KÖZZÉTÉTELI
55. PÉLDÁNY

3694/91

60523

JAVÍTOTT ELJÁRÁS POLIPEPTIDEK KIFEJEZÉSÉRE

BIOGEN, INC., Cambridge, Massachussets, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1991.02.22.

Elsőbbsége: 1990.02.22.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/01222

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/13151

KIVONAT

A találmány eljárásokkal és köztes termékekkel foglalkozik egy kívánt polipeptid termelési szintjének javításához olyan rekombináns gazdaszervezetben, amelynek genomjába egy "kifejezési sziget" van integrálva. Ez a kifejezési sziget 5' ⟶ 3' irányban az alábbiakat foglalja magában: egy 5' szegélyező terület, a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia, és egy 3' szegélyező terület. A találmány szerinti kifejezési sziget lehetővé teszi, hogy az integrált heterológ DNS szekvencia kifejezése lényegében függő legyen a kifejezési sziget kópiaszámától és lényegében független legyen a gazdaszervezetbe való integrálódás helyétől.

55.278/PA

3648/91

Ügyvédi és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon 153-3733, 131-4200

60523

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

„A" C12N 15/00
C12N 15/11
C12N 15/10
C12N 15/62

JAVÍTOTT ELJÁRÁS POLIPEPTIDEK KIFEJEZÉSÉRE

BIOGEN, INC., Cambridge, Massachussets, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltaláló: MEADE Harry, Newton, Massachussets,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1991.02.22.

Elsőbbsége: 1990.02.22 (483,450) AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/01222

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/13151

A jelen találmány eljárásokkal és intermedierekkel foglalkozik egy kívánt polipeptid termelési szintjének javítására valamely rekombináns gazdaszervezetben. Pontosabban a jelen találmány a "kifejezési sziget"-tel foglalkozik - ez olyan DNS szegmens, amely egy heterológ polipeptidet kódoló DNS szekvenciát tartalmaz -, valamint foglalkozik a kifejezési szigetnek alkalmazásával egy gazdaszervezet átfertőzésére. A kifejezésnek ezt a szigetét magában foglaló gazdaszervezetek meglepően magas szinten termelik a kívánt heterológ polipeptidet. A kifejezési szigetnek beépülése egy gazdaszervezetbe lehetővé teszi, hogy a kifejezendő kívánt polipeptid lényegében független legyen integrálódási helyétől a gazdaszervezet genomban, viszont lényegében függő legyen a kifejezési sziget kópiáinak számától, amelyek integrálódnak a gazdaszervezet genomban.

A szakterületen jól ismert, hogy a polipeptideket ki lehet fejezni és ki lehet választani olyan gazdaszervezetek révén, amelyek a nevezett polipeptidet kódoló DNS szekvenciával vannak átfertőzve vagy transzformálva. Ezzel kapcsolatban pl. az alábbi irodalmi helyek: Gilbert és munkatársai: 4,565,785 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (1986); Villa-Komaroff L. és munkatársai: "A Bacterial Clone Synthesizing Proinsulin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3727-31 (1978), bemutatják, hogy egy kiválasztott polipeptidet szintetizálhatunk egy bakteriális gazdaszervezeten belül és kiválaszthatjuk a sejtmembránon át. Hasonló munkafolyamatot lehet elvégezni állati sejtekben is [Doehmer J. és munkatársai: "Introduction of Rat Growth Hormone Gene Into Mouse Fibroblasts Via A Retroviral DNA Vector: Expression And Regulation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2268-72 (1982)]. Rekombináns fehérjéket kifejeztek még em-

lősökben is egy kifejező rendszer transzgenikus beépítésével egy megtermékenyített embrió pronukleuszába [Bucchini D. és munkatársai: "Pancreatic Expression Of Human Insulin Gene In Transgenic Mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2511-15 (1986); Gordon K. és munkatársai: "Production Of Human Tissue Plasminogen Activator In Transgenic Mouse Milk", Bio/Technology 5(11), 1183-87 (1987)].

Jelenleg azonban még ezen technikák egyike sem sikeres következetesen olyan értelemben, hogy lehetővé tenné valamely kívánt heterológ polipeptid nagy mennyiségű kifejezését olyan gazdaszervezet révén, amely valamely heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát integrált a genomjába. Ez különösen meglepő, ha tekintetbe vesszük a teljesen azonos kifejező kontroll szekvenciákból eredő magas szintű natív fehérje termelést natív környezetben. Így pl. a tej-specifikus kifejező kontroll szekvenciák lehetővé teszik, hogy nagy mennyiségű fehérje, pl. kazein képződjék az emlős mirigyekben és választódjék ki onnan. A teljesen azonos tej-specifikus kifejező kontroll szekvenciákról azonban nem mutatták még ki, hogy nagy mennyiségű heterológ polipeptidet indukálnának, amikor operatívan össze vannak kapcsolva heterológ polipeptidet kódoló szekvenciákkal [lásd pl. Pittins C.W. és munkatársai: "A Milk Protein Gene Promoter Directs The Expression of Human Tissue Plasminogen Activator cDNA To The Mammary Gland In Transgenic Mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5874-78 (1988)]. A kifejezés szintje ez utóbbi konstrukciókban függ a gazdaszervezet genomba integrálódott, a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia kópiaszámától is. Ezen kívül a kifejeződés szintje a helyi hatásoknak is alá van vetve, vagyis ez a kifejeződési szint függ attól, hogy a heterológ polipeptidet

kódoló szekvencia hol integrálódott a genomba [Lee K.F. és munkatársai: "Tissue-Specific Expression Of The Rat Beta Casein Gene In Transgenic Mice", Nucleic Acids Res. 16(3), 1027-41(1988)].

Következésképpen fennáll az igény egy olyan eljárásra, amely növeli egy heterológ fehérjét vagy polipeptidet kódoló DNS szekvencia kifejeződését a gazdaszervezet genomban történő integrálódás helyétől függetlenül. Ezen kívül az ilyen eljárásoknak olyan kifejezést kell nyújtaniok, amely függ a gazdaszervezet genomba integrálódott kópiaszámtól, úgy, hogy a kifejeződési szint szabályozható legyen.

A jelen találmány megoldja ezeket a problémákat olyan módon, hogy a "kifejezési sziget"-et szolgáltatja, amely egy kívánt heterológ polipeptidet kódoló DNS szekvenciát tartalmaz. A jelen találmány szerinti kifejezési sziget első ízben nyújtja egy heterológ polipeptidet kódoló DNS szekvencia magas szintű, helytől független, de a kópiaszámtól függő kifejeződését.

Amint az 1. ábrában bemutatjuk, a jelen találmány szerinti kifejezési sziget 5' $\longrightarrow$ 3' irányban az alábbiakat tartalmazza: egy 5' szegélyező terület, egy heterológ polipeptidet kódoló szekvencia (amely a kívánt heterológ fehérjét vagy polipeptidet kódolja), és egy 3' szegélyező terület. Az 5' szegélyező terület 5' $\longrightarrow$ 3' irányban az alábbiakat tartalmazza: 5' kifejező kontroll szekvenciák, és egy 5' nem transzlatált terület. A kifejező kontroll szekvenciák működőképesen kapcsolódnak a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciához. Az 5' nem transzlatált terület egy transzlációs iniciációs helynél kezdődik és a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia transzlációs rajthelyével végződik. A 3' szegélyező terület az 5' $\longrightarrow$ 3' irányban az alábbiakat tartalmazza: egy 3' nem transzlatált terület, és 3' kifejező

kontroll szekvenciák, ahol a kontroll szekvenciák működőképesen össze vannak kapcsolva a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával. Végül a találmány szerinti kifejezési sziget 5' és 3' szegélyező területeit megfelelő méret és szerkezet jellemzi, amely hatásosan változtatja meg a kívánt fehérje vagy polipeptid termelési szintjét lényegében függően a gazdaszervezet genomjába integrálódott kifejezési sziget kópiaszámától és lényegében függetlenül ezek integrálódási helyétől.

A találmány foglalkozik a kifejezési sziget alkalmazásával valamely gazdaszervezet átfertőzésére, és foglalkozik ezekkel az átfertőzött gazdaszervezetekkel. Azok a gazdaszervezetek, amelyek genomjukba integrálták a kifejezési szigetet, magas szinten termelik azt a heterológ polipeptidet, amelyet egy, ezen a kifejezési szigeten belül levő DNS szekvencia kódol. Ez a szignál szekvencia kódoló terület fuzionálva van a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia 5' végéhez, és azonos leolvasó keretben van azzal. A szignál szekvenciát kódoló terület működőképesen össze van kapcsolva a kifejezés kontroll szekvenciákkal is úgy, hogy a gazdaszervezet, amelynek genomja ezt a kifejezési szigetet hordozza, képes legyen termelni, kiválasztani, és előnyösen fel is dolgozni a kívánt fehérjét vagy polipeptidet a kombinált szignál-heterológ polipeptid kódoló szekvencia által kódolt elő-fehérjéből vagy elő-polipeptidből.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábra egy jelen találmány szerinti tipikus "kifejezési sziget" (A) és egy előnyös "kifejezési sziget" (B) vázlatos bemutatása.

A 2. ábra szarvasmarha alfa S-1 kazein 5' és 3' szegélyező területeit tartalmazó plazmid (CAS 1288) megalkotását ábrázolja.

A 3. ábra az urokináz strukturgén bevezetését ábrázolja CAS 1288-ba, hogy kialakuljon a CAS 1295, a kifejezési sziget.

Abból a célból, hogy az itt bemutatott találmány könnyebben legyen megérthető, az alábbi részletes leírást adjuk.

A leírásban az alábbi fogalmakat alkalmazzuk:

Kifejezés kontroll szekvenciák --- olyan szekvenciák, amelyek ellenőrzik és szabályozzák géntermékek kifejezését mind transzkripciós (átírási), mind transzlációs szinten, amikor operatívan (működőképesen) kapcsolódnak valamely strukturgénhez (egy polipeptidet kódoló DNS-hez). Ezek magukban foglalják a promotor és fokozó (enhancer) területeket, riboszóma kötőhelyeket , poliadenilező szignálokat és más olyan szekvenciákat, amelyek gének kifejezéséhez hasznosan.

Működőképesen (operatívan) kapcsolt --- 5' és 3' kifejezés kontroll szekvenciák összekapcsolása valamilyen heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával úgy, hogy a kifejezés kontroll szekvenciák képesek legyenek szabályozni és ellenőrizni a heterológ polipeptid kifejezését és termelését.

Heterológ polipeptidet kódoló szekvencia --- egy kívánt fehérjét vagy polipeptidet kódoló szekvencia, amely egy gazdaszervezet genomjába van iktatva. Ez a DNS szekvencia olyan polipeptidet kódol, amely heterológ a gazdaszervezetre, a szegélyező szekvenciákra vagy mindkettőre nézve. A heterológ polipeptidet kódoló szekvencia adott esetben saját transzlációs stop kodont tartalmaz 3' végén. A heterológ polipeptidet kódoló szekvencia tartalmazhat saját szignál szekvencia kódoló területet is.

Szignál szekvencia kódoló terület --- olyan DNS szekvencia, amely egy szignál peptidnek nevezett, tipikusan hidrofób aminosavakból álló szekvenciát kódol. A szignál peptid lehetővé teszi, hogy egy polipeptid, amely hozzá kötődik, át tudjon jutni egy

biológiai membránon.

Kifejezési sziget --- DNS konstrukció, amely 5' ⟶ 3' irányban az alábbiakat tartalmazza: egy 5' szegélyező terület, egy heterológ polipeptidet kódoló szekvencia, és egy 3' szegélyező terület. Az 5' és 3' szegélyező területek megfelelő méretűek és szerkezetűek ahhoz, hogy a kívánt fehérje vagy polipeptid termelési szintje lényegében függő legyen a gazdaszervezet genomjába beépült kifejezési sziget konstrukció kópiaszámától, viszont lényegében független legyen a kifejezési sziget integrálódásának helyétől a gazdaszervezet genomján belül.

5' szegélyező terület ---a kifejezési sziget azon része, amely a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciától 5' irányban van. Ez - 5' ⟶ 3' irányban - az alábbiakat foglalja magában: 5' kifejezés kontroll szekvenciák és egy 5' nem transzlatált terület; a kifejezés kontroll szekvenciák működőképesen össze vannak kapcsolva a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával. Az 5' nem transzlatált terület tipikusan egy transzkripciós iniciációs helytől a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia transzlációs rajthelyéig terjed.

3' szegélyező terület --- a kifejezési sziget azon része, amely a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciától 5' irányban van. Ez - 5' ⟶ 3' irányban - az alábbiakat foglalja magában: egy 3' nem transzlatált terület, és 3' kifejezés kontroll szekvenciák. A 3' szegélyező terület magában foglalhatja a strukturgénből a 3' szegélyező területtel eredetileg is társult kódoló szekvencia egészét vagy egy részét.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

Bár nem szándékozunk semmiféle elmélethez kötődni, úgy véljük, hogy a kifejezési sziget lehetővé teszi az 5' és 3'

szegélyező területeken belül levő, még meg nem határozott faktorok számára, hogy működtessék a kifejezés kontroll szekvenciákat és lehetővé tegyék, hogy a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia magasabb termeléssel fejeződjék ki. A kifejezés függ a gazdaszervezet genomjába beépült kifejezési sziget konstrukció kópiaszámától, így lehetővé válik, hogy a polipeptid termelés szintját változtathassuk.

A jelen találmány szerinti kifejezési sziget nagy 5' és 3' szegélyező területet egy puffer zónát is szolgáltatnak úgy, hogy a kifejezés kontroll szekvenciákat izoláljuk a gazdaszervezet kifejezés kontroll szekvenciáiból, amelyeket azután az a környező DNS alkalmazhat, amelybe a kifejezési sziget integrálódott. Ennél fogva mindegy, hogy a kifejezési sziget a gazdaszervezet genomjában hol integrálódik; a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia ettől függetlenül magas szinten fejeződik ki. Ez magával hordozza saját genomikus szerkezetét, így lesz belőle "kifejezési sziget".

Bár nem kívánunk egyetlen elmélethez sem kötődni, úgy véljük, hogy a DNS azon területeinek többsége, amelyek fokozhatják a kifejeződést a kifejezés kontroll szekvenciákból, egy adott strukturgén 5' és 3' szegélyező szekvenciáiban található. Ennél fogva egy strukturgén izolálása után 5' és 3' szegélyező területeikkel együtt a strukturgén részben vagy egészben kimetszhető és helyettesíthető bármely heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával olyan módon, hogy lehetővé váljék a kifejezés olyan szinten, amely az eredeti strukturgén kifejezésének felel meg. Egy másik eljárás szerint a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát beiktathatjuk a strukturgén 5' végénél a gén egyidejű eltávolítása nélkül. Ebben a kiviteli módban a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia szintén kifejezhető olyan szinten,

amely az eredeti strukturgén kifejeződési szintjének felel meg.

A kifejezés kontroll szekvenciák közül a jelen találmány különböző kiviteli módjaiban azok használhatók, amelyek magas szinten irányítják a kifejezést sejtek bizonyos típusaiban, illetve a sejtnövekedés vagy differenciálódás adott stádiumaiban, vagy speciális tenyésztési körülmények között. A jelen találmány szerinti transzgenikus gazdaszervezetben előnyösek a szövet-fajlagos kifejezés kontroll szekvenciák.

Ha emlős gazdasejteket alkalmazunk, a hasznos kifejezés szabályozó szekvenciák a gazdasejtből magából származhatnak, mégpedig olyan natív szekvenciákból, amelyek egy magas szinten kifejezett terméket kódolnak. Származhatnak azonban más magas szinten kifejeződő eukarióta génekből is, pl. β-aktint, kollagént, miozint, albumint, metallotioneint vagy humán növekedési hormont kódoló génekből.

A jelen találmány egy előnyös kiviteli módja fehérjék termelését idézi elő transzgenikus emlősökben. Ez a kiviteli mód előnyösen olyan kifejezés kontroll szekvenciákat alkalmaz, amely szabályozza és ellenőrzi a géntermékek kifejeződését emlős szövetekben; ilyen kifejezés kontroll szekvenciák pl. a kazein promotorok és a béta laktoglobulin promotor. A kazein promotorok pl. az alábbiak lehetnek: alfa kazein promotor, béta kazein promotor, vagy kappa kazein promotor. A kazein promotor és az ezzel társult kifejezés kontroll szekvenciák előnyösen szarvasmarha eredetűek, és legelőnyösebben ezek az alfa S-1 kazein promotor és az ezzel társult kifejezés kontroll szekvenciák.

A kifejezés kontroll szekvenciák származhatnak akár közvetlenül azokból a sejtekből is, amelyeket gazdaszervezetként szándékozunk használni a kifejezési sziget konstrukcióhoz. Először is azonosítani kell a gazdaszervezetben az aktivitás kívánt

szintjével bíró promotort és az ezzel társult kifejezés kontroll szekvenciákat. A kifejezési szigetet úgy kell tervezni, hogy a kifejezési sziget konstrukció, amely a gazdaszervezet genomjában integrálódik, kópiaszám-függően, de helytől függetlenül fejeződjék ki.

Az alábbiakban eljárásokat írunk le kifejezés kontroll szekvenciák azonosítására, az ezeket a szekvenciákat tartalmazó szükséges szegélyező területek klónozására,a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia hozzáadására, és annak vizsgálatára, vajon az így létrejött konstrukció találmányunk szerinti "kifejezési sziget"-e?

Az első lépés az, hogy meghatározzuk azt a gazdaszervezetet és azokat a követelményeket, amelyel lehetővé teszik, hogy a gazdaszervezet magas szinten vagy speciális időpontokban legyen képes kifejezni. Szövettenyészet esetében előnyösen alkalmazhatók a VERAX rendszerben található kollagén gyöngyökön növekedő CHO sejtek.

Abból a célból, hogy egy homológ génre kifejezés kontroll szekvenciákat izoláljunk, amelyek a gazdasejtekben jól megválasztott körülmények között magas szinten fejeződnek ki, egy dúsan kifejezett RNS fajtát kell azonosítanunk. Ezt úgy érhetjük el, hogy egy kiválasztott indukciós és növekedési körülmények között kiválasztott gazdasejtekből izolált poliA RNS-ből cDNS könyvtárat készítünk. A cDNS könyvtárat azután átvizsgáljuk olyan RNS jelzett alikvotját alkalmazva, amelyből a cDNS könyvtárat kialakítottuk. A leginkább pozitív szignálok jelzik azokat a cDNS-eket, amelyek RNS-ei a legdúsabbak a gazdasejtekben a kiválasztott indukciós és növekedési körülmények között. A kiválasztott cDNS-eket azután felhasználhatjuk a kiválasztott gazdasejtekből készített genomikus DNS könyvtárak átvizsgálására

abból a célból, hogy megtaláljuk azokat a genomikus DNS szekvenciákat, amelyek a legdúsabb RNS-eknek felelnek meg. Ezeket a genomikus szekvenciákat, tipikusan kozmidokban [Maniatis T. és munkatársai: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1982)], azután elemezhetjük, hogy meghatározzuk a kozmidban a restrikciós helyeket, a szegélyező szekvenciák mennyiségét és a polipeptidet kódoló területeket.

Egy másik, de kevésbbé előnyös eljárás szerint a kifejezés kontroll szekvenciákat izolálhatjuk olyan módon is, hogy egy kiválasztott körülmények közt nőtt és indukált gazdasejteket átvizsgálunk dúsan termelt fehérjére vagy polipeptidre. Ezt úgy érhetjük el, hogy a gazdaszervezetben termelt összes polipeptidet elemezzük vagy SDS (nátrium-dodecil-szulfát)-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), vagy kétdimenziós gélelektroforézissel. A legdúsabb polipeptidet a legerősebb csíkként azonosítjuk az SDS-PAGE elemzésben, vagy a legnagyobb foltként a kétdimenziós gélen. Miután azonosítottuk, a csíkot vagy foltot kimetszszük a gélről, eluáljuk, és automatizált fehérje szekvenciaelemzésnek vetjük alá. A fehérje szekvenciaelemzésből kapott aminosav-szekvenciára alapozva azután szintetizáljuk a megfelelő oligonukleotidokat. Ezeket az oligonukleotidokat azután jelezhetjük és felhasználhatjuk vizsgáló mintaként (próbaként) megfelelő genomikus szekvenciák azonosítására a gazdasejt DNS-ből alkotott kozmid könyvtárból.

Amikor ennek a dúsan kifejezett génnek a kielégítően részletes térképét meghatároztuk, a strukturgén kódoló szekvenciáit és közbenső szekvenciáit a kozmidokból eltávolíthatjuk pl. megfelelő restrikciós enzimek segítségével, és a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával helyettesíthetjük. Egy másik módszer

szerint a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát a strukturgéntől 5' felé iktathatjuk be. Ebben az eljárásban a strukturgént nem kell kimetszeni. Egy előnyös kiviteli mód szerint a heterológ polipeptid urokináz, amelynek DNS szekvenciáját genomikus könyvtárból izoláljuk és klónozzuk, próbaként már publikált szekvenciákat alkalmazva [Riccio A. és munkatársai: "The Human Urokinase-Plasminogen Activator Gene And Its Promoter", Nucleic Acid Res. 13(8), 2759-71(1985)].

Az így létrejövő konstrukció a heterológ polipeptidet kódoló DNS szekvenciával bír, amelyet mindkét oldalán annak a dúsan kifejeződő génnek a genomikus szekvenciái szegélyeznek, amelyet eredetileg a gazdasejtekből izoláltunk. A különböző hosszúságú 5' és 3' szegélyező szekvenciákat át kell vizsgálnunk, hogy meghatározzuk: milyen méretű szegélyező területek szükségesek a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia kifejezésének irányításához kópiaszám-függő, de helytől független módon.

Abból a célból, hogy meghatározzuk: tartalmaz-e az izolált kozmid annak megfelelő 5' és 3' szegélyező területeket, hogy egy beiktatott heterológ polipeptidet kódoló szekvencia lényegében ugyanolyan szinten fejeződjék ki, mint a magas szinten kifejezett homológ DNS szekvencia, a szelektált DNS szekvenciát szövettenyészet sejtjeibe fertőzzük át, vagy valamely embrió genomjába vezetjük be, hogy transzgenikus állatokat állítsunk elő. Előnyösen azokat a sejteket vagy embriókat alkalmazzuk ebben a lépésben, amelyeket a végső termelésben is alkalmazunk. A transzformált gazdaszervezeteket azután megvizsgáljuk a heterológ fehérje kifejeződésére a jól ismert vizsgálati eljárások bármelyikével. Ezek között találjuk (de eljárásunk nemcsak ezekre korlátozódik) a radioimmunassayt, az ELISA-t, az immunfoltképzést, és azokat a vizsgálatokat, amelyek a kívánt polipeptid

aktivitását mérik. Egy másik előnyös eljárás szerint a többféle növekedési körülmények közt mért mRNS szinteket alkalmazzuk. Ezt elvégezhetjük Northern folt technikával, próbaként a korábban leírt (és a polipeptid szekvenciáknak megfelelő) oligonukleotidokat vagy a korábban azonosított cDNS-eket alkalmazva.

Mivel a gazdasejtekből kiválasztott kifejezés kontroll szekvenciák mutatják azt a képességet, hogy ismert körülmények között (pl. kollagén gyöngyökön, a VERAX rendszerben növekvő CHO sejtekben) irányítsák a homológ gén magas szintű kifejeződését, várható, hogy a heterológ polipeptid kifejeződése lényegében azonos szinten történjék azonos körülmények között. Amennyiben a kozmid-eredetű DNS szekvencia nem nyújt ilyen szintű kifejeződést, akkor más, eltérő hosszúságú 5' és 3' szegélyező területeket tartalmazó kozmidokat kell elemezni lényegében azonos módon, amíg csak megfelelő DNS szekvenciákat nem lokalizálunk.

Az ezen szekvencia által létrehozott heterológ fehérje termelési szintjét azután összevetjük az integrált kifejezési sziget kópiaszámával. A kópiaszámot megfelelő restrikciós enzimes elemzéssel határozzuk meg. Azok a kifejezési konstrukciók, amelyek helytől független, de kópiaszámtól függő kifejezést mutatnak, az optimális "kifejezési szigetek" a jelen találmány szerint.

Egy előnyös kiviteli mód szerint egy gazdaszervezet, amely magában foglal egy találmányunk szerinti kifejezési szigetet, kiválasztja a kívánt polipeptidet. A polipeptidek kiválasztását úgy érjük el, hogy egy szignál peptidet kódoló DNS szekvenciát a megfelelő leolvasó keretben fuzionálunk a heterológ polipeptidet kódoló DNS-sel. A szignál peptid mérete nem kritikus ebben a találmányban. Minden, ami szükséges, csak az, hogy a szignál

peptid legyen megfelelő méretű és szekvenciájú ahhoz, hogy hatékonyan elősegítse a heterológ polipeptid kiválasztását. A szignál peptidet kódoló szignál szekvenciákra példák lehetnek a természetben a kifejezés kontroll szekvenciákkal társult szignál szekvenciák, a természetben a kívánt heterológ fehérjével vagy polipeptiddel társult szignál szekvenciák, a heterológ polipeptid forrására nézve natív szignál szekvenciák, a kifejezés kontroll szekvenciák forrására nézve natív szignál szekvenciák és bármely más szekvencia, amely működőképes szignál peptideket kódol.

A kifejezendő fehérjék közül sok normálisan kiválasztódik és saját szignál peptiddel bír, amelynek megfelelőnek kell lennie a kiválasztás irányításához. Ebben az esetben az ezt a szignált kódoló DNS-t bele lehet érteni a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciába, amely a kifejezési szigetbe beiktatódik. Amikor olyan polipeptidet állítunk elő, amely normálisan nem választódik ki, olyan szignál szekvencia alkalmazása lehetséges, amely a gazdasejtekből normálisan kiválasztódó polipeptidekből vagy más kiválasztódó polipeptidekből származik.

A jelen találmány egyik előnyös kiviteli módja tej-specifikus szignál peptideket kódoló szekvenciákat vagy olyan más szignál peptidek szekvenciáit alkalmazza, amely szignál peptidek használhatók fehérjék érésében és kiválasztásában emlős szövetekben. Ha a kiválasztandó heterológ polipeptid a természetben saját szignál szekvenciájával társul, a természetben a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával társult szignál szekvencia a legelőnyösebb szignál szekvencia.

A szükséges 5' és 3' szegélyező területeket az jellemzi, hogy képesek kifejeződést előidézni a kifejezési sziget konstrukcióból helytől független, de kópiaszámtól függő módon. A

szegélyező szekvenciák hossza nem kritikus mindaddig, amíg a kívánt tulajdonságokat megadják a kifejezési konstrukciónak. A felső méretheatárt a DNS manipulálhatóságának könnyűsége határozza meg. A kifejező kontroll szekvenciák eredeti forrásában (az állatban vagy a sejtvonalban) a kifejezés kontroll szekvenciákat elméletileg a teljes kromoszóma szegélyezi. A jelenlegi technikák mintegy 40-50 kb-s DNS szegmens könnyű manipulálhatóságát teszik lehetővé. Ez a jól ismert kozmid technika alkalmazását igényli. A DNS méretében határt jelenthet, hogy ez injektálható legyen az embrió manipulációkhoz alkalmazott tűkön keresztül. Az előnyös technika az, ha olyan nagy 5' és 3' szegélyező területeket alkalmazunk, amilyen nagyokat csak lehet, hogy elegendő elszigetelő területet biztosítsunk a kópiaszám-függőség és a helytől való függetlenség átadásához.

A kívánt heterológ polipeptid kódoló szekvenciája származhat cDNS-ből, genomikus szekvenciákból, szintetikus DNS-ből vagy félszintetikus DNS-ből. Azok között a polipeptid termékek között, amelyeket a jelen találmány szerinti eljárással előállíthatunk, találjuk pl. a VIII. és IX. alvadási faktorokat, a humán vagy állati szérum albumint, szöveti plazminogén aktivátort (tPA), urokinázt, alfa-1-antitripszint, állati növekedési hormonokat, Müller-féle gátló anyagot [Mullerian Inhibiting Substance (MIS)], sejtfelületi fehérjéket, inzulint, interferonokat, interleukinokat, tej-lipázokat, vírusellenes fehérjéket, peptid hormonokat, immunglobulinokat, lipokortinokat, és más heterológ fehérje termékeket.

A kívánt heterológ polipeptidet fúziós fehérjeként is előállíthatjuk, amely a kívánt vagy natív polipeptidben levő aminosavakon túl további aminosavakat is tartalmaz. Így pl. a találmányunk szerinti kívánt heterológ polipeptid előállítható egy

nagyobb heterológ fehérje vagy polipeptid részeként abból a célból, hogy stabilizálja a kívánt polipeptidet, vagy annak tisztítását könnyebbé és/vagy gyorsabbá tegye. Ezt úgy lehet elérni, hogy a heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát a kifejezési szigetbe attól a strukturgéntől vagy részétől 5' hely felé iktatjuk be, amely eredetileg társult a kifejezés kontroll szekvenciához; a beiktatás megfelelő leolvasó keretben történik. Nyílvánvaló, hogy az ilyen konstrukció a heterológ polipeptid terminációs kodon eltávolítását igényli a kifejezési szigetbe való beiktatás előtt.

Egy másik eljárás szerint a fúziós fehérjét kódoló területet megalkothatjuk a kifejezési szigetbe való beiktatás előtt. A fúziós fehérje konstrukció két vagy több heterológ fehérjét kódoló szekvenciát vagy részeit tartalmazhatja, amíg csak a szekvenciák azonos leolvasó keretben vannak. Ilyen konstrukciókat a szakterületen ismert eljárásokkal készíthetünk. A fúziós fehérjét ezután elhasíthatjuk, ha szükséges, és a kívánt fehérjét izolálhatjuk. A kívánt heterológ polipeptidet annak a polipeptidnek a fragmentumaként vagy származékaként állíthatjuk elő, amely eredetileg társult a kifejezés kontroll szekvenciákkal. Ezeknek a fenti változatoknak bármelyike könnyen elvégezhető, csupán a korrekt DNS szekvenciákat kell kiválasztani és/vagy manipulálni. Az ilyen manipulációk a szakterületen jól ismertek.

A fentebb leírt kifejezési sziget konstrukciókat a szakterületen jól ismert eljárásokat alkalmazva készíthetjük el. Így pl. hagyományos kapcsolókat, restrikciós helyeket, stb. alkalmazó különböző ligálási technikákat alkalmazhatunk jó hatásfokkal. A találmányunk szerinti kifejezési szigeteket nagyobb

plazmidok részeként állítjuk elő. Az ilyen készítmények lehetővé teszik a korrekt konstrukciók klónozását és szelektálását hatékony módon, ahogyan ez a szakterületen jól ismert, és lehetővé teszik nagy mennyiségű kifejezési sziget konstrukció kényelmes előállítását.

A plazmid mibenléte nem kritikus a jelen találmány gyakorlatában. Bármely plazmid, amelyről a szakterületen ismert, hogy replikálódni, szelektálódni és nagyobb DNS darabokat hordozni képes, megfelelő hordozó lehet, amelybe be lehet iktatni a találmányunk szerinti kifejezési szigeteket. A találmányunk szerinti kifejezési szigetek legelőnyösebben kényelmes restrikciós helyek közt helyezkednek el a plazmidban úgy, hogy könnyen izolálhatól legyenek a plazmid szekvenciák további részeitől a kívánt gazdaszervezetbe való beépítéshez.

Egy, a kifejezési szigethez megfelelő gazdaszervezet kiválasztását sokféle, a szakterületen ismert tényezővel ellenőrizhetjük. Ezek között találjuk pl. az összeférhetőséget a kiválasztott vektorral, a polipeptid termékek toxicitását, a kívánt heterológ polipeptid kinyerésének könnyűségét, a kifejezési jellemzőket, a heterológ polipeptid speciális feldolgozási igényeit, a biológiai biztonságot és a költségeket.

A gazdaszervezet abszolut biztos kiválasztása nem lehetséges egy adott, kívánt fehérje vagy polipeptid részére a fenti faktorok közül egynek a segítségével, bármelyik is legyen az. Ezeknek a tényezőknek az egyensúlya alapján az a reális kép alakul ki, hogy nem minden gazdaszervezet egyformán alkalmas egy adott heterológ polipeptid hatékony kifejezéséhez.

Az alkalmas emlős gazdasejtek között találjuk a B és T limfocitákat, leukocitákat, fibroblasztokat, hepatocitákat, hasnyálmirigy sejteket, és nem differenciált sejteket. Előnyö-

sen immortalizált (halhatatlanná tett) emlős sejtvonalakat hasznosíthatunk. Az alkalmas emlős sejtvonalak között találjuk pl. az alábbiakat: 3T3, 3T6, STO, CHO, Ltk^-, FTO2B, Hep2B, AR42J és MPC1L. A legelőnyösebb emlős sejtvonalak a CHO, 3T3 és Ltk^-.

Abból a célból, hogy transzgenikus állatokat állítsunk elő, különböző emlősök embrióit alkalmazhatjuk. A gazda embrió kiválasztása olyan tényezőktől függ, mint a heterológ polipeptid kívánt végső sorsa az állatban. Így pl. a heterológ polipeptidek kifejezésénél az egyik előnyös kiviteli mód az emlős tejben levő polipeptidek kifejezése, ahol az előnyös gazda embriók olyan állatokból származnak, amelyek már nagy térfogatú tejtermelésre vannak tenyésztve; ilyenek pl. a tehenek, birkák, kecskék és sertések.

Számos standard munkamenet áll rendelkezésre a kifejezési konstrukció DNS-ének bevezetésére állati sejtekbe. Az általánosan használt átfertőzési eljárások között található az elektroporáció [Potter H. és munkatársai: "Enhancer-Dependent Expression of Human Kappa Immunoglobulin Genes Introduce Into Mouse Pre-B Lymphocytes By Electroporation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77(7), 4216-4200(1980)], a protoplaszt fuzió [Sandri-Goldin R.M. és munkatársai. Mol. Cell. Biol. 1, 743-52(1981)], a kalcium-foszfátos együtt-kicsapás [Graham F.L. és van der Eb A.J.: "A New Technique For The Assay Of Infectivity Of Human Adenovirus 5 DNA", Virology 52(2), 456-67(1973); Miller A.D. és munkatársai: "c-fos Protein Can Induce Cellular Transformation: A Novel Mechanism Of Activation Of A Cellular Oncogene" Cell 36(1), 51-60(1981)], továbbá a DEAE-dextrán-szulfáttal közvetített munkamenetek. Ezen kívül számos változat létezik a DEAE-dextrán-szulfátos és kalcium-szulfátos eljárásokra [Queen C. és

Baltimore D.: "Immunglobulin Gene Transcription Is Activated By Downstream Sequence Elements", Cell 33(3), 741-48(1983); Gorman C.M. és munkatársai: "Recombinant Genomes Which Express Chloramphenicol Acetyl-transferase In Mammalian Cells", Mol. Cell. Biol. 2(9), 1044-41(1982); McIvor R.S. és munkatársai: "Expression Of A cDNA Sequence Encoding Human Purine Nucleoside Phosphorylase In Rodent And Human Cells", Mol. Cell. Biol. 5(6), 1349-57(1985)], amelyek számos előnyt nyújtanak. Így pl. a kalcium-foszfátos együtt-kicsapásos munkamenetek különösen hatékonyak emlős sejteknél, ezeken belül is a CHO sejteknél.

A kifejezési sziget konstrukcióval együtt általában bevezetünk egy szelektálható markert is az emlős sejtekbe, mint elkülönült DNS darabot, azért, hogy azokat a sejteket, amelyek beépítették a kifejező konstrukciót, könnyen kimutathassuk. Az alkalmas szelektálható markerek között találjuk többek között a dihidrofolát reduktázt, a metallotioeneint, a neo-t, a gpt-t és a hisD-t. A kiválasztott sejteket azután átvizsgáljuk a heterológ fehérje kifejezésére.

Standard technikák állnak rendelkezésre a kifejező konstrukció bevezetésére egy emlős embrió genomjába. Az emlősök transzgenikus megváltoztatásának egyik technikája a kifejezési sziget konstrukció mikroinjektálása a megtermékenyített emlős petesejt pronukleuszába; ez azt eredményezi, hogy a konstrukció egy vagy több kópiája integrálódik a genomba és megőrződik a kifejlődő emlősök sejtjeiben. Röviden ismertetve a mikroinjektálási munkamenet abból áll, hogy izolálják a megtermékenyített petesejtet, a pronukleuszt láthatóvá teszik, majd a DNS-t olyan módon vezetik be a pronukleuszba, hogy a petesejteket egy tompa megtámasztó pipettával (mintegy 50 µm átmérőjű) rögzítik, és egy élesre kihegyezett pipetta (mintegy 1,5 µm átmérőjű) alkalmazá-

sával a DNS-t tartalmazó pufferoldatot a pronukleuszba injektálják [lásd pl. Kraemer D. és munkatársai: "Gene Transfer Into Pronuclei Of Cattle And Sheep Zygotes", a "Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo" című szakkönyvben, 221-27. oldal, Cold Spring Harbor Laboratory (kiadó)(1985); Hammer R. G. és munkatársai: "Production Of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs By Microinjection", Nature 315, 680-83(1985); és Gordon J.W. és Ruddle F.H.: "Gene Transfer Into Mouse Embryos: Production Of Transgenic Mice By Pronuclear Injection" Methods in Embryology 101, 411-33(1983)].

A mikroinjektálást előnyösen az egy-sejt állapotban levő embrión hajtják végre, hogy maximális legyen az esély arra: az injektált DNS beépül az állat minden sejtjébe, és a DNS beépül a csírasejtekbe is úgy, hogy az állat utódai ugyanúgy transzgenikusak lesznek. Általában az injektált petesejtekből kifejlődött emlősök legalább 40%-a tartalmazza a klónozott konstrukció legalább egy kópiáját a szomatikus szövetekben, és ezek a "transzgenikus emlős"-ök általában átviszik a gént a csíravonalon keresztül a következő nemzedékbe is. Az így létrejövő transzgenikus emlősök szöveteiből izolált DNS-t a kifejezési sziget jelenlétére Southern folt elemzéssel vizsgálhatjuk. Ha a kifejezési sziget egy vagy több kópiája stabilan integrálódva megmarad az ilyen transzgenikus emlősök genomjában, lehetséges permanens transzgenikus emlős vonalat létesíteni, amely hordozza a kifejezési sziget konstrukciót.

A transzgenikusan megváltoztatott emlősök utódait a születés után megvizsgálhatjuk a kifejezési sziget konstrukciónak a genomba való beépülésére. Ezt a vizsgálatot előnyösen az utód kromoszomális anyagának Southern hibridizálásával lehet végre-

hajtani, a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia egy részletének megfelelő próbát alkalmazva. Azokat az emlős utódokat, amelyekről úgy találjuk, hogy genomjukban tartalmazzák a konstrukciónak legalább egy kópiáját, érettségig neveljük. A jelen találmány egyik előnyös kiviteli módjában ezen utódok nőstényei a kívánt heterológ polipeptidet tejükben vagy tejükkel együtt termelik. Egy másik eljárás szerint a transzgenikus emlősöket tovább tenyésztjük, hogy további transzgenikus utódokat hozzunk létre, amelyek szintén alkalmasak a kívánt heterológ polipeptidek termelésére.

KIVITELI PÉLDÁK

1. PÉLDA - A SZARVASMARHA ALFA S-1 KAZEIN KIFEJEZÉSI SZIGET MEGALKOTÁSA

Erre a technológiára az egyik példa az, hogy a kifejezési sziget konstrukciót ép állat speciális szöveteiben vagy szervrendszerében egy heterológ fehérje termelésére alkalmazzuk. Ebben az esetben a heterológ fehérje magas szintű kifejezését egy emlős emlőmirigyeibe irányítjuk.

Az itt leírt génkonstrukció olyan "kifejezési sziget"-et tartalmaz, amelyben a szarvasmarha alfa kazein génből származó nagy 5' és 3' szegélyező területek humán urokináz genomikus klónjának kifejezését irányítják. Az 5' szegélyező terület egy 21 kb-s, felfelé levő (upstream) alfa kazein szekvenciából áll, amelyben benne foglaltatik az első nem-kódoló exon és a második exon nem-kódoló része. A 9 kb-s 3' szegélyező terület tartalmazza az alfa kazein COOH-terminális felét kódoló exonokat, a poliadenilező szignált, és 2 kb-t a további lefelé levő (downstream) szegélyező szekvenciákból.

A borjú timusz DNS kozmid könyvtárából a szarvasmarha alfa

S-1 kazein gént klónozzuk HC79 kozmid vektorban (Boehringer Mannheim), amint ezt Hohn B. és Collins J. leírták ["A Small Cosmid For Efficient Cloning Of Large DNA Fragments", Gene 11(3-4), 291-98 (1980)]. A timuszt vágóhídról szerezzük be és a DNS-t a szakterületen jól ismert eljárásokkal izoláljuk Maniatis T. és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 271. oldal, Cold Spring Harbor Laboratory (kiadó)(1982)]. A kozmid könyvtárat standard technikák alkalmazásával alkotjuk meg [Grosveld F. és munkatársai: "Isolation Of Beta-Globin-Related Genes From A Human Cosmid Library", Gene 13(3), 227-31(1981)]. A borjú timusz DNS-t részlegesen emésztjük Sau3A-val (New England BioLabs), és NaCl gradiensen (1 mól/l $\longrightarrow$ 5 mól/l) futtatjuk, hogy feldúsítsuk a 30 és 40 kb közötti fragmentumokat. A részlegesen emésztett DNS fragmentumokat azután BamHI -gyel emésztett HC79 kozmid vektorba ligáljuk, amelyet in vitro csomagolás követ lambda extraktumok segítségével (Amersham Corporation, Arlington Heights, Illinois) a gyártó cég útmutatásai szerint. Az in vitro csomagolt anyagot azután felhasználjuk az E. coli K-12 HB101 törzs átfertőzésére. Az ezt a vektort beépített klónokat olyan módon szelektáljuk, hogy 50 μg/ml ampicillint (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) tartalmazó LB lemezeken növesztjük.

Az így létrejövő könyvtárat egy 45 bázispáros oligonukleotid próba, a CAS-1 alkalmazásával vizsgáljuk át. Ezt a CAS-1 szekvenciát (5'-ATGGCTTGATCTTCAGTTGATTCACTCCCAATATCCTTGCTCAG-3') az alfa S-1 kazein Willis I.M. és munkatársai által leírt részleges cDNS szekvenciájára alapozva szintetizáljuk "Construction And Identification By Partial Nucleotide Sequence Analysis Of Bovine Casein And Beta-Lactoglobulin cDNA Clones" DNA 1(4), 375-86(1982) . Ez a szekvencia az érett szarvasmarha kazein 20.-35. aminosavainak felel meg. Ennek az átvizsgá-

lásnak az eredményeképpen három klónt izolálunk (C9, D4 és E1), amelyek tartalmaznak kozmidokat.

Az 5' és 3' szegélyező szekvenciákat az E1 és C9 kozmid klónokból kapjuk. A restrikciós térképezés és a Southern folt elemzés [Southern E.: "Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated By Gel Electrophoresis", J. Mol. Biol. 98(3), 503-517 (1975)], amelyhez a kazein cDNS ismert szekvenciájú területeinek megfelelő oligonukleotid próbákat alkalmazunk [Stewart A.F. és munkatársai: "Nucleotide Sequences Of Bovine Alpha S1-And Kappa-Casein cDNAs", Nucleic Acids Res. 12(9), 3895-3907 (1984); Nagao M. és munkatársai: "Isolation and Sequence Analysis Of Bovine Alpha S1-Casein cDNA Clone", Agric. Biol. Chem. 48(6), 1663-67(1984)], megállapítja, hogy a D4 és E1 kozmidok tartalmazzák a kazein strukturgén (vagyis a kazein fehérjét kódoló DNS szekvencia) egy részét, továbbá tartalmaznak 21 kb-t a fölfelé levő vagy 5' szegélyező szekvenciákból. A C9 kozmid tartalmazza a kazein strukturgén egy részét és kiterjed mintegy 7 kb-re a poliadenilező helytől lefelé. Elvégezzük az E1 és D4 kozmidok szekvenciaelemzését a kazein strukturszekvencia transzkripciós rajtjának megfelelő területben és meghatározzuk, hogy a szekvencia megfelel az azonos területtel kapcsolatban publikált szekvenciának [Yu-Lee L.Y. és munkatársai: "Evolution Of The Casein Multigene Family: Conserved Sequences In The 5' Flanking And Exon Regions", Nucleic Acid Res. 14(4), 1883-1902 (1986)].

A találmányunk szerinti kifejezési sziget megalkotását a 2. ábrában mutatjuk be. A C9 kozmidból a 9 kb-s BamHI fragmentumot al-klónozzuk, amely az alfa kazein 98. aminosavát követő intronon belül levő BamHI helynél kezdődik és az alfa kazein poliade-

nilező szignáljától 2 kb-re lefelé elhelyezkedő másik BamHI helyig folytatódik. Ezt a fragmentumot a 2. ábrán "c-term" jelöléssel jelöljük. Ezt a 9 kb-s fragmentumot BamHI-gyel hasított pUC19-be klónozzuk, így kapjuk meg a pCAS 947-et. A lefelé levő BamHI helyet SalI hellyé alakítjuk olyan módon, hogy a pCAS 947-et részlegesen emésztjük BamHI-gyel, majd ligálunk egy SalI kapcsolóval, a CAS 10-zel, amelynek szekvenciája 5'-GATCGTCGAC-3'. Az így létrejövő plazmidot pCAS 1238-nak nevezzük. Ezt a 9 kb-s BamHI-SalI fragmentumot használjuk a "sziget" 3' szegélyező szekvenciájaként. Ez tartalmazza a 3'-nem transzlatált területet és a 3' kifejezés kontroll szekvenciákat, valamint az alfa S-1 kazeinből származó strukturgén egy részletét.

A következő lépés az 5' szegélyező terület megtervezése. Ezt a területet, amely tartalmazza a transzkripciós rajthelyet, továbbá tartalmaz egy nem-kódoló exont és egy második exont, amelynek egy része szintén nem kódoló, al-klónozzuk. Az E1 kozmidból izolálunk egy 4 kb-s SmaI/BamHI fragmentumot és alklónozzuk BamHI-gyel és SmaI-gyel hasított pUC19-be; így kapjuk meg a pCAS 2276-ot. Ezt a plazmidot BglII-vel hasítjuk, hogy eltávolítsuk a második exon kódoló részét, majd a BglII helyet BamHI hellyé alakítjuk át olyan módon, hogy egy CAS 12 kapcsolóhoz ligáljuk, amelynek szekvenciája 5'-GATCTTGGATCCAA-3'. Az így létrejövő plazmidot, a pCAS 1181-et azután SmaI-gyel és BamHI-gyel emésztjük, hogy eltávolítsuk az E1 kozmid DNS 3 kb-s darabját. A fragmentumot izoláljuk, ligáljuk a pCAS 1238-ból származó 9 kb-s BamHI-SalI fragmentumhoz, majd beiktatjuk az SmaI-gyel és SalI-gyel emésztett pUC19-be, így kapjuk meg a pCAS 1276-ot.

Az így létrejövő konstrukció összekapcsolja a transzkripciós rajthelyet a lefelé levő genomikus szekvenciával; köztük van egy egyedi BamHI klónozó hely, amelybe a heterológ polipeptidet kó-

doló szekvenciát be lehet iktatni. Mivel a végső konstrukciók számos más BamHI helyet is tartalmaznak a genomikus szekvenciákban, a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia klónozó helyet ki kell cserélni mind XhoI helyre, mind NotI helyre a CAS 30 kapcsoló hozzáadásával, amelynek szekvenciája 5'-GATCTCGAGCGCGGC CGCGCT-3'. Az így létrejövő vektor, a pCAS 1277 klónozó helyekként XhoI és NotI helyeket tartalmaz, ezek között van az alfa kazein transzkripciós rajtja és az alfa kazein C-terminális genomikus része.

A pCAS 1277-ből való transzkripciós rajtot és c-term-et azután az El kozmidban található alfa kazein genomikus szekvencia megfelelő részeinek helyettesítésére alkalmazzuk. Mivel a konstrukció 39 kb hosszúságú, a kozmid technikát alkalmazzuk a plazmidok manipulálására. Az eredeti El kozmidot részlegesen emésztjük XmaI-gyel, majd teljességig emésztjük SalI-gyel, hogy eltávolítsuk a kozmidban található alfa kazein gén 3' részének legtöbbjét. Az SmaI és XmaI enzimek azonos felismerő hellyel bírnak, azzal a kivétellel, hogy az XmaI meghagy egy 5' túlnyúlást, míg az SmaI tompa véget hagy hátra. A pCAS 1277-ből származó 12 kb-s XmaI-SalI fragmentumot azután beiktatjuk az XmaIgyel és SalI-gyel hasított kozmidba, hogy helyettesítsük az eltávolított részt.

A ligált termékeket azután in vitro csomagolásnak vetjük alá egy in vitro csomagoló készletet (Amersham Corporation) alkalmazva, és a csomagolt DNS-t E. coli DH5 sejtek átfertőzésére használjuk fel; ezt 50 µg/ml ampicillint (Sigma Chemical Co.) is tartalmazó LB lemezeken végzett szelekció követi. Az ampicillinre rezisztens telepekből plazmidokat vizsgálunk át, a kazein 3'-végére fajlagos próbákat alkalmazva. Azonosítunk és

jellemzünk olyan plazmidokat, amelyek tartalmaznak 21 kb-t a transzkripciós rajttól fölfelé. és tartalmazzák az XhoI/NotI klónozó helyet a kazein gén genomikus 3' végével együtt. Ezen plazmidok egyikét, a CAS 1288-at azután felhasználjuk a heterológ DNS szekvencia kifejezésére.

A humán urokináz genomikus klónját egy genomikus könyvtárból izoláljuk, próbaként közölt szekvenciákat alkalmazva (lásd Riccio A. korábban idézett munkáját). A közölt szekvenciából látható, hogy a gén transzlációs rajthelyétől felfelé van egy ApaI hely, és a poliA transzkripciós szignáltól lefelé is van egy. Oligonukleotid adaptereket (URO 8, amelynek szekvenciája 5'-CGT CGACG-3', és URI 9, amelynek szekvenciája 5'-GTACCGTCGACCGGCC-3') alkalmazunk, hogy SalI helyeket adjunk ehhez a két szegélyező ApaI helyhez. Ez lehetővé teszi, hogy a genomikus klónt az SV40 korai promotortól lefelé behelyezzük egy állati sejt kifejező vektorba úgy, hogy meg is tudjuk vizsgálni a kifejeződést, mielőtt beiktatnánk az alfa kazein kifejezési szigetbe. Az így létrejövő plazmid, a pUK0409, irányítja az autentikus humán urokináz kifejeződését átfertőzött szövettenyészet sejtekben. Mi ennél fogva tudjuk, hogy a genomikus klón működőképes. A következő lépés az urokináz genomikus klón behelyezése a CAS 1288 XhoI klónozó helyébe. Ezeket a lépéseket a 3. ábra ábrázolja.

Az urokináz genomikus klónt egy 8 kb-s SalI fragmentumként izoláljuk pUK0409-ból. A SalI túlnyúló végek képesek ligálódni a CAS 1288-ban talált XhoI klónozó helybe. Van azonban egy másik XhoI hely is az alfa kazein 21 kb-vel feljebb levő területeiben. Mi ennél fogva részleges XhoI emésztést végzünk, ezt ligálás követi az izolált SalI urokináz fragmentummal (lásd a 3. ábrát). A telepekből plazmidokat izolálunk és átvizsgáljuk az

urokináz DNS szekvencia jelenlétére és orientációjára. Ezeknek a plazmidoknak az egyike, a CAS 1295 korrekt orientációban tartalmazza az urokináz gént, amint ezt restrikciós elemzéssel meghatároztuk. Ez a plazmid 5' ⟶ 3' orientációban az alábbiakat tartalmazza: a 21 kb-s lefelé levő terület, az a kazein első nem kódoló exon és intron szekvenciái, az urokinázt kódoló genomikus szekvencia, és a 9 kb-s 3' genomikus alfa kazein terület.

2. PÉLDA A "KIFEJEZÉSI SZIGET" KONSTRUKCIÓ TRANSZGENIKUS BEÉPÍTÉSE EGEREKBE

Abból a célból, hogy transzgenikus kísérleteket hajtsunk végre, a CAS 1295-ben jelen levő prokarióta vektor szekvenciákat eltávolítjuk, mielőtt embriókba injektálnánk. Ezt úgy valósítjuk meg, hogy a CAS 1295-öt ClaI-gyel és SalI-gyel emésztjük, majd gélelektroforézisnek vetjük alá 1% agaróz TBE-n (lásd Maniatis fentebb idézett munkáját). A kifejezési sziget konstrukció eukarióta szekvenciáinak megfelelő 41 kb-s fragmentumot a gélről kihasítjuk és a DNS-t elektroelucióval tisztítjuk. A DNS-t azután egy éjszakán át centrifugáljuk kiegyensúlyozott CsCl gradiensen. A gradiensből eltávolítjuk a DNS csíkot és erőteljesen dializáljuk TNE pufferral szemben 5 mmól/l trisz(pH 7,4), 5 mmól/l NaCl és 0,1 mmól/l EDTA (pH 8,0).

A kívánt genetikai információ fejlődő egér embrióba való transzgenikus beépítésének munkamenete a szakterületen már rögzítve van. Hogan B. és munkatársai eljárását követjük ["Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory (kiadó) (1986)]. A C57B1 és CB6 egerek (Jackson Laboratories) közti keresztezés F1 generációját (Sloan Kettering) alkalmazzuk. Hat hetes nőstényeket szuperovulálunk Gestile (terhes kanca szérum) injekcióval, amelyet 2 nappal

később humán korion ganadotropin injekció követ. A kezelt nőstényeket pároztatjuk C57Bl tenyészhímekkel 24 órával később. A már megtermékenyített embrókat a párzást követő 12 órán belül kivesszük a DNS-sel végzendő mikroinjektáláshoz és az álterhes nőstényekbe való beültetéshez.

Az embrió izolálása után először hialuronidázzal leemésztjük a petesejtet körülvevő kumulusz sejteket. Ezután a kifejezési sziget konstrukciót az embrió pronukleuszába injektáljuk, amíg az méretének 30-50%-ával felduzzad. Az injektált embriókat azután álterhes F1 nőstények petevezetékébe ültetjük be. Az így létrejött élő utódok farkából származó DNS-t átvizsgáljuk, próbaként nick-transzlatált CAS 1295 DNS-t alkalmazva, hogy azonosítsuk azokat az állatokat, amelyek hordozzák a kifejezési sziget konstrukciót. Három transzgenikus állatot azonosítunk. Ezeket az állatokat pároztatjuk és az utódokat megvizsgáljuk a kifejezési sziget konstrukció jelenlétére a fentiek szerint.

A transzgenikus vonalak egyike, amely a kifejezési sziget konstrukció 2-3 kópiáját hordozza, a Mendel-féle szabályok szerint viszi tovább a genetikai anyagot. Ennek a transzgenikus vonalnak a nőstényei, amelyek a CAS 1295 beiktatást hordozzák, tejükben mind termelnek humán urokinázt mintegy 1 mg/ml mennyiségben, amint ezt enzimes vizsgálattal meghatározzuk. Az urokinázt gátoja a 394. monoklonális antitest, amely a humán urokinázra fajlagos (Americana Diagnostica, Inc., New York, New York).

A két másik transzgenikus vonal a konstrukció 20-50 kópiáját hordozza, de nem adja tovább a DNS-t az egerek további generációjának. Úgy véljük, hogy a nagy kópiaszámú vonalak azért képtelenek átadni ezeket a géneket, mert az embriogenezis során

az urokinázak nagy az alapszintje. Az urokináz normálisan embriószövetekben (embrionális őssejtekben) fejeződik ki, és a kifejlődés során működik. Az urokináz kifejeződés alacsony alapszintje a kazein kifejezés kontroll szekvenciákból nem zavarja a fejlődést a gén két kópiáját öröklő embriókban. Ha azonban a kifejezés függ a kópiaszámtól, azok a vonalak, amelyek 20-50 kópiával bírnak, 20-50-szer magasabb alapszinttel rendelkeznek, ezért elég urokinázt fejeznek ki ahhoz, hogy zavarják a megfelelő kifejlődést. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a kifejezett urokináz szintje függ a kópia-számtól.

3. PÉLDA A KIFEJEZÉSI SZIGET KONSTRUKCIÓ ÁTFERTŐZÉSE ÁLLATI SEJTEKBE

A kifejezési sziget konstrukciót és a pSV2-DHFR szelektálható markert [amely az American Type CultureCollection-nál rendelkezésre áll (ATCC 37146)], amely a dihidrofolát reduktáz termelését kódolja emlős sejtekben, együtt vezetjük be DHFR$^-$ CHO sejtekbe elektroporációval. Ezt a technikát ezért választottuk, mert olyan gazdasejtek előállítására képes, amelyeket a stabilan integrálódott idegen DNS jellemez nagy kópiaszámmal. A 0 343 783 számú európai szabadalmi bejelentés részletesen leírja ezt a technikát; ez a bejelentés referenciaként beépül ebbe a bejelentésbe.

Az elektroporáció előtt a pSV2-DHFR plazmidot linearizáljuk AatII-vel egy éjszakán át végzett emésztéssel. A kifejezési sziget szekvenciákat a vektor szekvenciákból olyan módon izoláljuk, hogy a 2. példában leírt módon restrikciós enzimekkel hasítjuk, ezt azután gélelektroforézis követi, hogy lehetővé váljék az elkülönítés és izolálás (lásd Maniatis korábban idézett munkáját). Lazac sperma DNS-t (200 µg), amelyet előzőleg ultra-

hangos kezeléssel 300-1000 bp-s fragmentumokká tördeltünk, adunk ahhoz a keverékhez, amely 200 µg linearizált pSV2-DHFR-t és 0,5 mg/ml kifejezési sziget konstrukciót tartalmaz. Abból a célból, hogy a DNS-t kicsapjuk, NaCl-t adunk a keverékhez 0,1 mól/l végső koncentrációig. Ezután 2,5 térfogat etanolt adunk hozzá és a keveréket 10 percig száraz jégen inkubáljuk. 10 percig centrifugáljuk 4°C hőmérsékleten, majd az etanolt leszívjuk és a DNS üledéket 15 percen át levegőn szárítjuk egy szövettenyésztő tartályban. A DNS üledéket azután újra szuszpendáljuk 800 µl HeBS pufferban [20 mmól/l Hepes/NaOH(pH 7,05); 137 mmól/l NaCl; 5 mmól/l KCl; 0,7 mmól/l Na_2HPO_4; 6 mmól/l glükóz) legalább 2 órával az elektroporáció előtt.

Mintegy 2.10^7 $DHFR^-$ CHO sejtet [a CHO-DUKX-B1 nevű klónból szubklónozzuk, amelyet Urlaub és Charis írnak le az alábbi közleményben: "Isolation Of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient In Dihídrofolate Reductase Activity", Proc. Natl. Acad. Sci.USA 77, 4216-20(1980)] alkalmazunk mindegyik elektroporációnál. A $DHFR^-$ CHO sejteket három nappal az elektroporáció előtt passzáljuk, és az elektroporációhoz való kinyerés időpontjában a 10 cm-es lemezeken a tenyészet mintegy 50%-ban összefolyó. A $DHFR^-$ CHO sejteket tripszines kezeléssel távolítjuk el a lemezekről, majd a tripszint lemezenként 8,0 ml α' tápközeg [MEM alfa, ribonukleotidokkal és dezoxiribonukleotidokkal kiegészítve (10-10 ng/l adenozin, citidin, guanozin, uridin, 2'-dezoxi-adenozin, 2'-dezoxi-guanozin és 2'-dezoxi-timidin; 11 ng/l 2'-dezoxi-citidin hidroklorid)(Gibco Laboratories, Grand Island, New York)], 10% borjú embrió szérum (Hazelton, Lenexa, KS) és 4 mmól/l glutamin (M.A. Bioproducts, Walkersville, Maryland) hozzáadásával inaktiváljuk. A lemezekről leválasztott sejteket azután összegyüjt-

jük és 1000 fordulat/percnél 4 percen át centrifugáljuk. A tápközeg legnagyobb részét leszívjuk a sejtüledékről, és a sejteket újra szuszpendáljuk a megmaradt tápközeg-maradékban a cső kocogtatásával.

A kifejezési szigetet, a pSV2-DHFR-t, valamint a lazac sperma DNS-t - 800 µl 1xHeBS-ben szuszpendálva - azután hozzáadjuk a DHFR$^-$ CHO sejtszuszpenzióhoz. Az így létrejövő keveréket azonnal átvisszük egy elektroporációs küvettába. Az elektroporációs berendezés kondenzátorát 960 µF-ra, és feszültségét 300 V-ra állítjuk be. Egy egyedi löketet, amely mintegy 10 milli-másodpercig tart, adunk a küvetta tartalmának szobahőmérsékleten. A sejteket azután 8-10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd átvisszük egy 14 ml α^+ tápközeget tartalmazó csőbe. A sejteket a fentiek szerint centrifugáljuk. A tápközeg leszivatása után a nedves sejtüledéket újra szuszpendáljuk a cső kocogtatásával, majd friss α^+ tápközeget adunk hozzá. A szuszpendált sejteket azután tenyésztő lemezekre oltjuk át nem szelektív tápközegre 2 napra, hogy lehetővé váljék az elektroporáció utáni sejtek kinyerése és a szelektív gén kifejezése. Az életképes CHO sejtek mintegy 20-30%-áról úgy véljük, hogy beépítette a kifejezési sziget/pSV2-DHFR-t, és így túlélte a szelekciós munkafolyamatot. Ennél fogva 10 cm-es lemezenként mintegy 1.10^7 teljes sejtet oltunk át és tenyésztünk 37°C hőmérsékleten, 5,5% CO_2-t tartalmazó inkubátorban.

Két napos helyreállítási periódus után a sejteket a tenyésztő lemezről tripszines kezeléssel eltávolítjuk a fentebb leírtak szerint , megszámoljuk és 6 db 10 cm-es lemezre oltjuk mintegy 1.10^6 sejt/lemez sűrűséggel, α^- tápközegben (Sigma Chemical Co.). A kifejezési szigetet és a pSV2-DHFR-t tartalmazó sejteket 4 napos, α^- tápközegen végzett inkubálás után szelektáljuk. A szelek-

tált sejteket azután urokináz kifejezésére megvizsgáljuk standard technikákkal, pl. kereskedelmi forgalomban kapható Spectrozyme kolorimetriás vizsgáló készlettel (Americana Diagnostica, Inc.)

Számos klónt izolálunk, amelyek különböző szinten fejeznek ki urokinázt. Ezekből a klónokból DNS-t és RNS-t izolálunk, és Northern, illetve Southern elemzést végzünk, hogy meghatározzuk a kifejezési sziget kontstrukció transzkripciós szintjét és kópiaszámát. Ez az elemzés feltárja, vajon az urokináz üzenet kifejezése függvénye-e a kópiaszámnak, és független-e az integrált konstrukció integrálódási helyétől.

Egy jelen találmány szerinti konstrukciót, amely tartalmazza a CAS 1288 plazmidot, példaként egy olyan tenyészet testesít meg, amely az In Vitro International, Inc.-nél (Linthicum, Maryland) lett deponálva 1990. február 1-én; ebben a CAS 1288 azonosítható, és ez a CAS 1288 plazmid E. coli DH5-ben van. Ennek deponálási száma IVI 10232 volt; a törzset később áthelyeztük az American Type Culture Collection-ba, ahol az ATCC 68776 számot kapta.

Egy második, jelen találmány szerinti konstrukciót, amely a CAS 1295 plazmidot tartalmazza, példaként egy olyan tenyészet testesít meg, amely az In Vitro International, Inc.-nél (Linthicum, Maryland) lett deponálva 1990. február 1-én; ebben a CAS 1295 plazmid E. coli DH5-ben van. Ennek deponálási száma IVI 10231 volt; a törzset később áthelyeztük az American Type Culture Collection-ba, ahol az ATCC 68776 számot kapta

Bár itt egy sor kiviteli módját ismertettük találmányunknak, nyílvánvaló, hogy alapvető konstrukciónk változtatható . Így más olyan kiviteli módokat hozhatunk létre, amelyek a jelen találmány munkameneteit és kompozícióit alkalmazzák. Így tehát a találmány oltalmi körét nem a példákban megadott speciális kiviteli módok, hanem a mellékelt igénypontok szabják meg.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1.) Eljárás egy kívánt polipeptid magas szintű termelésére valamely gazdaszervezetben azzal jellemezve, hogy

i.) legalább egy kifejezési szigetet integrálunk az említett gazdaszervezet genomjába, ahol az említett kifejezési sziget 5' ⟶ 3' irányban tartalmaz egy 5' szegélyező területet, egy heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát és egy 3' szegélyező területet; az említett 5' szegélyező terület tartalmaz 5' kifejezés kontroll szekvenciákat működőképesen összekapcsolva egy említett heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával, és egy 5' nemtranszlatált területet; az említett 3' szegélyező terület tartalmaz egy 3' nem transzlatált területet és 3' kifejezés kontroll szekvenciákat működőképesen összekapcsolva az említett heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával; és az említett kifejezési sziget 5' és 3' szegélyező területei megfelelő méretűek és szerkezetűek ahhoz, hogy hatásosan függővé tegyék a kívánt heterológ polipeptid termelését a gazdaszervezet genomjába integrált kifejezési sziget kópiaszámától, és lényegében függetlenné tegyék a kifejezési sziget integrálódási helyétől a gazdaszervezet genomban; és

ii.) az említett gazdaszervezetet tenyésztjük olyan körülmények között, amely lehetővé teszi a kívánt heterológ polipeptid kifejeződését.

2.) Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett heterológ polipeptidet kódoló szekvencia tartalmaz működőképes szignál szekvenciát kódoló területet is.

3.) A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett szignál szekvenciát kódoló terület egy tejspecifikus fehérje génből származik.

4.) A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a tejspecifikus fehérje gén kazein gén.

5.) A 2.-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezet valamely tejelő emlős, az alábbiak közül: egér, szarvasmarha, juh, kecske és sertés; és az 5' és 3' szegélyező szekvenciák egy tejspecifikus fehérje génből származnak.

6.) Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia az alábbi polipeptidek valamelyikét kódoló szekvencia: tPA, urokináz, Müller-féle gátló anyag (Mullerian Inhibiting Substance), valamely interferon, VIII. és IX. alvadási faktor, valamely állati növekedési faktor, inzulin, valamely interleukin, valamely immunglobulin és valamely lipokortin.

7.) Kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy 5' $\longrightarrow$ 3' irányban tartalmaz egy 5' szegélyező területet, egy heterológ polipeptidet kódoló szekvenciát és egy 3' szegélyező területet; az említett 5' szegélyező terület tartalmaz 5' kifejezés kontroll szekvenciákat működőképesen összekapcsolva egy említett heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával, és egy 5' nem-transzlatált területet; az említett 3' szegélyező terület tartalmaz egy 3' nem transzlatált területet és 3' kifejezés kontroll szekvenciákat működőképesen összekapcsolva az említett heterológ polipeptidet kódoló szekvenciával; és az említett kifejezési sziget 5' és 3' szegélyező területei megfelelő méretűek és szerkezetűek ahhoz, hogy hatásosan függővé tegyék a kívánt heterológ polipeptid termelését a gazdaszervezet genomjába integrált kifejezési sziget kópiaszámától, és lényegében függetlenné tegyék a kifejezési sziget integrálódási helyétől a gazdaszervezet genomban.

8.) A 7. igénypont szerinti kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy az említett heterológ polipeptidet kódoló szekvencia tartalmaz működőképes szignál szekvenciát kódoló területet is.

9.) A 7. igénypont szerinti kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy az 5' és 3' szegélyező szekvenciák egy tejspecifikus fehérje génből származnak.

10.) A 8. igénypont szerinti kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy az említett szignál szekvenciát kódoló terület egy tejspecifikus fehérje génből származik.

11.) A 9. igénypont szerinti kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy a tejspecifikus fehérje gén kazein gén.

12.) A 7. igénypont szerinti kifejezési sziget azzal jellemezve, hogy a heterológ polipeptidet kódoló szekvencia az alábbi polipeptidek valamelyikét kódoló szekvencia: tPA, urokináz, Müller-féle gátló anyag (Mullerian Inhibiting Substance), valamely interferon, VIII. és IX. alvadási faktor, valamely állati növekedési faktor, inzulin, valamely interleukin, valamely immunglobulin és valamely lipokortin.

13.) Transzformált gazdaszervezet azzal jellemezve, hogy genomja egy 7.-12. igénypontok bármelyike szerinti integrált kifejezési szigetet tartalmaz.

35 oldal + 3 ábraoldal

[signature]

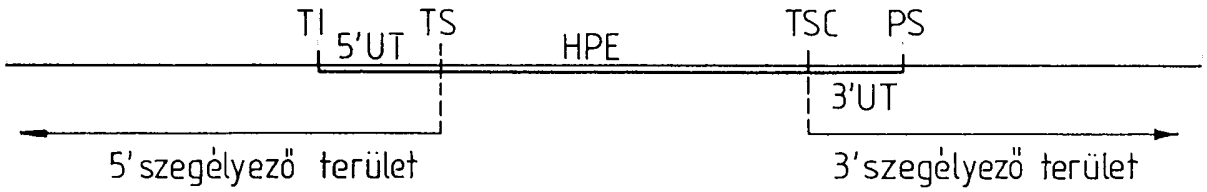
Ügyvédi és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, 131-4200

3695/91 3094/91

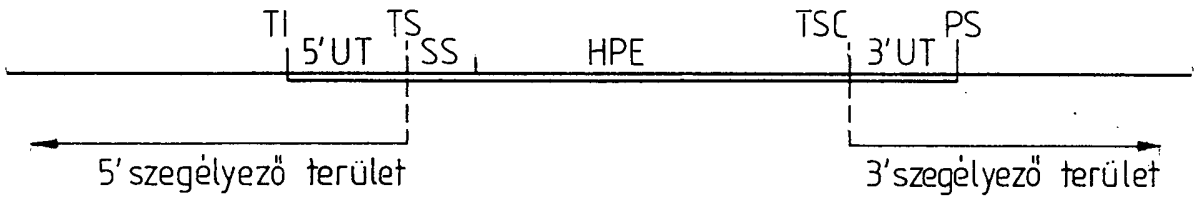
60523

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1a ÁBRA



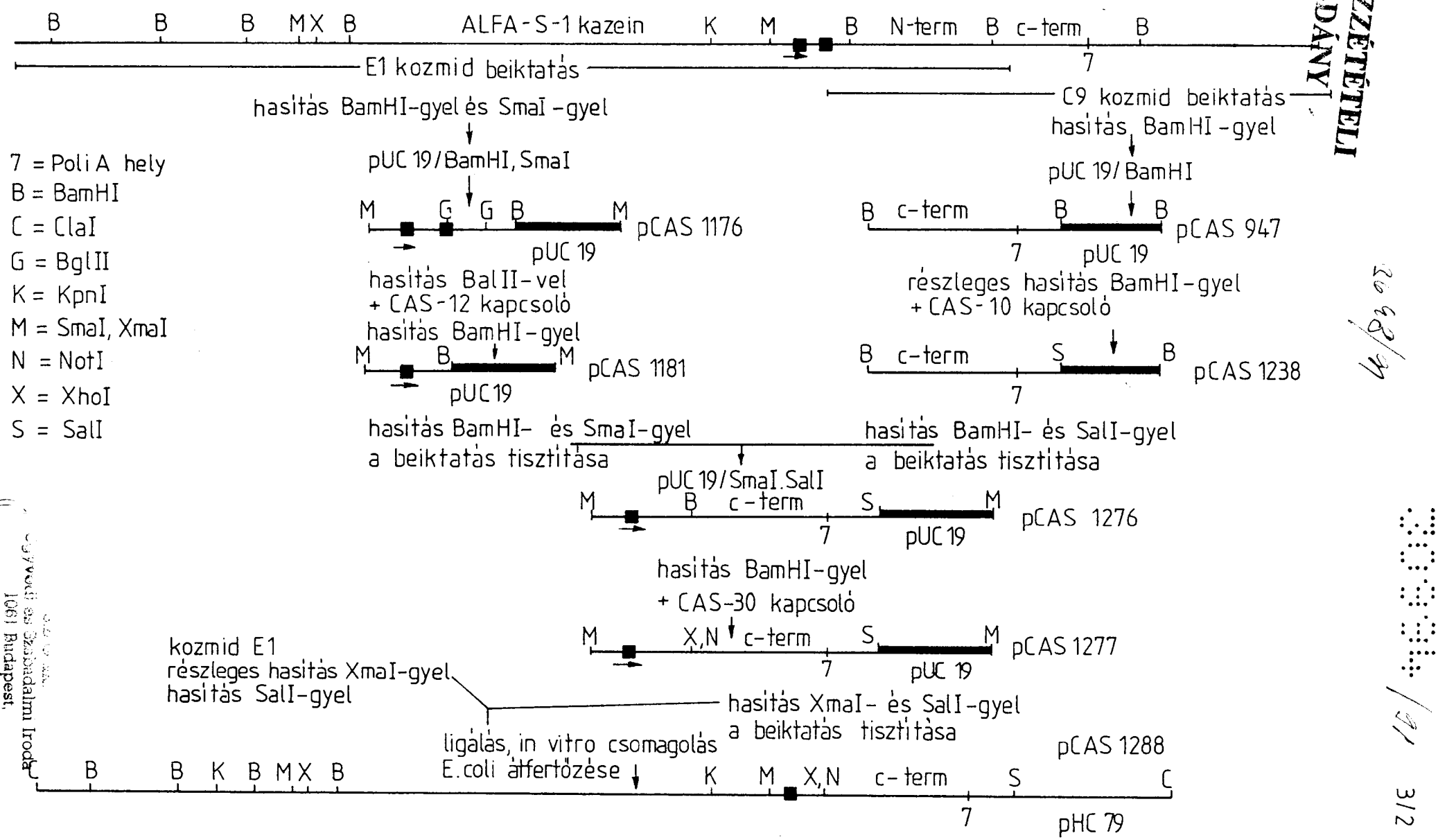
1b ÁBRA



TI = transzkripciós iniciációs hely
UT= nem transzlatált terület
TS= transzlációs rajt szignál
SS=szignál szekvenciát kódoló terület
HPE=heterológ polipeptidet kódoló terület
TSC = transzlációs stop kodon
PS= poliadenilező hely

Ügyvédi és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, 131-4300

2. ÁBRA



B = BamHI
C = ClaI
G = BglII
K = KpnI
M = SmaI, XmaI
N = NotI
X = XhoI
S = SalI
7 = Poli A hely

Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
153-2733, 131-4200

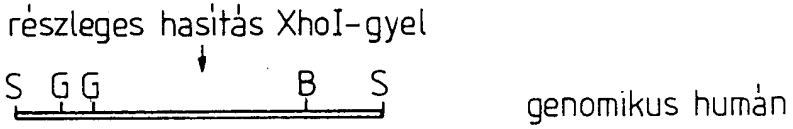
BÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

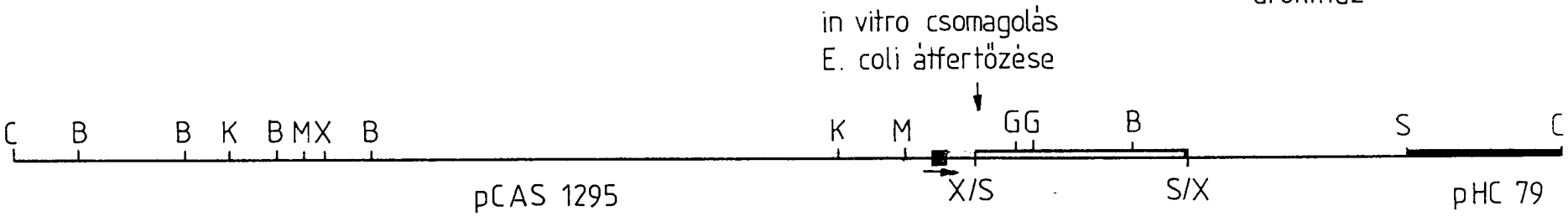
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3648/99

3a ÁBRA







3b ÁBRA

Ügyvédi és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon 153-3733, 131-4200