

(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 12 N 15/86**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1993 01074**

(22) Indleveringsdag: **1993-09-23**

(24) Løbedag: **1983-12-15**

(41) Alm. tilgængelig: **1993-09-23**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2001-09-17**

(30) Prioritet: **1983-02-22 US 468589**

(73) Patenthaver: **Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608, USA**

(72) Opfinder: **Rae Lyn Burke, 1624 8th Avenue, San Francisco, California, USA**
Patricia Tekamp/Olson, 1426 43rd Avenue, San Francisco, California, USA
Steven Rosenberg, 3861 Fruitvale Avenue, Oakland, California, USA
Pablo D.T. Valenzuela, 455 Upper Terrace 3, San Francisco, California, USA

(74) Fuldmægtig: **Hofman-Bang Zacco A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Vektor for udtrykkelse i gær med en PyK promotor og en fremgangsmåde til syntese af hepatitis B virus overfladeantigen ved hjælp af en sådan vektor**

(56) Fremdragne publikationer:
EP A 0072318

(57) Sammendrag:

Gærceller indeholdende DNA-plasmider med fremmed DNA, hvor det fremmede DNA er udtrykt, er beskrevet. F.eks. er DNA, som koder for hepatitis B og dets virusoverfladeantigen (HBsAg) ligeret til et gær-plasmid til dannelse af et produkt, som anvendes til at transformere gærceller. Plasmidet ifølge opfindelsen har PyK promotorer og er i stand til at replikere enten i en gær-celle eller en bakteriecelle.

- 5 For maksimal udtrykkelse af fremmede gener i mikrobiolo-
giske systemer er det sædvanligvis hensigtsmæssigt at an-
vende homologe reguleringslementer inden for udtrykkel-
sesvektoren. Effektiviteten af udtrykkelsen (produkt dan-
nelsen) antages at være en funktion af og proportional
10 med styrken af den anvendte promotor. Endvidere vil regu-
lering af gen-udtrykkelsen ved hjælp af ernæringsfaktorer
under kontrol af forsøgsudøveren tilvejebringe endnu et
velegnet manipulatorisk værktøj. De glycolytiske enzym-
gener for gær, dvs. sådanne som koder for pyrodruesyre-
15 kinase (PyK), besidder de ovennævnte værdifulde egenska-
ber, dvs. høj grad af udtrykkelse (og er således ved in-
terferens meget effektive promotorer) og susceptibilitet
til regulering ved komponenter af vækstmediet.
- 20 Opfindelsen vedrører således isolation, produkter og an-
vendelsen af gærudtrykkelses-plasmider af DNA-fragmenter,
svarende til de 5'-ikke-kodende regioner af de regulerba-
re gener PyK i gær. Disse fragmenter, som indeholder DNA-
sekvenser med stærk transcriptionspromoverende aktivi-
25 tet, kaldes "promotorer". Disse er ideelle komponenter af
DNA-vektorer til teknisk fremstilling af store mængder
proteiner, kodet af fremmede gener under deres trans-
scriptionelle kontrol. Det fremmede gen er hepatitis B
overfladeantigen eller dele deraf.
- 30 Endvidere angår opfindelsen gær-udtrykkelsesplasmider,
som omfatter en egnet terminator til at danne en "kasset-
te" af promotor-fremmed gen-terminator. Tilstedeværelse
af terminatoren forøger udtrykkelsen af det fremmede DNA.

- Et tidligt forsøg på at udtrykke fremmed DNA i gær er svigtet (Beggs, J.D. et al., Nature (1980) 283:285). I denne rapport blev hæmoglobin DNA (indført sammen med sin egen promotor) transskriberet, men der var ikke splejset
- 5 RNA. En række forklaringer for dette resultat er mulige, f.eks. en ukorrekt beliggenhed for initiering af transcription og/eller en dårlig evne får gærcellerne til at udføre splejsning af berørte sekvenser (introner).
- 10 PyK-genet er blevet klonet, men kun ved genetisk komplementering (ingen strukturstudier er udført) (Kawasaki, G. and Fraenel, D.G., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1982) 108:1107). Andre gærpromotorer, f.eks. for alkohol-dehydrogenase I (Valenzuela, P. et al., Nature (1982) 298:347
- 15 og Hitzeman, R.A. et al., Nature (1981) 293:717) og phosphoglycerat-kinase (Tuite, M.F. et al., EMBO J. (1982) 1:603 og Hitzeman, R.A. et al., Science (1983) 219:620) er blevet knyttet til fremmede gener til fremstilling af gærudtrykkelse, men der har ikke været anvendt terminatorer.
- 20 Ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes hidtil ukendte promotorer for gær-udtrykkelsessystemer, hvorved der opnås fordele ved højt udtrykkelige promotorer, kombineret med forbedret udtrykkelse, som er fundet med passende ligerede terminatorer.
- 25 Publiceret europæisk patentansøgning (EP 072 318) offentliggør konstruktionen af et gær-udtrykkelsessystem som, ved induktion, udtrykker hepatitis B virus overfladeantigen (HBsAG) S-protein under kontrol af gær
- 30 alkohol dehydrogenase I (ADH-I) promotoren.

Den foreliggende opfindelse angår således en vektor for udtrykkelse i gær og af den i indledningen til krav 1 angivne art.

Vektoren er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 anførte. Vektoren koder for hepatitis B virus (HBV) overfladeantigen (HBsAg), der er under trans-
5 scriptionel kontrol af en gær-PyK-promotor. Terminatorer kan også være tilknyttet på passende måde. Udtrykkelsesvektoren har typisk en gær-replikationsoprindelse og en bakteriel replikationsoprindelse og er i stand til at replicere i begge celletyper. Udtrykkelsesvektoren, an-
10 vendt til at transformere gærceller, vil give væsentlige mængder af proteinet, der er kodet af segmentet af fremmed DNA. Udtrykkelse af HBsAg under kontrol af gær-PyK-promotor giver overraskende højt udbytte, jvnf. eksempel 4 og tabel 1.

15

Opfindelsen skal forklares ved hjælp af tegningen, hvor

fig. 1 nucleotid-sekvens af pyrodruesyre-kinase (PyK)-
gen, og

20

fig. 2 strukturen for gær-udtrykkelsesplasmid indeholdende PyK-promotor-region.

I princippet har gær-udtrykkelsesplasmider særlige forde-
25 le, herunder de i det efterfølgende angivne. Gær kan dyrkes i stor målestok ved velkendte produktionsbetingelser. Derimod er bakterier, dyrket som kultur i stor målestok, udsat for det hyppigt forekomne problem med "phage-out". Gær synes også at have samme evne som animalske eller hu-
30 mane celler at kunne tilføre carbonhydratgrupper til nylig syntetiserede proteiner, en evne bakterier ikke er i besiddelse af. Da cDNA-sekvenser er let tilgængelige, kan problemet med udtrykning af gener, der har introner, let undgås.

Endvidere angår opfindelsen en fremgangsmåde til udtryk-
kelse af det i vektoren indeholdte DNA-kodningssegment i
gær, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i den
5 kendetegnende del af krav 6 anførte.

Den omhandlede vektor omfatter promotorer med usædvanlig
høj effektivitet. En promotor er heri defineret som et
DNA-segment, der kan fungere ved at indlede transscripti-
10 on af et tilsluttet DNA-segment. Transscription er synte-
sen af RNA (her defineret som messenger RNA eller mRNA),
der er komplementært til den ene streng af det i promo-
tor-regionen tilsluttede DNA. I eukaryoter katalyseres
messenger RNA-syntese ved et enzym betegnet RNA-polymera-
15 se II. De minimale essentielle elementer af promotor-
funktionen er følgende: for at tilvejebringe et udgangs-
punkt for initieringen af transscription og danne et bin-
dingssæde for at gøre det muligt at udvælge den aktuelle
streng af DNA som en støbeform for messenger RNA-syntese.
20 Endvidere fungerer en eukaryotisk promotor til at regule-
re den relative effektivitet af transscription af kod-
ningssegmenter under kontrol heraf. En aktiv promotor er
en, som frembringer syntese af forholdsvis store mængder
mRNA, der er komplementært med en streng af det tilslut-
25 tede DNA-kodningssegment.

De strukturmæssige korrelationer for promotor-funktion er
endnu ikke tydeligt opklaret. Et promotor-segment kan
sædvanligvis identificeres som en region, der ligger nær
30 ved 5'-enden af et givet strukturelt gen. (Referencerne
til 5'- og 3'-enderne af et gen vil forstås til at inji-
cere de tilsvarende respektive ender af mRNA, der er
transscriberet derfra, og disse korrelerer med henholds-
vis NH₂- og -COOH-endegrupperne i det kodede protein).

Sammenligninger af nucleotid-sekvenserne for promotorer for forskellige gener fra forskellige arter har kun afsløret nogle få korte regioner af nucleotidsekvens med stor indbyrdes lighed. Mest bemærkelsesværdig for disse er "TATA Box", der er et segment på 5-10 nucleotider, anbragt generelt ca. 70-230 nucleotider i retning fra sædet fra transsscription-initiering, og med en sekvens generelt lignende TATAA. En oversigt af strukturmæssig sammenligning fremgår af Breathnach, R. og Chambon, P., Ann. Rev. of Biochem. (1981) 50:349. TATA Box antages at fungere ved initiering af transsscription.

Det fremmede gen vil være frit for eller i det væsentlige frit for codoner fra det normale strukturelle gen, knyttet til promotoren. Sædvanligvis vil det fremmede gen være sluttet til en ikke-kodende 3'-ende af den regulerende region, der omfatter promotoren, og således være fri for de aminosyrer ved N-terminus af endogent gen, der naturligt er associeret med den regulatoriske region. Dvs. at færre end 3 codoner (9 nucleotider) vil være tilbageholdt med den regulatoriske region, når den er sluttet til det fremmede gen.

Tilstedeværelsen af terminator-sekvensen ved 3'-enden af kodningssegmentet forhøjer udtrykkelsen. Effekten er i almindelighed tilsvarende tilsætning af rho-faktoren til prokaryotiske transsscriptionssystemer, hvori hastigheden af frigivelsen af RNA-polymerase er forøget til at producere en forøgelse af hastigheden af reinitieringen af transsscription. Det vil forstås, at medens terminator-sekvenserne ikke kræves til påviselig udtrykkelse af fremmede DNA-segmenter, foretrækkes det på passende måde at knytte dem til forøget udtrykkelse. Terminatorregion-

en kan være naturligt associeret med det samme eller forskellige strukturelle gener som promotor-regionen.

Den mest velegnede DNA-vektor for PyK-konstruktion ifølge
5 opfindelsen er en skyttel-vektor. Disse vektorer kan
veksle som en skyttel mellem en bakteriestamme, f.eks. E.
coli, og gær, fordi de har en bakteriel replikationsop-
rindelse og en gær-replikationsoprindelse, se f.eks. Am-
merer, G. et al., Recombinant DNA, Proc. Third Cleveland
10 Symposium Macromolecules (Walton, A.G., ed.), p. 195,
Elsevier, Amsterdam (1981). En typisk bakteriel replika-
tionsoprindelse er f.eks. afledt af pBR322. Den mest
egnede gær-replikationsoprindelse er fundet i det ekstra-
chromosomale genetiske element, der er kendt som 2 mi-
15 cron-cirkel. I laboratoriestammer har 2 mikropلاسmid DNA
vist sig at være til stede i tilnærmelsesvis 50 kopier
pr. celle og opretholdes stabilt. En oversigt heraf frem-
går f.eks. af Curr. Topics Micro. Imm. (1982) 96:119.
Dette gærplasmid er også blevet bestemt (Hartley, J.L. et
20 al., Nature (1980) 286:860).

Repræsentative prøver af plasmiderne og værtscellerne,
der anvendes ved strukturen ifølge opfindelsen, er depo-
neret hos American Type Culture Collection, 12301 Park-
25 lawn Drive, Rockville, Maryland. Plasmid pPyK 9.1.1 og
gærcelletransformanter 2150-2-3/pHBS-56 og 2150-2-
3/pHBS56PyK blev deponeret 18. februar 1983 og har fået
ATCC-registreringsnumrene 40061 og 20666.

30 Mange af de i de efterfølgende eksempler omtalte teknik-
ker, reaktioner og adskillellesprocedurer er i og for sig
velkendte. Alle enzymer, med mindre andet er angivet, kan
tilvejebringes fra en eller flere kommercielle kilder,
såsom New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; Colla-

borative Research, Waltham, Massachusetts; Miles Laboratories, Elkhart, Indiana; Boehringer Biochemicals, Inc., Indianapolis, Indiana og Bethesda Research Laboratories, Rockville, Maryland. Puffere og reaktionsbetingelser for
5 enzymprocesser blev valgt efter anbefaling fra leverandøren af hvert enkelt enzym, med mindre andet er angivet. Standardmetoder for andre enzymreaktioner, gel-elektroforese-separationer og E. coli transformation er beskrevet i Methods in Enzymology, (1979) 68. Transformation af
10 gærprotoplaster kan udføres som beskrevet af Beggs, Nature (1978) 275:104.

Stammen af E. coli, der egner sig til transformation, omfatter X1776; K12-stammen 294 (ATCC no. 31446); RR1 og
15 HB101. Gærstammer XV610-8c med genotypen (a ade2 ade6 leu2 lys1 trp1 can1) og GM-3C-2, genotype: (Leu2 Trp1 His4 CYC1-1CYP3-1) (Faye, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1981) 78:2258) kan typisk anvendes til gærtransformationer. Det vil dog forstås, at praktisk taget enhver
20 gærart er velegnet til transformation. Bakterie kan dyrkes og udvælges i overensstemmelse med en procedure, som er beskrevet af Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972). Gær kan dyrkes på følgende medier:
25 YEPD med 1% (w/v) gærekstrakt, 2% (w/v) pepton og (w/v) glucose; og, i tilfælde af plademedium, 3% (w/v) agar. YNB plus CAA indeholder 6,7 g gærnitrogenbase (Difco Laboratories, Minneapolis, Minnesota), 10 mg adenin, 10 mg uracil, 5 g casaminsyrer (CCA) (Difco), 20 g glucose; og
30 i tilfælde af plademedier, 30 g agar pr. liter. Udvalgelse af tryptophanprototrofi kan ske på plader indeholdende 6,7 g gærnitrogenbase (mangel-aminosyre), supplementær med alle vækstbetingelser for den stamme, der skal transformeres, med undtagelse af tryptophan.

EKSEMPEL 1Kloning af gær-pyrodruesyre-kinase-gen

5

Pyrodruesyre-kinase-genet blev klonet ved komplementering. En gær-pyrodruesyre-kinase minus mutant blev transformeret med en portion rekombinant YEp24 plasmider indeholdende gær-genomisk DNA. Gærstammerne S288C (genotype: 10 SUC2, mal, gal2, CUP1) og PyK 1-5 (genotype a, adel, leul, met14, ura3, pyk1-5) blev leveret fra Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics, University of California, Berkeley. Den anvendte gær-genombank består af et partielt Sau3A præparat af total DNA fra stammen S288C 15 klonet i BamHI-sædet af "skyttel"-vektor YEp24. Vektoren YEp24 indeholder pBR322-sekvenser til udvælgelse og vækst i bakterier, gær URA3-genet til udvælgelse i gær og et EcoRI-fragment af gær 2 μ cirkel til sikring af plasmid-replikation og segregering i gær. Portionen omfatter til- 20 strækkeligt uafhængige rekombinant-plasmider til at repræsentere hele gær-genomet.

Stammen pyk1-5 er ikke i stand til at gro på medium indeholdende glucose eller manglende uracil på grund af mutationer i denne stamme ved henholdsvis PyK1 og URA3-sæderne. Transformation af denne stamme med YEp24 genomisk bibliotek og udvælgelse for transformanter, der kan gro på et medium, som mangler uracil og indeholder glucose, udvælger sådanne celler, som har erhvervet YEp24, indeholdende pyrodruesyre-kinase-genet. Transformation af $3,5 \times 10^9$ pyk1-5 gærceller med 10 μ g YEp24 rekombinant-plasmid-DNA gav 5 uafhængige transformanter, som voksede i fraværelse af uracil og i nærværelse af glucose. 30

Karakterisation af det indsatte DNA i disse transformanter ved restriktionsenzym-analyse angav, at de indeholdt overlappende DNA-indsætninger. Der er fokuseret på en enkelt transformant, pPyK 9,1, som indeholdt en 7,0 kb indsats. Pyrodruesyre-kinase-genet blev lokaliseret inden for denne indsætning ved bestemmelse hvilken indsætnings-specifik restriktions-fragmenter, som hybridiserede til et mRNA på ca. 1,7 kb, hvilket er forventet for pyrodruesyre-kinase-mRNA. Lokalisering af PyK-genet blev bekræftet ved underkloning af passende regioner af det indsatte DNA og iagttagelse af komplementering af funktion i pyk1-5-mutant. En underklon pPyK 9.1.1, som indeholdt PyK-genet på en 4,4 kb indsætning blev rækkebestemt og anvendt til udtrykkelse af plasmidstrukturer.

15

EKSEMPEL 2

Sekvens af gær-pyrodruesyre-kinase-gen

20

Ialt 2885 nucleotider af PyK-genet er blevet rækkebestemt, omfattende 1497 nucleotider i en enkelt åben kæde, 911 nucleotider af 5'-ikke-translaterede region og 477 nucleotider af 3'-ikke-translaterede region (se fig. 4). Genet forkoder for et polypeptid med 499 aminosyrer til opnåelse af en monomer molekylvægt på 54,608 dalton, hvilket er i god overensstemmelse med den ventede værdi for gær-PyK. Aminosyrekompositionen, afledt fra nucleotidsekvensen svarer også nøje til den, som er målt for det isolerede gær-protein. Nucleotidsekvensen forudsiger en carboxy-terminalvalin, som er fundet for gær-pyrodruesyre-kinase.

30

EKSEMPEL 3Struktur for gær-udtrykkelles-plasmider under anvendelse af pyrodruesyre-kinase-promotor-region

5

To forskellige strukturer blev fremstillet: pHBS16 PyK og pHBS56 PyK. Proceduren er den i fig. 5 illustrerede.

Plasmidet pPyK 9.1.1, som indeholder gær-PyK-genet klonet
 10 i pBR322 blev omsat med XbaI, og de udragende ender blev fyldt op med deoxynucleotider ved hjælp af DNA-polymerase I. Produktet blev omsat med BamHI for endeligt at isolere et 912 bp BamHI-afstumpet fragment, indeholdende PyK-promotor og 8 baser fra PyK-kodningsregion. Dette fragment
 15 blev legeret til plasmid-pHBS-6 (indeholder HBsAg-genet, hvori den 5'-ikke-kodende region er blevet fjernet, klonet i pBR322), forud omsat med NcoI, fyldt ind ved hjælp af DNA-polymerase og omsat med BamHI. Efter transformation af E. coli blev pHBS-6PyK isoleret. Dette plasmid in-
 20 deholder PyK-promotor med codoner for 3 ekstra aminosyrer, smeltet i fase med HBsAg-kodningssekvens,

ATGTCTAG CATG .
 └────────┘ └──┘

25

pHBS-6PyK blev omsat med BamHI til afslutning og delvis reageret med EcoRI til isolering af 1750 bp BamHI-EcoRI-fragment, indeholdende PyK-promotor, smeltet til HBsAg-genet. Dette 1750 bp-fragment blev ligeret til det store
 30 fragment, som er opnået efter omsætning af pHBS-16 (ATCC register No. 40043, plasmid, beskrevet i USA patentansøgning nr. 442 687, med benævnelsen "Adenovirus Promotor in Yeast", med BamHI og EcoRI og anvendt til transformering af E. coli. Der opnåedes gær-udtrykkellesplasmidet pHBS-

16PyK. Dette pHBS-16PyK blev omsat til afslutning med SphI og XbaI, og et 1200 bp SphI-XbaI-fragment (indeholdende 200 bp af pBR322, PyK-promotoren og 100 bp af 5'-region af HBsAg-genet) blev isoleret. Dette 1200 bp SphI-XbaI-fragment blev ligeret til et 1070 bp XbaI-SphI-fragment (isoleret fra pHBS-56) indeholdende 3'-enden af HBsAg-genet og ADH-1-terminatoren. Efter omsætning med SphI isoleredes et SphI-SphI 2300 bp-fragment (kassette) indeholdende PyK-promotor, HBsAg-gen og ADH-1-terminator. Dette kassette-fragment blev klonet i pHBS-56, som forud var omsat med SphI. Gær-udtrykkelsesplasmid pHBS-56 PyK blev opnået. Dette plasmid blev anvendt til at transformere gærstammen AB102 (se eksempel 2) eller stammen 2150-2-3 (se eksempel 2).

EKSEMPEL 4

Syntese af HBsAg i gær under PyK-promotor-kontrol

100 ml Kulturer af stammen AB102, indeholdende plasmid pHBS-56 PyK blev dyrket til optisk tæthed ved 650 nm af 1-2. Cellefrit lysat blev fremstillet ved omrøring med glaskugler og fjernelse af celle-debris ved centrifugering. HBsAg blev målt ved Abbott AusriaII radioimmunoprøver, og protein-koncentrationen blev bestemt ved Coomassie-blåt-bindingsmetoden. Resultaterne fremgår af tabel 2. De viser, at PyK-promotor er mindst to gange mere effektiv end ADH-1-promotor for udtrykkelse af proteinproduktet i gær.

Tilsvarende resultater blev opnået ved at benytte gærstammen 2150-2-3 i stedet for stammen AB102 og i øvrigt gentage eksempel 4.

5 TABEL 1: Syntese af HBsAG i gær

	(a) fra pHBS-56 (kontrol, ADH-I promotor)			
				Spec.
	<u>Exp#</u>	<u>sAg</u>	<u>protein</u>	<u>aktivitet</u>
10		($\mu\text{g/ml}$)	(mg/ml)	($\mu\text{gsAg/mg protein}$)
	1	8,2	24	0,34
	2	7,2	24	0,32
	3	4,7	27	0,23
15	(b) fra pHBS-56 PyK (PyK-promotor)			
				Spec.
	<u>Exp#</u>	<u>sAg</u>	<u>protein</u>	<u>aktivitet</u>
		($\mu\text{g/ml}$)	(mg/ml)	($\mu\text{gsAg/mg protein}$)
20	1	18	2,5	0,68
	2	10,6	22	0,48
	3	15,2	27	0,56

25

Tilsvarende resultater blev opnået ved at benytte gærstammen 2150-2-3 i stedet for stammen AB102 og i øvrigt gentage eksempel 4.

P a t e n t k r a v :

- 5 1. Vektor for udtrykkelse i gær, bestående af et fremmed
DNA-segment, der er under kontrol af en gær-pyrodruesyre-
kinasepromotor, k e n d e t e g n e t ved, at segmentet
er orienteret korrekt for transscription og har færre end
tre codoner fra gær-pyrodruesyre-kinase ved 5'-enden af
10 det nævnte fremmede DNA, som koder for hepatitis B
overfladeantigen eller en del deraf.
2. Vektor ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
den omfatter en terminator, knyttet til 3'-enden af seg-
15 mentet med fremmed DNA.
3. Vektor ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
den omfatter gær 2 micron plasmid-DNA eller en del deraf.
- 20 4. Plasmid pHBS-56 PyK, der har ATCC nummer 20666.
5. Fremgangsmåde til udtrykkelse af et DNA-kodningsseg-
ment i gær, k e n d e t e g n e t ved,
- 25 (a) at kodningssegmentet indsættes i en gær-udtryk-
kelsesvektor, hvilken vektor omfatter et DNA-segment, som
indeholder gær-pyrodruesyre-kinase-promotor, der har
færre end tre codoner fra 5'-enden af gær-pyrodruesyre-
kinase, hvilken promotor er knyttet til 5'-enden af det
30 indsatte DNA-kodningssegment og således orienteret, at
transscriptionen, der initieres i den nævnte promotor,
omfatter kodningssegmentet, således at der opstår en
kodningssegment-udtrykkelsesvektor, hvori DNA-segmentet

koder for hepatitis B overfladeantigen eller en del deraf.

(b) at gærcellerne med kodningssegment-udtrykkelsesvektoren transformeres.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at gær-udtrykkelsesvektoren yderligere omfatter en terminator, der er knyttet til 3'-enden af det indsatte DNA-kodningssegment.

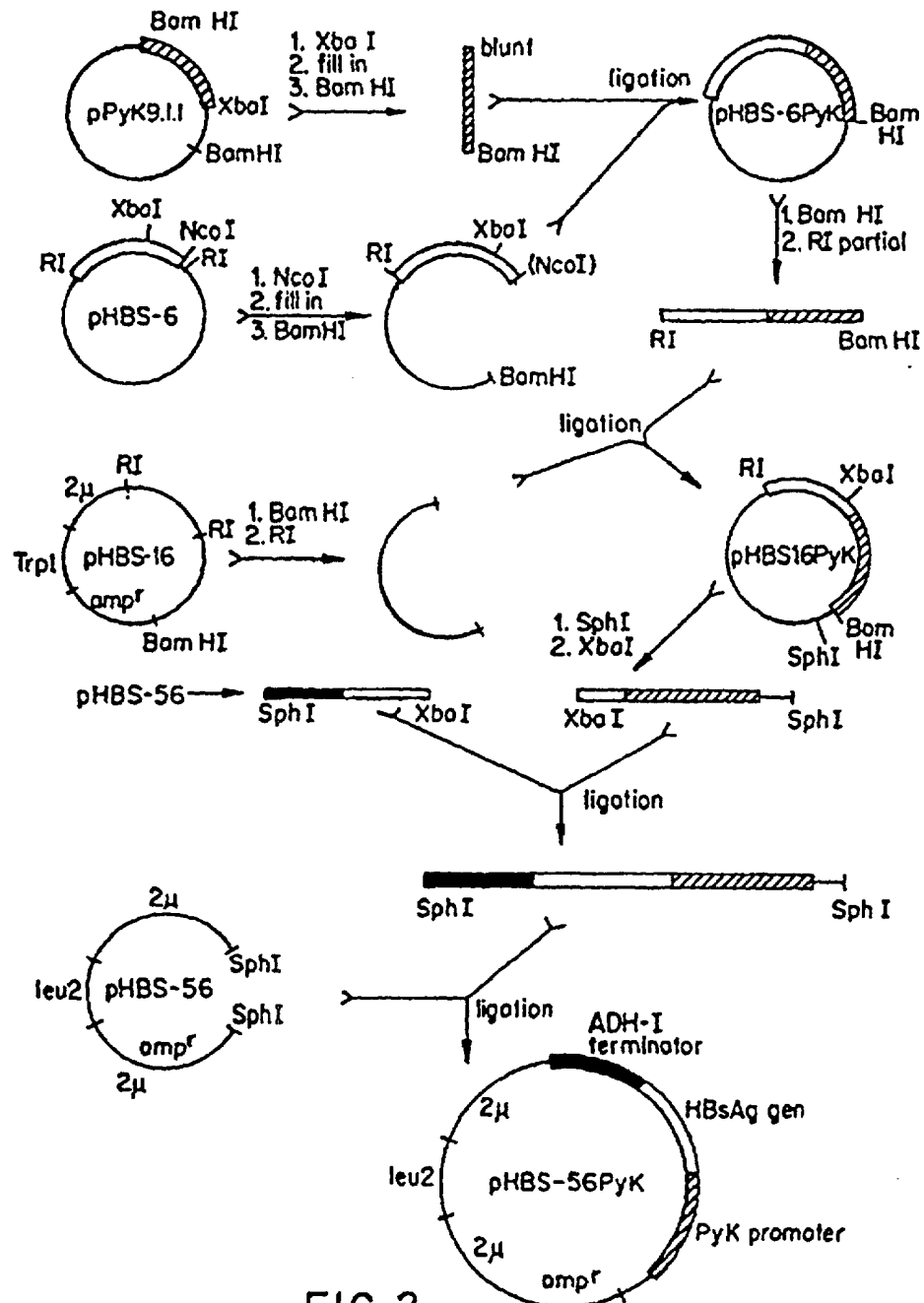
7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at gær-udtrykkelsesvektoren yderligere omfatter en bakteriecelle-replikation og er i stand til at replikere i en bakteriecelle.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den nævnte terminator omfatter alkohol-dehydrogenase I terminator fra gær.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den nævnte terminator består af PyK-terminator fra gær.

FIG. 1

Nucleotid-sekvens af pyrodruesyre-kinase (PyK)-gen



Strukturen for gær-udtrykkellesplasmid indeholdende PyK-promotor-region