli 66 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DDT ja 40  $\mu$ g/ml liivatetta. Yhteenliittäminen suoritettiin 16°C:ssa 16 tunnissa.

Transformointi:

20,5  $\mu$ l:lla yhteenliittämisseosta transformoitiin  $\text{CaCl}_2$ :lla käsitelty *E. coli* MC 1000 ( $r^-$ ,  $m^+$ ). Bakteeria viljeltiin LB-agarlevyillä ja valittiin ampisilliinin vastustuskyvyn suhteen (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Näin saatiin  $2,6 \times 10^3$  pesäkettä per pmol M13 mp10 insHX $\Delta$ Pst.

Pesäkehybridisointi:

123 transformoitunutta pesäkettä poimittiin tuoreille ampisilliinilevyille ja kasvatettiin yön yli 37°C:ssa. Pesäkkeet siirrettiin Whatman 540-suodatinpaperille ja kiinnitettiin [Gergen, J.P., Stern, R.H., ja Wensink, P.C. (1979), Nucl.Acids Res. 7, 2115-2136]. Esihybridisointi suoritettiin suljetussa muovipussissa 6 ml:ssa liuosta, jossa oli 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl pH 7,5, 0,006 M EDTA, 0,2 % Ficoll, 0,2 % polyvinyylipyrrolidonia, 0,2 % naudan seerumialbumiinia, 0,1 % SDS ja 50  $\mu\text{g/ml}$  lohen sperman DNA:ta, 2 tunnissa 65°C:ssa. Sitten lisättiin  $8,5 \times 10^6$  cpm  $^{32}\text{P}$ -merkittyä 19-meeriä ja suoritettiin hybridisointi 45°C:ssa yön aikana. Suodatin pestiin kolmeen kertaan (0°C, 5 minuuttia) liuoksella, jossa oli 0,9 M NaCl ja 0,09 M natriumsitraattia, sen jälkeen suoritettiin autoradiografia, pestiin kerran 45°C:ssa 1 minuutti ja autoradiografoitiin uudestaan. Kun oli pesty 45°C:ssa, voitiin tunnistaa 3 pesäkettä, joissa oli mutatoitunut plasmidi.

Mutatoituneiden plasmidien endonukleasianalyysi

Oletetuista mutanttipesäkkeistä valmistettiin plasmidit nopealla menetelmällä [Ish-Horowicz, D. ja Burke, J.F. (1981), Nucl.Acids Res. 9, 2989-2998], pilkottiin BamHI:n ja HindIII:n seoksella ja analysoitiin sen jälkeen elektroforeettisesti 2 % agarosi-geelillä. 179 emäsparin jakson läsnäolo vahvisti, että 3 pesäkettä sisälsi mutanttiplasmidin.

Uudelleentransformointi

"Mutanteiksi" tunnistetut pesäkkeet sisältävät plasmideja, jotka ovat heterokahdenteen jälkeläisiä. Puhdas mutantti

voitiin saada transformoimalla  $\text{CaCl}_2$ :lla käsitelty *E. coli* MC1000 ( $r^-$ ,  $m^+$ ) uudestaan 2 mutanttipesäkkeen plasmideilla. Kustakin levystä eristettiin 5 ampisilliinille vastustuskykyistä kloonaa, valmistettiin plasmidi-DNA ja suoritettiin analyysi endonukleasipilkonnalla edellä kuvatulla tavalla. 3 viidestä ja 5 viidestä vastaavasti osoittautuivat puhtaiksi mutanteiksi. Yksi plasmidi, pMT319, valittiin jatkokäyttöön.

#### DNA-sekvenssin analyysi

5  $\mu\text{g}$  plasmidia pMT319 pilkottiin BamHI:llä standardiolosuhteissa, uutettiin fenolilla ja saostettiin etanolilla. BamHI:n tuottamat lomittaiset päät täytettiin käyttämällä Klenow DNA-polymeraasi I:tä, dCTP:tä, dGTP:tä, dTTP:tä ja  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP:tä.

Fenoliuuton ja etanolisaostuksen jälkeen DNA pilkottiin EcoRI:llä.  $^{32}\text{P}$ :llä leimattu jakso, jossa oli deleetio, puhdistettiin elektroforeesilla 2 % agarosigeelillä ja sekventoitiin Maxamin ja Gilbertin menetelmällä (Maxam, A. ja Gilbert, W. (1980) *Methods in Enzymology* 65, 499-560).

#### Esimerkki 2

Hiivaplasmidin pMT344 rakentaminen ihmisen insuliinin B(1-29)-A(1-21):n ilmentämiseksi (B'A)

Plasmidi pMT319, jossa oli B'A:ta koodittava geeni, ja joka oli rakennettu edellä kuvatulla tavalla, leikattiin restriktioentsyymeillä HindIII ja XbaI ja 0,18 ke:n jakso  $\overline{T}$ . Maniatis, E.F. Fritsch, ja J. Sambrook. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press 1982 $\overline{7}$  eristettiin 2 % agarosigeelistä. Samoin eristettiin US-patenttihakemuksen S.N. 547 748 (1. marraskuuta, 1983) mukaisesti valmistetusta plasmidista p285 jakso (6,5 ke XhoI-HindIII), joka sisälsi *S.cerevisiae*n TPI-promoottorin (TPI<sub>p</sub>)  $\overline{T}$ . Alber ja G. Kawasaki. *Nucleotide Sequence of the Triose Phosphate Isomerase Gene of Saccharomyces cerevisiae*, *J.Mol. Applied Genet.* 1 (1982) 419-434 $\overline{7}$  ja MF $\alpha$ 1-johtosekvenssin  $\overline{J}$ . Kurjan ja I. Herskowitz, *Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF $\alpha$ ): A Putative  $\alpha$ -Factor Precursor Contains four Tandem Copies of Mature  $\alpha$ -Factor*. *Cell* 30 (1982) 933-943 $\overline{7}$ . p285 sisältää

liitännäisen TPI<sub>P</sub>-MF 1-johtosekvenssi -B-C-A- TPI<sub>T</sub> ja se on taltioituna hiivakantaan Z33 (ATCC n:o 20681). Jakso (0,7 ke XbaI-BamHI), jossa oli TPI:n transkription lopetussekvenssit (TPI<sub>T</sub>) [T. Alber ja G. Kawasaki, Nucleotide Sequence of the Triose Phosphate Isomerase Gene of Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Applied Genet. 1 (1982) 419-434] eristettiin myös plasmidista p285. Lopuksi eristettiin 5,4 ke:n XhoI-BamHI-jakso hiiivan vektorista YEpl3 [J.R. Broach. Construction of High Copy Yeast Vectors Using 2 μm Circle Sequences. Methods Enzymology 101 (1983) 307-325]. Edellä mainitut neljä jaksoa liitettiin yhteen [T. Maniatis, E.F. Fritsch, ja J. Sambrook. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press 1982], liitännäisillä suoritettiin E. coliin transformointi [T. Maniatis, E.F. Fritsch, ja J. Sambrook. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press 1982] ja suoritettiin valinta ampicilliiniresistenssin suhteen. Plasmidit eristettiin transformanteista ja yhden plasmidin, pMT344, rakenne varmistettiin restriktiokartoituksella. pMT344:n rakentaminen ja pääpiirteet on esitetty kaaviollisesti kuvassa 1.

### Esimerkki 3

Hiivaplasmidin pMT475 rakentaminen ihmisen insuliinin B(1-29)-A(1-21):n ilmentämiseksi siten, että B'A on muunnetun MF<sub>α</sub>1-johtosekvenssin jäljessä

Jotta saataisiin rakennetuksi plasmidi B'A:n ilmentämiseksi MF<sub>α</sub>1-johtosekvenssin jälkeen [J. Kurjan ja I. Herskowitz, Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF<sub>α</sub>): A Putative α-Factor Precursor Contains four Tandem Copies of Mature α-Factor. Cell 30 (1982) 933-943], josta viimeksimainitusta puuttuu viimeiset neljä aminohappoa (Glu-Ala-Glu-Ala), plasmidista pMT319 eristettiin 0,14 ke:n XbaI-EcoRII-jakso, jossa oli A-sekvenssi ja osa B'-sekvenssiä. Samoin eristettiin B'-geenin 5'-pään läheinen osa 0,36 ke:n EcoRI-EcoRII-jaksona plasmidista pM215. Plasmidi pM215 rakennettiin alakloonaamalla EcoRI-XbaI-jakso, jossa oli plasmidin p285 B-C-A-proinsuliinigeenin plasmidiin pUC13 [Rakennettu samoin kuin pUC8 ja pUC9 julkaisussa Vieira et al., Gene 19: 259-268 (1982)] ja sen jälkeen poistettiin in vitro

silmukoimalla 12 emästä, jotka koodittavat aminohappoketjua Glu-Ala-Glu-Ala, MF $\alpha$ 1-johtosekvenssin ja B-C-A-proinsuliini-geenin välistä. Nämä kaksi B'A-geenin kattavaa jaksoa liitettiin EcoRI-XbaI:llä leikattuun pUC13-vektoriin (ks. kuva 2), jolloin saatiin pMT473. Saatu muunnettu geeni, joka sisältyi plasmidista pMT473 eristettyyn 0,5 ke:n EcoRI-XbaI-jaksoon, liitettiin sen jälkeen plasmidista pMT342 saatuihin kahteen jaksoon (4,3 ke:n XbaI-EcoRV ja 3,3 ke:n EcoRV-EcoRI). pMT342 on hiivavektori pMT212, johon on sijoitettu TPI<sub>p</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi-B-C-A-TPI<sub>T</sub>. Saatu plasmidi pMT475 sisältää liitännäisen TPI<sub>p</sub>-MF $\alpha$ 1-johtosekvenssi (miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B'A-TPI<sub>T</sub>. Plasmidien pMT342, pMT473 ja pMT475 rakentaminen on esitetty kaaviollisesti kuvassa 2. Vektorin pMT212 rakentaminen on esitetty kuvassa 3. Plasmidi pMLB1034 on kuvattu julkaisussa M.L. Berman et al., *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor (1982), 49-51 ja pUC12 rakennettiin samoin kuin pUC13 (Vieira et al, *ibid.*).

#### Esimerkki 4

B(1-29)-A(1-21)-geenin (B'A-geeni) sijoittaminen stabiiliin hiivaplasmiin pMT479

Plasmidista pMT475 saatu muunnettu B'A-geeni eristettiin 2,1 ke:n BamHI - osittainen SphI-jaksona ja liitettiin noin 11 ke:n BamHI-SphI-jaksoon, joka oli saatu plasmidista CPOT (ATCC n:o 39685), jolloin saatiin plasmidi pMT479 (kuva 4). Plasmidi CPOT perustuu vektoriin Cl/1, joka on muunnettu korvaamalla alkuperäinen pBR322:n Bgl1-BamHI-jakso samanlaisella pUC13:sta saadulla Bgl1-BamHI-jaksolla ja liittämällä sen jälkeen S. pombe TPI-geeni (POT) (US-patenttihakemus S.N. 614 734, jätetty virastoon 25. toukokuuta, 1984) BamHI-SalI-jaksona, jolloin saadaan CPOT. Cl/1 on johdettu plasmidista pJBD248, Beggs et al., *Nature* 275, 104-109 (1978) kuten on selostettu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa n:o O103409A.

#### Esimerkki 5

##### Transformointi

S. cerevisiae-kantaa MT118 (a, leu 2, ura 3, trp 1) kasvatettiin

YPD-alustassa (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) OD<sub>600</sub>-arvoon 2,1. 100 ml viljelmää otettiin talteen sentrifugoimalla, pestiin 10 ml:ssa vettä ja sentrifugoitiin uudestaan ja suspendoitiin uudestaan 10 ml:aan liuosta, jossa oli 1,2 M sorbitolia, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0 ja 6,7 mg/ml ditiotreitolia. Saatua suspensiota inkuboitiin 30°C:ssa 15 minuuttia, sentrifugoitiin ja solut suspendoitiin uudestaan 10 ml:aan liuosta, jossa oli 1,2 M sorbitolia, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1 M natriumsitraattia pH 5,8 ja 2 mg Novozym<sup>®</sup> 234-entsyymiä. Saatua suspensiota inkuboitiin 30 minuuttia 30°C:ssa, solut sentrifugoitiin talteen, pestiin 10 ml:lla 1,2 M sorbitolia ja 10 ml:lla CAS-liuosta / 1,2 M sorbitoli, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (Tris = tris(hydroksimetyyli)aminometaani) pH = 7,57 ja suspendoitiin uudestaan 2 ml:aan CAS-liuosta. Transformointia varten 0,1 ml:aan CAS-liuokseen uudelleensuspendoituja soluja sekoitettiin noin 1 µg plasmidia pMT344 ja seos jätettiin huoneen lämpötilaan 15 minuutiksi. Lisättiin 1 ml (20 % polyetyleeniglykolia 4000, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH 7,5) ja saatu seos jätettiin vielä 30 minuutiksi huoneen lämpötilaan. Seos sentrifugoitiin ja pelletti suspendoitiin uudestaan 0,1 ml:aan SOS-liuosta (1,2 M sorbitolia, 33 tilavuus-% YPD, 6,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 14 µg/ml leusiinia) ja inkuboitiin 2 tuntia 30°C:ssa. Sitten suspensio sentrifugoitiin ja pelletti suspendoitiin uudestaan 0,5 ml:aan 1,2 M sorbitolia. Lisättiin 6 ml peiteagarua (Sherman et al:n SC-alusta (Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) ilman leusiinia ja sisältäen 1,2 M sorbitolia sekä 2,5 % agarua) 52°C:ssa ja suspensio kaadettiin levyjen päälle, jotka sisälsivät samaa agarilla kiinteytettyä, sorbitolipitoista alustaa. Transformanttipesäkkeet poimittiin sen jälkeen, kun oli kasvatettu 3 vuorokautta 30°C:ssa, eristettiin uudestaan ja käytettiin nestemäisten kasvatusten aloittamiseen. Jatkotutkimuksiin valittiin yksi tällainen transformantti MT350 (=MT 118/pMT344).

Plasmidi pMT475 siirrettiin *S. cerevisiae*-kantaan MT362 ( $\alpha$ , leu2) samoin kuin edellä ja eristettiin transformantti MT371 (=MT362/pMT475).

Plasmidin pMT479 siirtäminen kantaan E2-7B X Ell-3C ( $\underline{a}/\alpha$ ,  $\Delta tpi/\Delta tpi$ , pep 4-3/pep 4-3; tästä kannasta käytetään nimeä MT501) suoritetaan samoin kuin edellä, mutta seuraavin muunnoksien: 1) ennen transformointia kantaa MT501 kasvatettiin YPGaL-alustassa (1 % Bacto-hiivaa, 2 % Bacto-peptonia, 2 % galaktoosia, 1 % laktaattia)  $OD_{600}$ -arvoon 0,6. 2) SOS-liuos sisälsi YPGaL:ää eikä YPD:tä. Jatkotutkimuksiin valittiin yksi transformantti MT519 (=MT501/pMT479).

Tämän patentin hakija taltioi transformoituneet mikro-organismit MT350, MT371 ja MT519 kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Griesebachstrasse 8, D-3400 Göttingen, 15. toukokuuta 1984, jolloin niille annettiin kokoelmanumerot DSM 2957, DSM 2958 ja DSM 2959 vastaavasti.

#### Esimerkki 6

##### B(1-29)-A(1-21)-insuliinin ilmentyminen hiivassa

Kantoja MT350 (DSM 2957) ja MT371 (DSM 2958) kasvatettiin synteettisessä täydellisessä SC-alustassa (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory 1981), josta puuttui leusiini. Kummastakin kannasta kasvatettiin ravisteluviljelminä kaksi 1 litran viljelmää 2 litran pulloissa, jotka oli varustettu ohjauslevyillä, 30°C:ssa, kunnes  $OD_{600nm}$ -arvoksi tuli 7-10. Sitten viljelmät sentrifugoitiin ja emäliuokset otettiin talteen jatkoanalysointia varten.

Kantaa MT519 (DSM 2959) kasvatettiin vastaavalla tavalla, mutta YPD-alustassa (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) ja  $OD_{600nm}$ -arvoon 15, sentrifugoitiin ja emäliuos erotettiin analysointia varten edellä kuvatulla tavalla.

#### Esimerkki 7

##### B(1-29)-A(1-21)-insuliinin ilmentäminen hiivakannassa MT350 (DSM 2957)

Hiivakantaa MT350 (DSM 2957) kasvatettiin samoin kuin edellä esimerkissä 6 on esitetty ja 1100 ml:sta tämän kannan emäliuosta



erotettiin ilmentymistuotteet seuraavalla tavalla:

10 g LiChroprep<sup>®</sup> RP-18 (Merck, art. 9303) pestiin 3 kertaa liuoksella, jossa oli 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ja 60 % EtOH, ja sen jälkeen pakattiin 6 x 1 cm pylvääseen. Pylväs tasapainotettiin 50 ml:lla 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . 1100 ml:aan hiivan emäliuosta lisättiin 55 ml 96 % EtOH ja seos laskettiin pylvään läpi yön aikana (virtaus: 70 ml/h).

Pylväs pestiin 10 ml:lla 0,5 M NaCl ja 10 ml:lla  $\text{H}_2\text{O}$  ja peptidit eluointiin liuoksella, jossa oli 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ja 60 % EtOH. Eluaatti (5 ml) väkevöitiin vakuumisentrifugoinnilla 1,4 ml:ksi (etanolin poistamiseksi) ja sen jälkeen tilavuudeksi säädettiin 10 ml lisäämällä liuosta, jossa oli 25 mM HEPES-puskuria pH 7,4. Näyte sijoitettiin anti-insuliini-immunoabsorptiopylvääseen (AIS-pylväs) (2,5 x 4,5 cm), joka oli sitä ennen pesty 4 kertaa 5 ml:lla NaFAM-puskuria (Heding, L., Diabetologia 8, 260-66, 1972) ja kaksi kertaa 5 ml:lla 25 mM HEPES-puskuria. Näytteen sijoittamisen jälkeen pylvään annettiin seisoa 30 minuuttia huoneen lämpötilassa ja sen jälkeen se pestiin 10 kertaa 4 ml:lla 25 mM HEPES-puskuria. Peptidit eluointiin 20 % HAC:llä. Eluaatin pH säädettiin ammoniumhydroksidilla arvoon 7,0 ja kerättyjen jakeiden tilavuus säädettiin 500  $\mu$ l:aan vakuumirotaatiolla.

Saatu näyte puhdistettiin HPLC-menetelmällä 10  $\mu$  Waters  $\mu$ Bondopak C-18-pylväässä (3,9 x 300 mm). A- ja B-puskurit olivat 0,1 % TFA  $\text{H}_2\text{O}$ :ssa ja 0,07 % TFA MeCN:ssä vastaavasti. Pylväs tasapainotettiin 25 %:lla B:tä (virtaus: 1,5 ml/min) ja peptidit eluointiin MeCN:n lineaarisella gradientilla (1 %/min) ja havaittiin 276 nm:ssä. Kunkin puhdistusvaiheen saanto määritettiin edellä kuvatulla radioimmunomäärityksellä ja puhdistuksen yhteenveto on esitetty taulukossa 2. Kokonaissaanto oli 68 %.

Taulukko 2

Hiivakannan MT350 ilmentymistuotteiden puhdistaminen emäliuoksesta

Puhdistusvaihe	Tilavuus (ml)	Immunoreaktiivinen B(1-29)-A(1-21)-insuliini (nmol)
Emäliuos	1100	110*
RP-18	10	116
Anti-insuliini		
Sepharose	0,5	116
HPLC	2,5	75

\*Tässä näytteessä havaittiin laimenemisilmiö

HPLC-pylväästä havaittiin vain yksi piikki, joka sisälsi immunoreaktiivista B(1-29)-A(1-21)-insuliinia. Tämän piikin sisältämä peptidimateriaali eristettiin ja sille suoritettiin aminohapposekventointi. Sekvenssianalyysi suoritettiin kaasufaasi-sekventaattorilla (Applied Biosystem Model 470A) menetelmällä Hewick, R.M. et al. (J. Biol.Chem. 256, 7990-7997, 1981). Sekventointituloksista voitiin päätellä, että ilmentymistuotteet koostuivat 3 peptidistä:

(Glu-Ala) <sub>2</sub> -B(1-29)-A(1-21)-insuliini	89 %
Glu-Ala-B(1-29)-A(1-21)-insuliini	2 %
B(1-29)-A(1-21)-insuliini	9 %

Peptidejä oli mainitut suhteelliset määrät.

Esimerkki 8

B(1-29)-A(1-21)-insuliinin ilmentyminen hiivakannassa MT371 (DSM 2958)

Hiivakantaa MT371 (DSM 2958) kasvatettiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla ja 665 ml:sta tämän kannan emäliuosta erotettiin ilmentymistuotteet esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Kokonaissaanto oli 50 nmol, mikä vastaa 39 %. Peptidimateriaali eristettiin HPLC-pylväästä ja sekventoitiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla.

Sekventointituloksista (18 tähdettä N-päästä) voitiin päätellä, että peptidi oli homogeeninen B(1-29)-A(1-21)-insuliini.

Näiden tulosten vertailu esimerkissä 7 saatuihin tuloksiin osoittaa, että on hyvä poistaa Glu-Ala-Glu-Ala-sekvenssi MF<sub>ol</sub>:n C-päästä. Esimerkistä 7 ilmenee, että hiivan dipeptidaasientsyymi ei lohkaise kovinkaan tehokkaasti Glu-Ala- eikä Glu-Ala-Glu-Ala-sekvenssiä B(1-29)-A(1-21)-insuliinista ennen insuliinin prekursorin erittymistä hiivasoluista.

#### Esimerkki 9

B(1-29)-A(1-21)-insuliinin ilmentyminen hiivakannassa MT519 (DSM 2959)

Hiivakantaa MT519 (DSM 2959) kasvatettiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla ja ilmentymistuotteet eristettiin 70 ml:sta emäliuosta esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Kokonaissaanto oli 116 nmol, mikä vastaa 57 %. Peptidi sekventoitiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. N-päästä identifioitujen 42 tähteen perusteella arvioituna oli peptidi homogeeninen B(1-29)-A(1-21)-insuliini. Noin 5 nmol peptidiä hydrolysoitiin 100  $\mu$ l:ssa 6 N HCl 24 tuntia 110°C:ssa. Hydrolysaatti analysoitiin aminohappoanalysointorilla (Beckman Model 121M). Seuraava aminohappokoostumus löytyi:

Taulukko 3

Puhdistetun B(1-29)-A(1-21)-insuliinin aminohappoanalyysi

<u>Aminohappo</u>	<u>Löydetty</u>	<u>Laskettu</u>	<u>Aminohappo</u>	<u>Löydetty</u>	<u>Lasket</u>
Asx*	2,97	3	Val	3,37	4
Thr	1,77	2	Ile	1,65	2
Ser	2,45	3	Leu*	5,65	6
Glx*	6,68	7	Tyr	3,51	4
Pro	1,33	1	Phe*	2,73	3
Gly*	3,95	4	Lys*	0,95	1
Ala*	1,22	1	His*	1,84	2
Cys 0,5	4,54	6	Arg*	1,13	1

\*Normalisoinnissa käytetty aminohappo

Esimerkki 10

Hiivaplasmidin pMT610 rakentaminen B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):n ilmentämistä varten

---

4,3 ke:n EcoRV-Xbal-jakso ja 3,3 ke:n EcoRI-EcoRV-jakso, jotka oli saatu plasmidista pMT342 (ks. esimerkki 3), liitettiin 0,6 ke:n EcoRI-Xbal-jaksoon, joka oli saatu plasmidista pM215 (ks. esimerkki 3). Saatu plasmidi pMT462 sisältää liitännäisen MFal-johtosekvenssi(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B-C-A. Jotta saataisiin B-C-A:ta koodittava jakso B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):tä koodittavaksi jaksoksi, käytettiin muunnettua paikkaspesifistä mutatoointia (K. Norris et al., *ibid.*). Plasmidista pMT642 saatu 0,6 ke:n EcoRI-Xbal-jakso, joka koodittaa peptidiä MFal-johtosekvenssi(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B-C-A, sijoitettiin Xbal-EcoRI-leikattuun M13 mp10 RF-faagiin. Yksisäikeistä M13-faagia, jossa oli edellä mainittu EcoRI-Xbal-liitännäinen, inkuboitiin 30-meerisen d(TTCACAATGCCCTTAGCGGCCTTGGGTGTG)-priimerin (KFN15) ja "universaalisen" 15-meerisen M13-priimerin d(TCCCAGTCACGACGT) (ks. esimerkki 1) kanssa kuumentamalla 5 minuuttia 90°C:ssa ja jäädyttämällä sen jälkeen hitaasti huoneen lämpötilaan parittumistarkoituksessa. Osittain kaksisäikeinen DNA valmistettiin lisäämällä dNTP-seos, Klenow-polymeraasi ja T4-ligaasi. Sitten suoritettiin fenoliuutto, etanolisaostus ja uudelleensuspendointi ja DNA leikattiin restriktioentsyymeillä Apal, Xbal ja EcoRI. Suoritettiin uudestaan fenoliuutto, etanolisaostus ja uudelleensuspendointi ja DNA liitettiin EcoRI-Xbal:llä leikattuun plasmidiin pUC13. E. coli (r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>)-kanta transformoitiin yhteenliittämisseoksella ja useista transformanteista valmistettiin plasmidit. Plasmidivalmisteet leikattiin EcoRI:llä ja Xbal:llä ja niillä valmisteilla, joissa oli vyöhykkeet sekä 0,5 että 0,6 ke:ssä, transformoitiin E. coli uudestaan. Uudelleentransformointiin valittiin transformantti, jossa oli vain pUC13, joka sisälsi 0,5 ke:n liitännäisen. Tämän plasmidin pMT598 EcoRI-Xbal-liitännäisen sekvenssi varmistettiin Maxamin ja Gilbertin menetelmällä todeten, että se kooditti peptidiä MFal-johtosekvenssi(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21). Plasmidin pMT598 Xbal-EcoRI-liitännäinen varustettiin TPI-promoottorilla ja TPI-lopettajalla liittämällä

pMT598:n 0,5 ke:n XbaI-EcoRI-jaksoon pT5:n 5,5 ke:n XbaI-EcoRI-jakso. Plasmidin pT5-rakentaminen, jossa on TPI<sub>p</sub>-Mfal-johtosekvenssi-B-C-A-TPI<sub>T</sub>, on esitetty kuvassa 8. Saatu plasmidi pMT601, joka sisältää liitännäisen TPI<sub>p</sub>-Mfal-johtosekvenssi-(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)-TPI<sub>T</sub>, leikattiin BamHI:llä ja osittain SphI:llä ja 2,1 ke:n jakso sijoitettiin CPOT:hen, joka oli leikattu BamHI:llä ja SphI:llä. Näin saatua plasmidia pMT610 käytettiin hiivan transformointiin.

#### Esimerkki 11

Hiivaplasmidin pMT639 rakentaminen B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):n ilmentämiseksi

Plasmidin pMT462 (ks. esimerkki 10) BCA:ta koodittava jakso muunnettiin B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):tä koodittavaksi suorittamalla esimerkin 10 mukainen paikkaspesifinen mutatointi seoksella, jossa oli 27-meeristä d(TCCACAATGCCCTTAGACTTGGGTGTG)-priimeriä KFN36 ja "universaalista" 15-meeristä M13-priimeriä. Kun oli suoritettu täyttäminen Klenow-polymeraasilla ja liittäminen T4-ligaasilla, osittain kaksisäikeinen DNA pilkottiin Apal:llä, EcoRI:llä ja XbaI:llä ja liitettiin yhteen plasmidista pT5 saadun 5,5 ke:n XbaI-EcoRI-jakson kanssa (ks. esimerkki 10). Kun oli suoritettu E. colin transformointi ja uudelleentransformointi, eristettiin plasmidi pMT630, jossa oli liitännäinen Mfal-johtosekvenssi(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21), ja liitännäisen sekvenssi varmistettiin. Jatkotoimenpiteet plasmidin pMT639 aikaansaamiseksi, joka sisältää liitännäisen TPI<sub>p</sub>-Mfal(miinus Glu-Ala-Glu-Ala)-B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21)-TPI<sub>T</sub>, suoritettiin esimerkin 10 mukaisesti. Plasmidin pMT639 rakentaminen on esitetty kuvassa 9.

#### Esimerkki 12

B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):n ilmentäminen hiivakannassa MT620  
S.cerevisiae-kanta MT501 (ks. esimerkki 5) transformoitiin plasmidilla pMT610 samoin kuin esimerkissä 5 on selostettu plasmidin pMT479 kohdalla. Transformanttipesäkkeet poimittiin sen jälkeen, kun niitä oli kasvatettu 3 vuorokautta 30°C:ssa,

eristettiin uudestaan ja käytettiin nestemäisten viljelmien aloittamiseen. Yksi tällainen transformantti, MT620 = (MT501/pMT610), valittiin jatkotarkasteluun. Tämän patentin hakija taltioi MT620:n kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM), 16. tammikuuta 1985, jolloin se sai kokoelmanumeron DSM 3196.

MT620-kantaa kasvatettiin YPD-alustassa. Kahta litran viljelmää ravisteltiin 2 litran pulloissa, jotka oli varustettu ohjauslevyillä, 30°C:ssa, kunnes OD<sub>600nm</sub>-arvoksi tuli 15. Suoritettiin sentrifugointi ja emäliuos otettiin talteen jatkotutkimuksia varten. Radioimmunomäärityksellä mitattu ilmentymistaso oli 1,2  $\mu$ mol/l. 840 ml:sta emäliuosta puhdistettiin ilmentymistuotteet esimerkin 7 mukaisesti (RP-18-pylväs, anti-insuliini, Sepharose ja HPLC). Kokonaissaanto oli 100 nmol vastaten n. 10 %. Peptidimateriaali eristettiin HPLC-pylvästä ja sekven-toitiin esimerkin 7 mukaisesti. Suoritettiin 35 Edmanin hajotus-sykliä (taulukko 4). Sekvenssitulokset varmistivat B(1-29)- ja A(1-21)-ketjua toisistaan erottavan 3 aminohappotähteen muodosta-man ketjun (Ala-Ala-Lys) sijainnin.

Taulukko 4

Kannan MT620 kasvualustasta eristetyn B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):n sekvenssianalyysi

<u>Sykli n:o</u>	<u>PTH-aminohappotähde</u>	<u>Saanto (pmol)</u>
1	Phe	3381
2	Val	1738
3	Asn	5169
4	Gln	2750
5	His	2045
6	Leu	1405
7	Cys	-
8	Gly	1372
9	Ser	345
10	His	1105
11	Leu	2228
12	Val	1963
13	Glu	1219
14	Ala	1514
15	Leu	1793
16	Tyr	1707
17	Leu	1354
18	Val	1765
19	Cys	-
20	Gly	882
21	Glu	1019
22	Arg	1100
23	Gly	1123
24	Phe	1492
25	Phe	2042
26	Tyr	1014
27	Thr	195
28	Pro	710
28	B <sub>29</sub> Lys	1173
30	Ala	1026
31	Ala	885
32	Lys	1175
33	A <sub>1</sub> Gly	552
34	Ile	518
35	Val	548

Keskimääräinen saanto toistettuna oli 95,6 %.

Esimerkki 13

B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):n ilmentyminen hiivakannassa MT643

S. cerevisiae-kanta MT501 transformoitiin plasmidilla pMT639, kuten esimerkissä 5 on selostettu plasmidin pMT479 kohdalla.

Jatkotutkimuksiin valittiin yksi transformantti, MT643 = (MT501/pMT639). Tämän patentin hakija taltioi MT643-kannan DSM-kokoelmiin 16. tammikuuta 1985, jolloin sille annettiin numero DSM 3197.

MT643-kantaa kasvatettiin esimerkissä 12 kuvatulla tavalla. Sentrifugoinnin jälkeen emälius otettiin talteen jatkotutkimuksia varten.

Insuliinin prekursorin ilmentymistaso oli radioimmunomäärityksellä mitattuna  $1,6 \mu\text{mol/l}$ . MT643-kannan emäliuoksen sisältämät ilmentymistuotteet eristettiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. HPLC-pylvästä erotetulle peptidimateriaalille suoritettiin sekventointi esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Sekventointitulokset (ei yksityiskohtaisesti ilmoitettu) osoitti, että kahden aminohappotähteen muodostama ketju (Ser-Lys) erottaa B(1-29)- ja A(1-21)-ketjun toisistaan.

#### Esimerkki 14

B(1-29)-A(1-21):n muuntaminen Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi

20 mg B(1-29)-A(1-21)-insuliinia liuotettiin 0,1 ml:aan 10 M etikkahappoa. Lisättiin 0,26 ml Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>:n 1,54 M N,N-dimetyyliasetamidiliuosta. Seos jäähdytettiin 12°C:een. Lisättiin 2,8 mg trypsiiniä, joka oli liuotettu 0,035 ml:aan 0,05 M kalsiumasetaattia. Seosta inkuboitiin 72 tuntia 12°C:ssa, proteiinit saostettiin lisäämällä 4 ml asetonia, erotettiin sentrifugoimalla ja kuivattiin vakuumissa. B(1-29)-A(1-21):n muuntuminen Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi tapahtui 64-prosenttisesti HPLC-menetelmällä mitattuna.

#### Esimerkki 15

B(1-29)-A(1-21):n muuntaminen Thr-OMe(B30)-ihmisinsuliiniksi

20 mg B(1-29)-A(1-21)-insuliinia liuotettiin 0,1 ml:aan 10 M etikkahappoa. Lisättiin 0,26 ml liuosta, jossa oli 1,54 M Thr-OMe dimetyylisulfoksidin ja butaanidioli-1,4:n seoksessa



(1:1 tilavuusosina). Lisättiin 1 mg *Achromobacter lyticus* lysisosin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japani) 0,07 ml:ssa vettä. Seosta inkuboitiin 120 tuntia 25°C:ssa, proteiinit saostettiin lisäämällä 4 ml asetonia, erotettiin sentrifugoimalla ja kuivattiin vakuuissa. B(1-29)-A(1-21):n muuttuminen Thr-OME(B30)-ihmisinsuliiniksi tapahtui 75-prosenttisesti HPLC-menetelmällä mitattuna.

#### Esimerkki 16

B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):n muuntaminen Thr-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi

20 mg B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21) liuotettiin 0,1 ml:aan seosta, jossa oli 34,3 % (tilavuus/tilavuus) ja 42,2 % (tilavuus/tilavuus) N,N-dimetyyliformamidia vedessä. Lisättiin 0,2 ml liuosta, jossa oli 2 M Thr-OBu<sup>t</sup>:n hydroasetatisuolaa N,N-dimetyyliformamidissa. Seoksen lämpötila säädettiin termostaatilla arvoon 12°C. Lisättiin 2 mg trypsiiniä 0,05 ml:ssa 0,05 M kalsiumasetattia. Seosta inkuboitiin 24 tuntia 12°C:ssa, proteiinit saostettiin lisäämällä 4 ml asetonia, erotettiin sentrifugoimalla ja kuivattiin vakuuissa. B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21):n muuttuminen Thr-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi tapahtui 85-prosenttisesti HPLC-menetelmällä määritettynä.

#### Esimerkki 17

B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):n muuntaminen Thr-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi

20 mg B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)-insuliinia liuotettiin 0,1 ml:aan seosta, jossa oli 34,3 % etikkahappoa (tilavuusosina) ja 42,2 % N,N-dimetyyliformamidia (tilavuusosina) vedessä. Lisättiin 0,2 ml liuosta, jossa oli 2 M Thr-OBu<sup>t</sup>:n hydroasetatisuolaa N,N-dimetyyliformamidissa. Seoksen lämpötila säädettiin termostaatilla 12°C:een. Lisättiin 2 mg trypsiiniä 0,05 ml:ssa 0,05 M kalsiumasetattia. Seosta inkuboitiin 96 tuntia 12°C:ssa, erotettiin sentrifugoimalla ja kuivattiin vakuuissa. B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21):n muuttuminen Thr-OBu<sup>t</sup>(B30)-ihmisinsuliiniksi tapahtui 84-prosenttisesti HPLC-menetelmällä mitattuna.

Esimerkki 18

Ihmisinsuliinin valmistaminen erilaisista ihmisinsuliinistereistä

---

Epäpuhtaiden asetonisakkojen sisältämät ihmisinsuliiniesterit puhdistettiin geelisuodatuksella ja anioninvaihtokromatografialla, kuten on selostettu julkaisussa *Methods in Diabetes Research* Vol. 1, p. 407-408 [Eds. J. Larner & S. Pohl (John Wiley Sons, New York, 1984)]. Menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin näihin kolmeen ihmisinsuliiniesteriin. Eri esteriryhmien lohkaus niin, että saatiin ihmisen insuliinia lähes 100 % saannolla, tapahtui hydrolysoimalla Thr-OMe(B3O)-ihmisinsuliini ja asidolysoimalla Thr(Bu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>(B3O)-ihmisinsuliini ja Thr-OBu<sup>t</sup>(B3O)-ihmisinsuliini trifluorietikkahapolla, kuten edellä mainitussa julkaisussa sivulla 409 on selostettu.

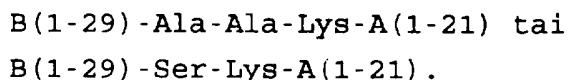
Patenttivaatimukset

1. DNA-sekvenssi käytettäväksi hiivavektorissa, **tunnettu** siitä, että se muodostuu sellaista insuliinin prekursoria koodaavasta nukleotidiyhdistelmästä, jolla on kaava



jossa kaavassa  $X_n$  on peptidiketju, jossa on  $n$  luonnonmukaisesti esiintyvää aminohapotähdettä,  $Y$  on Lys tai Arg,  $n$  on kokonaisluku 0-33,  $m$  on 0 tai 1, B(1-29) on ihmisen insuliinin lyhennetty B-ketju ulottuen aminohaposta Phe<sup>B1</sup> aminohappoon Lys<sup>B29</sup> ja A(1-21) on ihmisen insuliinin A-ketju edellyttäen, että peptidiketju  $-X_n - Y-$  ei sisällä kahta vierekkäistä emäksistä aminohapotähdettä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-sekvenssi, **tunnettu** siitä, että se muodostuu sellaista insuliinin prekursoria koodaavasta nukleotidiyhdistelmästä, jolla on kaava



3. Hiivassa replikoitumiskykyinen vektori, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen DNA-sekvenssin.

4. Menetelmä insuliinin prekursorin valmistamiseksi, jolla on kaava



jossa kaavassa  $X_n$  on peptidiketju, jossa on  $n$  luonnonmukaisesti esiintyvää aminohapotähdettä,  $Y$  on Lys tai Arg,  $n$  on kokonaisluku 0-33,  $m$  on 0 tai 1, B(1-29) on ihmisen insuliinin lyhennetty B-ketju ulottuen aminohaposta Phe<sup>B1</sup> aminohappoon Lys<sup>B29</sup> ja A(1-21) on ihmisen insuliinin A-ketju edellyttäen, että peptidiketju  $-X_n - Y-$  ei sisällä kahta vierekkäistä

emäksistä aminohappotähdettä, **tunnettu** siitä, että hiivakantaa, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 3 mukaisella vektorilla, viljellään sopivassa ravintoväliaineessa, minkä jälkeen insuliinin prekursori otetaan talteen sinänsä tunnetulla tavalla.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä kaavan B(1-29)-A(1-21) mukaisen insuliinin prekursorin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että hiivakantana käytetään kantaa DSM 2959.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä kaavan B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) mukaisen insuliinin prekursorin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että hiivakantana käytetään kantaa DSM 3196.

7. Menetelmä ihmisen insuliinin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että hiivakantaa, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 3 mukaisella vektorilla, viljellään sopivassa ravintoväliaineessa, minkä jälkeen ilmentynyt insuliinin prekursori otetaan talteen kasvunesteestä ja muutetaan ihmisen insuliiniksi sinänsä tunnetulla tavalla.

8. Ihmisen insuliinin prekursori, **tunnettu** siitä, että sillä on kaava

B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) tai  
B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21).

jossa kaavassa B(1-29) on ihmisen insuliinin lyhennetty B-ketju ulottuen aminohaposta Phe<sup>B1</sup> aminohappoon Lys<sup>B29</sup> ja A(1-21) on ihmisen insuliinin A-ketju.

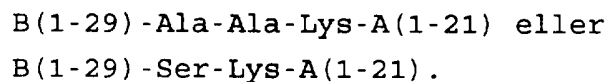
Patentkrav

1. DNA-sekvens till användning i en jästvektor, **kännetecknad** av att den består av en nukleotidkombination som kodar för en insulinprekursor med formeln



vari  $X_n$  är en peptidkedja med  $n$  naturligt förekommande aminosyrarester,  $Y$  är Lys eller Arg,  $n$  är ett heltal från 0 till 33,  $m$  är 0 eller 1,  $B(1-29)$  är en avkortad B-kedja av humaninsulin från Phe<sup>B1</sup> till Lys<sup>B29</sup> och  $A(1-21)$  är A-kedjan av humaninsulin, med det förbehållet att peptidkedjan  $-X_n - Y$  ej innehåller två intill varandra liggande basiska aminosyrarester.

2. DNA-sekvens enligt patentkravet 1, **kännetecknad** av att den består av en nukleotidkombination som kodar för en insulinprekursor med formeln



3. Vektor med förmåga till replikation i jäst, **kännetecknad** av att den innehåller en DNA-sekvens enligt patentkravet 1 eller 2.

4. Förfarande för framställning av en insulinprekursor med formeln



vari  $X_n$  är en peptidkedja med  $n$  naturligt förekommande aminosyrarester,  $Y$  är Lys eller Arg,  $n$  är ett heltal av från 0 till 33,  $m$  är 0 eller 1,  $B(1-29)$  är en avkortad B-kedja av humaninsulin från Phe<sup>B1</sup> till Lys<sup>B29</sup> och  $A(1-21)$  är A-kedjan av humaninsulin, med det förbehållet att peptidkedjan  $-X_n - Y$  ej innehåller två intill varandra liggande basiska aminosy-

rarester, **kännetecknat** av att en jäststam transformerad med en vektor enligt patentkravet 3 odlas i ett lämpligt näringsmedium följt av utvinning av insulinprekursorerna på i och för sig känt sätt.

5. Förfarande enligt patentkravet 4 för framställning av en insulinprekursor med formeln B(1-29)-A(1-21), **kännetecknat** av att man som jäststam använder stammen DSM 2959.

6. Förfarande enligt patentkravet 4 för framställning av en insulinprekursor med formeln B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21), **kännetecknat** av att man som jäststam använder stammen DSM 3196.

7. Förfarande för framställning av humaninsulin, **kännetecknat** av att en jäststam transformerad med en vektor enligt patentkravet 3 odlas i ett lämpligt näringsmedium, varefter den uttryckta insulinprekursorerna utvinnes från kulturvätskan och omvandlas till humaninsulin på i och för sig känt sätt.

8. Humaninsulinprekursor, **kännetecknad** av att den har formeln

B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) eller

B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21)

vari B(1-29) är en avkortad B-kedja av humaninsulin från Phe<sup>B1</sup> till Lys<sup>B29</sup> och A(1-21) är A-kedjan av humaninsulin.

FIG. 1

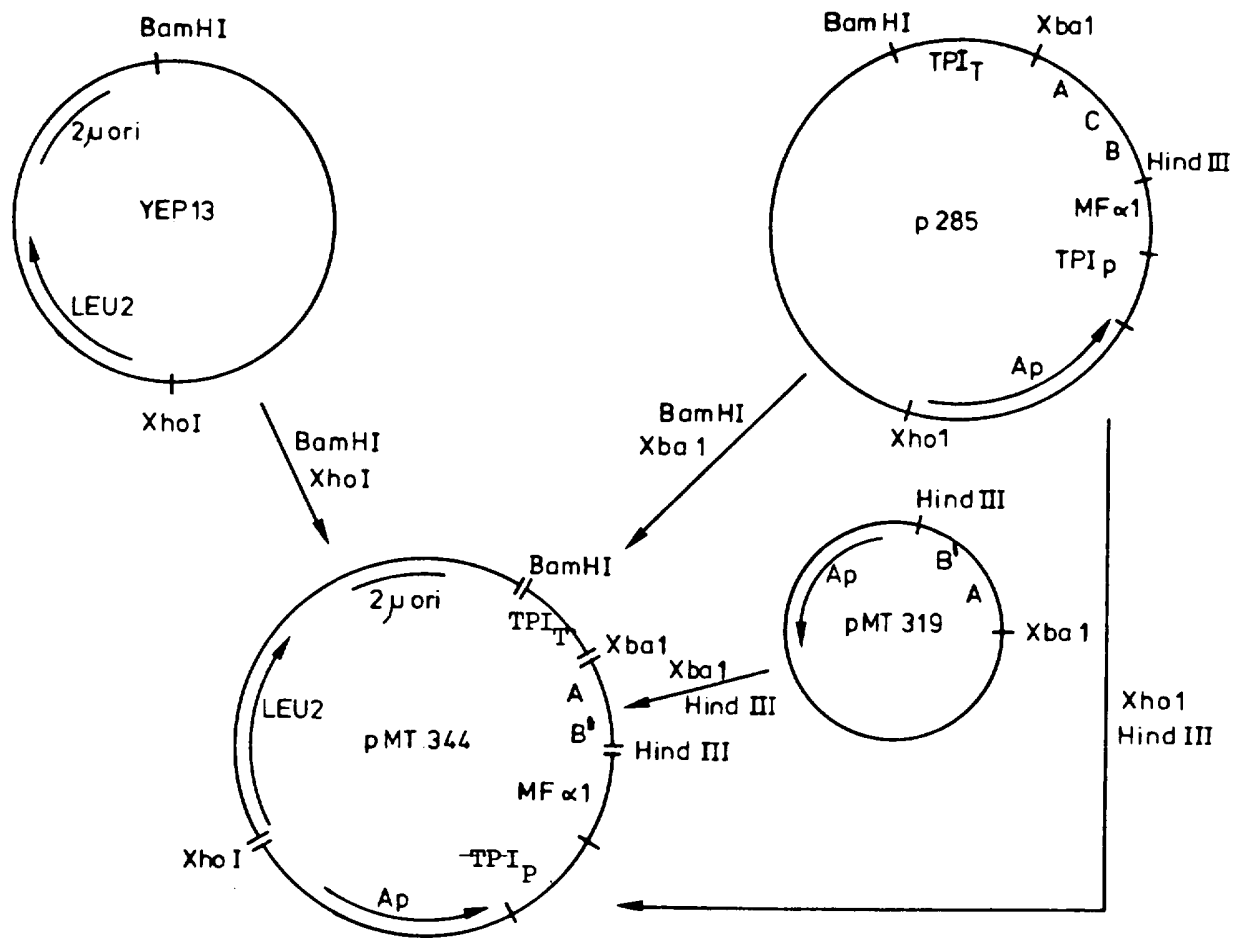


FIG. 2

89183

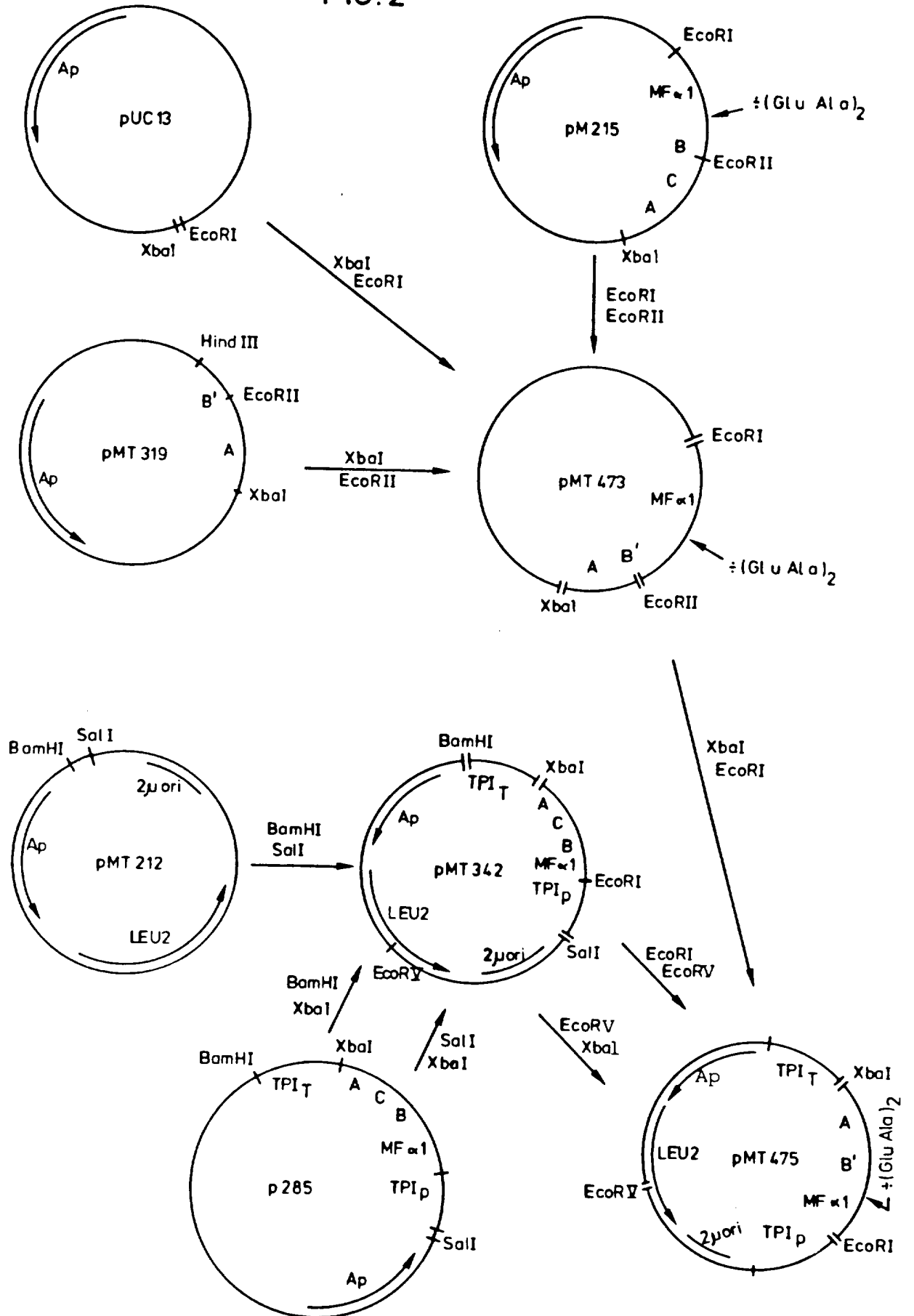




FIG.3

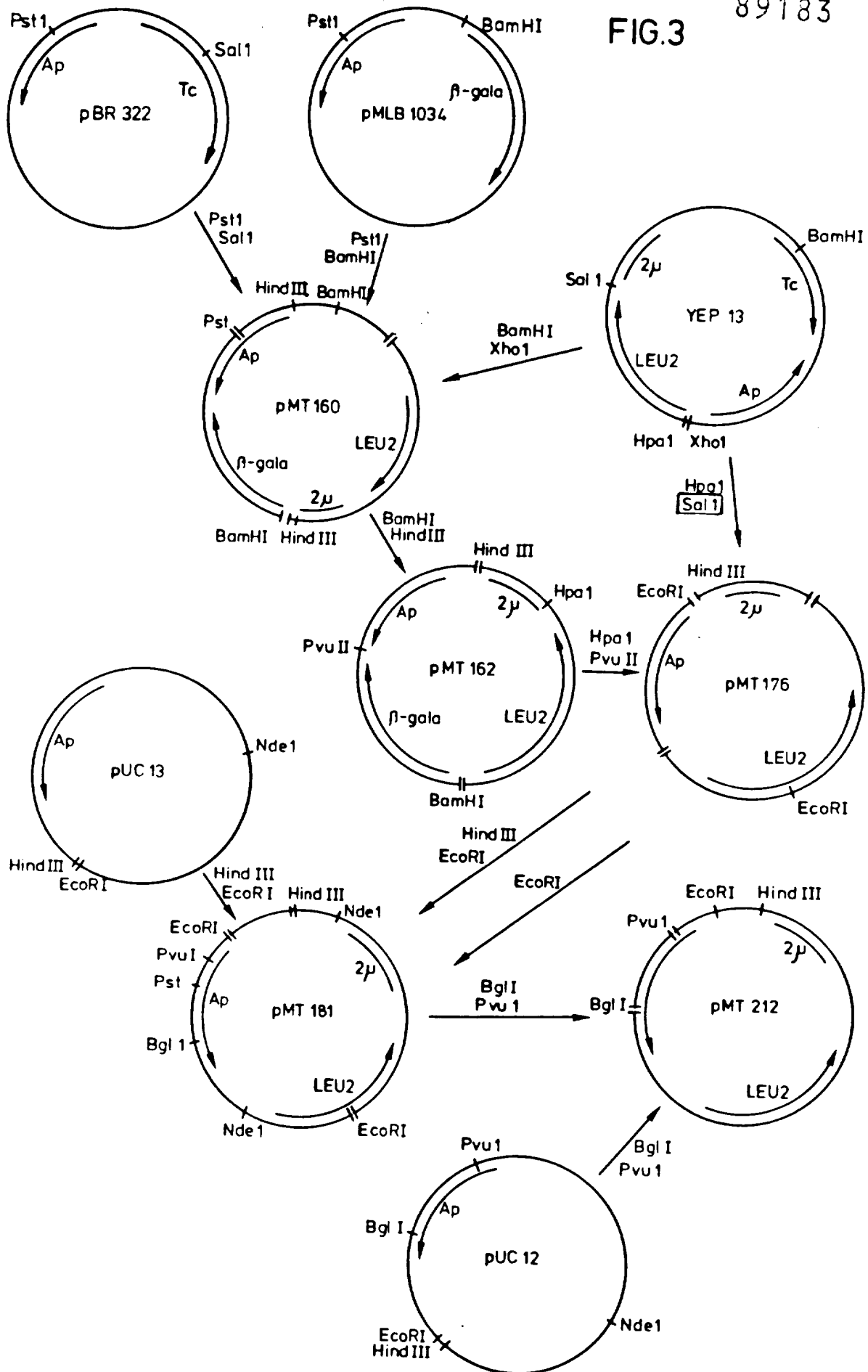


FIG. 4

89183

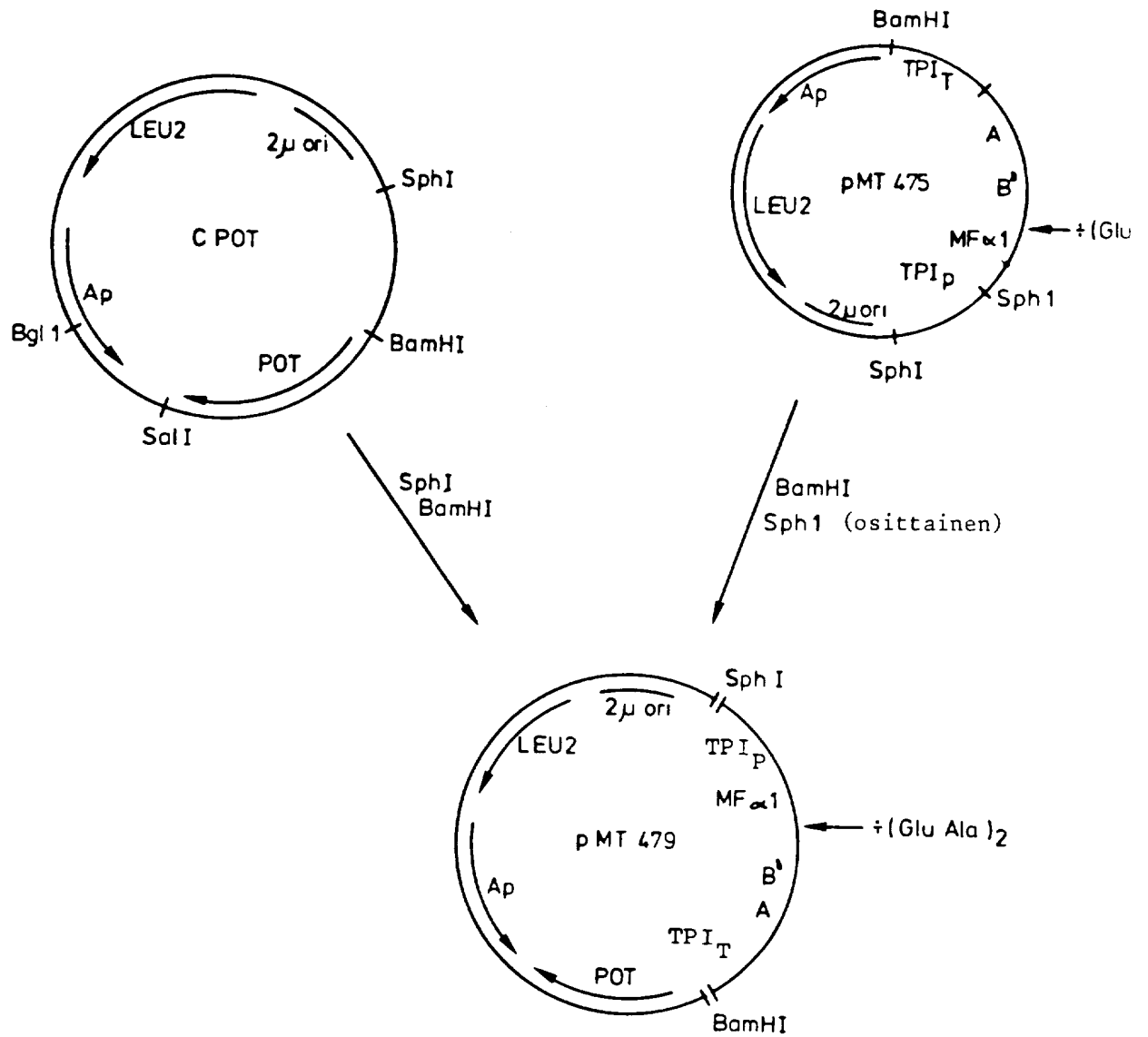


FIG. 5

89183

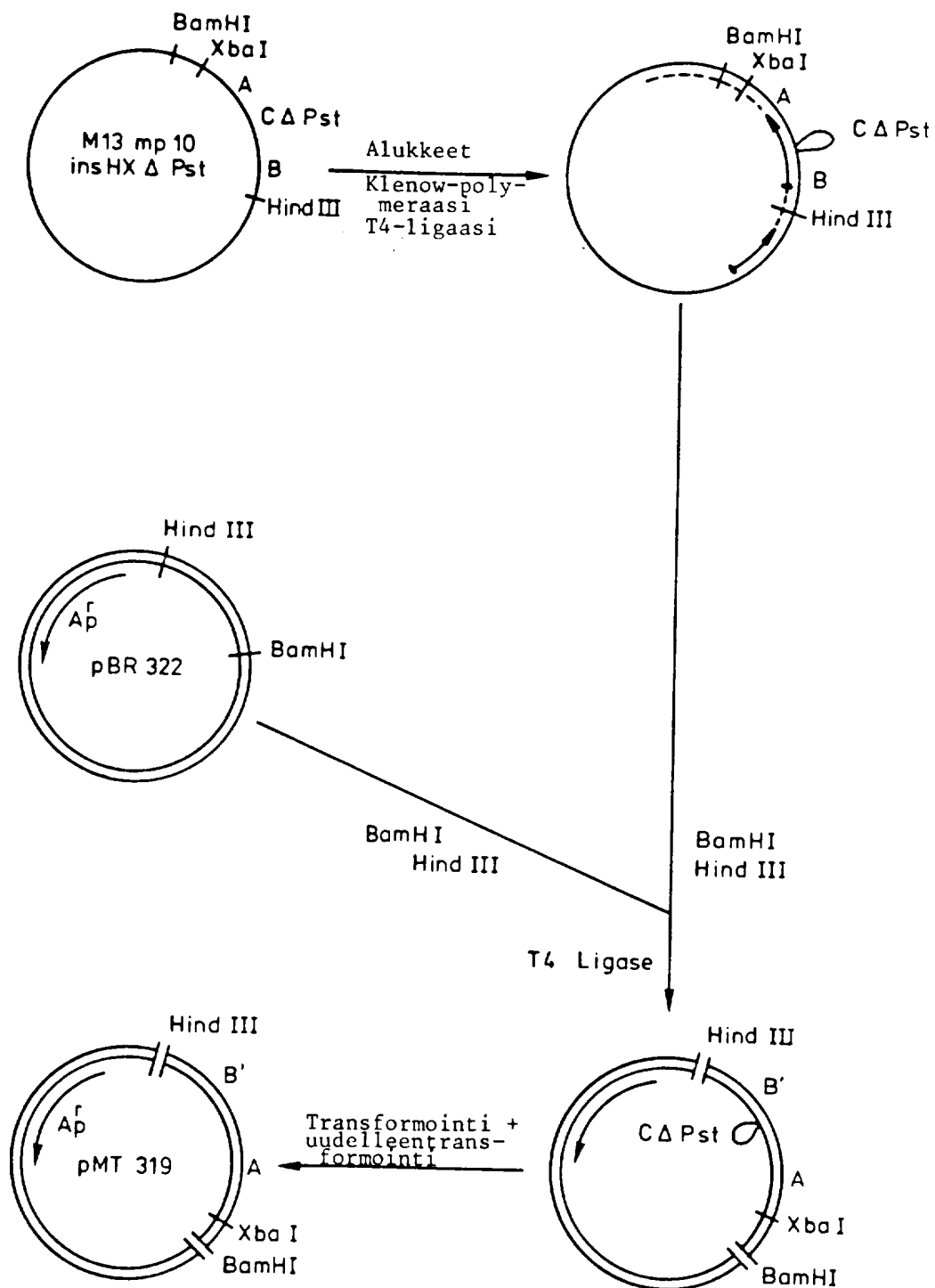


FIG. 6

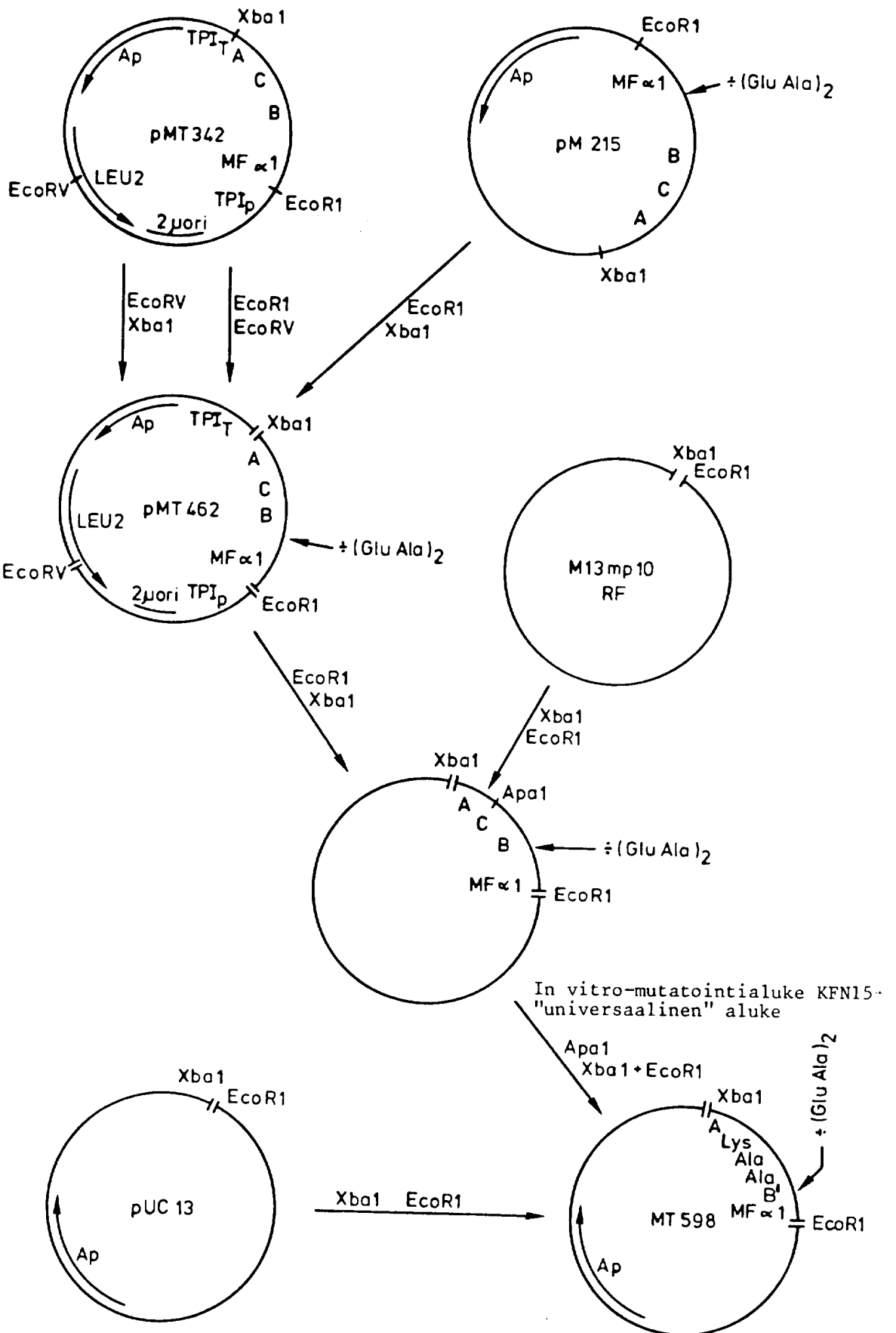


FIG. 7

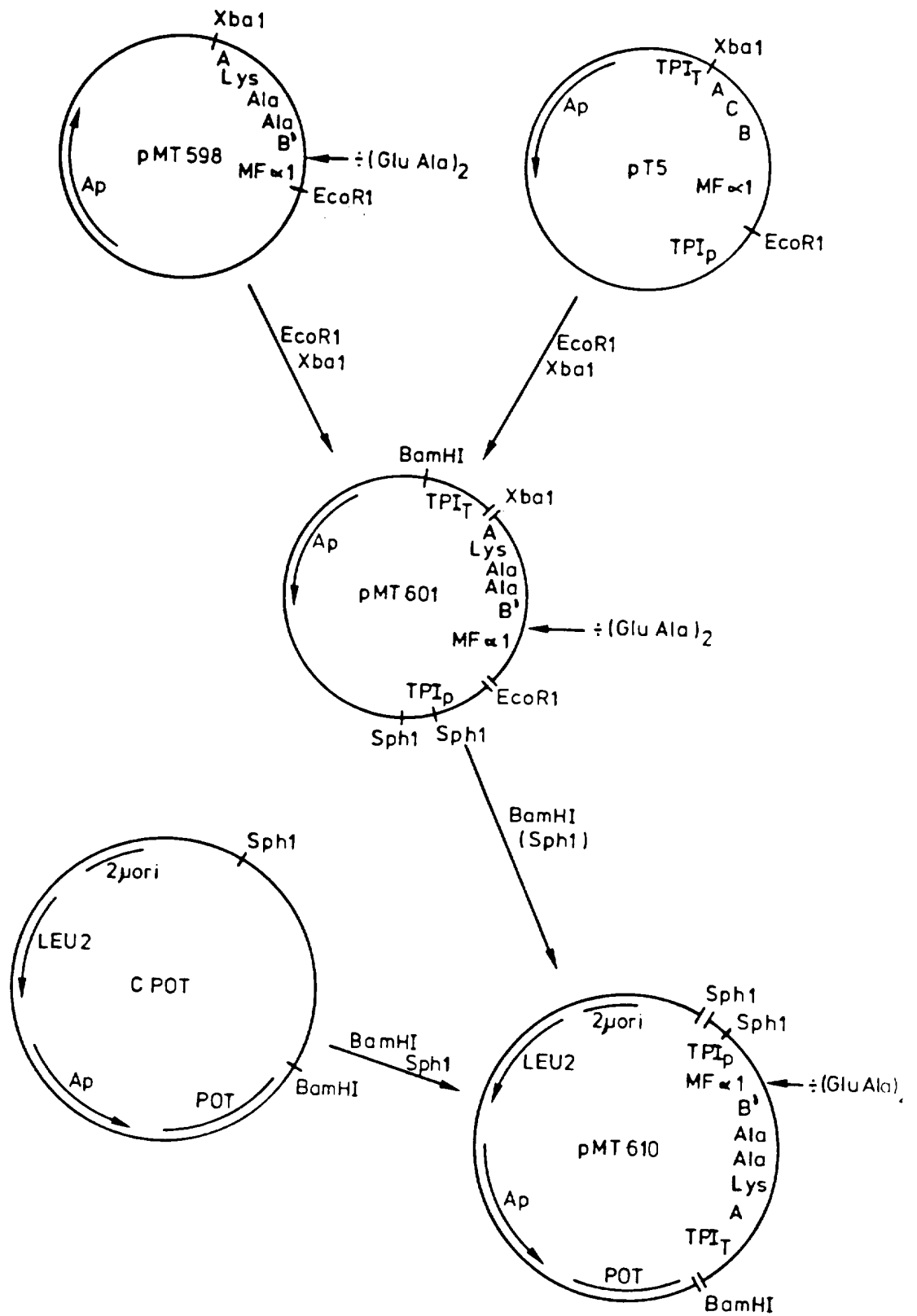


FIG. 8

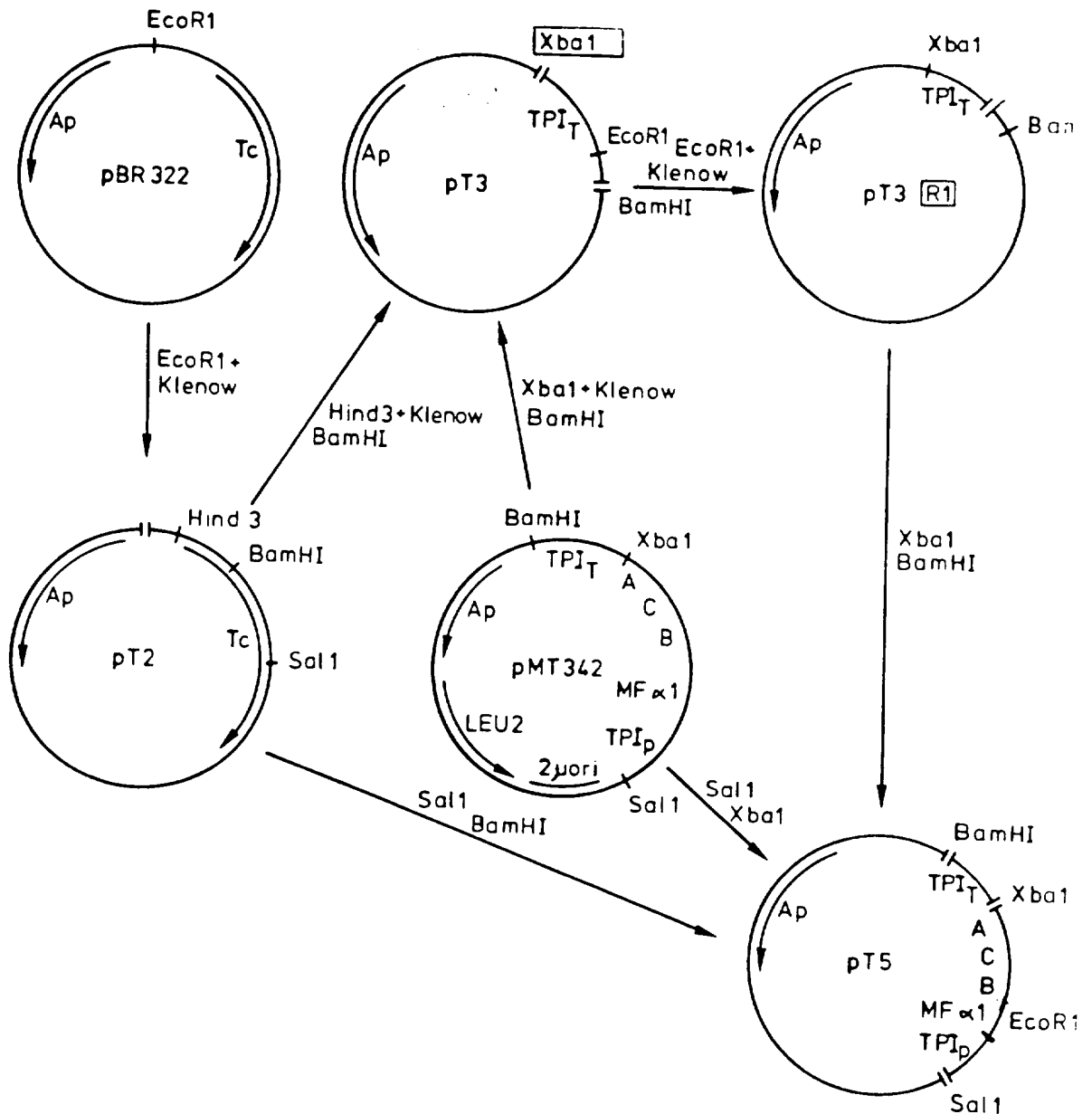


FIG. 9

