



H U 0 0 0 2 1 6 3 3 5 B

(19) Országkód

**HU****MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL****SZABADALMI  
LEÍRÁS**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 02688

(22) A bejelentés napja: 1992. 08. 19.

(30) Elsőbbségi adatok:

3-230769 1991. 08. 19. JP

4-223520 1992. 07. 31. JP

(40) A közzététel napja: 1993. 04. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 06. 28.

(11) Lajstromszám:

**216 335 B**(51) Int. Cl.<sup>6</sup>**C 12 N 15/62**

C 12 P 21/02

(72) Feltalálók:

Magota, Koji, Osaka (JP)  
Ohsuye, Kazuhiro, Oura-gun, Gunma (JP)  
Onai, Seiko, Oura-gun, Gunma (JP)  
Oshima, Takehiro, Oura-gun, Gunma (JP)  
Suzuki, Yuji, Oura-gun, Gunma (JP)  
Tanaka, Shoji, Osaka (JP)  
Yabuta, Masayuki, Oura-gun, Gunma (JP)

(73) Szabadalmaz:

Suntory Ltd., Osaka (JP)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

**Eljárás peptidek előállítására****KIVONAT**

A találmány tárgya olyan eljárás peptid (célpeptid) előállítására, amelyben

a) egy A-L-B általános képletű fúziós fehérjét – a képletben

B jelentése célpeptid;

A jelentése 90–200 aminosavcsoportot tartalmazó védőpeptid; és

L jelentése a célpeptidnek a fúziós fehérjéből enzim vagy kémiai anyaggal történő felszabadítását lehetővé tevő kapcsolópeptid, amely a védőpeptid C-terminálisa és a célpeptid N-terminálisa között helyezkedik el –

kódozó gén kifejezésére alkalmas, kifejezőplazmiddal transzformált gazdasejteket tenyésztene, a védőpeptid és kapcsolópeptid megfelelő kiválasztásával az egész

A-L-B fúziós peptid izoelektromos pontját a 4,9–6,9 tartományba állítják be;

b) a tenyésztett transzformáns sejtek homogenizálásával zárványtesteket tartalmazó oldhatatlan frakciót állítanak elő;

c) az oldhatatlan frakciót szolubilizálószerrel kezelik, és így a zárványtestekben a fúziós fehérjét szolubilizálják, és

d) a szolubilizált fúziós peptidben lévő kapcsoló aminosavcsoport C-terminálisa és a célpeptid N-terminálisa közötti peptidkötés elhasításával a célpeptidet felszabadítják.

A találmány szerinti eljárás célpeptidek nagy mennyiségű előállítására és ezek gazdasejtekben való zárványtestként megvalósított akkumulálására alkalmas.

A találmány tárgya eljárás fiziológiailag aktív peptidek vagy prekursoraik (a továbbiakban „célpeptidek”-ként is említjük) fúziós fehérjeként való előállítására, amelyeknek izoelektromos pontja a savas pH-tartományban van.

A fiziológiailag aktív peptidek vagy fehérjék mikroorganizmusokban, mint például *Escherichia coli*-ban való, rekombináns DNS-technológiával megvalósított előállítására számos kísérletet végeztek már. Abban az esetben, ha viszonylag kis molekulatömegű peptideket mikroorganizmusokkal, mint például *Escherichia coli*-val mint közvetlen kifejezőrendszerrel állítanak elő, a rövid peptid a mikroorganizmuson belül gyorsan lebomlik, és így hamar tönkremegy.

A lebomlás megakadályozására alkalmazott eljárásban a célpeptidet egyéb fehérjékkel vagy polipeptidekkel (a továbbiakban védőpeptid) összeépítve fúziós fehérjeként állítják elő, majd a célpeptid fúziós peptidből való specifikus felszabadítására kémiai vagy enzimatis kezelést, és ezt követően elválasztást és tisztítást alkalmaznak.

A célpeptid fúziós fehérjéből való felszabadítására abban az esetben, ha a célpeptid nem tartalmaz metionincsoportot, ismert egy eljárás, amelynek értelmében olyan fúziós fehérjét állítanak elő, amelyben a védőpeptid és a célpeptid között lévő kapcsolópeptid C-terminális aminosavhelyzetébe egy metionincsoportot építenek be, majd a célpeptid felszabadítására a metionincsoportot cián-bromiddal (CNBr) kezelik [Science, 198, 1059 (1977), Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 106 (1978)].

Abban az esetben pedig, ha a célpeptid nem tartalmaz arginincsoportot vagy lizincsoportot, egy olyan fúziós fehérjét állítanak elő, amelyben a védőpeptid és a célpeptid között lévő C-terminális aminosavhelyzetbe egy arginin- vagy lizincsoportot építenek be, majd a célpeptid felszabadítását tripszinnel történő kezeléssel, amely fajlagosan hasítja az arginincsoport és lizincsoport C-terminálisát [Nature, 285, 456 (1980)], illetve lizil-endopeptidázal (*Achromobacter I* proteáz) történő kezeléssel végzik, amely fajlagosan hasítja a lizincsoport C-terminálisát.

A fúziós fehérje előállításához védőpeptidként szokásosan a gazdamikroorganizmusból származó fehérjefragmenst alkalmaznak. Ilyen esetben a gazdamikroorganizmus-sejtekben nagy mennyiségben kifejezett fehérje N-terminálisáról (aminovég-régió) származó, megfelelő méretű (hosszúságú) polipeptidet alkalmaznak, és ismeretes, hogy a polipeptid hosszúsága a fúziós fehérje termelékenységét nagymértékben befolyásolja.

Így például annak ellenére, hogy a védőpeptid-régió méretének csökkentésével (hosszúságának csökkentésével), és így a célpeptid fúziós fehérjéhez viszonyított mennyiségének növelésével a termelékenység javítható, a célpeptid termelékenysége a védőpeptid-régió csökkentésével nem minden esetben nő. Például ha *Escherichia coli*-ban inzultint állítanak elő fúziós fehérjeként, és védőpeptidként  $\beta$ -galaktozidázt alkalmaznak, a  $\beta$ -galaktozidáz méretcsökkenésével az inzultintermelékenység ideiglenesen nő, azonban a további méretcsök-

kenés a termelékenység csökkenéséhez vezet [Gene, 29, 251 (1984)].

Valamely célpeptid fúziós fehérje részeként való előállítása esetén, annak ellenére, hogy a védőpeptid mérete a mikroorganizmuson belül szoros kapcsolatban van a fúziós peptid stabilitásával, nincs megalapozott elmélet arra vonatkozóan, hogy a védőpeptidnek milyen méretűnek kell lennie. Általában mondhatjuk, hogy a stabil fúziós fehérjék a gazdasejtekben oldhatatlan zárványtesteket képeznek. Ez azt jelenti, hogy nagy mennyiségű fúziós fehérjék előállításához a gazdasejtekben zárványtesteket kell kialakítani.

Abban az esetben azonban, ha a sejtenként kifejezett zárványtestek száma nő, a zárványtestek károsítják a sejteket, és ezáltal a sejtfejlődés gátlásával csökkenthetik a tenyészközeg térfogategységében képződő zárványtestek mennyiségét. A mikroorganizmusokban a zárványtestek képződésének mechanizmusát Catherine ugyan részletesen ismerteti [Biotechnology, 7, 1141 (1989)], a képződést azonban nagyon sok tényező befolyásolja, és elfogadott elmélet jelenleg még nem létezik. Ezenkívül a fúziós fehérjék mikroorganizmusokban való stabil zárványtestként történő kifejezésére alkalmas ipari méretű eljárás sem ismert.

Számos olyan eljárást ismertetnek, amelyben humán kalcitonint *Escherichia coli*-ban fúziós fehérjeként állítanak elő.

Így például Bennett és munkatársai humán kalcitoninprekursor (hCT-Gly) előállítására olyan eljárást ismertetnek, amelyet kloramfenikol-acetil-transzferáz és humán kalcitoninprekursor (hCT-Gly) fúziós fehérje kifejezésével végeznek (60-501391 számú közrebo-csátási irat). Az eljárás hatékonysága azonban nagyon kicsi, ugyanis 44 mg fúziós fehérjéből csak 1,1–2,0 mg humán kalcitoninprekuzort kapnak.

Korábbi kutatásaink során kidolgoztunk egy eljárást *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz és humán kalcitoninprekursor (hCT-Gly-Lys-Lys-Arg) fúziós fehérje előállítására, amelyben a fúziós fehérjét *Escherichia coli*-ban zárványtestként állítjuk elő (64-10999 számú japán közrebo-csátási irat).

Kidolgoztunk továbbá a humán kalcitonin előállítására egy olyan eljárást is, amelyben a fenti fúziós fehérje karbamiddal való szolubilizálása után a humán kalcitoninprekuzort (hCT-Gly-Lys-Lys-Arg) a fúziós fehérjéből V8 proteázzal felszabadítjuk, majd a humán kalcitoninprekursor Lys-Lys-Arg C-terminális részét karboxi-peptidáz B alkalmazásával eltávolítjuk, és a kapott hCT-Gly-ből *Xenopus laevis* C-terminális amidáló enzim alkalmazásával, jó kitermeléssel érett, C-terminálisan amidált humán kalcitonint állítunk elő (2-190193 számú japán közrebo-csátási irat).

Fennáll azonban az igény az iránt, hogy a peptid előállítási eljárásának hatékonyságát tovább javítsuk.

A találmány tárgya tehát eljárás nagy mennyiségű fiziológiailag aktív peptid vagy prekursora előállítására.

A fenti problémák megoldására végzett munkánk során kísérletileg igazoltuk, hogy a fúziós fehérje *Escherichia coli* sejtekben történő előállításának termelékenysége javítható, ha a fúziós fehérje izoelektromos pontját

4,9–6,9 pI-tartományba állítjuk, mivel így a fúziós fehérje stabilitása és az előállítás termelékenysége nagymértékben nő. Emellett azt is tapasztaltuk, hogy a fúziós fehérje izoelektromos pontjának pI=4,9–6,9 tartományba történő beállítása megvalósítható a kapcsolópeptidben a töltéssel rendelkező aminosavak (bázikus vagy savas aminosavcsoportok) számának szabályozásával.

Ennek megfelelően a találmány tárgya eljárás fiziológiailag aktív peptidek vagy prekursoraik (célpeptid) előállítására, amelynek során

a) egy A–L–B általános képletű fúziós fehérjét – a képletben

B jelentése célpeptid;

A jelentése 90–200 aminosavcsoportot tartalmazó védőpeptid; és

L jelentése kapcsolópeptid, amely a védőpeptid C-terminálisa és a célpeptid N-terminálisa között helyezkedik el –

kódoló gén kifejezésére alkalmas kifejezőplazmiddal transzformált gazdasejteket tenyésztünk, a kapcsolópeptidet úgy választjuk meg, hogy a célpeptid a fúziós fehérje enzim vagy kémiai anyaggal történő kezelésével felszabadítható legyen, és a védőpeptid és a kapcsolópeptid megfelelő kiválasztásával az egész A–L–B fúziós peptid izoelektromos pontját a 4,9–6,9 tartományba állítjuk be;

b) a tenyésztett transzformáns sejtek homogenizálásával zárványtesteket tartalmazó, oldhatatlan frakciót állítunk elő;

c) az oldhatatlan frakciót szolubilizálószerrel kezeljük, és így a zárványtestekben a fúziós fehérjét szolubilizáljuk, és

d) a szolubilizált fúziós peptidben lévő kapcsoló-aminosavcsoport C-terminálisa és a célpeptid N-terminálisa közötti peptidkötés elhasításával a célpeptidet felszabadítjuk.

A mellékelt 1. ábrán a pBR322 plazmid 403–495. nukleotidpozíciói tetraciklinrezisztens részének nukleotidszekvenciáját, a megfelelő aminosavszekvenciákat és a kapcsolópeptideket kódoló részeket mutatjuk be; a nukleotidszekvenciát az 1. szekvencia ábrán ismertetjük;

a 2. ábrán a pG97S4DhCT(G)R10 és pG97S4DhCT(G)R6;

a 3. ábrán a pG97S4DhCT(G)R8; és

a 4. ábrán a pG97S4DhCT(G)R1–R5 plazmid szerkesztésének eljárását mutatjuk be;

az 5. ábrán a kapcsolórészek kódolására alkalmas DNS R<sub>1</sub>–R<sub>5</sub> nukleotidszekvenciáit ismertetjük, ezeket a szekvenciákat a 2–9. szekvencia ábrákon is bemutatjuk;

a 6. ábrán a kapcsolópeptidek aminosavszekvenciáit mutatjuk be;

a 7. ábrán egy olyan SDS poli(akril-amid) gél-elektroforézis felvételt mutatunk be, amelyen a fúziós fehérjék kifejezőplazmidokból való kifejeződésének fázisai láthatók;

a 8. ábrán a találmány szerinti eljárással előállított humán kalcitonin nagynyomású folyadékkromatográfiás mérési eredményeit ismertetjük;

a 9. ábrán egy CNP–22 aminosavszekvenciát, egy ezt kódoló nukleotidszekvenciát és restriktióenzimhelyeknek a két véghez való inszertálására alkalmas PCR-primereket ismertetünk;

5 a 10. ábrán a pG97S4DhCNP–22 plazmid szerkesztési eljárását ismertetjük;

a 11. ábrán a fúziós fehérje izoelektromos pontja beállítására alkalmas kapcsolópeptidet és egy ezt kódoló oligonukleotidszekvenciát ismertetünk;

10 a 12. ábrán a pG97S4DhCNP–22R3-2 és a pG97S4DCNP–22R5-2; és

a 13. ábrán a pG97S4DhCNP–22R5-3 plazmid szerkesztési eljárását ismertetjük;

a 14. ábrán egy olyan SDS poli(akril-amid) gél-elektroforézis felvételt mutatunk be, amely a beállított izoelektromos pontú kifejezett fúziós fehérjék mennyisége összehasonlításának eredményét jelzi;

a 15. ábrán egy fúziós fehérjének a hCNP–22 leválasztása előtti nagynyomású folyadékkromatográfiás felvételt mutatjuk be; és

a 16. ábrán egy fúziós fehérjének a hCNP–22 leválasztása utáni nagynyomású folyadékkromatográfiás felvételt mutatjuk be.

A találmány szerinti eljárás fiziológiailag aktív peptideket (célpeptidek) tartalmazó fúziós fehérjék előállítására, elsősorban zárványtestek képződésén keresztül megvalósított előállítására alkalmas. Az eljárás a leírásban részletesen ismertetett humán kalcitonin előállításán kívül egyéb peptidek, mint például nem humán kalcitoninok és prekursoraik, ezek nátriuretikus peptidjei (NP), mint például ANP, BNP és CNP, sejtnövekedési faktorok és paratiroid hormon (PTH) előállítására is alkalmas. A találmány szerinti eljárás azonban nem korlátozódik a fenti peptidek előállítására.

A találmány szerinti eljárásban védőpeptidként előnyösen egy, a gazdasejtben eredetileg meglévő peptidet alkalmazunk. Így például *Escherichia coli* gazdasejre alkalmazása esetén előnyös az *Escherichia coli* β-galaktoszidáz vagy egy részének alkalmazása. Az *Escherichia coli* β-galaktoszidáz alkalmazása esetén előnyös az N-terminális rész alkalmazása. Így például előnyös a 90–210. aminosavat tartalmazó N-terminális rész alkalmazása. Különösen előnyös védőpeptidek az *Escherichia coli* β-galaktoszidáz N-terminális 1–97. aminosavait tartalmazó peptidek. Még előnyösebbek az olyan peptidek, amelyekben egy 97 aminosavat tartalmazó peptid ciszteincsoportját szerincsoport helyettesíti. Még előnyösebbek az olyan peptidek, amelyekben egy, a fenti 97 aminosavat tartalmazó peptid ciszteincsoportját szerincsoport helyettesíti, és négy glutaminsavcsoportot aszparaginsav-csoport helyettesít.

A találmány szerinti eljárással a célpeptidet olyan fúziós peptid formájában állítjuk elő, amelynek izoelektromos pontja 4,9–6,9. Ilyenkor a fúziós peptid izoelektromos pontját az aminosavszekvenciából határozzuk meg a következőkben ismertetésre kerülő eljárással. Az izoelektromos pontot az Analytical Chemistry, 5 (4), 82–83 (1986) irodalmi helyen ismertetett trendekből is kiszámíthatjuk. Alkalmazható például a fenti eljárás

ráson alapuló DNASIS (Hitachi) izoelektromospontszámítási módszer is.

A fúziós peptid izoelektromos pontja fenti tartományban való szabályozásához a védőpeptid és/vagy kapcsolópeptid aminosavcsoportjait változtatjuk, mert a célpeptid aminosavcsoportjai nem változtathatók. Ilyen esetben védőpeptidként és/vagy kapcsolópeptidként olyan, a fenti izoelektromos ponttal rendelkező természetes peptidet vagy peptidrészt alkalmazunk, amely egy, a célpeptidet tartalmazó fúziós peptidet alkot. A fúziós peptid izoelektromos pontját természetes peptidekkel vagy részeivel való helyettesítéssel, ezek eltávolításával vagy hozzáadásával is változtathatjuk. Ezt végezhetjük savas aminosavak, mint például aszparaginsav- és glutaminsavcsoportok hozzáadásával vagy eltávolításával, bázikus aminosavak, mint például arginin- vagy lizincsoportok hozzáadásával vagy eltávolításával, egyéb aminosavakkal való helyettesítésével vagy a fenti eljárások kombinálásával is.

A fúziós fehérje izoelektromos pontját a fentiekben ismertetetteknek megfelelően szabályozhatjuk a védőpeptiddel, vagy a kapcsolópeptiddel, vagy mindkettővel. Ilyen típusú peptidként alkalmazhatunk pBR322-ből származó tetraciklinrezisztencia-gén 403–495. nukleotidszekvenciával kódolt peptidet vagy peptidrészt. Amint azt az 1. ábrán és az 1. szekvenciaábrán ismertetjük, ez a génrégió 33 aminosavcsoporton belül 10 arginincsoportot kódolhat, és a régió különböző számú részeinek alkalmazásával különböző számú arginincsoportot tartalmazó kapcsolópeptidet állíthatunk elő. Ilyen esetben előnyösen 1 vagy több, még előnyösebben 3 vagy több, és elsősorban 3–8 aminosavat alkalmazunk.

Valamely célpeptid fúziós peptidből való felszabadításának feltétele, hogy egy kapcsolópeptid C-terminálisa egy enzimatikusan vagy kémiai hasítható aminosavcsoportot tartalmazzon. Ilyen aminosavcsoport például a tripszinnel hasítható arginin- vagy lizincsoport, a lizil-endopeptidázal hasítható lizincsoport, a V8 proteázal hasítható glutamincsoport és a cianogén-bromiddal hasítható metionincsoport.

A következőkben egy olyan fúziós fehérje kifejezésére alkalmas plazmid előállítási eljárását ismertetjük, amelyben a célpeptid humán kalcitoninprekursor.

Egy humán kalcitoninprekursor – amely különböző kapcsolókat tartalmazó fúziós fehérje formában tartalmazza a humán kalcitonin aminosavszekvenciáját és ennek C-terminálisához kapcsolódva egy glicincsoportot – kifejezésére alkalmas plazmid szerkesztéséhez kiindulási plazmidként a pG97S4DhCT(G)-plazmidot alkalmazunk.

Ebben a plazmidban, amint azt a 2. ábrán ismertetjük, az *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális 97 aminosavát tartalmazó védőpeptidet kódoló szerkezeti gén ( $\beta$ -gal197S4D), amelyben a ciszteinscsoportot szerincsoport helyettesíti, négy glutaminsavcsoportot pedig aszparaginsav-csoport helyettesíti, és egy humán kalcitoninprekursor szerkezeti gén az EcoRI és XhoI felismerőhelyeken keresztül kapcsolódik. A fúziós fe-

hérjét kódoló szerkezeti gén a lac promotor ellenőrzése alatt van, és ez a plazmid egy szelekciós marker gént is tartalmaz.

Ez a plazmid a 2–190193 számú japán közrebocsátási iratban ismertetett pG97SHPCTLE(G) plazmidból származik. A pG97S4DhCT(G) plazmidot tartalmazó *Escherichia coli* W3110 a Budapesti Egyezmény alapján, FERM BP–3503 számon, *Escherichia coli* SBM 323 néven a Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology letéti helyen, 1991. augusztus 8-án került letétbe helyezésre.

A pG97S4DhCT(G) plazmiddal kódolt fúziós fehérje tartalmaz egy védőpeptidet, amely egy, a  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális 97 aminosavából álló védőpeptidet tartalmaz, amelyben a ciszteinscsoport szerincsoporttal és 4 glutaminsavcsoport aszparaginsav-csoporttal van helyettesítve, valamint a fentiekben ismertetett humán kalcitoninprekuzort. Kifejezése nagyon gyenge, és izoelektromos pontja 4,43. Ennek megfelelően a különböző, széles izoelektromos tartományú bázikus aminosavakat tartalmazó fúziós fehérjék kifejezéséhez az EcoRI–XhoI hely alkalmazásával a fentiekben ismertetett  $\beta$ -galaktozidáz és humán kalcitoninprekuzor-gén közé különböző bázikus aminosavcsoportokat tartalmazó kapcsolópeptidet kódoló DNS-szekvenciákat inszertálunk.

Kapcsolópeptidként előnyösen olyan, 33 aminosavat tartalmazó peptidet vagy ennek részét alkalmazunk, amelyet a pBR322 plazmid 86–1273. nukleotidhelyzetében lévő tetraciklinrezisztencia-génből származó gén kódol. Ebben a peptidrégióban 10 arginincsoport található, és a megfelelő részek kapcsolópeptidként való alkalmazásával különböző izoelektromos pontokat tartalmazó fúziós fehérjéket állíthatunk elő.

A régióból származó kapcsolópeptideket és a kapcsolópeptideket kódoló nukleotidszekvenciákat az 1. ábrán mutatjuk be. A peptideket kódoló géneket a pBR322 plazmid megfelelő restrikciós enzimmal való emésztésével vagy szokásos kémiai eljárásokkal állíthatjuk elő. Ezek az R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub> és R<sub>10</sub> kapcsolópeptidek rendre 1, 3, 4, 5, 6, 8 és 10 arginincsoportot tartalmaznak. A fentiekben ismertetett pG97S4DhCT(G) plazmid EcoRI–XhoI helyére inszertált, a kapcsolópeptidek valamelyikének kódolására alkalmas géneket tartalmazó kifejezőplazmidok a következők:

pG97S4DhCT(G)R1, pG97S4DhCT(G)R3, pG97S4DhCT(G)R4, pG97S4DhCT(G)R5, pG97S4DhCT(G)R6, pG97S4DhCT(G)R8 és pG97S4DhCT(G)R10.

A kiindulási, illetve a fentiekben ismertetett plazmidok által transzformált *Escherichia coli* W3110 törzsek a következők:

W3110/pG97S4DhCT(G),  
W3110/pG97S4DhCT(G)R1,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R3,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R4,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R5,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R6,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R8 és  
W3110/pG97S4DhCT(G)R10.

Az ezen mikroorganizmusokkal előállított fúziós fehérjék izoelektromos pontjainak számolásakor a következő eredményeket kaptuk:

W3110/pG97S4DhCT(G) (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=0); izoelektromos pont=4,43;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R1 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=1); izoelektromos pont=4,70;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R3 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=3); izoelektromos pont=4,90;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R4 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=4); izoelektromos pont=5,80;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R5 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=5); izoelektromos pont=5,91;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R6 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=6); izoelektromos pont=6,01;  
W3110/pG97S4DhCT(G)R8 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=8); izoelektromos pont=6,83 és  
W3110/pG97S4DhCT(G)R10 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=10); izoelektromos pont=7,85.

Olyan *Escherichia coli* transzformánsokat tenyésztünk, ahol az izoelektromos pont 4,43–7,85, és a sejtenként képződött fúziós fehérje mennyiségét SDS poli(akril-amid)gélelektroforézis-eljárással elemeztük. A 4,43 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCT(G)R1 törzs és a 4,70 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCT(G)R<sub>1</sub> törzs csak kis mennyiségű fúziós fehérjét állított elő. Úgy találtuk, hogy a többi törzs bakteriális sejtekben, zárványtest alakban nagy mennyiségű fúziós fehérjét állított elő. Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a 4,5–4,7 értéktartományhoz közeli izoelektromos pontú fúziós fehérjék termelékenysége és az előállított zárványtestek mennyisége egyaránt rossz.

Az is bebizonyosodott, hogy annak ellenére, hogy a 7,85 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCT(G)R10 törzs sejtenkénti fúziósfehérje-termelékenysége az egyéb törzsekével közel azonos, a tenyésztés alatti végső bakteriális koncentráció a többi törzshöz képest fele értékű. Feltételezzük, hogy bár a sejt számra vetített fúziósfehérje-képző kapacitás növekedett, mivel a fúziós fehérje pI=7,85 izoelektromos pontja gyengén alkális, a sejtnövekedés gátlása következett be a zárványtestek gyors képződése vagy a fúziós fehérje gyengén alkális izoelektromos pontja alatt, és így a végső bakteriális koncentráció nem nő.

A fenti eredmények alapján tehát úgy találtuk, hogy fúziós fehérjék *Escherichia coli*-ban való stabil és nagy mennyiségű, zárványtestként megvalósított előállításához a fúziós fehérje izoelektromos pontjának a pI=4,9–6,9 savas tartományba kell esnie.

Megoldottuk továbbá a humán kalcitoninprekursor (hCT–Gly) kinyerését és tisztítását (a fenti módon) *Escherichia coli*-ban előállított zárványtestektől. Azt is igazoltuk, hogy C-terminálison amidált humán kalcitonin hatékonyan állítható elő *Xenopus laevis*-ből származó amidálóenzimmel.

A következőkben egy olyan fúziósfehérje-kifejező plazmid szerkesztését ismertetjük, amely humán C típusú nátriuretikus peptid–22-t (rövidítve: CNP–22, 10. szekvenciaábra) mint célpeptidet tartalmazó fúziós fehérjét fejez ki. A fúziós fehérjeként 22 aminosavat és különbö-

ző kapcsolókat tartalmazó humán CNP–22 kifejezésére alkalmas kifejezőplazmid szerkesztéséhez kiindulási plazmidként pG97S4DhCNP–22-t alkalmaztunk.

Ebben a plazmidban a szerkezeti gén ( $\beta$ gal97S4D), amely egy olyan *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális 97. aminosavát tartalmazó védőpeptidet kódol, amelyben egy ciszteincsoport szerincsoporttal, négy glutaminsavcsoporthoz aszparaginsav-csoporttal van helyettesítve, és a CNP–22 humán szerkezeti gén az EcoRI és XhoI felismerőhelyeken keresztül kapcsolódik a 10. ábrán ismertetettek szerint. A fúziós fehérjét kódoló szerkezeti gén a lac promóter irányítása alatt van. Ez a plazmid még egy tetraciklinrezisztencia-markert is tartalmaz.

A pG97S4DhCNP–22 kifejezőplazmid szerkesztésénél a gén előállításához alkalmazott humán CNP–22 szerkezeti gént és pUCCNP1 plazmidot a 4–139199 számú japán közrebocsátási iratban ismertetik. A védőpeptidet kódoló pG97S4DhCT(GRRRR) plazmid pedig lényegében véve azonos a fentiekben ismertetett pG97S4DhCT(G) plazmiddal.

A pG97S4DhCNP–22 plazmiddal kódolt fúziós fehérje izoelektromos pontja 4,56. Ez az érték a fentiekben ismertetett előnyös pI=4,9–6,9 értéktár alatt van, ezért nagy mennyiségű fúziósfehérje-képződés nem várható. Ezért egy olyan kísérletet végeztünk, amelyben különböző bázikus aminosavakat kódoló kapcsolópeptid géneket inszertáltunk az EcoRI–XhoI régióba az említett  $\beta$ -galaktozidázgén és humán CNP-gén közé azért, hogy különböző, 4,9–6,9 izoelektromos pontú fúziós fehérjéket tervezzünk, és ezeket a fúziós fehérjéket *Escherichia coli*-ban nagy mennyiségben fejesszük ki.

Ezek a kapcsolópeptidok úgy állíthatók elő, hogy bázikus aminosavakat kódoló géneket mesterségesen tervezzünk, majd azokat kémiai szintetizáljuk.

A 11. ábrán a bázikus aminosavakat kódoló kapcsolópeptid gén tervezését és a kémiai szintetizált génszekvenciákat mutatjuk be. A bemutatott kapcsolópeptidok a következők: R3-2 (13. és 14. szekvenciaábra), R5-2 (15. és 16. szekvenciaábra) és az R5-3 (17. és 18. szekvenciaábra), amelyek rendre 3, 5 és 5 arginincsoportot tartalmaznak. A kapcsolópeptideket kódoló géneket tartalmazó kifejezőplazmidokat, amelyek a kapcsolópeptideket a fentiekben ismertetett pG97S4DhCNP–22 EcoRI–XhoI tartományban inszertálva tartalmazzák, rendre: pG97S4DhCNP–22R3-2, pG97S4DhCNP–22R5-2 és pG97S4DhCNP–22R5-3 plazmidoknak nevezzük.

A kiindulási, illetve a fentiekben ismertetett plazmidokkal transzformált *Escherichia coli* W3110 törzsek rendre W3110/pG97S4DhCNP–22, W3110/pG97S4DhCNP–22R3-2, W3110/pG97S4DhCNP–22R5-2 és W3110/pG97S4DhCNP–22R5-3.

Az ezen mikroorganizmusokkal előállított fúziós fehérjék izoelektromos pontjainak számolási eredményeként a következőket kaptuk:

W3110/pG97S4DhCNP–22 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=0); izoelektromos pont=4,56;  
W3110/pG97S4DhCNP–22R3-2 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=3); izoelektromos pont=4,95;

W3110/pG97S4DhCNP-22R5-2 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=5); izoelektromos pont=6,22 és W3110/pG97S4DhCNP-22R5-3 (arginincsoportok száma a kapcsolórégióban=5); izoelektromos pont=5,59.

Amikor a 4,56–6,22 izoelektromos pontú, fenti fúziós fehérjét termelő *Escherichia* törzseket tenyésztettük, és a sejtenként képződött fúziós fehérje mennyiségét SDS poli(akril-amid)gélelektroforézis-eljárással meghatároztuk, a W3110/pG97S4DhCNP-22 törzzsel előállított fúziós fehérje (izoelektromos pontja=4,56) mennyisége ugyan nem volt olyan nagy, mint a pI=4,95–6,22 értékhatáru fúziós fehérjékkel demonstrált törzseké, azonban bebizonyosodott, hogy a W3110/pG97S4DhCNP-22 törzshöz viszonyítva nagy mennyiségű fúziós fehérje fejeződött ki.

Nagyon jól látható (14. ábra), hogy az 5,59 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCNP-22R5-2 és 6,22 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCNP-22R5-3 törzsekkel nagy mennyiségű fúziós fehérje fejeződött ki a W3110/pG97S4DhCNP-22 törzshöz képest. A humán CNP-22 esetén is bebizonyosodott tehát, hogy a pI=4,9–6,9 izoelektromos pontú fúziós fehérjék a korábbiaknál jobb termelékenységgel állíthatók elő.

Azt is igazoltuk, hogy a humán CNP-22 az *Escherichia coli*ban előállított fúziós fehérje zárványtestekből V8 proteázzal könnyen felszabadítható, és így a humán CNP-22 hatékonyan előállítható.

A következő példákat a találmány részletesebb bemutatására ismertetjük.

#### 1. példa

##### Kifejezővektor szerkesztése

Egy 1–10 arginincsoportot tartalmazó fúziós fehérje kifejezésére alkalmas kifejezőplazmidot szerkesztettünk a következőképp:

##### (A) pG97S4DhCT(G)R10 szerkesztése

Az alábbi eljárással a kapcsolópeptidet kódoló régióba, a  $\beta$ -gal 97S4D gén (amely 97  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális aminosavat tartalmazott, és amelyben a ciszteinscsoport szerincsoporttal, négy glutaminsavcsoporthoz pedig aszparaginscsoporttal volt helyettesítve) és egy hCT(G) gén (a C-terminálison egy glicincsoportot tartalmazó humán kalcitoninprekursor) közé az 1. ábrán ismertetett R10 aminosavrégiót kódoló gént inszertáltuk.

A pG97S4DhCT(G)R10 szerkesztési eljárását a 2. ábrán mutatjuk be.

Először pBR322-t emésztettünk restriktációs enzimekkel a pBR322 tetraciklinrezisztencia-gén R10 régiójának izolálására:

150  $\mu$ g pBR322-t 200–200 egység BamHI-gyel és Eco47III-mal emésztettünk 60 percig 37 °C-on, 300  $\mu$ l erős pufferben [50 mmol/l trisz-HCl, pH=7,5, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> és 1 mmol/l ditioneitol (DTT)].

A reakció lejárás után a reakcióelegyhez 30  $\mu$ l festékkoldatot (0,25 térfogat% brómfenolkék, 0,25 térfogat% xilol-cianol és 40 tömeg/térfogat% szacharóz) adtunk, és 1,5%-os agarózgél-elektroforézist (TAE puf-

feroldat; 40 mmol/l triszecetsav, pH=8,0, 2 mmol/l EDTA, 120 V, 2 óra) végeztünk. Az elektroforézis után a gél 0,5  $\mu$ g/ml etidium-bromid-oldatba merítettük, és a gélből kivágtuk a 119 bp méretű BamHI-Eco47III fragmenst.

A kivágott gél ezután TAE puffert tartalmazó dializálócsőbe tettük, és a 119 bp méretű fragmens gélből való eluálásához további elektroforézisnek vetettük alá.

A dializálócsőben lévő folyadékot ezután fenollal, majd kloroformmal kezeltük, ezután szokásos eljárással etanollal kicsapattuk, és az etanolos csapadékot 40  $\mu$ l TE pufferben (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 1 mmol/l EDTA) oldottuk.

A 119 bp-s BamHI-Eco47III DNS-fragmens tartalmazó oldat 20  $\mu$ l-éhez 2,5  $\mu$ l tizedére koncentrált Medpuffert (100 mmol/l trisz-HCl, pH=7,5, 500 mmol/l NaCl, 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub> és 10 mmol/l DTT), valamint 10 egység HaeIII-t adtunk, és 37 °C-on emésztettük 2 órán át. A festékkoldat hozzáadása után 15%-os poli(akril-amid)gél-elektroforézist (TBE puffer; 89 mmol/l triszborsavpuffer, pH=8,0, 2 mmol/l EDTA, 120 V, 90 perc) végeztünk.

Ezután a gél etidium-bromiddal megfestettük, és a (89 bp méretű) HaeIII-Eco47III DNS-fragmenst tartalmazó foltot kivágtuk a gélből. Apró darabokra aprítva 12 óra hosszat, 37 °C-on, 200  $\mu$ l DNS-eluáló pufferben (0,5 mol/l ammónium-acetát, 1 mmol/l EDTA, pH=8,0) állni hagytuk. Fenollal és kloroformmal kezelést, majd etanolos kicsapást végeztünk szokásos módszerekkel, ezután az etanolos csapadékot 5  $\mu$ l TE pufferben (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 1 mmol/l EDTA) oldottuk.

Ezután 5  $\mu$ g pG97S4DhCT(G) plazmidot 30 egység EcoRI-gyel 2 órán át, 37 °C-on, 50  $\mu$ l TA pufferben (33 mmol/l trisz-ecetsav, pH=7,9, 10 mmol/l magnézium-acetát, 0,5 mmol/l DTT, 66 mmol/l kálium-acetát, 0,01% borjúsérum-albumin) emésztettünk. A reakcióelegyhez hozzáadtunk 1  $\mu$ l 25 mmol/l dNTP-t (dATP, dGTP, dCTP és dTTP elegye) és 4 egység T4 DNS-polimerázt tartalmazó oldatot, és a ragadós végek feltöltésére 5 percig 37 °C-on inkubáltuk.

A reakció lejárás után a reakcióelegyet fenollal és kloroformmal kezeltük, és szokásos eljárással etanolos kicsapatsnak vetettük alá, majd az etanolos csapadékot 10  $\mu$ l TE pufferben oldottuk.

Összekevertünk 5  $\mu$ l EcoRI-emésztett, tompa végűvé tett pG97S4DhCT(G)-t és 5  $\mu$ l 89 bp-s HaeIII-Eco47III DNS-fragmenst, majd 16 °C-on egy DNS-ligáló készlettel (Takara Shuzo) egy 12 órás ligálóreakciót végeztünk. A ligációs reakcióeleggyel szokásos eljárással *Escherichia coli* W3110-et transzformáltunk, és így tetraciklinrezisztens transzformánsokat kaptunk.

A plazmidszerkezetet BspHI és BglII restriktációs-enzim-elemzéssel igazoltuk, és a kívánt szerkezetű transzformáns W3110/pG97S4DhCT(G)R10 törzsnak neveztük.

##### (B) pG97S4DhCT(G)R6 szerkesztése

Az alábbi eljárással a kapcsolópeptid-régióba, a  $\beta$ -gal94S4D gén és egy hCT(G) gén közé egy, az 1. ábrán ismertetett R6 régiót kódoló gént inszertáltunk.

A pG97S4DhCT(G)R6 szerkesztését a 2. ábrán mutatjuk be.

Először pBR322-t emésztettünk restriktációs enzimekkel a pBR322 tetraciklinrezisztens gén R6 régiójának izolálására:

150 µg pBR322-t 200-200 egység BamHI-gyel és Eco47III-mal emésztettünk 60 percig 37 °C-on, 300 µl erős pufferben [50 mmol/l trisz-HCl, pH=7,5, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub> és 1 mmol/l ditiotritol (DTT)].

A reakció lejártszódása után a reakcióelegyhez 30 µl festékkoldatot (0,25 térfogat% brómfenolkék 0,25 térfogat% xilol-cianol és 40 tömeg/térfogat% szacharóz) adtunk, és 1,5%-os agarózgél-elektroforézis (TAE pufferoldat; 40 mmol/l trisz-ecetsav, pH=8,0, 2 mmol/l EDTA, 120 V, 2 óra) végeztünk. Az elektroforézis után a gélt 0,5 µg/ml etidium-bromid-oldatba merítettük, és a gélből kivágtuk a 119 bp méretű DNS-fragmenst.

A kivágott gélt ezután TAE puffert tartalmazó dialíziscsőbe tettük, és a 119 bp méretű fragmens gélből való eluálásához további elektroforézisnek (120 V, 30 perc) vetettük alá.

A dialíziscsőben lévő folyadékot ezután fenollal, majd kloroformmal kezeltük, ezután szokásos eljárással etanollal kicsapattuk, és az etanolos csapadékot 40 µl TE pufferben (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 1 mmol/l EDTA) oldottuk.

A 119 bp-s BamHI-Eco47III DNS-fragmens-tartalmú oldat 20 µl-éhez 2,5 µl tizedére koncentrált TA puffert (300 mmol/l trisz-HCl, pH=7,9, 100 mmol/l magnézium-acetát, 5 mmol/l DTT, 660 mmol/l kálium-acetát és 0,1% borjúsérum-albumin) 10 egység BanI-t adtunk, és 37 °C-on inkubáltuk 2 órán át.

Az oldathoz a ragadós végek 5 perc alatt 37 °C-on történő feltöltéséhez 1 µl 25 mmol/l dNTP-t és 4 egység T4 DNS-t adtunk.

A festékkoldat hozzáadása után 15%-os poli(akrilamid)gél-elektroforézist (TBE puffer, 89 mmol/l trisz-borsav-puffer, pH=8,0, 2 mmol/l EDTA, 120 V, 90 perc) végeztünk.

Az elektroforézis után a gélt etidium-bromid-oldatba merítettük, és a gélből kivágtuk az 56 bp-s HaeIII-Eco47III DNS-fragmenst. A kivágott gélt finom darabokra vágtuk, és 200 µl DNS-eluáló pufferben (0,5 mol/l ammónium-acetát, 1 mmol/l EDTA, pH=8,0) 37 °C-on hagytuk állni 12 órán át.

A reakcióelegyet fenollal és kloroformmal kezeltük, és szokásos eljárással etanolos kicsapatsnak vetettük alá, majd az etanolos csapadékot 5 µl TE pufferben (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 1 mmol/l EDTA) oldottuk.

5 µg pG97S4DhCT(G) plazmidot 30 egység EcoRI-gyel emésztettük 2 órán át, 37 °C-on, 50 µl TA pufferben. A reakcióelegyhez a kohéziós végek 5 percig, 37 °C-on történő feltöltéséhez 1 µl 25 mmol/l dNTP-t és 4 egység T4 DNS-polimerázot adtunk.

A reakció lejártszódása után a reakcióelegyet fenollal és kloroformmal kezeltük, és szokásos eljárással etanolos kicsapatsnak vetettük alá, majd az etanolos csapadékot 10 µl TE pufferben oldottuk.

Összekevertünk 5 µl EcoRI-gyel emésztett, tompa végűvé tett pG97S4DhCT(G)-t és 5 µl 56 bp-s BanI-Eco47III DNS-fragmenst, majd 16 °C-on, egy DNS-ligáló készlettel (Takara Shuzo) 12 órán át egy ligálóreakciót végeztünk. A reakcióeleggyel szokásos eljárással Escherichia coli W3110-et transzformáltunk, és így tetraciklinrezisztens transzformánsokat kaptunk.

A plazmidszerkezetet BspHI és BglII restriktációs-enzim-elemzéssel igazoltuk, és a kívánt szerkezetű transzformáns W3110/pG97S4DhCT(G)R6 törzsnek neveztük.

#### (C) pG97S4DhCT(G)R8 szerkesztése

Az alábbi eljárással a kapcsolópeptid-régióba, a β-gal 94S4D gén és egy hCT(G) gén közé egy, az 1. ábrán ismertetett R8 régiót kódoló gént inszertáltunk.

A pG97S4DhCT(G)R8 szerkesztését a 3. ábrán mutatjuk be.

3 darab, egyenként 50 µl erős puffert tartalmazó cső mindegyikébe 10-10 µg pG97S4DhCT(G)R10-et tettünk. A három csőbe rendre 20-20 egység BbeI-t és BglIII-t, BbeI-t és EcoRV-t, valamint BglII-t és EcoRV-t adtunk. A reakcióelegyeket 37 °C-on 2 órán át hagytuk reagálni, majd 1,5%-os agarózgél-elektroforézist végeztünk, a gélből kivágtuk a BbeI-BglII-BglII (84 bp), Bbe-EcoRV (0,35 kb), illetve a BglII-EcoRV (2,7 kb) sávokat, és elektroforézist végeztünk.

A reakcióelegyet fenollal és kloroformmal kezeltük, majd szokásos eljárással etanolos kicsapatsat végeztünk, és az etanolos csapadékot 5 µl TE pufferben oldottuk. Az így kapott három DNS-fragmenst összekevertük, majd egy DNS-ligáló készlettel, 16 °C-on, 12 órán át ligáltuk. A reakcióeleggyel szokásos eljárással Escherichia coli W3110-et transzformáltunk, és így tetraciklinrezisztens transzformánsokat kaptunk.

A plazmidszerkezetet restriktációs enzim-elemzéssel igazoltuk, és a kívánt szerkezetű transzformáns E. coli W3110/pG97S4DhCT(G)R8 törzsnek neveztük.

#### (D) pG97S4DhCT(G)R1, pG97S4DhCT(G)R3, pG97S4DhCT(G)R4 és pG97S4DhCT(G)R5 szerkesztése

Az alábbi eljárással a kapcsolópeptid-régióba a β-gal 97S4D gén és egy hCT(G) gén közé egy, az 1. ábrán ismertetett, R1, R3, R4 és R5 kódoló gént inszertáltunk.

A pG97S4DhCT(G)R1, pG97S4DhCT(G)R3, pG97S4DhCT(G)R4 és pG97S4DhCT(G)R5 szerkesztését a 4. ábrán mutatjuk be.

25 µg pG97S4DhCT(G)-t 30 egység XhoI-gyel és 30 egység EcoRI-gyel emésztettünk erős pufferben, 37 °C-on, 2 órán át.

A reakció lejártszódása után 1%-os agarózgél-elektroforézist végeztünk, és a gélből elektroforézissel 3,2 kb DNS-fragmenst izoláltunk. A DNS-fragmensek mindegyikéből 100 pmol mennyiséget az 5. ábrán ismertetett, kémiai előállított oligonukleotiddal elegyítettük, és ligáltuk. A ligációs eleggyel ismert eljárással Escherichia coli W3110 törzset transzformáltunk, és így tetraciklinrezisztens transzformánsokat kaptunk.

Restriktációs enzim hasítás után gélelektroforézissel igazoltuk, hogy E. coli W3110/pG97S4DhCT(G)R1,

W3110/pG97S4DhCT(G)R3,  
W3110/pG97S4DhCT(G)R4 és  
W3110/pG97S4DhCT(G)R5 törzset kaptunk.

A fenti eljárásokkal 7 olyan plazmidot szerkesztettünk, amely a pG97S4DhCT(G) EcoRI vagy EcoRI–XhoI hasítási helyre inszertálva tetraciklinrezisztenciát egy részét tartalmazta.

Mivel ezek az inszertált gének a bázikus arginin aminosavnak megfelelő 1–10 kodont tartalmaztak, a kiméria fehérjék közötti töltés nem volt azonos, és így különböző izoelektromos pontú fúziós fehérjéket eredményezett.

Az így előállított fúziós fehérjéket a 6. ábrán ismertetjük.

## 2. példa

### *hCT(G) fúziós fehérje kifejezése*

A mikroorganizmusokban előállított fúziós fehérjék izoelektromos pontja és termelékenysége közötti összefüggés vizsgálatára a mikroorganizmusokat tenyésztettük, és SDS poli(akril-amid)gél-elektroforézissel meghatároztuk a sejtenkénti fúziós fehérje termelékenységét.

Az előállított mikroorganizmusokat lombikban, 37 °C-on, 500 ml SB közegben [0,5 térfogat% glicerint, 2,4 térfogat% élesztő kivonat, 1,2 térfogat% tripton, 100 mmol kálium-hidrogén-foszfát, pH=7,5, tetraciklin (10 µg/ml)] tenyésztettük.

A tenyésztés után spektrofotométerrel mértük a turbiditást (OD<sub>660</sub>), és annyi tenyészközeget távolítottunk el, hogy [OD<sub>660</sub>-érték x tenyészközeget-térfogat (ml)]=5 értéket érjünk el, és a kapott elegyet a mikrobacejtek elválasztására 5 percig, 12 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk.

A sejtleledékhez 1 ml SDS mintapuffert (63 mmol/l trisz-HCl, pH=6,8, 10 térfogat% glicerint, 10 térfogat% SDS, 5 térfogat% 2-merkaptó-etanolt és 12,5 mg/l brómfenolkék) adtunk, majd 5 percig 95 °C-on melegítettük, és így SDS poli(akril-amid)gél-elektroforézis elemzésre alkalmas mintát kaptunk.

5 µl fenti mintával 18 mA és 90 perc mérési jellemzők mellett SDS 16%-os poli(akril-amid)gél-elektroforézist (TEFCO) végeztünk.

A gélelektroforézis után a gél festékoldattal (10 térfogat% ecetsav, 40 térfogat% metanol és 2 g/l Coomassie brilliantkék R250) megfestettük, és mindegyik törzsnél meghatároztuk a sejtenként termelt hCT(G) fúziós fehérje mennyiségét. Az elektroforézis eredményeit a 7. ábrán mutatjuk be.

A 7. ábrán láthatjuk, hogy a 4,43 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCT(G) csak nagyon kis mennyiségű fúziósfehérje-előállításra tesz lehetővé, és a 4,70 izoelektromos pontú W3110/pG97S4DhCT(G)R1

is csak kis mennyiségű fúziós fehérjét állít elő. Egyértelműen látszik, hogy a többi törzs nagy mennyiségű sejtenkénti fúziósfehérje-előállítást biztosít.

Az eredményekből láthatjuk, hogy amint a fúziós fehérje izoelektromos pontja a 4,5–4,7 tartomány közé esik, a fúziós fehérje termelékenysége és az ezekből képződött zárványtestek mennyisége csökken.

Ezt követően a fúziós fehérje termelékenységének, valamint a hCT(G) fúziós fehérjéből való felszabadítás hatékonyságának vizsgálatára folytattunk kísérletet, amelyet W3110/pG97S4DhCT(G)R3,

W3110/pG97S4DhCT(G)R4,

W3110/pG97S4DhCT(G)R5,

W3110/pG97S4DhCT(G)R6,

15 W3110/pG97S4DhCT(G)R8 és

W3110/pG97S4DhCT(G)R10

törzsek alkalmazásával, V8 proteázzal, 30 literes tenyésztőtartályban végzett nagyméretű tenyésztéssel végeztünk.

## 3. példa

*Fúziós fehérje termelékenységének vizsgálata nagyméretű tenyésztési körülmények között, és a hCT(G) fúziós fehérjéből való felszabadítása V8 proteáz alkalmazásával*

A következő eljárással a fehérjék nagy térfogatban végzett tenyésztési körülmények között történő előállítása termelékenységének és a hCT(G) különböző fúziós fehérjéből V8 proteázzal végzett felszabadításának hatékonyságát vizsgáltuk.

30 literes tenyésztőtartályokban, a fentiekben ismertetett SB közegben azokat a kifejezőképességű törzseket [W3110/pG97S4DhCT(G)R3, W3110/pG97S4DhCT(G)R4, W3110/pG97S4DhCT(G)R5, W3110/pG97S4DhCT(G)R6, W3110/pG97S4DhCT(G)R8 és W3110/pG97S4DhCT(G)R10] vizsgáltuk, amelyek zárványtestképződését a lombikméretű kísérletekben megfigyeltük.

A tenyészközeget összetétele a következő: 4 g/l élesztő kivonat, 4 g/l kálium-dihidrogén-foszfát, 4 g/l dikálium-hidrogén-foszfát, 2,7 g/l nátrium-hidrogén-foszfát, 1,2 g/l ammónium-szulfát, 0,2 g/l ammónium-klorid, 2,0 g/l L-metionin, 2,0 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mg/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mg/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mg/l AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4 mg/l CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 mg/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mg/l Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,0 mg/l CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,5 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> és 10 mg/l MnSO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O.

A tenyésztés elején szénforrásként 2 térfogat% glükózt, majd a glükóz elfogyása után 8 térfogat% glicerint alkalmaztunk. Az így kapott végső baktériumkoncentrációkat az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

| Törzs                  | Végő baktérium-koncentráció [OD <sub>660</sub> ] (a) | Baktériumonkénti záránymennyiség [relatív érték] (b) | Összes záránymennyiség [relatív érték] (a × b) |
|------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| W3110/pG97S4DhCT(G)R10 | 53                                                   | 116                                                  | 6148                                           |
| W3110/pG97S4DhCT(G)R8  | 120                                                  | 113                                                  | 13 560                                         |
| W3110/pG97S4DhCT(G)R6  | 110                                                  | 106                                                  | 11 660                                         |
| W3110/pG97S4DhCT(G)R5  | 105                                                  | 100                                                  | 10 500                                         |
| W3110/pG97S4DhCT(G)R4  | 94                                                   | 100                                                  | 9400                                           |
| W3110/pG97S4DhCT(G)R3  | 106                                                  | 96                                                   | 10 176                                         |

Az 1. táblázatból látható, hogy a W3110/pG97S4DhCT(G)R10 az egyéb törzsekkel összehasonlítva sokkal kisebb, körülbelül a fele végő baktériumkoncentrációt eredményez. Emellett annak ellenére, hogy a W3110/pG97S4DhCT(G)R10 törzs által előállított fúziós fehérje izoelektromos pontja 7,85, azaz enyhén lúgos, és a sejtenkénti fúziós fehérje termelékenysége feltehetően a záránymennyiség gyors kialakulása vagy az enyhén lúgos izoelektromos pontú fúziós fehérje miatt nő, a sejtnövekedés gátlása alacsony sejtkoncentrációt eredményez.

A találmány szerinti eljárással kapott eredmények azt igazolják, a záránymennyiségként előállított fúziós fehérjék *Escherichia coli*-ban való stabil és nagy mennyiségű képződésének az a feltétele, hogy a fúziós fehérje izoelektromos pontja 4,9–6,9 legyen. Ezen túlmenően a sejtenkénti fúziósfehérje-mennyiség meghatározásához az SDS poli(akril-amid)gél-elektroforézis és fehérjefestés mellett géletapogatást is alkalmaztunk. Ezeket az eredményeket a sejtenkénti záránymennyiségben megadva (relatív érték) az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Ha a W3110/pG97S4DhCT(G)R4 törzssel előállított sejtenkénti fúziós fehérje mennyiségét 100-nak vesszük, a törzsek záránymennyisége 96–116 értékhatárok között változik.

A W3110/pG97S4DhCT(G)R10 törzs tenyészfolyadékra számított záránymennyisége 6148, a W3110/pG97S4DhCT(G)R8 törzsé pedig 13 560, ami körülbelül kétszeres különbséget jelent. Bár a tenyészközegre vetített legnagyobb záránymennyiséget a W3110/pG97S4DhCT(G)R8 törzs mutatja, a hCT képződése folyamán V8 proteáz hatására a fúziós fehérje hasítása következik be, amelynek hatékonysága az előállítási folyamat termelékenységét erőteljesen befolyásolja.

A V8 proteázzal megvalósított hasítási reakció hatékonyságát a kapott záránymennyiségek alkalmazásával mérjük.

A fenti 30 literes tartályban való tenyésztés után kivettünk 1000 ml tenyészközeget, és a sejteket nagynyomású homogenizálóberendezésben (Manton Gualin Laboratory Homogenizer 15M–8TA) 600 kg/cm<sup>2</sup> nyomáson homogenizáltuk. A záránymennyiségeket tartalmazó

csapadékot 7000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással kinyertük. A csapadékhoz annyi ionmentes vizet adtunk, hogy térfogata az eredeti térfogat legyen, majd a szuszpenziót a csapadék kimosására újra centrifugáltuk.

A mosási eljárást még egyszer megismételtük, majd a csapadékot annyi vízzel hígítottuk, hogy az OD<sub>660</sub>-érték 800 legyen, majd a következő, V8 proteázzal megvalósított hasítási reakciónak vetettük alá:

A szuszpenzió 0,6 ml-éhez 75 µl 1 mol/l trisz-HCl-t (pH=8,0), 7,5 µl 0,5 mol/l-es EDTA-t (pH=8,0), 540 mg karbamidot és 100 µl 100 mmol/l DTT-t adtunk, 30 °C-on hagytuk állni 10 percig, és annyi ionmentes vizet adtunk hozzá, hogy végő térfogata 3,7 ml legyen. A kapott elegyet 30 °C-on előmelegítettük 10 percig, 7 µl V8 proteázt (1 mg/ml) adtunk hozzá, és a reakcióelegyet 1 órán át hagytuk reagálni.

A hasított hCT(G) kvantitatív meghatározását nagynyomású folyadékkromatográfiás elemzéssel (HPLC), YMC A–302 töltött oszloppal (0,46 × 15 cm, Yamamura Chemical Research) végeztük. Az eluáláshoz lineáris koncentrációgradienssel 0,1 térfogat% trifluor-ecetsavat (TFA) és 0,1 térfogat% TFA/50 térfogat% acetonitril elegyet alkalmaztunk.

Mérésekkel igazoltuk, hogy a hCT(G) fúziós fehérjéből való lehasításának hatékonysága nagymértékben a hCT(G) fúziós fehérje függvénye.

A legnagyobb hasítási hatékonyság 97%, amelyet a W3110/pG97S4DhCT(G)R4 alkalmazásával érhetünk el, és a legkisebb, 7%-os hasítási hatékonyságot a W3110/pG97S4DhCT(G)R5 mutatja.

A hasítási hatékonyság és a végő baktériumkoncentráció között nincs korreláció. Ugyancsak nincs korreláció a fúziós fehérjébe inszertált kapcsolófehérje bázikus aminosavcsoportjainak számával sem. Feltételezésünk szerint a hasítás hatékonyságát elsősorban a V8 proteáz hasítási felismerőhely-régió aminosav-szekvenciája befolyásolja.

Mivel a legnagyobb hCT(G) kinyerés a W3110/pG97S4DhCT(G)R4 törzssel érhető el, humán kalcitoninprekurzor humán kalcitoninná való, amidálőnzimmel megvalósított átalakítását ezzel a baktériumtörzssel végezzük.

#### 4. példa

##### *hCT(G) prekursor tisztítása és humán kalcitoninná való átalakítása amidálóenzimmel*

Egy 20 literes tenyésztartályban a fentiekben ismertetett eljárással W3110/pG97S4DhCT(G)R4 törzset tenyésztettünk, és a kapott fúziósfehérjezárványtest-szuszpenziót a fentiekben ismertetett eljárással kinyertük.

A szuszpenzió 6 ml-éhez 750 µl 1 mol/l trisz-HCl-t (pH=8,0), 75 µl 0,5 mol/l EDTA-t (pH=8,0), 5,4 g karbamidot és 17 mg DTT-t adtunk, és hagytuk állni 10 percig, majd annyi ionmentes vizet adtunk hozzá, hogy térfogata 37 ml legyen. A szuszpenzióhoz ezután 40 µl (1 mg/ml) V8 proteázt adtunk, és ezzel 37 °C-on 90 percig kezeltük.

A reakcióelegyet ezután ionmentes vízzel kétszeresére hígítottuk, 30 percig állni hagytuk, és ecetsavval a pH-t 4,6-ra állítottuk be. pH=4,6-nál β-gal 97S4D csapadék vált ki, és a hCT(G) a felülúszó frakcióban maradt.

A felülúszó frakciót 15 percig centrifugáltuk, és ezt a frakciót egy 10 mmol/l ammónium-acetáttal (pH=4,6) egyensúlyba hozott SP Sepharose (Tosoh) oszlopra adtuk, majd oszlopkromatográfiás eljárásnak vetettük alá.

A hCT(G)-t 40 mmol/l ammónium-acetáttal (pH=6,5) eluáltuk. Így egy liter tenyészkezege számolva közelítőleg 0,4 g hCT(G)-t kaptunk.

A fentiek szerint kapott hCT(G) amidálóenzimmel való reagáltatásával jó kitermeléssel humán kalcitonint állíthatunk elő a 2–190193 számú japán közrebocsátási iratban ismertetett eljárással.

Az amidálóreakció után YMC A–302 töltött oszlopon (Yamamura Chemical Research) nagynyomású folyadékkromatográfiás elemzést végeztünk. A kapott eredményeket a 8. ábrán mutatjuk be. Az alkalmazott eluálási körülmények között a humán kalcitonin 9,7 perc retenciós idővel jött létre, és amint az az ábrából nyilvánvaló, a termék rendkívül tisztán és magas termelékenységgel állítható elő.

#### 5. példa

##### *Humán CNP–22 gén előállítás*

A következő eljárással in vitro DNS-sokszorozítással (PCR) egy olyan humán CNP–22-t kódoló gént állítottunk elő, amelyben az N-terminális V8 proteázhoz alkalmas helyként egy glutaminsavcsoportot adtunk.

DNS-templátként pUCCNP1 plazmidot alkalmaztunk.

1,57 µg pUCCNP1 plazmidot 37 °C-on, 157 µl K-pufferben [20 mmol/l trisz-HCl, pH=8,5, 100 mmol/l KCl és 1 mmol/l ditreitol (DTT)] 12 egység EcoRI-gyel emésztettük a plazmid elhasítására.

A reakcióelegyet szokásos eljárással fenolos, 2-butanolos kezelésnek és etanolos kicsapatsnak vetettük alá, és az EcoRI-emésztett DNS-fragmenst 157 µl TE pufferben (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0 és 1 mmol/l EDTA) oldottuk.

A PCR-reakcióban alkalmazott primerek jelöléseit a 9. ábrán ismertettük.

Az 1. primert (11. számú szekvencia) úgy terveztük meg, hogy a humán CNP–22 N-terminálisához egy V8 proteázzal hasítható glutaminsavcsoport kapcsolódjon, és felfelé egy EcoRI és XhoI restriktációs enzim hasító helyet is tartalmazzon; a 2. primert (12. számú szekvencia) pedig úgy, hogy közvetlenül a humán CNP–22 gén után egy SalI restriktációs enzim hasító hely következzen.

A primereket DNS-szintetizáló berendezéssel (Applied Biosystems Model 380A) szintetizáltuk.

A szintézis után 8 mol/l karbamidot tartalmazó 20%-os poli(akril-amid) gélen elektroforézist végeztünk, és mindegyik primer előállításához a primernek megfelelő hosszúságú DNS-fragmenst felszabadítottuk.

10 ng fenti EcoRI-gyel hasított pUCCNP1-t és 100 µl reakcióoldatot (10 mmol/l trisz-HCl, pH=8,3, 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,1% zselatin és 200–200 µmol dGTP, dATP, dTTP és dCTP), amely 1–1 pmol primert tartalmazott, 95 °C-on hagytuk állni 5 percig, és az oldatokat jéggel gyorsan lehűtöttük. Az elegyhez 0,5 egység Taq DNS-polimerázt (Ampli-Taq, Takara Shuzo), majd ásványolajat adtunk a PCR-reakció kivitelezéséhez. A reakciót hőreaktorban (Hybaid) folytattuk le.

A PRC-reakciót 30 cikluson keresztül megismételtük. A ciklusok egyenként egymás utáni hődenaturálásból (92 °C, 1 perc), temperálásból (55 °C, 2 perc) és DNS-meghosszabbításból (72 °C, 3 perc) álltak. Az utolsó ciklusban a DNS-meghosszabbítás további 7 percig tartott.

Ezután a reakcióelegy térfogatát TE pufferrel 400 µl-re egészítettük ki, az egész elegyet SUPREC–02 (Takara Shuzo) berendezésbe tettük, és 8 percig 2000 g erővel centrifugáltuk. A szűrletet eltávolítottuk, majd az elegy térfogatát TE pufferrel ismét 400 µl-re egészítettük ki. Megismételtük a fenti centrifugálást. A szűrőcsésében maradt PCR-reakcióoldat térfogatát TE pufferrel 40 µl-re egészítettük ki.

A 40 µl PCR-reakcióelegyhez 5 µl tizedrésze koncentrált erős puffert (500 mmol/l trisz-HCl, pH=7,5, 1 mol/l NaCl, 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, és 10 mmol/l DTT), 36 egység EcoRI-t és 60 egység SalI-t adtunk. Az elegy térfogatát vízzel 50 µl-re egészítettük ki, és 37 °C-on, 60 perc alatt hagytuk lejátszódni a reakciót.

A reakció befejeződése után fenolos és 2-butanolos kezelést és etanolos kicsapást végeztünk, és a csapadékot TE pufferrel oldottuk. Így olyan humán CNP–22 gént kaptunk, amely mindkét végén EcoRI és SalI ragadós végeket tartalmazott.

#### 6.a példa

##### *pG97S4DhCNP–22 kifejezőplazmid szerkesztése*

A 10. ábrán ismertetett CNP–22 gén PCR-termékét olyan pG97S4DhCT(GRRR) plazmidba inszertáltuk, amely a β-gal 97S4D gént (β-galaktozidáz N-terminális 97 aminosavát tartalmazó peptid, amelyben egy ciszteinsavcsoportot szerincsoport és négy glutaminsavcsoportot aszpartinsavcsoport helyettesít) tartalmazott. A szerkesztést a következő eljárással végeztük:

10 µg pG97S4DhCT(GRRR)-t 36 egység EcoRI és 60 egység SalI alkalmazásával erős pufferben, 6 percig emésztettünk 37 °C-on.

A reakció befejezése után szokásos eljárással 1,0%-os agarózgél-elektroforézist végeztünk, és a gélből kivágtunk egy 3,2 kb EcoRI–SalI fragmensávot. A gél-szeletben lévő DNS-fragmenst egy SUPREC–01 mikrocentrifugacsőben (Takara Shuzo) centrifugáltuk, majd fenolos és kloroformos kezelést és ezt követően etanolos kicsapást végeztünk.

Az EcoRI–SalI DNS-fragmensek mindegyikének 5 µl-ét és a humán CNP–22 gén fragmens PCR-termékét (EcoRI–SalI DNS-fragmens) összekevertük, és DNS-ligáló készlettel (Takara Shuzo) ligáltuk. A ligációs elegyet *Escherichia coli* W3110 transzformálására alkalmaztuk, és az egyik transzformánst W3110/pG97S4DhCNP–22 törzsnek neveztük.

#### 6.b példa

##### *pG97S4DhCNP–22R3-2 és pG97S4DhCNP–22R5-2 kifejezőplazmid szerkesztése*

A következő eljárással a kapcsolópeptidet kódoló régióba a β-gal97S4D gén és humán CNP–22 gén közé a 11. ábrán ismertetett R3-2 vagy R5-2 aminosavszekvenciát kódoló kapcsolópeptid gént inszertáltuk. A pG97S4DhCNP–22R3-2 és pG97S4DhCNP–22R5-2 szerkesztését a 12. ábrán ismertettük.

3 µg pG97S4DhCNP–22-t 10–10 egység EcoRI és XhoI alkalmazásával 50 µl erős pufferben 37 °C-on emésztettünk 2 órán át. A reakció befejezése után 1%-os agarózgél-elektroforézist végeztünk, és a gélből elektroelúálással egy 3,2 kb DNS-fragmenst izoláltunk. Ezt a DNS-fragmenst 20 pmol kémiaiilag előállított oligonukleotiddal, amely az R3-2 és R5-2 szekvenciákat kódolja, ligálókészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával ligáltuk. A ligációs elegyet *Escherichia coli* W3110 transzformálására alkalmaztuk.

A plazmid tetraciklinrezisztens transzformált törzstől való izolálása után restrikciós enzimekkel szerkezeti elemzést végeztünk a

W3110/pG97S4DhCNP–22R3-2 és a

W3110/pG97S4DhCNP–22R5-2 céltörzsek előállításához.

#### 6.c példa

##### *pG97S4DhCNP–22R5-3 szerkesztése*

A következő eljárással a pG97S4DhCNP–22 plazmidba a 11. ábrán ismertetett R5-3 aminosavat kódoló kapcsolópeptid gént inszertáltuk.

3 µg pG97S4DhCNP–22-t 50 µl erős pufferben 10 egység EcoRI-gyel emésztettünk 37 °C-on, 2 órán át.

Az emésztés után az elegyhez az 5' defoszforilálására egy órán át, 37 °C-on 0,5 egység alkalikus foszfatázt adtunk.

Ezután az alkalikus foszfatáz inaktiválására fenolos kezelést alkalmaztunk.

Ezután 1%-os agarózgél-elektroforézist végeztünk, és így 3,2 kb DNS-t izoláltunk.

Ezt követően 3 µg R5-3 aminosavszekvenciát kódoló, kémiaiilag előállított oligonukleotidot 100 µl T4-polinukleotid-kináz-reakcióoldatban (50 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l 2-merkapto-etanol és 1 mmol/l ATP), 20 egység T4-polinuk-

leotid-kinázzal 1 órán át, 37 °C-on kezeltünk az 5'-vég foszforilezésére.

Ezután a foszforilált oligonukleotid 2 µl-ét és a fenti EcoRI-hasított, alkalikus foszfatázzal kezelt pG97S4DhCNP–22-t ligációs reakciónak vetettük alá.

A ligációs elegyet *Escherichia coli* W3110 transzformálására alkalmaztuk, és tetraciklinrezisztens transzformánsokat kaptunk.

A plazmidot restrikciós enzimekkel elemeztük, és így a W3110/pG97S4DhCNP–22R5-3-at kaptunk.

#### 7. példa

##### *Humán CNP–22 fúziós fehérje kifejezése*

A mikrobacejtekben kifejezett fúziós fehérjék izoelektromos pontja és a termelékenység közötti összefüggések vizsgálatára mikroorganizmusokat tenyésztettünk, és a sejtenként képződött fúziós fehérje mennyiségét SDS poli(akril-amid)gél-elektroforézissel vizsgáltuk.

*Escherichia coli* törzseket lombikban, 500 ml Nu1 közegben (0,4 g/l élesztő kivonat, 4 g/l kálium-dihidrogén-foszfát, 4 g/l dikálium-hidrogén-foszfát, 2,7 g/l nátrium-hidrogén-foszfát, 1,2 g/l ammónium-szulfát, 0,2 g/l ammónium-klorid, 0,8 térfogat% glicerin, 2 g/l magnézium-szulfát és 10 mg/l tetraciklin) tenyésztettünk 37 °C-on, 12 órán át.

A tenyésztés után spektrofotométerrel mértük a tenyészközeg zavarosságát (OD<sub>660</sub>), a tenyészközeget [OD<sub>660</sub>-érték × közegetérfogat (ml)] = 5 értékre állítottuk be, majd a mikrobacejtek elválasztására 5 percig 12 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. Ehhez a sejttöledékekhez 1 ml SDS mintapuffert (63 mmol/l trisz-HCl, pH=6,8, 10 térfogat% glicerin, 10 térfogat% SDS, 5 térfogat% 2-merkapto-etanol és 12,5 mg/l brómfenolkék) adtunk, és az SDS poli(akril-amid)gél-elektroforézis lefolytatásához 5 percig 95 °C-on melegítettük.

Az így kapott minta 5 µl-ét 18 mA-en, 90 percig SDS 15%-os poli(akril-amid)gél-elektroforézisnek (TEFCO) vetettük alá.

A gélelektroforézis után a gél festékoldattal (10 térfogat% ecetsav, 40 térfogat% metanol és 2 g/l Coomassie brillantkék R–250) festettük, és törzsenként megvizsgáltuk a sejtenként képződött humán CNP–22 fúziós fehérje mennyiségét. Az elektroforézisvizsgálat eredményeit a 14. ábrán mutatjuk be.

Amint azt a 14. ábrán láthatjuk, ha a 4,56 izoelektromos pontú W3110pG97S4DhCNP–22 törzs termelékenységét egyéb törzsek (4,95 izoelektromos pontú W3110pG97S4DhCNP–22R3-2, 6,22 izoelektromos pontú W3110pG97S4DhCNP–22R5-2 és 5,59 izoelektromos pontú W3110pG97S4DhCNP–22R5-3) termelékenységéhez viszonyítjuk, a W3110pG97S4DhCNP–22R3-2, W3110pG97S4DhCNP–22R5-2 és W3110pG97S4DhCNP–22R5 fúziós fehérje termelékenysége nagyobb, mint a W3110pG97S4DhCNP–22-é.

Különösen a W3110pG97S4DhCNP–22R5-2 és a W3110pG97S4DhCNP–22R5-3 tesz lehetővé nagy mennyiségű fúziós fehérje kifejezést.

A kísérlet azt is igazolja, hogy ha a fúziós fehérje izoelektromos pontját 4,9–6,9 tartományba állítjuk be, nagy mennyiségű fúziósfehérje-képződést érhetünk el.

### 8. példa

#### Humán CNP–22 fúziós fehérjéből való felszabadtatása V8 proteázzal

A humán CNP–22 fúziós fehérjéből V8 proteázzal megvalósított felszabadtatására végzett kísérletet a következőképpen folytattuk le.

A fentiekben ismertetett Nu1 közegben W3110pG-97S4DhCNP–22R3-2, W3110pG97S4DhCNP–22R5-2 és W3110pG97S4DhCNP–22R5-3 törzseket tenyésztettünk, majd 400 ml tenyészközeget nagynyomású homogenizálóban (Manton Gaulin Laboratory Homogenizer 15M–8TA) 600 kg/cm<sup>2</sup> nyomáson homogenizáltunk.

A zárványtesteket tartalmazó csapadékot 7000 fordulat/perc sebességgel, 30 percig centrifugáltuk. A kapott csapadékfrakcióhoz 400 ml A puffert (50 mmol/l trisz-HCl, pH=8,0, 2 mmol/l EDTA és 1 térfogat% Triton X–100) adtunk, majd szuszpendálás után a csapadékot újra centrifugáltuk. Ezt a kicsapattatási eljárást megismételtük, kétszer A pufferes, egyszer ionmentes vizes kicsapattatást végeztünk. Az így kapott csapadékot annyi ionmentes vízben szuszpendáltuk, hogy OD<sub>660</sub>-értéke 100 legyen, majd a fúziós fehérjét a következő eljárással, V8 proteázzal lehasítottuk.

60 µl zárványtest-szuszpenzióhoz 6,0 µl 1 mol/l trisz-HCl-t (pH=8,0), 0,6 µl 0,5 mol/l EDTA-t, 36 mg karbamidot és 3 µl 1 mol/l DTT-t adtunk, és a kapott elegyet 10 percig állni hagytuk. Ezután annyi ionmentes vizet adtunk hozzá, hogy térfogata 300 µl legyen. A kapott elegyhez 1 µl V8 proteázt (1 mg/ml) adtunk, és 30 °C-on, 1 óra alatt lejátszottuk a hasítási reakciót.

A fúziós fehérjéből lehasított humán CNP–22 kvantitatív meghatározását YMC A–302 töltött oszlopon (2,46×15 cm, Yamamura Chemical Research), nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) végeztük.

A V8 proteáz reakcióoldatot 2 mol/l karbamid és 6 térfogat%-os ecetsavoldattal 20-szorosára hígítottuk, majd 0,1 térfogat% trifluor-ecetsav (TFA) és 0,1 térfogat% TFA és 50 térfogat% acetonitril alkalmazásával lineáris koncentrációgradienssel HPLC-eluálást végeztünk. A β-gal97S4DhCNP–22R5-3 fúziós fehérje V8 proteázzal való lehasítása előtt és után kapott elúciós mintáját a 15., illetve a 16. ábrán mutatjuk be.

Amint azt a 15. és 16. ábrán láthatjuk, a V8 proteázzal emésztett fúziós fehérjéből származó csúcs azonos a humán CNP–22 standard csúccsal, azaz a fúziós fehérjéből humán CNP–22 szabadult fel.

A β-gal97S4DhCNP–22R5-2 és β-gal97S4DhCNP–22R3-2 törzsekből szintén a humán CNP–22 standarddal azonos humán CNP–22 szabadult fel.

A pG97S4DhCNP–22R3-2, illetve a pG97S4DhCNP–22R5-2 és a pG97S4DhCNP–22R5-3 törzsek humán CNP–22 felszabadtató hatékonysága rendre 99%, 95% és 92%.

A fenti eredményekből nyilvánvaló, hogy a humán CNP–22 előállítása nagy mennyiségben megvalósítható úgy, hogy a kapcsolópeptid-régió aminosav részének töltését úgy állítjuk be, hogy a fúziós fehérje izoelektromos pontja 4,9–6,9 legyen. Különösen nagy mennyi-

ségben állítható elő ezzel az eljárással a fúziós fehérje V8 proteázzal való hasításával a CNP–22.

A találmány szerinti eljárás fúziós fehérjék mikroba-sejtekben zárványtestként létrejövő, nagy mennyiségű előállítására alkalmas. Az eljárás során a fúziós fehérje izoelektromos pontját a megfelelő savas tartományba állítjuk be, és így a célpeptidet tartalmazó, nagy mennyiségű fúziós fehérjét nyerünk.

Az eljárás lehetővé teszi a célpeptidet tartalmazó fúziós fehérje gazdasejtben való nagy mennyiségű előállítását, és így az aktiv peptidek ipari méretű előállítását.

A találmány tárgyát képezi a humán calcitoninprekursor és a humán CNP–22 gazdasejtek nagyméretű tenyésztése után megvalósított fúziós fehérjéből való felszabadtatása és tisztítása. Az eljárás a humán calcitoninprekursor érett calcitoninná való, amidálóbenzimmellel megvalósított ipari méretű előállítására is alkalmas.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás peptidek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) egy A–L–B általános képletű fúziós fehérjét kódoló gén kifejezésére alkalmas kifejezőplazmiddal transzformált prokarióta gazdasejteket tenyésztünk – a képletben

B jelentése célpeptid;

A jelentése 90–200 aminosavcsoporthoz tartozó védőpeptid; és

L jelentése kapcsolópeptid, amely

a védőpeptid C-terminálisa és a célpeptid N-terminálisa között helyezkedik el;

az 1. szekvenciaábrán bemutatott aminosavszekvencia arginincsoport(ka)t tartalmazó részeit képezi;

a célpeptidnek a fúziós fehérjéből történő felszabadtatását előre meghatározott kémiai anyaggal, célszerűen enzimmel történő kezeléssel lehetővé teszi; és

az egész fúziós fehérje izoelektromos pontjának egy 4,9–6,9 értékhatárok közé eső értéket biztosít –;

ii) a tenyésztett transzformáns sejtek homogenizálásával zárványtesteket tartalmazó oldhatatlan frakciót állítunk elő;

iii) az oldhatatlan frakciót szolubilizálószerrel történő kezelésével a zárványtestekben lévő fúziós fehérjét szolubilizáljuk; és

iv) a kapcsolópeptid C-terminális aminosavcsoporthoz és a célpeptid N-terminális aminosavcsoporthoz tartozó peptidkötés elhasításával felszabadtatjuk a célpeptidet. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3–8 arginincsoportot tartalmazó kapcsolópeptidet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pBR322 plazmid tetraciklinrezisztencia-génje 403–495. nukleotidszekvenciájának egy

része által kódolt kapcsolópeptidet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás humán kalcitonin előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

5. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás szívpitvari nátriuretikus peptid, agyi nátriuretikus peptid vagy C típusú nátriuretikus peptid (CNP) előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás CNP–22 előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1992. 07. 31.)

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőpeptidként egy, a gazdasejt számára natív peptidet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy gazdasejtként *E. coli*t és védőpeptidként *E. coli*

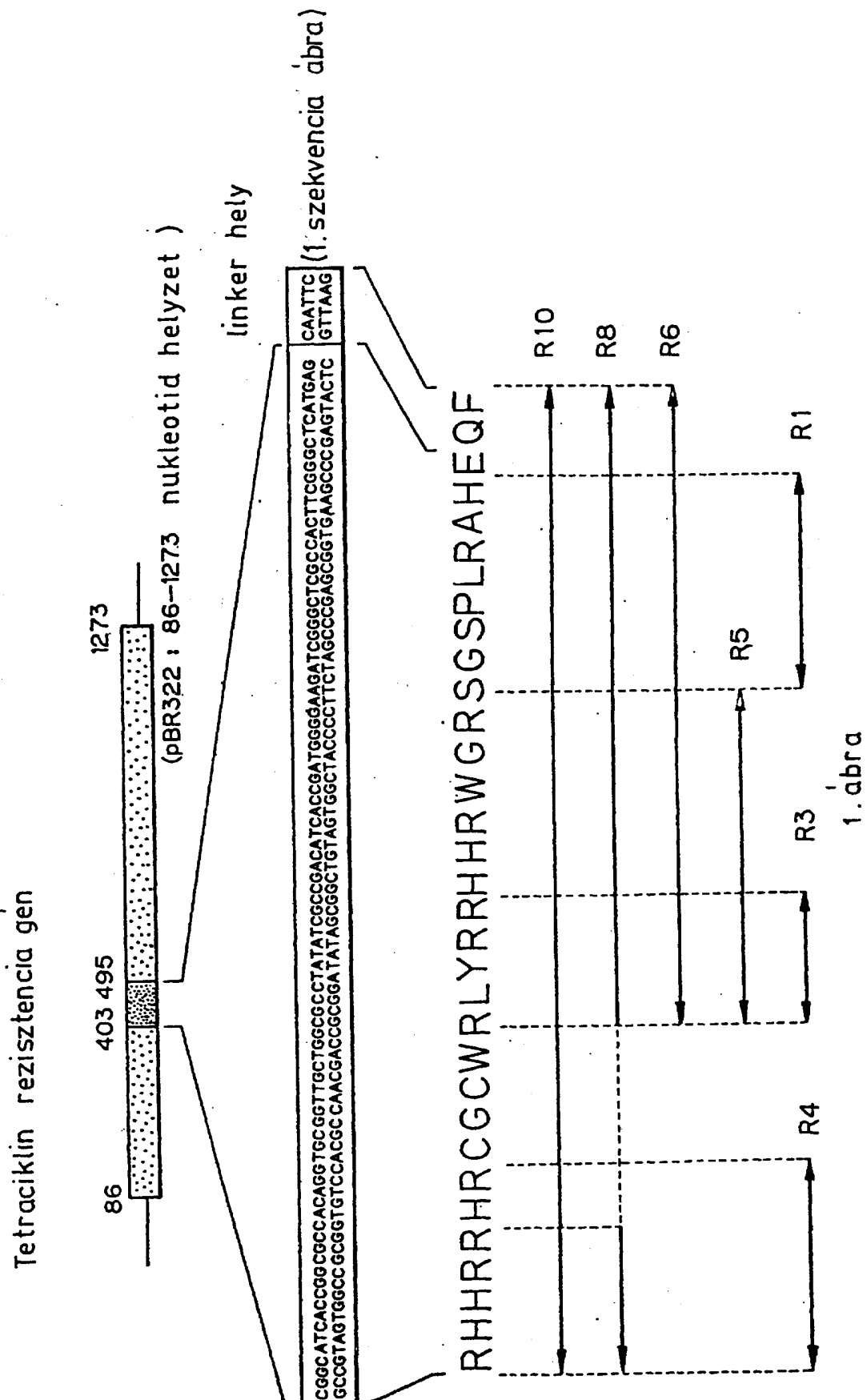
$\beta$ -galaktozidázt vagy annak részét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

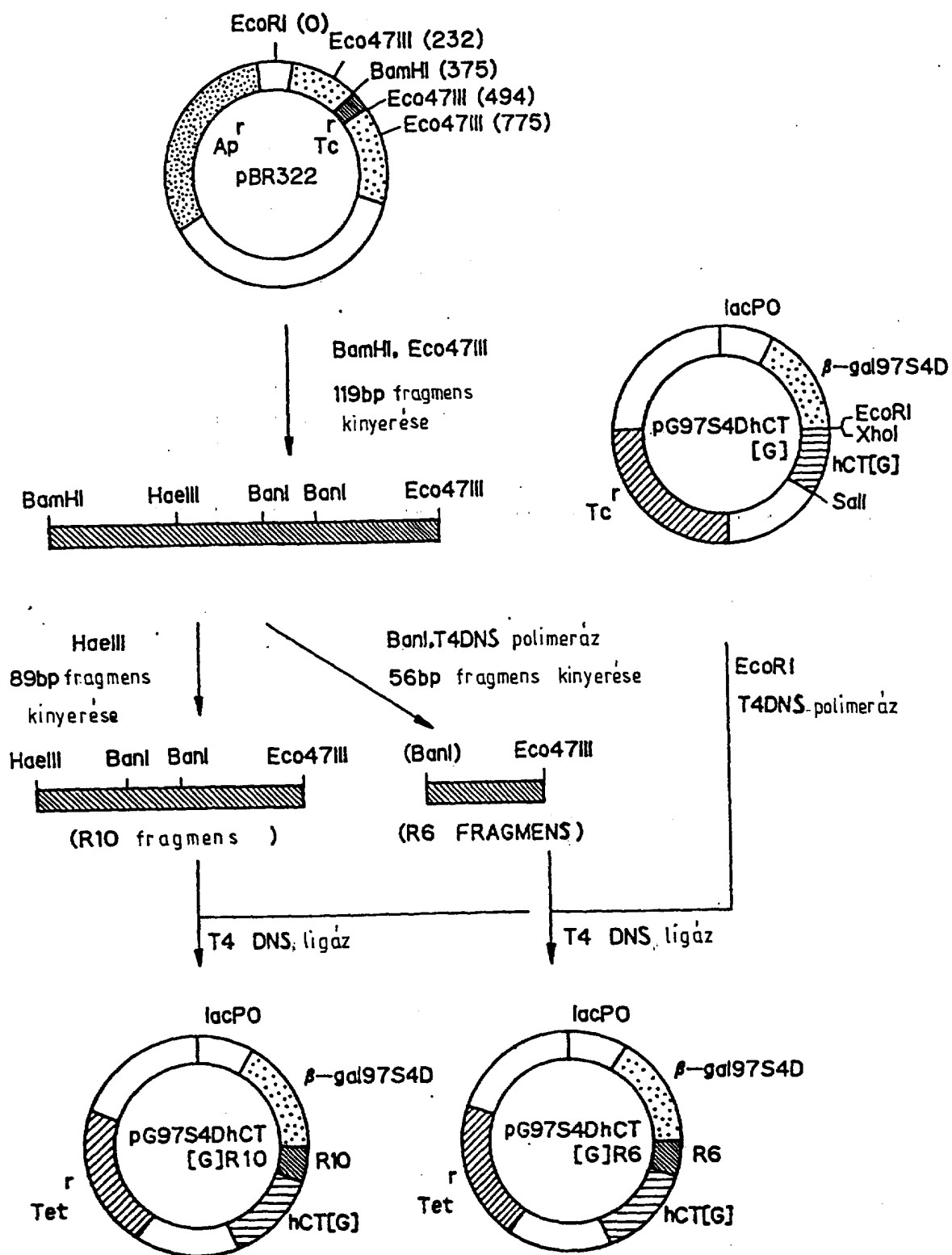
9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőpeptidként a  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális, 90–210. aminosavat tartalmazó fragmensét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy védőpeptidként a  $\beta$ -galaktozidáz N-terminális 1–97. aminosavát tartalmazó fragmensét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

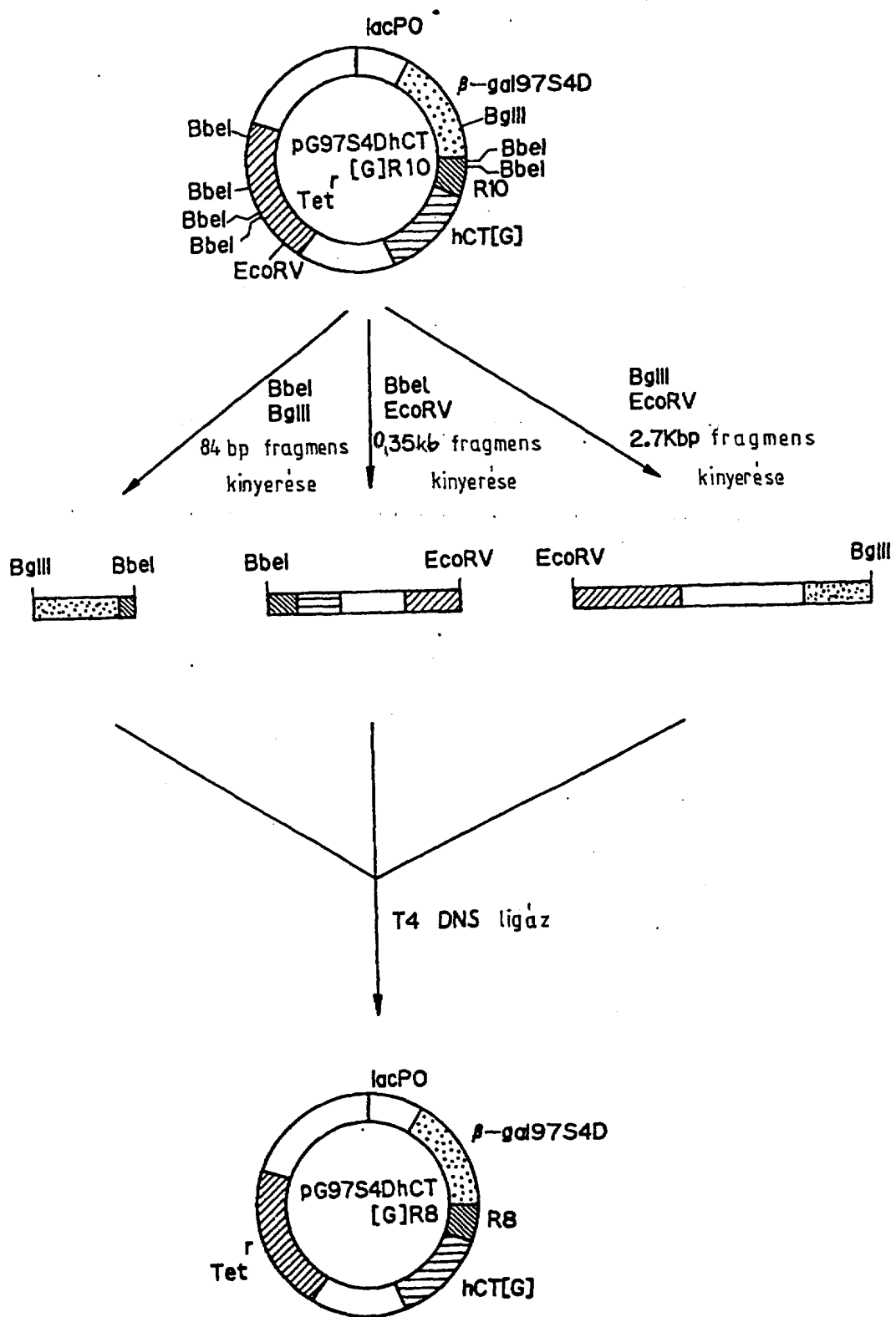
11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ciszteincsoportok helyett szerincsoportokat és glutaminsavcsoporthoz helyett aszparaginsav-csoportokat tartalmazó védőpeptidet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egyetlen arginincsoporttól eltérő kapcsolópeptidet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1991. 08. 19.)

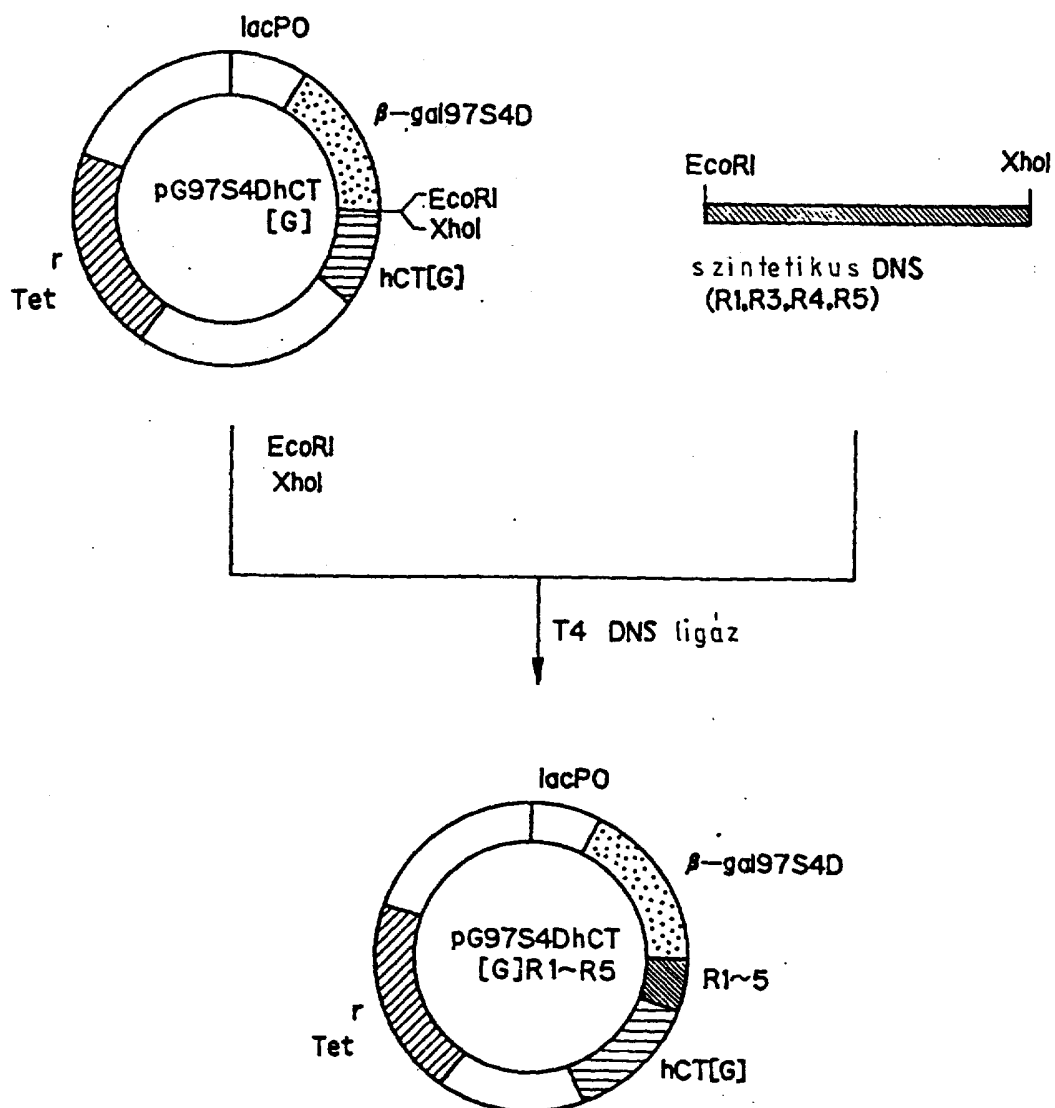




2. abra



3. abra



4. ábra

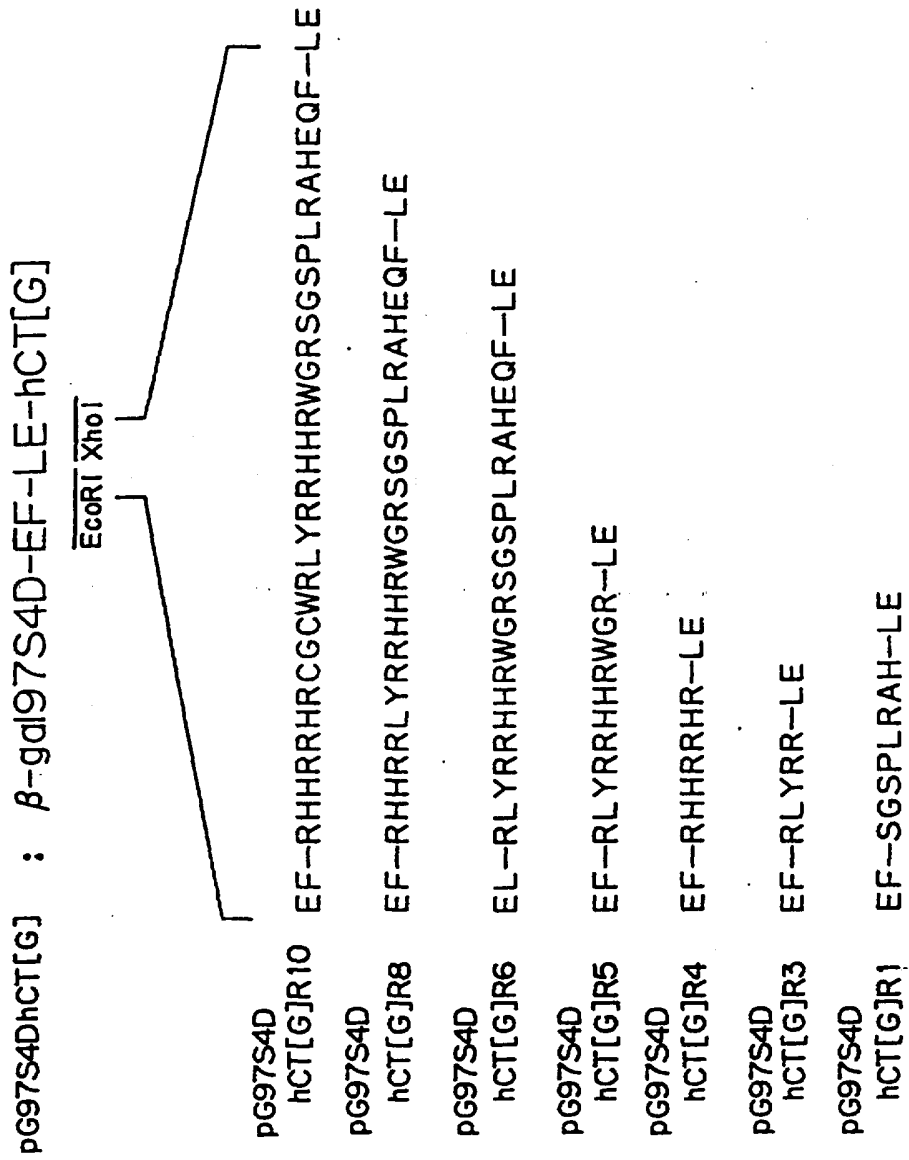
R1: 5'-AATTCTCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATC-3' (2. szekvencia ábra )  
3-GAGCCCGAGCGGTGAAGCCCGAGTAGAGCT-5' (3. szekvencia ábra )

R3: 5'-AATTCCGCCCTATATGCCCGAC-3' (4. szekvencia ábra )  
3-GCGGATATAGCGGCTGAGCT-5' (5. szekvencia ábra )

R4: 5'-AATTCCGGCATCACCGCGCCACAGGC-3' (6. szekvencia ábra )  
3-GGCCGCTAGTGGCCGCGGTGTCCGAGCT-5' (7. szekvencia ábra )

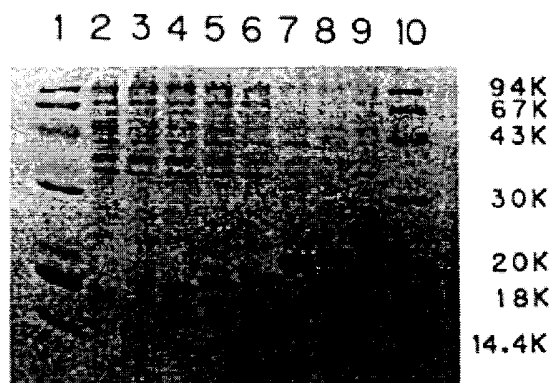
R5: 5'-AATTCCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGAC-3' (8. szekvencia ábra )  
3-GCGGATATAGCGGCTGTAGTGGCTACCCCTTCTGAGCT-5' (9. szekvencia ábra )

5. ábra



R : arginin

6. abra

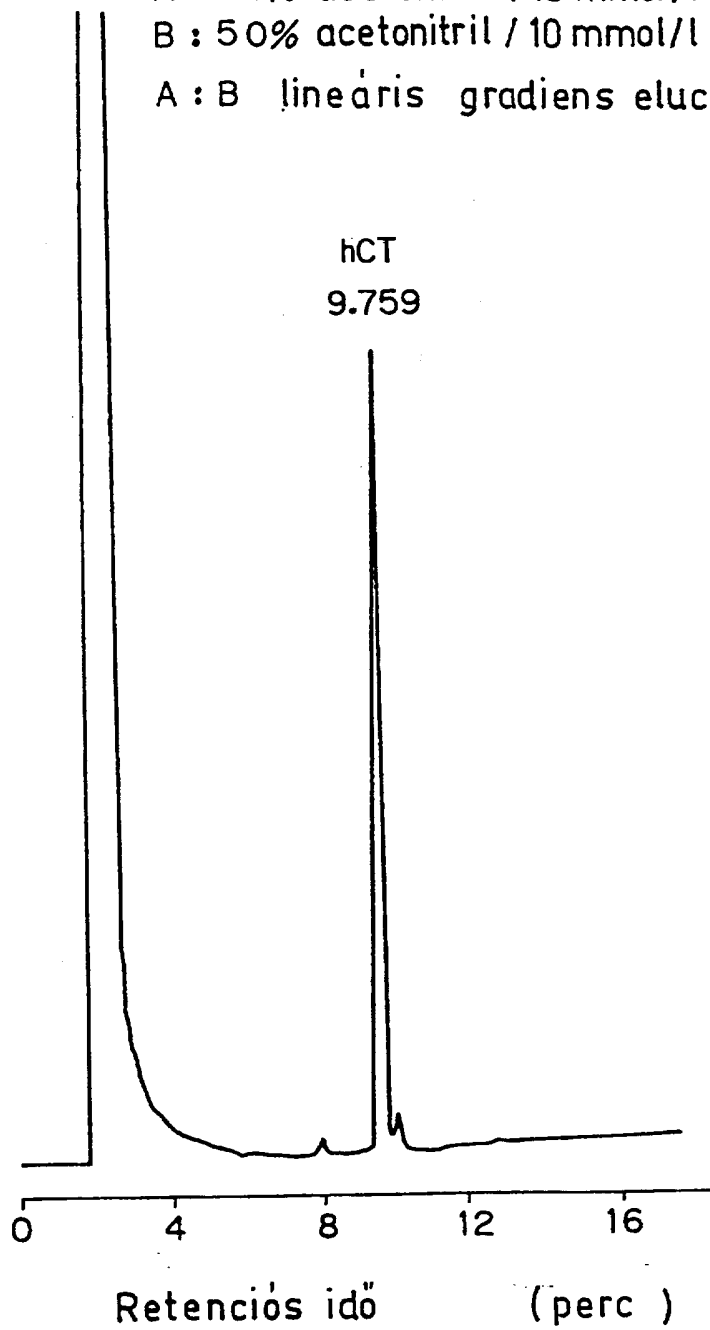


1. Moltömeg marker
2. W3110 / pG97S4DhCT[G]
3. W3110 / pG97S4DhCT[G]R1
4. W3110 / pG97S4DhCT[G]R3
5. W3110 / pG97S4DhCT[G]R4
6. W3110 / pG97S4DhCT[G]R5
7. W3110 / pG97S4DhCT[G]R6
8. W3110 / pG97S4DhCT[G]R8
9. W3110 / pG97S4DhCT[G]R10
10. Moltömeg marker

hCT fúziós proteint termelő mikroorganizmus  
16 %-os SDS-poliakrilamid - gélelektroforézise

7. ábra

A : 10% acetonitril / 10 mmol/l nátrium-acetát  
B : 50% acetonitril / 10 mmol/l nátrium-acetát  
A : B lineáris gradiens elució



8. ábra

# CNP-22 aminosav- és DNS szekvenciája

GlyLeuSerLysGlyCysPheGlyLeuLysLeuAspArgIleGlySerMetSerGlyLeuGlyCys \*

( 10. szekvencia ábra )

GGCTTGTCCAAGGGCTGCTTCGGCCTCAAGCTGGACCGAATCGGCTCCATGAGCGGCCTGGGATGTTAG  
CCGAACAGGTTCCCGACGAAGCCGGAGTTCGACCTGGCTTAGCCGAGGTACTCGCGGACCCCTACAATC

9a. ábra

Primer szerkesztése

1

EcoRI XhoI

5'-TAAGAATTCTCGAGGGCTTGTCCAAGGGCT-3'

( 11. szekvencia ábra )

Primer szerkesztése

2

3'-TCGCCGCCGGACCCCTACAATTCAGCTGAAT-5'

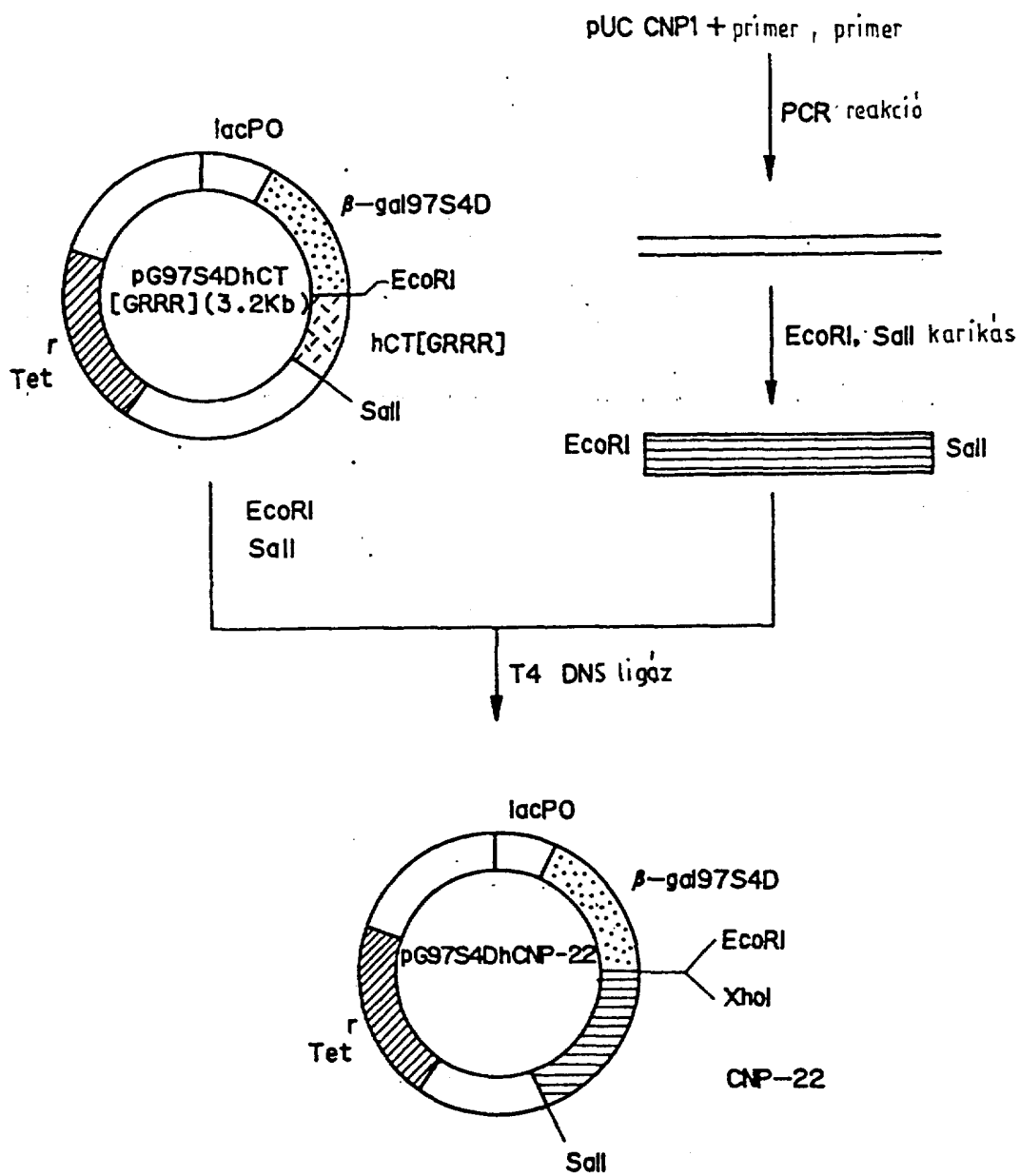
( 12. szekvencia ábra )

Sall

9b. ábra

— ahol a primer a CNP génnel kapcsolódik

[ ahol a génnek heklrtatott restrikciós enzim felismerőhelyek



10. ábra

(13. szekvencia ábra )  
(14. szekvencia ábra )

GluPheArgArgArgGluPheLeuGlu  
AATTCGGCGCCGAGAGTTCC  
GGCCGGGCTCTCAAGGAGCT

R 3 - 2

( 15. szekvencia ábra )  
( 16. szekvencia ábra )

GluPheArgArgHisArgArgHisArgGluPheLeuGlu  
AATTCGGCGCCATCACGGCGCCACCGAGATTCC  
GGCCGGGTAAGTGGCCGGTGGCTCTCAAGGAGCT

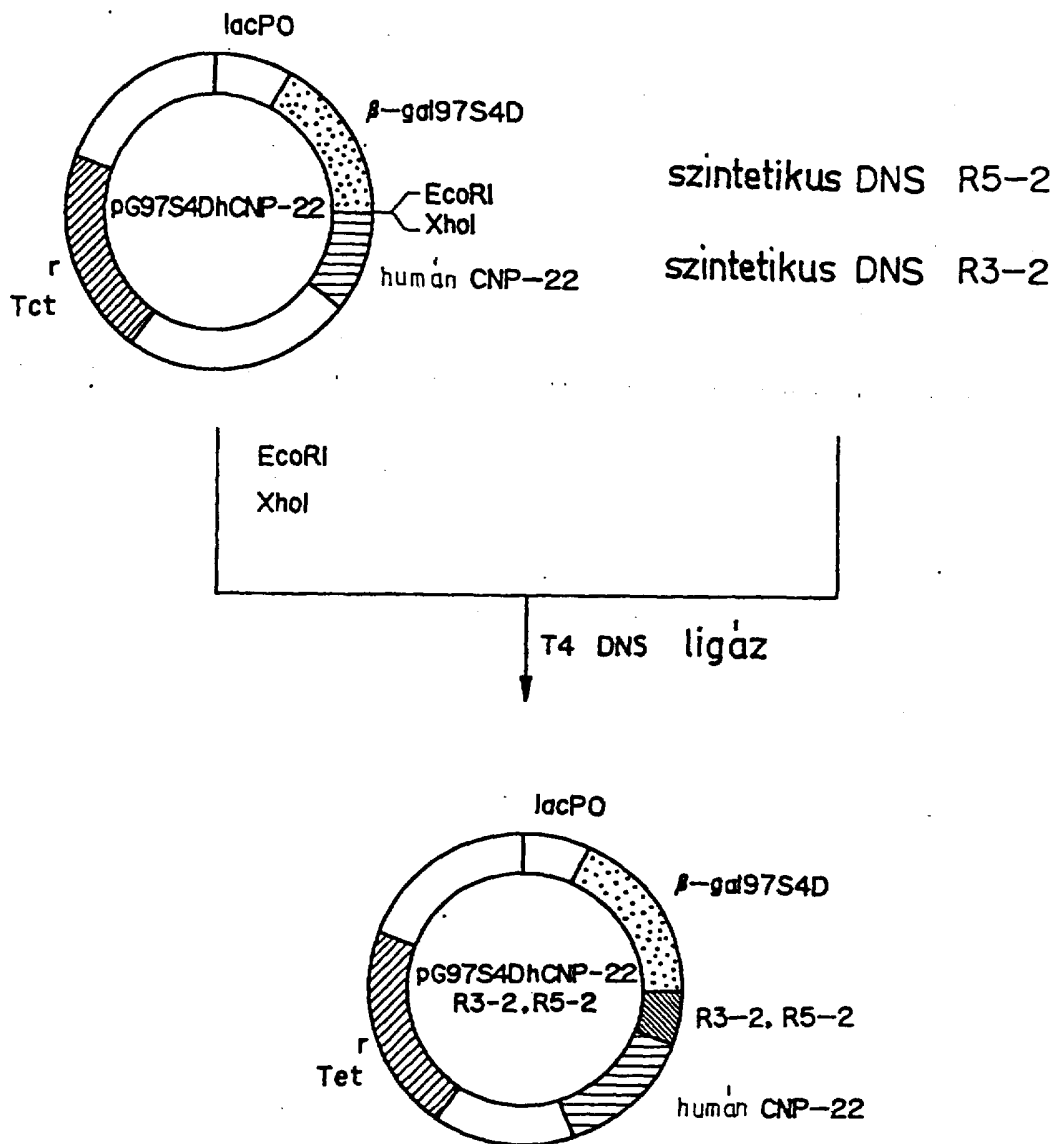
R 5 - 2

(17. szekvencia ábra )  
( 18. szekvencia ábra )

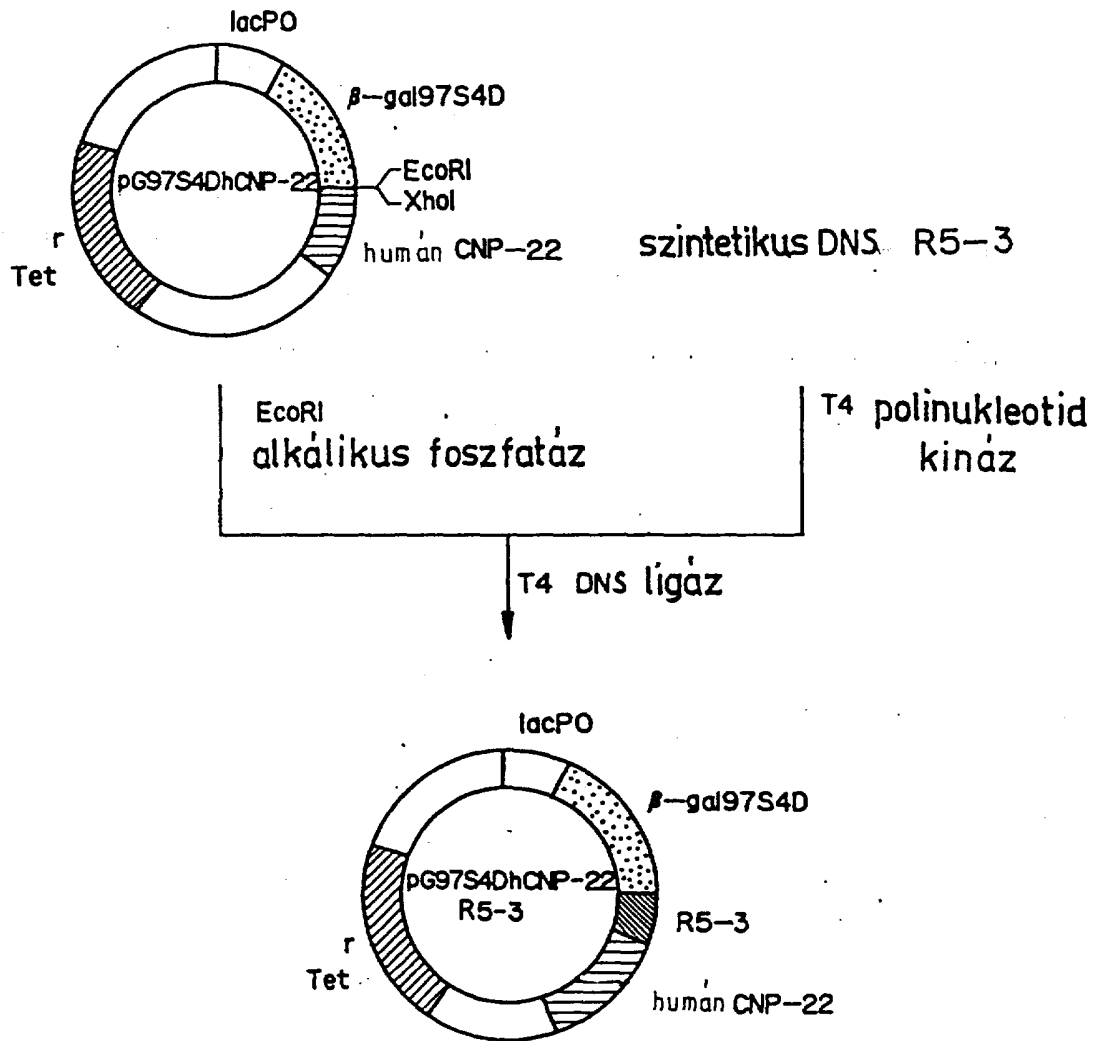
GluPheArgArgArgArgGluPhe  
AATTTCGACGCCGTCGCCGAG  
AGCTGGCGCAGCGGCTCTTAA

R 5 - 3

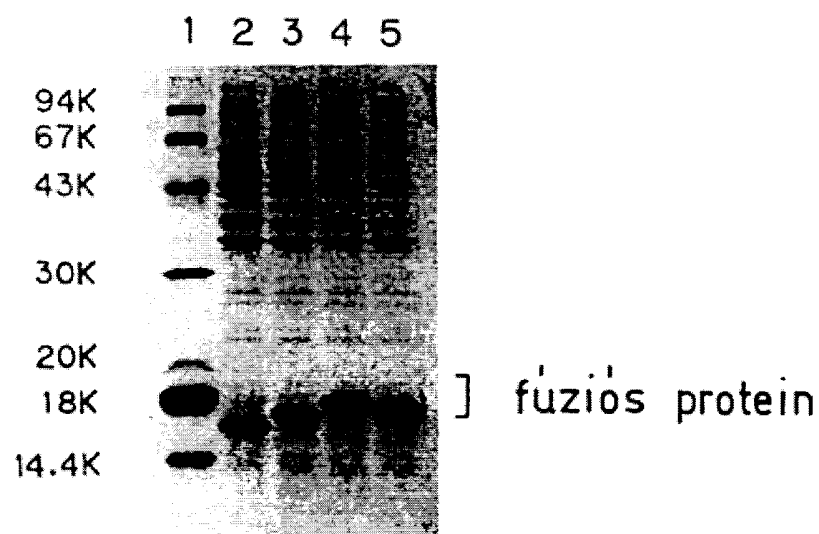
11. ábra



12. ábra

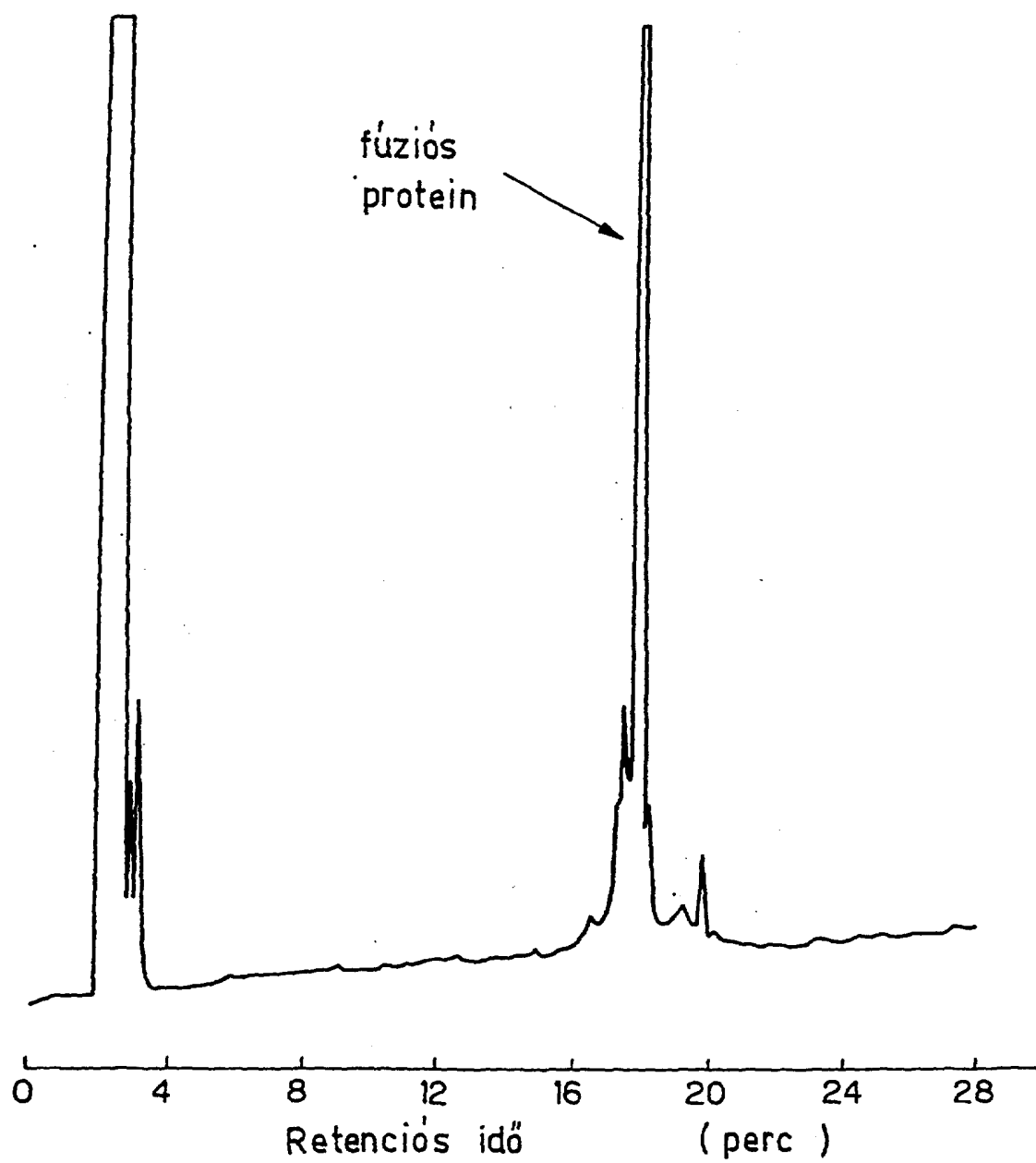


13. ábra

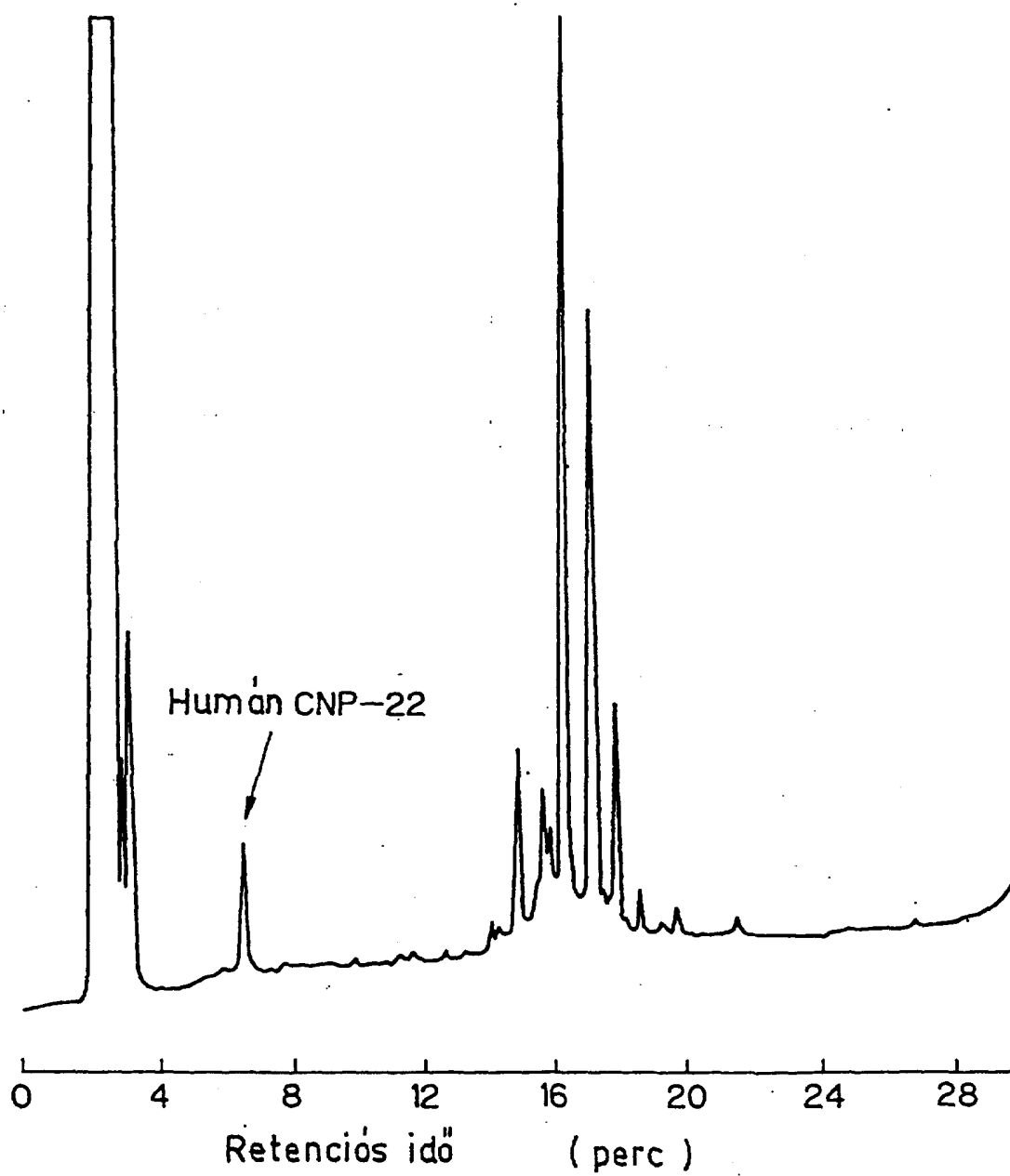


1. moltömeg marker
2. W3110/ pG97S4DhCNP-22
3. W3110/ pG97S4DhCNP-22 R3-2
4. W3110/ pG97S4DhCNP-22 R5-2
5. W3110/ pG97S4DhCNP-22 R5-3

14. ábra



15. abra



16. ábra

**1. szekvencia ábra**

45  
CGG CAT CAC CGG CGC CAC AGG TGC GGT TGC TGG CGC CTA TAT CGC  
Arg His His Arg Arg His Arg Cys Gly Cys Trp Arg Leu Tys Arg  
5 10 15

90  
CGA CAT CAC CGA TGG GGA AGA TCG GGC TCG CCA CTT CGG GCT CAT  
Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser Pro Leu Arg Ala His  
20 25 30

99  
GAG CAA TTC  
Glu Gln Phe

**2. szekvencia ábra**

30  
AATTCTCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATC

**3. szekvencia ábra**

30  
TCGAGATGAG CCCGAAGTGG CGAGCCCGAG

**4. szekvencia ábra**

21  
AATTCGCGCT ATATCGCCGA C

**5. szekvencia ábra**

21

TCGAGTCGGC GATATAGGCG G

**6. szekvencia ábra**

27

AATTCCGGCA TCACCGGCGC CACAGGC

**7. szekvencia ábra**

27

TCGAGCCTGT GGCGCCGGTG ATGCCGG

**8. szekvencia ábra**

39

AATTCCGCCT ATATCGCCGA CATCACCGAT GGGGAAGAC

**9. szekvencia ábra**

39

TCGAGTCTTC CCCATCGGTG ATGTCGGCGA TATAGGCGG

## 10. szekvencia ábra

45

GGC TTG TCC AAG GGC TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA ATC GGC  
Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly  
5 10 15

69

TCC ATG AGC GGC CTG GGA TGT TAG  
Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

## 11. szekvencia ábra

31

TAAGAATTCC TCGAGGGCTT GTCCAAGGGC T

## 12. szekvencia ábra

30

**TAAGTCGACT TAACATCCCA GGCCGCCGCT**

### 13. szekvencia ábra

**21**

AATCCGGCG CCGAGAGTTC C

**14. szekvencia ábra**

21

TCGAGGAACT CTCGGCGCCG G

**15. szekvencia ábra**

36

AATTCCGGCG CCATCACCGG CGCCACCGAG AGTTCC

**16. szekvencia ábra**

36

TCGAGGAACT CTCGGTGGCG CCGGTGATGG CGCCGG

**17. szekvencia ábra**

21

AATTTCGACG CCGTCGCCGA G

**18. szekvencia ábra**

21

AATTCTCGGC GACGGCGTCG A