



F10000931258

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLAGNINGSSKRIFT 93125

C (15) Patentti myönnetty
Patent meddelat 27 02 1995

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/12, 15/71, 1/21, C 07K 7/10

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	861217
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	21.03.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	21.03.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	23.09.86
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.11.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
22.03.85 IT 47856/85 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Istituto di Ricerca Cesare Serono Spa, Via Valle Caia, 22, Ardea (Roma), Italia, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Canosi, Umberto, Via Parco della Rimembranza, 9 Albano, Italia, (IT)
2. De Fazio, Gabriele, Via Pio Emanuelli, 50 Roma, Italia, (IT)
3. Villa, Stefano, Via Oslavia, 37 Roma, Italia, (IT)
4. Donini, Silvia, L.go degli Orsi, 22 Roma, Italia, (IT)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenus & Co Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kasvuhormonia vapauttavan tekijän sekvenssin sisältävien hybridipolypeptidien ilmentäminen E. colissa
Expression i E. coli av hybridpolypeptider som innehåller sekvensen för tillväxthormon frigörande faktorn

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 53054 ATCC
53056 ATCC
53058 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 81378 (C 12N 15/18), EP A 129073 (C 12N 15/00), EP A 108387 (C 12N 15/00),
EP A 68719 (C 12N 15/00),
Science 218 (1982) p. 585-587, Guillemin et al., Nature 300 (1982) p. 276-278,
Rivier et al., Biochemistry 20 (1981) p. 6997-7004, Fontana et al.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu uusiin plasmidi-vektoreihin, jotka sisältävät koko Trp-säätelyjärjestelmän promoottori, operaattori, leader-alue ja attenuaattori mukaanlukien, sekä menetelmiin hybridipolypeptidien ilmentämiseksi E. colissa. Hybridipolypeptidit sisältävät heterologisen GRF-44, 40, 37, tai 29 sekvenssin.

Uppfinningen avser nya plasmidvektorer som innehåller hela Trp regler-systemet, promotor, operator, leader och attenuator inkluderade, samt förfaranden för expression av hybridpolypeptider i E. coli. Hybridpolypeptiderna innehåller den heterologa sekvensen för GRF-44, 40, 37 eller 29.

Kasvuhormonia vapauttavan tekijän sekvenssin sisältävien hybridipolypeptidien ilmentäminen *E. coli*ssa
Expression i *E. coli* av hybridpolypeptider som innehåller sekvensen för tillväxthormon frigörande faktorn

Äskettäin on eristetty akromegaalisen potilaan haimakasvaimesta ryhmä aineita, joita kutsutaan kasvuhormonia vapauttaviksi tekijöiksi (Growth hormone releasing factors, GRF). Guillemin et al, *Science* 218, 585, 1982; Esch et al, *J. Biol. Chem.* 258, 1806, 1983.

Useita GRF-muotoja on puhdistettu ja niiden aminohappojärjestykset on määritetty. GRF-44 sisältää koko GRF-40:n aminohappojärjestyksen ja se jatkuu karboksyylipäästä neljällä aminohapolla.

GRF-40 puolestaan sisältää koko GRF-37:n aminohappojärjestyksen ja se jatkuu karboksyylipäästä kolmella aminohapolla. Myös GRF-29 peptidin on osoitettu olevan biologisesti aktiivinen (J. Riveir et al, *Nature* 300, 276-8, 1982).

Vain GRF-44:n karboksyylipää (Leu) on amidoitu (GRF-NH₂-44). Uskotaan, että GRF-NH₂-44 on kypsä hormoni ja että GRF-40, 37 ja 29 ovat sen proteolyyttisiä johdannaisia, vaikkakin kaikki em. GRF:t ovat biologisesti aktiivisia.

On raportoitu, että GRF:t vaikuttavat sekä kasvuhormonin synteesiin että sen vapautumiseen aivolisäkkeestä. (Brazeau et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 7909, 1982; Baringa et al, *Nature*, 306, 84, 1983.)

On esitetty, että hypothalamuksesta (alanäkökukkulasta) eristetty GRF-44 peptidi (hhGRF) olisi identtinen haimakasvaimesta saadun (hpGRF) kanssa, ja itse asiassa immunoreaktiivisuutta hhGRF:n ja hpGRF:a vastaan synnytettyjen vasta-aineiden välil-

lä havaittiinkin. Lisäksi molempien peptidien profiilit HPLC:llä analysoituina olivat samat (Bohlen et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 144, 930, 1983). Aivan äskettäin osoitettiin, että hpGRF:llä ja hhGRF:llä on sama aminohappojärjestys (Ling et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4302, 1984).

hpGRF:a tuottavasta haimakasvaimesta eristetyin lähetti-RNA:n komplementaarisen DNA:n synteesi ja karakterisointi on osoittanut, että GRF-44 tuotetaan pre-prohormonina, jossa on 107-108 aminohappoa ja että GRF ulottuu aminohappo-tähteestä 32 aminohappo-tähteeseen 75 (Gublere et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4311, 1983; Mayo et al, Nature, 306, 86, 1983).

GRF-44 sekvenssiä seuraava Gly-Arg muistuttaa tyypillistä amidointikohtaa (Boel et al, The EMBO J. 3, 909, 1984; Bradbury et al, Nature, 298, 686, 1982).

GRF:eja voidaan käyttää terapeuttisesti hyväksi useimmilla aloilla, joilla nykyisin ehdotetaan kasvuhormonikäsittelyn käyttämistä. Esimerkkeinä tällaisista terapeuttisista käyttötarkoituksista ovat aivolisäkeperäinen kääpiökasvuisuus, diabetes, johon liittyy epänormaali kasvuhormonin tuotto, haavojen ja vakavien palovammojen hoito.

GRF:n koko sen useissa muodoissa tekee sen valmistamisen tavanomaisin peptidisynteesin menetelmin mahdolliseksi. Useita GRF-johdannaisia onkin tuotettu näillä keinoin, ja niiden on havaittu olevan biologisesti aktiivisia (Murphy et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112, 469, 1983; Thorner et al, Lancet, January, 1/8, 24, 1983; Adams et al, Lancet, May 14, 1100, 1983; Rosenthal et al, J. Clin. Endocr. Metab., 57, 677, 1983). Lisäksi on mahdollista syntetisoida peptidejä, jotka sisältävät amidoidun karboksyylin pääteaminohapossa. GRF-44:n tuottaminen kemiallisesti on kuitenkin melko kallista ja peptidin tuottaminen yhdistelmä-DNA-tekniikoiden avulla vaikuttaa olevan tarkoituksenmukaisempaa.

Eurooppalainen patenttijulkaisu EP 0108387 kuvaa synteettisten DNA-molekyylien valmistuksen, jotka molekyylit koodaavat useita GRF:n muotoja, joita edeltää metioniinikodoni, jotka siirrettyinä sopivaan ekspressiovektoriin ohjaavat metionylloidun GRF:n suoran synteessin sopivassa mikro-organismissa. Julkaisussa kuvataan menetelmä, joka käsittää kahden oliogodeoksi-ribonukleotidi-fragmenttisarjan valmistamisen, jotka sopivaan järjestykseen liitettynä tuottavat kaksi kaksijuosteista DNA-molekyyliä, jotka koodaavat GRF-peptidin amino- ja karboksyyliäpäitä.

Nämä kaksi kaksijuosteista DNA-molekyyliä liitetään yhteen halutun GRF-rakennegeenin aikaansaamiseksi. Suositeltavat ekspressiovektorit ovat plasmidi pBR322:n johdannaisia, jotka sisältävät bakteriofaagi lambda DNA:sta eristetyn P_L-promootorin, joka on sijoitettu tet^R- ja amp^R-geenin väliin. Lisätyn metioniiniaminohapon läsnäolo GRF-molekyylin N-päässä saattaa tehdä mahdolliseksi epätoivottavat immunologiset reaktiot, erityisesti pitkäaikaishoidossa.

Tämä keksintö koskee GRF:n tuotantoa yhdistelmä-DNA-tekniikalla saadun hybridipolypeptidin avulla sekä siihen käytettyä materiaalia.

.. Hybridipolypeptidi sisältää TrpE:n aminohapot 1...323 liitettynä järjestyksessä Trp-aminohappoon ja GRF:n aminohappojärjestykseen. Amidoimaton GRF voidaan saada pelkistämällä ja karboksiamidometyloimalla, leikkaamalla Trp-tähde spesifisesti irti, sen jälkeen geelisuodattamalla ja puhdistamalla GRF HPLC:lla.

Niinpä tämän keksinnön tarkoitus on tarjota menetelmä GRF:n valmistamiseksi hybridipolypeptidinä, jota koodaa plasmidi ja joka perustuu E. coli Trp promoottori/operaattorin käyttöön, jota seuraavat Trp-leader-alue ja attenuaattori, TrpE-geenin ribosomin sitoutumiskohta, ensimmäinen kaksi kolmannesta TrpE

polypeptidiä kohdaavasta DNA:sta, Trp-kodoni ja GRF-peptidiä koodaava geeni.

Tämän keksinnön toinen tarkoitus on esittää GRF:a koodaavan DNA-molekyylin synteesi, jota edeltää Trp:n TGG-kodoni ja nukleotidijärjestys, joka tekee mahdolliseksi tämän molekyylin liittämisen plasmidiin, jossa on TrpE rakennegeeni, samalla säilyttäen sen oikean lukuraamin.

Edelleen tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota käyttöön menetelmä keksinnön mukaisen plasmidin sisältävän mikro-organismien kasvattamiseksi runsaan hybridi TrpE-GRF polypeptidin synteessin mahdollistamiseksi.

Lisäksi tämän keksinnön tarkoitus on tarjota menetelmä hybridipolypeptidin uuttamiseksi ja halutun GRF-peptidin eristämiseksi siitä eri vaiheiden kautta.

Nämä ja muut keksinnön kohteet tulevat asiantuntijoille ilmi seuraavista yksityiskohtaisista kuvauksista, joissa

Kuva 1 osoittaa GRF-44 koodaavan geenin nukleotidijärjestyksen. DNA-molekyyli syntetisoitiin kemiallisesti kiinteään faasiin fosfotriesterimenetelmällä käyttäen dinukleotidejä rakennusyksikköinä ja polystyreeniä kiinteänä kantajana. Bgl II, XbaI, BstXI, NarI ja BamHI osoittavat näiden restriktioendonukleaasien tunnuskohtia. "Stop" merkitsee proteiinisynteesin lopetuskodonia.

Kuva 2 on pSP2 plasmidivektorin restriktiokartta, jossa ohut viiva esittää pBR322 DNA:ta, paksu viiva esittää E. colin kromosomaalista DNA:ta, jossa sijaitsee Trp promoottori/ope-raattori, Trp-leader-sekvenssi (TrpL), koko TrpE rakennegeeni ja osa TrpD rakennegeenistä (Δ TrpD), Ap^R ja Tc^R merkitsevät ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssin geenejä ja "Ori" on tämän plasmidin replikaation aloituskohta.

Kuva 3 on juoksukaavio, joka esittää plasmidin pSP2del rakentamisen plasmidista pSP2, jossa ΔE merkitsee epätäydellistä TrpE rakennegeeniä.

Kuva 4 on juoksukaavio, joka esittää plasmidin pSP19 rakentamisen plasmidista pSP2del.

Kuva 5 on kaavamainen esitys hybridi TrpE-GRF polypeptidin aminohappojärjestyksestä, jossa esitetään TrpE osan koko aminohappojärjestys ja GRF:n ensimmäiset viisi aminohappoa. GRF-44:n koko sekvenssi on esitetty kuvassa 1.

Koska GRF-44 DNA-molekyylissä on useita restriktioentsyymien pilkkomiskohtia, on mahdollista muodostaa 3 muuta molekyyliä, jotka myös kuuluvat tämän keksinnön piiriin, so. molekyylit, jotka koodaavat GRF-40, GRF-37 ja GRF-29 peptidejä.

Niinpä DNA-molekyyli voidaan pilkkoa NarI restriktioentsyymillä ja 3'-pään fragmentti voidaan korvata seuraavalla oligonukleotidilla:

40	
Ala	Stop
C GCC	TAG
<u>GG</u>	<u>ATCCTAG</u>
NarI	BamHI

GRF-40 koodaavan DNA-molekyylin muodostamiseksi.

GRF-37 koodaava DNA-molekyyli voidaan saada seuraavalla tavalla:

a) Kuvan 1 DNA pilkotaan BstXI restriktioentsyymillä, joka saa aikaan seuraavanlaisen 3'-pään:

35	36	
Asn	Gln	
---AAC	CAG	GAGC
---TTG	GTC	

b) Yksijuosteinen pää poistetaan S1 eksonukleaasilla.

c) Seuraava oligonukleotidi

37	
Glu	Stop
GAG	TAG
CTC	<u>ATCCTAG</u>
	BamHI

lisätään 3'-päähän kodonin 37 regeneroimiseksi.

Pilkkomalla kuvan 1 mukainen DNA-molekyyli XbaI restriktioentsyymillä ja korvaamalla 3'-pään fragmentti seuraavalla oligonukleotidillä:

29	
Arg	Stop
CTAGA	TAG
<u> </u> T	<u>ATCCTAG</u>
XbaI	BamHI

saadaan GRF-29 koodaava DNA-molekyyli

pSP19 plasmidi rakennettiin ja plasmidista saatava TrpE-GRF-44 hybridipolypeptidi valmistettiin seuraavalla tavalla:

1) pSP2 plasmidin rakentaminen

pSP2 plasmidi rakennettiin lähtien pBR322:sta (Bolivar et al., *Gene*, 2, 95...113, 1977) sekä λ ED10f:sta (Armstrong et al., *Science*, 196, 172, 1977 ja Helinski et al.: *Recombinant Molecules*, Tenth Miles International Symposium, Raven Press, 1977, siv. 151...165), jota käytettiin *E. coli* promoottorista TrpD rakennegeeniin ulottuvan Trp-operonin DNA:n lähteenä. pBR322 ja λ ED10f hajotettiin EcoRI ja HindIII restriktioentsyymeillä. λ ED10f:n EcoRI-HindIII fragmentti, joka sisälsi

Trp-operonin säätelyjärjestelmän, täydellisen TrpE rakennegeenin ja TRpD rakennegeenin 5'-pään, liitettiin yhteen pBR322:n suuremman HindIII-EcoRI fragmentin kanssa T4 DNA ligaasilla. Ligaatioseoksella transformoitiin E. coli W3110 Δ Trp E5/tna2 solut (Nichols ja Yanofsky, Methods in Enzymology, 101, 155, 1983). Transformoidut solut maljattiin minimaalimaljoille, joilta puuttui tryptofaani. Yhtä Trp⁺-kloonina käytettiin pSP2 yhdistelmä-DNA-plasmidin lähteenä. Tämän kloonin soluja kasvatettiin ja säilytettiin rikkaalla kasvatusalustalla (esim. NB, Difco), johon oli lisätty ampicilliinia (Ap) 50 μ g/ml. pSP2:n restriktiokartta esitetään kuvassa 2, missä paksulla viivalla kuvattu EcoRI-HindIII fragmentti sisältää E. colin Trp-toiminnot ja on peräisin lambda ED10f:sta, muun DNA:n ollessa peräisin pBR322:sta.

2) pSP2del plasmidin rakentaminen

pSP2 plasmidin DNA hajotettiin Bgl II endonukleaasilla ja suurempi fragmentti puhdistettiin agarosigeeli-elektroforeesilla ja liitettiin yhteen itsensä kanssa T4 DNA ligaasilla. Ligaatioseoksella transformoitiin W3110 Δ TrpE5/tna 2 solut. Ap^R transformantit valikoitiin Nutrient Agarille (Difco), joka sisälsi 50 μ g/ml Ap. Yhtä Ap^R kloonina käytettiin pSP2del DNA:n, jonka restriktiokartta esitetään kuvassa 3, lähteenä. (Ks. kuvan 2 selostusta yksityiskohtien osalta.)

Bgl II fragmentin poistaminen TrpE rakennegeenistä aiheutti osittaisen TrpE polypeptidin, jonka entsymaattinen aktiivisuus on kadonnut, ilmentymisen. Tämän vuoksi pSP2del plasmidin sisältäviä W3110 Δ TrpE5/tna 2 soluja täytyy kasvattaa tryptofaanin läsnäollessa.

Bgl II kohtien liitoskohta pSP2del:ssa muodostaa uuden proteiinisynteesin lopetuskodonin. (Nichols et al., J. Mol. Biol. 146, 45...54, 1981).

pSP2del:sta peräisin oleva osittainen TRpE (Δ TrpE) sisältää

siten 342 aminohappoa verrattuna pSP2 plasmidin koodaamaan kokonaisen proteiinin 520 aminohappoon (ks. jälleen kuva 3).

3) Trp-GRF-44 geenin kloonaminen

pSP2del DNA hajotettiin Bgl II ja BamHI restriktioentsyymeillä ja suurempi fragmentti puhdistettiin agarosigeeli-elektrofooresilla. Tämä DNA sekoitettiin synteettisen Trp-GRF-44:ää koodaavan DNA-molekyylin (ks. kuva 1) kanssa ja käsiteltiin T4 DNA ligaasilla.

Kuva 4 osoittaa pSP19 plasmidin rakentamisen liittämällä synteettinen geeni pSP2del plasmidiin. Tc^S ilmaisee tetrasykliinisensitiivisyyttä.

Ligaatioseos käytettiin W3110 Δ TrpE/tna2 solujen transformoimiseen ja Ap^R kloonit valikoitiin maljoilla, jotka sisälsivät 50 μ g/ml Ap. Yhtä tetrasykliinisensitiivistä (Tc^S) Ap^R kloonina käytettiin pSP19 DNA:n lähteenä.

Trp-GRF-44 geenin nukleotidijärjestys tekee mahdolliseksi syntetisoida osittaisen TrpE:n ja GRF-44:n välisen hybridipolypeptidin, joita erottaa tryptofaanitähde. Trp voidaan hajottaa jodosobensoehapolla, kuten seuraavassa kuvataan. pSP19 plasmidi DNA:n koodaaman hybridipolypeptidin aminohappojärjestys osoitetaan kuvassa 5 ja sitä kutsutaan tavallisesti TrpE-GRF:ksi.

Ensimmäiset 323 aminohappoa edustavat TrpE:n ensimmäistä kahta kolmannelta, joita seuraa Trp-tähde ja GRF-44:n aminohappojärjestys. TrpE-GRF koostuu siis 368 aminohaposta.

TrpE-GRF-44 hybridiproteiinin tuottaminen

W3110 Δ TrpE5tna2 (pSP19) kannan soluja kasvatettiin yli yön 300 ml:ssa SMM:ää (Spizizer Minimal medium), joka sisältää litraa vesiliuosta kohti:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	g
KH_2PO_4	6	g
K_2HPO_4	14	g
Na. sitraatti. $2\text{H}_2\text{O}$	1	g
MgSO_4	0,2	g

Autoklaavilla steriloinnin jälkeen lisättiin:

10 ml 40% glukoosia

3,5 $\mu\text{g/ml}$ indolia.

Viljelmä (noin $4,3 \times 10^8$ solua/ml) laimennettiin 10 litraan samaa kasvatusliuosta ja soluja kasvatettiin ravistellen ja ilmastaen 1 litralla ilmaa 1 atm paineessa/minuutti.

Kasvualustan koostumuksen ja kasvuolosuhteiden 10 litran fermentorissa on osoitettu olevan ihanteelliset pSP19 sisältämän Trp-promoottorin derepressoituna pitämiseksi (mikä sallii siten TrpE-GRF polypeptidin ilmentymisen) sekä solujen kasvatamiseksi.

22...25 tunnin kasvatuksen jälkeen kasvatus saavutti OD-arvon noin 3,0 aallonpituudella 590 nm. Solut kerättiin sentrifugomalla ja ne säilytettiin -80°C :ssa. Näytettä näistä soluista käytettiin proteiinipitoisuuden määrittämiseen polyasyyliamidigeeli-elektroforeesin avulla. Tulos osoitti halutun TrpE-GRF polypeptidin läsnäolon.

TrpE-GRF polypeptidin puhdistaminen

Jäädytetyt solut sulatettiin seuraavassa puskurissa: 0,2 M Tris-HCl pH 7,6; 0,2 M NaCl; 0,01 M CH_3COOMg ; 0,01 M β -merkaptoetanolii ja 5 % glyseroli. Solut jauhettiin rikki alumiinioksidin läsnäollessa ja solujäte poistettiin sentrifugomalla.

Vesifaasi laimennettiin neljä kertaa H_2O :lla ja hybridiproteiini sakkautettiin lisäämällä 144 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ litraa lopul-

lista liuosta kohti. Sakkautetut proteiinit pelletoitettiin sentrifugoimalla, liuotettiin veteen ja dialysoitiin voimakkaasti 10 mM NH_4HCO_3 vastaan.

Dialyssaatti analysoitiin sitten PAGE:lla ja lyofilisoitiin.

GRF-44:n eristys TrpE-GRF hybridipolypeptidistä

GRF-peptidiosan eristämiseksi TrpE-GRF polypeptidi käsiteltiin jäljempänä kuvatuin kemiallisin reaktioin.

1) Cys-tähteiden pelkistys ja karboksiamidometylaatio

Pelkistys- ja karboksiamidometylaatio-olosuhteet otettiin julkaisusta G. Allen: Laboratory Techniques in biochemistry and Molecular Biology, Vol. 9, siv. 28, T. S. Work ja R. H. Burdon, Elsevier, 1981). Aikaisemmin valmistettu ja lyofilisoitu TrpE-GRF polypeptidi liuotettiin seuraavaan puskuriin: Tris-HCl 0,5 M; EDTA 0,1 %, guanidiini-HCl 6M pH 8,5.

Lopullinen proteiinipitoisuus oli 2 %. Sitten lisättiin DTT:tä pitoisuudeksi, joka oli 15 kertaa korkeampi kuin proteiinin Cys-pitoisuus. Seosta inkuboitiin sitten 2 tuntia 50 °C:ssa ja jodoasetamidia lisättiin kaksi kertaa DTT-pitoisuuden. Pimeässä huoneenlämpötilassa 30 minuutin inkubaation jälkeen reaktio keskeytettiin lisäämällä beta-merkaptetanolia.

Reaktioseosta dialysoitiin 2 tunnin ajan vettä vastaan ja yön yli 10 mM NH_4HCO_3 vastaan. Tämä materiaali, joka sisälsi karboksiamidometyloidun TrpE-GRF polypeptidin, lyofilisoitiin tämän jälkeen.

2) Jodosobentsoehapon reaktio

Käytetty menetelmä on pääosin kuvattu julkaisussa A. Fontana et. al.: Biochemistry, 20, 6997, 1981. 5 mg jodosobentsoehappoa liuotettiin 375 µl:aan 4M guanidiini-HCl 80 % etikkahappoon.

Tähän liuokseen lisättiin 7,5 μ l p-kresolia ja sitten siihen liuotettiin 5 mg karboksiamidometyloitua TrpE-GRF:ää. Reaktioon annettiin edetä 20 tuntia pimeässä huoneenlämpötilassa. Sitten lisättiin 750 μ l vettä ja 10 minuutin kuluttua seos sentrifugoitiin 5 minuuttia 12000 g:ssa. Vesifaasi sisältää peptidit, joiden joukossa on GRF-44.

3) GRF-44:n puhdistus

Edellä saadusta vesiliuoksesta poistettiin suolat geelisuodattamalla Sephadex G-25 1 x 50 cm pylvään läpi, joka oli tasapainotettu 5 % etikkahappoa vastaan. Virtausnopeus oli noin 3 ml/tunti. Läpivirranut liuos kerättiin ja sen tilavuutta pienennettiin haihduttamalla. Näin saatu konsentroitunut liuos analysoitiin HPLC:llä käyttäen C18 pylvästä, joka oli tasapainotettu 10 mM H_3PO_4 :llä, jonka pH oli säädetty 3,5:een Et_3N :llä.

Peptidit eluoitiin asetonitriilillä ja kerättiin fraktioissa, jotka analysoitiin myöhemmin RIA:lla.

Tulokset osoittivat immunoreaktiivisuutta pääasiallisessa piikissä.

TrpE-GRF40, TrpE-GRF37 ja TrpE-GRF29 hybridipolypeptidit ja vastaavat GRF40, GRF37 ja GRF29 peptidit voidaan saada edellä kuvattujen TrpE-GRF44 ja GRF44 tuoton kanssa analogisin menetelmin.

W3110 Δ TrpE5tna2 solut, jotka sisältävät tässä kuvatut plasmidit, on talletettu ATCC:hen ja niiden talletusnumerot ovat:

W 3110 Δ TrpE5 tna2 (pSP2) ATCC n. 53056
W 3110 Δ TrpE5 tna2 (pSP2-del) ATCC n. 53058
W 3110 Δ TrpE5 tna2 (pSP19) ATCC n. 53054

Patenttivaatimukset

1. Hybridigeeni, t u n n e t t u siitä, että se käsittää DNA-sekvenssin, joka koodaa TrpE:lle homologista aminohappojärjestystä fuusioituna lukuraamissa rakennegeeniin, joka koodaa Trp-GRF:a, jonka ensimmäistä N-päänteistä tyrosiini-kodonia edeltää välittömästi Trp:n kodoni.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridigeeni, t u n n e t t u siitä, että TrpE:lle homologinen aminohappojärjestys käsittää TrpE:n aminohapot 1...323.
3. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen 1...2 mukainen hybridigeeni, t u n n e t t u siitä, että GRF on GRF-44, GRF-40, GRF-37 tai GRF-29.
4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen 1...3 mukainen hybridigeeni, t u n n e t t u siitä, että se on toiminnallisesti liitetty DNA sekvenssiin, joka kykenee aikaansaamaan mainitun rakennegeenin ilmentymiseen mikrobissa.
5. Replikoituva mikrobialinen ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 4 mukaisen hybridigeenin.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen replikoituva mikrobialinen ekspressiovektori, t u n n e t t u siitä, että vektori on plasmidi.
7. Bakteeri-isäntä, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukaisella ekspressiovektorilla.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen bakteeri-isäntä, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli-kanta.
9. Menetelmä hybridipolypeptidin valmistamiseksi, joka hyb-

ridipolypeptidi käsittää Trp-GRF:n, jossa ensimmäistä N-päätteistä Tyr-aminohappoa edeltää välittömästi Trp-aminohappo, t u n n e t t u siitä, että patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukaista bakteeri-isäntää kasvatetaan sopivassa ravintoliuoksessa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressiovektori sisältää jonkin patenttivaatimuksen 2...4 mukaisen hybridigeenin ja että mikro-organismia kasvatetaan sellaisen indolipitoisuuden läsnäollessa, joka riittää solujen kasvuun sekä Trp-operonin derepressoituna pitämiseen.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solut kasvatetaan ilmastuksessa, joka riittää osittain inaktivoimaan indolin.

12. Hybridipolypeptidi, joka sisältää TrpE-GRF:n, t u n n e t t u siitä, että ensimmäistä N-terminaalista Tyr-aminohappoa edeltää välittömästi Trp-aminohappo ja Trp-GRF-järjestystä edeltää välittömästi TrpE:lle homologinen aminohappojärjestys.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen hybridipolypeptidi, t u n n e t t u siitä, että TrpE:lle homologisena aminohappojärjestyksenä on TrpE:n 1...323.

14. Patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen hybridipolypeptidi, t u n n e t t u siitä, että GRF on GRF-44, GRF-40, GRF-37 tai GRF-29.

Patentkrav

1. Hybridgen, k ä n n e t e c k n a d av att den omfattar en DNA-sekvens, som kodar för en TrpE-homolog aminosyrasekvens fusionerad i en läsram med en strukturen som kodar för Trp-GRF och som har ett kodon för Trp omedelbart före det första N-terminala tyrosinkodonet.
2. Hybridgen enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att den TrpE-homologa aminosyrasekvensen omfattar aminosyrorna 1...323 av TrpE.
3. Hybridgen enligt något av de föregående patentkraven 1...2, k ä n n e t e c k n a d av att GRF är GRF-44, GRF-40, GRF-37 eller GRF-29.
4. Hybridgen enligt något av de föregående patentkraven 1...3, k ä n n e t e c k n a d av att den är operativt bunden till en DNA-sekvens som förmår åstadkomma expression av den nämnda strukturen i en mikrob.
5. Replikerbar mikrobiell expressionsvektor, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en hybridgen enligt patentkravet 4.
6. Replikerbar mikrobiell expressionsvektor enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d av att vektorn är en plasmid.
7. Bakterievärd, k ä n n e t e c k n a d av att den är transformerad med en expressionsvektor enligt patentkravet 5 eller 6.
8. Bakterievärd enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d av att den är en stam av E. coli.

9. Förfarande för framställning av en hybridpolypeptid som omfattar en Trp-GRF där aminosyran Trp är omedelbart före den första N-terminala aminosyran Tyr, k ä n n e t e c k n a t av att en bakterievärd enligt patentkravet 7 eller 8 odlas i ett lämpligt näringsmedium.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t av att expressionsvektorn innehåller en hybridgen enligt något av patentkraven 2...4 och att man odlar mikroorganismen i närvaro av en indolkoncentration som räcker för tillväxt av cellerna samt för att hålla Trp-operonen depresserad.

11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t av att cellerna odlas under luftning som är tillräcklig för att delvis inaktivera indolet.

12. Hybridpolypeptid som innehåller en TrpE-GRF, k ä n n e t e c k n a d av att aminosyran Trp är omedelbart före den första N-terminala aminosyran Tyr och en TrpE-homolog aminosyrasekvens är omedelbart före Trp-GRF-sekvensen.

13. Hybridpolypeptid enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a d av att den TrpE-homologa aminosyrasekvensen är 1...323 av TrpE.

14. Hybridpolypeptid enligt patentkravet 12 eller 13, k ä n n e t e c k n a d av att GRF är GRF-44, GRF-40, GRF-37 eller GRF-29.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
 TrpTyrAlaAspAlaIlePheThrAsnSerTyrArgLysValLeuGlyGlnLeuSerAlaArgLysLeu
 GATCTGGTACGCAGACGCTATCTTTACTAACTCTTACCGTAAAGTTC TGGGCCAGCTGCTGCAGGCAAGCTT
 ACCATGCGTCTGCGATAGAAATGATTGAGAATGGCATTTC AAGACCCGGTCGACAGACGTCGCTTCGAA

 Bgl II

23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 Stop
 LeuGlnAspIleMetSerArgGlnGlnGlyGluSerAsnGlnGluArgGlyAlaArgAlaArgLeu
 CTGCAGGATATCATGTCTAGACAGCAGGGCGAATCTAACCAGGAGCGTGGCGCCCGTGCACGCCTGTAG
 GACGTCCTATAGTACAGATCTGTGTCGCCGCTTAGATTGGTCCCTCGCACCCGGGGCACGTCCGGACATCCTAG

_____ Bst XI _____
 xbaI NotI BamHI

FIG. 1

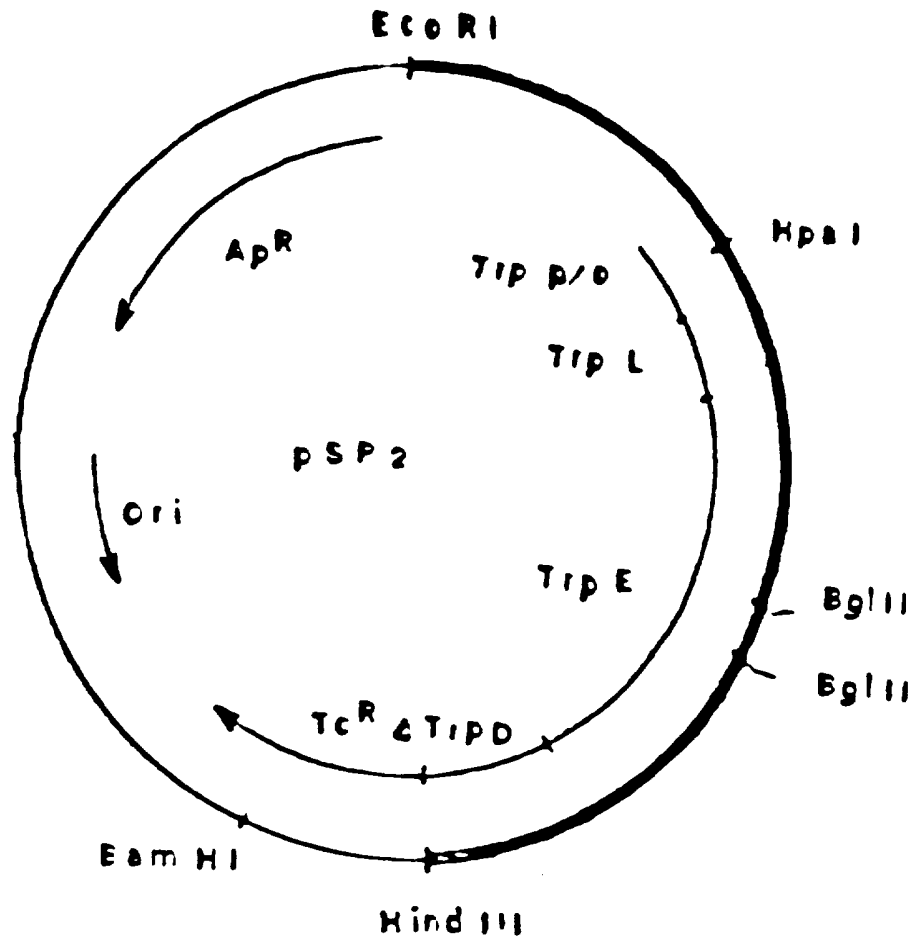


FIG 2

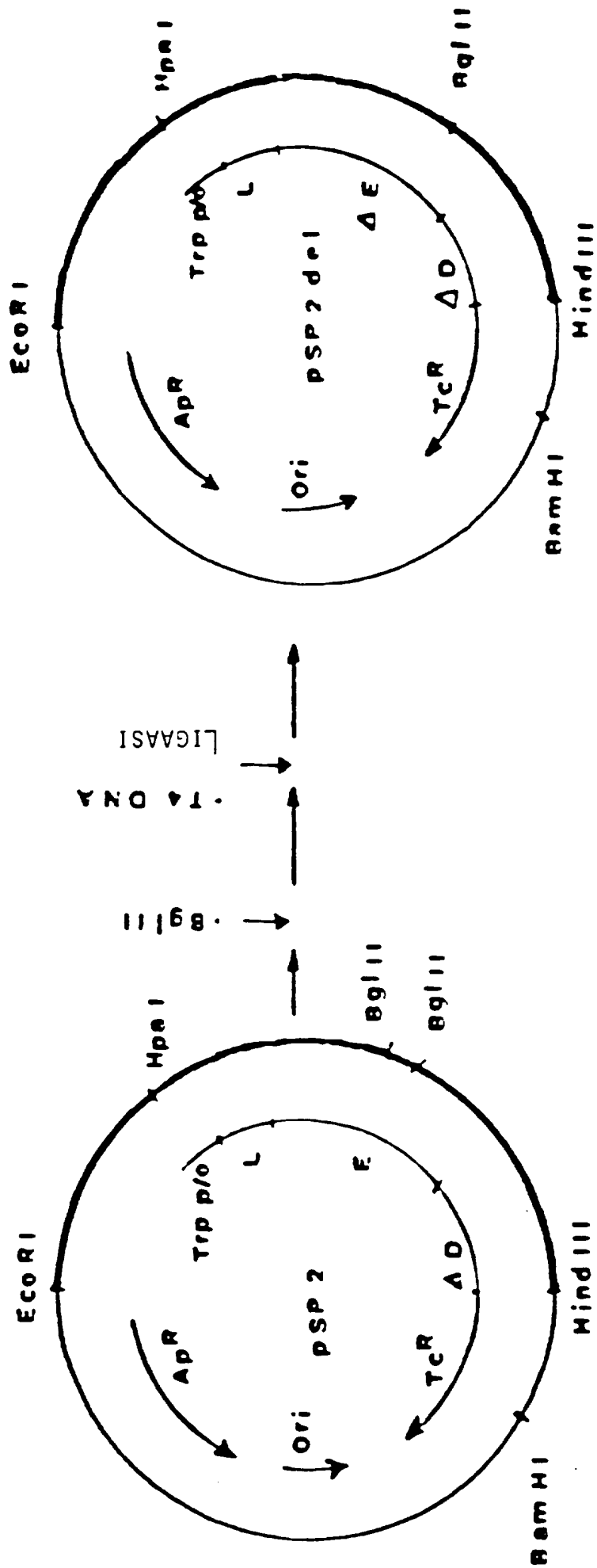


FIG. 3

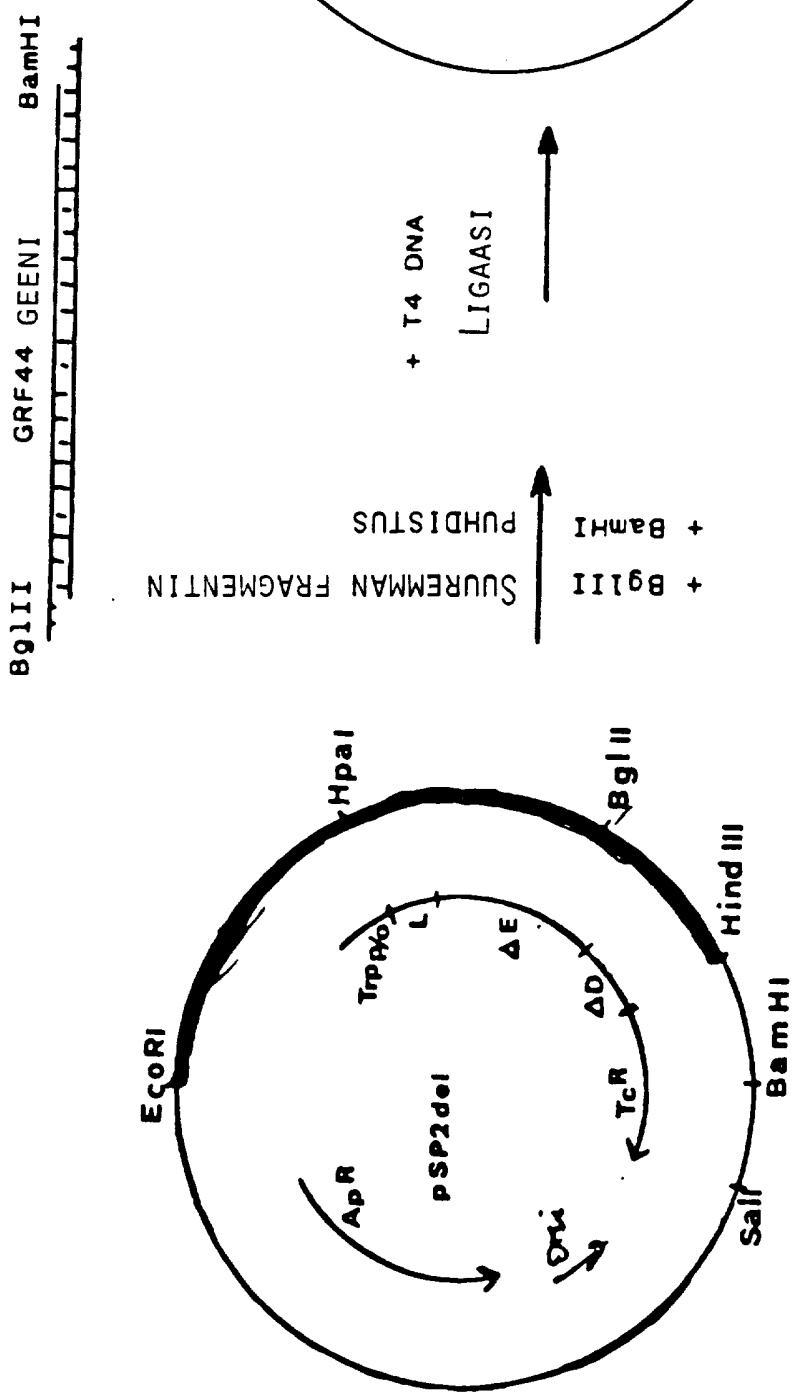


Fig.4

TrpE-GRF hybridipolypeptidin aminohappojärjestys

MET GLN TRP GLN LYS PRO THR LEU GLU LEU LEU THR CYS GLU GLY ALA
 TYR ARG ASP ASN PRO THR ALA LEU PHE HIS GLN LEU CYS GLY ASP ARG
 PRO ALA THR LEU LEU LEU GLU SER ALA ASP ILE ASP SER LYS ASP ASP
 LEU LYS SER LEU LEU LEU VAL ASP SER ALA LEU ARG ILE THR ALA LEU
 GLY ASP THR VAL THR ILE GLN ALA LEU SER GLY ASN GLY GLU ALA LEU
 LEU ALA LEU LEU ASP ASN ALA LEU PRO ALA GLY VAL GLU SER GLU GLN
 SER PRO ASN CYS ARG VAL LEU ARG PHE PRO PRO VAL SER PRO LEU LEU
 ASP GLU ASP ALA ARG LEU CYS SER LEU SER VAL PHE ASP ALA PHE ARG
 LEU LEU GLN ASN LEU LEU ASN VAL PRO LYS GLU GLU ARG GLU ALA MET
 PHE PHE SER GLY LEU PHE SER TYR ASP LEU VAL ALA GLY PHE GLU ASP
 LEU PRO GLN LEU SER ALA GLU ASN ASN CYS PRO ASP PHE CYS PHE TYR
 LEU ALA GLU THR LEU MET VAL ILE ASP HIS GLN LYS LYS SER THR ARG
 ILE GLN ALA SER LEU PHE ALA PRO ASN GLU GLU GLU LYS GLN ARG LEU
 THR ALA ARG LEU ASN GLU LEU ARG GLN GLN LEU THR GLU ALA ALA PRO
 PRO LEU PRO VAL VAL SER VAL PRO HIS MET ARG CYS GLU CYS ASN GLN
 SER ASP GLU GLU PHE GLY GLY VAL VAL ARG LEU LEU GLN LYS ALA ILE
 ARG ALA GLY GLU ILE PHE GLN VAL VAL PRO SER ARG ARG PHE SER LEU
 PRO CYS PRO SER PRO LEU ALA ALA TYR TYR VAL LEU LYS LYS SER ASN
 PRO SER PRO TYR MET PHE PHE MET GLN ASP ASN ASP PHE THR LEU PHE
 GLY ALA SER PRO GLU SER SER LEU LYS TYR ASP ALA THR SER ARG GLN
 ILE GLU ILE-TRP-TYR ALA ASP ALA ILE(fig.1).

1 2 3 4 5

FIG. 5