

(19) **DANMARK**

(11)

DK 175846 B1



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: **C 12 P 21/02** **A 61 K 38/00** **C 12 N 1/19** **C 12 N 15/14** **C 12 N 15/62**
C 12 N 15/81

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 03831**

(22) Indleveringsdag: **1989-08-04**

(24) Løbedag: **1989-08-04**

(41) Alm. tilgængelig: **1990-02-06**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2005-03-29**

(83) Deponering af mikroorganismer.

(30) Prioritet: **1988-08-05 FR 8810615** **1989-07-03 FR 8908897**

(73) Patenthaver: **Rhône-Poulenc Santé, 20, Avenue Raymond Aron, F-92160 Antony, Frankrig**

(72) Opfinder: **Reinhard Fleer, 1, allée Port-Royal - Résidence de l'Abbaye, 91190 Gif Sur Yvette, Frankrig**
Hiroshi Fukuhara, 160, avenue de Général Leclerc Résidence de Courcelles - Bat. 7, 91190 Gif Sur Yvette, Frankrig
Patrice Yeh, 13, rue Linné - Bat. B, 75005 Paris, Frankrig

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

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af humant serum albumin ved hjælp af gær**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Mikrobiologisk metode til fremstilling af humant serum albumin og andre heterologe (ikke gær) proteiner ved at dyrke en gærart, specielt af slægten *Kluyveromyces* under anvendelse af rekombinante DNA-metodikker.

fortsættes

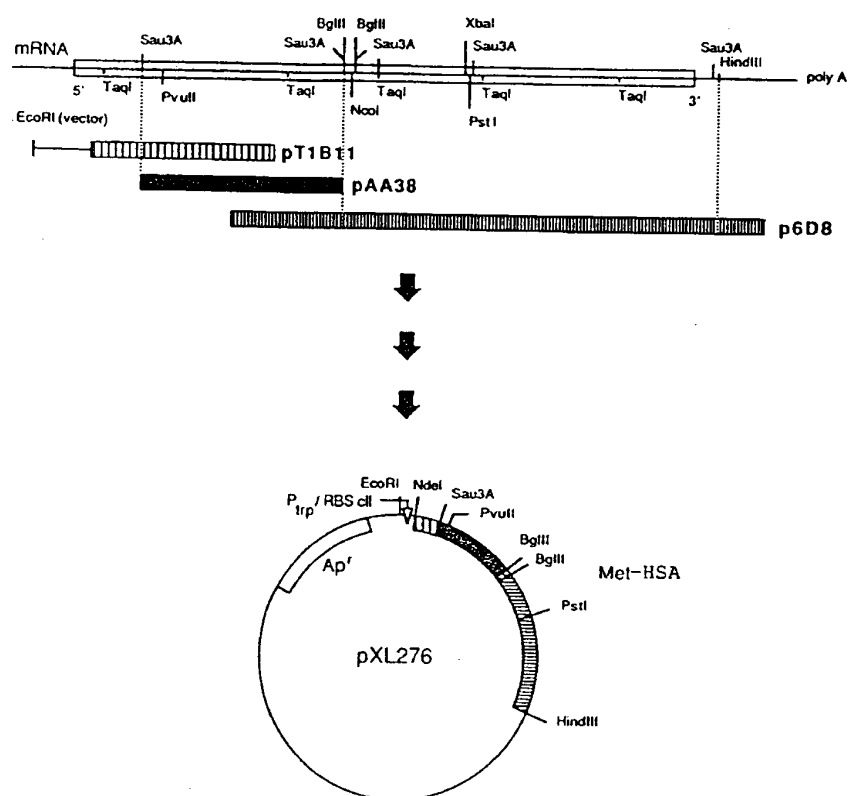


FIG. 1

Den foreliggende opfindelse angår en mikrobiologisk metode til fremstilling af humant serumalbumin (HSA) ved at dyrke gær, specielt af slægten *Kluyveromyces*, der er modificeret under anvendelse af rekombinante DNA-metoder.

5

HSA er et protein på 585 aminosyrer med en molekylvægt på 66 kilodaltons (kd) i form af en kugleformet, uglycosyleret monomer. Dens kugleformede opbygning opretholdes ved hjælp af 17 disulfidbindinger, der frembringer en rækkefølge af 9 dobbelte slyngninger (Brown, J.R., in "Albumin Structure, Function and Uses", Rosenoer, V.M. et al., (udg.), Pergamon Press, Oxford, (1977) 27-51). Generne, der koder HSA, er kendt for at være højt polymorfe og mere end 30 tilsyndeladende forskellige genetiske varianter er blevet typebestemt ved hjælp af elektrophoretisk analyse under forskellige betingelser (Weitkamp, L.T. et al., Ann. Hum. Genet. 37 (1973) 219-226). HSA-genet er opsplittet i 15 exoner med 14 intronsekvenser og omfatter mere end 16,9 kilobaser (kb) fra det formodede "Cap" sted til det første poly(A)additionssted.

20

Humant albumin syntetiseres i leveren hepatocytter, fra hvilke det udskilles i blodstrømmen. Det er det mest rimeligt forekommende protein i blodet med en koncentration på 40 g/liter serum; der er derfor ca. 160 g cirkulerende albumin i det menneskelige legeme på et hvilket som helst tidspunkt. Den vigtigste rolle for HSA er at opretholde normalt osmolaritet i blodstrømmen. Det har også en eksceptionel bindingsevne for forskellige forbindelser og spiller herudover en rolle ved den endogene transport af hydrophobe molekyler (f.eks. steroider og galdesalte) såvel som af forskellige terapeutiske forbindelser, der således kan transporteres til deres respektive virkningssteder. Yderligere har man fornyligt vist at HSA er impliceret i prostaglandinernes katabolisme.

35

Syntesen af HSA i hepatocytterne giver først en precursor, prepro-HSA, der indeholder et signalsekvens på 18 aminosyrer, der dirigerer det nascente polypeptid til den secernerende del. Denne signalsekvens afspaltes, sandsynligvis ved co-translational bearbejdning, inden proteinet frigøres fra det endoplasmiske reticulum. Denne første proteolytiske spaltning giver precursor pro-HSA, der stadig indeholder et N-endestillet hexapeptid (Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg), der normalt ikke forefindes i den modne form af cirkulerende HSA.

En konvertase, sandsynligvis beliggende i Golgi vesiklerne, fjerner propeptidet i et andet proteolytisk trin ved at spalte hexapeptidet bundet til den N-endestillede asparaginsyre af modent HSA (Judah, J.D., and Quinn, P.L., *Nature* 271 (1987) 384-385; Bathurst, I.C. et al., *Science* 235 (1987) 348-350). Imidlertid kan ikke-bearbejdet humant albumin udgøre halvdelen af det tilstedeværende i blodstrømmen i sjældne heterozygote individer, der bærer en arvet mutation i propeptidsekvensen, og alt albuminet hos visse ekstremt sjældne homozygoter (Takahashi, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7403-7407). En af disse varianter er betegnet pro-albumin Christchurch og begynder med sekvensen Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Gln⁻¹-Asp⁺¹, hvori substitutionen Arg⁻¹---> Gln forhindrer spaltningen af det således muterede propeptid (Brennan, S.O. and Carrel, R.W., *Nature* 274 (1978) 908-909). Andre varianter betegnes proalbumin Lille (Abdo, Y. et al., *FEBS Letters* 131 (1981) 286-288) og Takefu (Nagata et al., *Rinsho Byori* 30 (1982) 791-796) har henholdsvis følgende N-endestillede sekvenser Arg-Gly-Val-Phe-Arg-His-Asp og Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Pro-Asp. I hvert af disse tilfælde påvirker den observerede mutation det basiske aminosyrepar Arg-Arg, der normalt står foran aminosyresekvensen af modent humant albumin og er et resultat af en enkelt-base ændring i arginincodonen (Takahashi, N. et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci USA 84 (1987) 7403-7407).

Spaltning efter et par basiske aminosyrer er et væsentligt træk ved modningen af andre proteiner, herunder peptidhormoner, neuropeptider og andre plasmaproteiner end HSA (Douglass, O. et al., Annu. Rev. Biochem. 53 (1984) p. 665). Fornylik har man fundet, at konvertase, der spalter proalbumin til albumin i leveren, sandsynligvis er meget nært beslægtet med protease yscF fra gær (Bathurst, I.C. et al., Science 235 (1987) 348-350). Denne calcium-afhængige thiolprotease er kodet af KEX2 genet fra *Saccharomyces cerevisiae* og er sandsynligvis bundet til membranen fra Golgi-apparatet. Den er kendt for at være involveret i modningen af pheromon omtalt som α -faktor og i modningen af dræbertoxinet, da *kex2* mutanter af *S. cerevisiae* er ude af stand til at spalte de respektive proproteiner ved det basiske aminosyrepar Lys-Arg (Julius, D.J. et al., Cell. 32 (1983) p. 839). Yderligere er det blevet påvist, at gærenzymet kodet af KEX2 genet korrekt genkender og spalter den normale prosekvens (Arg-Arg) af albumin in vitro, men ikke spalter den muterede prosekvens (Arg-Gln) fra proalbumin Christchurch (Bathurst, I.C. et al., Science 235 (1987) 348-350). En konvertase analog med yscF proteasen er fornylik blevet beskrevet som værende kodet af KEX1 genet af *K. lactis* (Wésolowski-Louvel. M. et al., Yeast 4 (1988) 71-81). I lyset af denne opdagelse blev disse gærarters evne til at modne rekombinant humant albumin korrekt og secernere dette i dyrkningsmediet undersøgt.

30

Albumin undgør 40% af verdensmarkedet med hensyn til plasmaproteiner. Kommerciel interesse i dette skyldes den kendsgerning, at dette produkt anvendes i udstrakt grad f.eks. i såkaldte blod-volumen expanders for at kompensere for blodtab under kirurgi, ulykkestilfælde, blødninger og med doser pr. dag og pr. individ i en mængde på adskillige gram.

35

Indtil er HSA sædvanligvis blevet fremstillet ved hjælp af almindelige metoder i form af fraktionering af plasma, der stammer fra bloddonorer (Cohn, E.J. et al., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) p. 459), idet det årlige forbrug i verden af plasma er i området $9,5 \times 10^6$ liter. Det kan også ekstraheres fra menneskeplacenta ved de metoder, der er beskrevet af J. Liautaud et al., (13th Intern. Congress of IABS, Budapest, A: "Purification of Proteins. Development of biological standard", Karger (ed.), Bale, 27 (1973) p. 107).

Udviklingen indenfor genteknologien og nye ekstraktions- og rensningsmetoder har muliggjort at fremstille forbedrede produkter med højere renhed og bedre stabilitet uden viral forurening (f.eks. hepatitis B og AIDS) og med lavere omkostninger. Imidlertid er der ikke kendt nogen metode baseret på genetisk manipulering indtil nu, der er effektiv nok til at være af økonomisk interesse til fremstilling af HSA i industriel målestok.

Dette er hovedsageligt på grund af manglen på et effektivt vært/vektorsystem, der ville muliggøre produktion i stor mængde af et korrekt modnet udskilt serumalbumin, der er i besiddelse af den korrekte tertiære struktur, og som udviser de fysisk-kemiske egenskaber ved nativt humant albumin.

Selv om anvendelsen af pattedyrs cellekulturer kunne forekomme at være det ideelle valg til udtrykkelsen af humane proteiner, ville omkostningerne ved en sådan metode være langt over den nuværende salgspris for albumin, der anvendes til farmaceutiske formål (Klausner, A., Biotechnology 3 (1985) 119-125). Da dette produkt sædvanligvis ordineres i mængder på adskillige gram og med en lav pris pr. enhed, synes bioteknologisk produktion af HSA kun at være mulig med mikrobielle forgæringssystemer.

Indtil fornylig er langt størstedelen af de genetiske manipuleringsforsøg blevet foretaget med *Escherichia coli* som værtsorganismen ved den mikrobielle produktion af heterologe proteiner af økonomisk betydning. Selv om denne type metode har synes at være tilfredsstillende for en række heterologe proteiner, har alle forsøg på at frembringe HSA under økonomisk acceptable betingelser under anvendelse af denne organisme kun været delvis udført med held (EP-A-0 079 739).

En af hovedulemperne i forbindelse med anvendelsen af *E. coli* ligger i den kendsgerning, at denne bakterie er i de fleste tilfælde ude af stand til at udskille de heterologe proteiner i dyrkningsmediet, og at disse proteiner akkumulerer i en af cellebestanddelene. Det ønskede protein må derefter fraskilles det cellulære materiale, hvilket giver anledning til komplicerede og kostbare behandlingsmetoder. Yderligere frembringer *E. coli* endotoxiner og pyrogener, der kan forurene de producerede proteiner. Af denne grund må man være særdeles omhyggelig ved rensningen for at fjerne rest endotoxiner i slutproduktet, især dersom dette skal anvendes som et medicinsk produkt.

Udskilte proteiner taber ofte evnen til at folde korrekt, dersom de syntetiseres og akkumuleres inden i cytoplasma. Sædvanligvis kræves sekretion for at muliggøre dannelsen af disulfidbindinger som f.eks. de, der forekommer i HSA. Den kendsgerning, at HSA produceret inden i *E. coli* ikke er secerneret, bevirker at det udfælder intracellullært i en uopløselig form (Latta, M. et al., *Bio/Technology* 5 (1987) 1309-1314). Som en følge heraf må efter ekstraktion for bakteriecellerne proteinet denatureres og herefter renatureres in vitro.

Yderligere mangler *E. coli* det cellulære maskineri, der gør det muligt at udføre post-transskriptionelle og post-

translationelle modifikationer, der er specifikke for eukaryotiske organismer, herunder gær og mennesker. Med hensyn til HSA viser det sig at være vanskeligt at inducere *E. coli* til i et tilfredsstillende niveau at udtrykke den naturlige HSA precursor dvs. prepro-HSA. Yderligere er kunstige albuminer, hvori det HSA strukturelle gen er blevet koblet til sekretionssignaler stammende fra bakterielle *pac* eller *ompA* gener, sædvanligvis bearbejdet ufuldstændig (ibid.). Yderligere viser udtrykkelsen af HSA uden preprosekvensen dvs. i Met-HSA formen, at den N-
10 endestillede methioninrest ikke er afskåret af *E. coli* methionin aminopeptidasen (MAP) (ibid., europæisk patentansøgning nr. EP 198 745 offentliggjort 22.10.1986). Som en følge heraf kan *E. coli*-afledt HSA ikke opnås i moden
15 form *in vivo* og må modificeres *in vitro* ved tryptisk spaltning for at udskære en phag-afledt ledersekvens efter denaturering og renaturering *in vitro* (europæisk patentansøgning nr. EP 236 210 offentliggjort 09.09.1987).

20 Med hensyn til andre bakterielle værter er undersøgelser for nyligt blevet offentliggjort om sekretion af HSA af *Bacillus subtilis* (Saunders, C.W. et al., *J Bacteriol.* 169 (1987) 2917-2925). Skønt denne undersøgelse indicerer, at en prokaryotisk organisme som *B. subtilis* er i
25 besiddelse af potentialet for at udskille højmolekylære humane proteiner som f.eks. HSA, viser den også, at udskillelsen i vækstmediet kun kan opnås, dersom der anvendes *B. subtilis* protoplaster dvs. bakterieceller,
30 hvis normale celler er blevet nedbrudt med enzymatisk behandling. Yderligere er procentdelen af modificeret HSA omvendt proportional med den frembragte proteinmængde: ved høje udtrykkelsesniveauer forbliver det meste af det rekombinante HSA i ikke-moden form (ibid.). Yderligere er
35 der ikke blevet rapporteret nogen resultater med hensyn til de fysiske kemiske egenskaber af det rekombinante HSA fra *B. subtilis*. Yderligere er det opnåede udskillelses-

mængde af HSA ved hjælp af denne mikroorganisme særdeles lav set i lyset af de mængder af HSA der er påvist i kulturer supernatanter under anvendelse af immunologiske metoder (europæisk patentansøgning nr. EP 0 229 712 A2 offentliggjort 22.07.1987).

Et attraktivt alternativ til anvendelsen af bakterielle værter til fremstillingen af heterologe proteiner er anvendelsen af mikrobielle eukaryotiske systemer som f.eks. gær eller svampe. Faktisk besidder disse organismer alle de træk i form af strukturel og cellulær organisering, der findes i mere komplekse eukaryotiske organismer som f.eks. pattedyrceller. Specielt er gærarter i stand til at udføre post-transskriptionelle og post-translationelle modifikationer, der er vigtige for aktiviteten af mange proteiner. Herudover er gærarter meget almindelige ved industriel produktion og kan dyrkes til høje celletætheder, er ikke pathogene, producerer ikke endotoxiner og har været anvendt inden for fødevarerindustrien helt siden oldtiden. Endelig er i modsætning til pattedyrceller genetiske manipulationer med gærarter lette at udføre, og klassiske og molekylære genmanipulationer har givet en stor mængde data.

Udtrykket gær anvendes hyppigst for at betegne *Saccharomyces cerevisiae*, eller bagerigær, der er en af de mest almindelige og bedst kendte species. I det efterfølgende skal forstås, at udtrykket gær angår andre arter og er ikke begrænset til specien *S. cerevisiae*.

Udtrykkelsen af prepro-HSA under kontrol af chelatinpromotoren er blevet demonstreret i *S. cerevisiae* i maksimummængder på ca. 1% af de totale proteiner (Etcheverry, T. et al., *BioTechnology* 4 (1986) 726-730). Imidlertid forbliver materialet, der genkendes af anti-HSA antistoffer, der er beskrevet i denne undersøgelse, celleassocieret, og overføres derfor ikke reelt til kulturens super-

natante del. Herudover er der ikke blevet rapporteret detaljeret karakterisering af det rekombinante protein.

- 5 Produktion af HSA i bryggerigær under anvendelse af en post-fermenteringsmetode under øl-brygning er blevet beskrevet (europæisk patentansøgning nr. EP 0 201 239 offentliggjort 12.11.1986). Her er der igen ikke blevet beskrevet nogen kvantitative eller kvalitative data med hensyn til det fremstillede produkt. Yderligere fører denne metode til udtrykkelsen af Met-
- 10 HSA dvs. en allel af HSA, der starter med aminosyren methionin lige opstrøms for sekvensen af det modne albumin. Manglen på en signalsekvens udelukker sekretionen og modningen af det rekombinante HSA og bevirker akkumulering af et intracellulært albumin, hvis tertiære struktur ikke er blevet karakteriseret. Her-
- 15 udover er manglende tilstedeværelse af N-endestillet methionin i slutproduktet ikke blevet demonstreret.

- EP-A-0 258 067, EP-A-0 308 381 og EP-A-0 319 641 beskriver produktion af human serum albumin (HSA) fra S. cerevisiae, men EP-
- 20 A-0 258 067 indikerer ikke, at HSA udstilles i mediet.

- Imidlertid beskriver den foreliggende opfindelse fremgangsmåde til fremstilling af genetiske manipulerede, modificerede Kluyveromyces-stammer, der kan dyrkes i kultur til masseproduktion,
- 25 og som er i stand til effektivt at producere og udskille HSA i dets native form i vækstmediet.

- Et foretrukket udtrykkelsessystem involverer gærarter af slægten Kluyveromyces som en vært og anvender vektorer, der stammer
- 30 fra det naturlige K. marxianus var. drosophilarum plasmid pKD1.

Yderligere har videnskabelige undersøgelser udført med den hensigt at fremstille albumin afsløret værdien af og vigtigheden af visse pKD1 sekvenser med hensyn til effektiviteten og speci-

elt stabiliteten af udtrykkelsesplasmiderne, der indeholder dem.

Gærarter af slægten *Kluyveromyces* og specielt *K. marxianus* (herunder varieteterne *lactis* og *marxianus*, der i det efterfølgende vil blive betegnet henholdsvis *K. lactis* og *K. fragilis*) er vigtige organismer. Journal of Basic Microbiology, 28, nr. 4, 1988, side 211-220 beskriver flere forskellige vektorer for at udtrykke "dræber" toxin fra *Kluyveromyces lactis*, men denne toxin er resultatet af udtrykkelsen af et homologt gen af denne gær. Imidlertid kan gær af *Kluyveromyces* genuset have betydelig kommerciel interesse inden for den bioteknologiske industri. *K. lactis* og *K. fragilis* anvendes f.eks. til den kommercielle produktion af enzymet lactase (β -galactosidase). Disse gærarter er i stand til at vokse på valle, et hovedbiprodukt indenfor mejeribrug. Adskillige *Kluyveromyces* stammer anvendes til produktion i stor målestok af "enkeltcelleprotein" (SCP), der spiller en vigtig rolle som foder til husdyr. Endelig er organismer af slægten *Kluyveromyces* nævnt på den såkaldte GRAS liste (Generally Recognized As Safe), der spiller en vigtig faktor ved fremstillingen af farmaceutiske produkter.

Genmanipulationsmetoder i *Kluyveromyces* er først blevet fornylig. Tre typer kloningsvektorer er blevet beskrevet for denne organisme.

i) Integrerende vektorer, der indeholder sekvenser homologe med regioner af *Kluyveromyces*genomet og som, efter at være blevet indført i cellerne, integreres i *Kluyveromyces* chromosomerne ved in vivo rekombination. Integration, en meget sjælden tildragelse, der kræver tilstedeværelsen af en effektiv selektionsmarkør, opnås, dersom disse vektorer ikke indeholder sekvenser, der muliggør autonom replikation i cellen. Fordelen ved dette system er stabiliteten af de transformerede stammer, dvs. den kendsgerning, at de

kan vokse i en normal næringstilførsel uden behovet for et selektionstryk for at opretholde de integrerede sekvenser. Ulempen er imidlertid, at de integrerede gener kun forefindes i en eller i bedste fald i et lille antal kopier pr. celle. Denne lave gendosis resulterer ofte i et lavt produktionsniveau af et heterologt protein.

- ii) Replicerende vektorer indeholdende autonomt replicerende sekvenser (ARS) afledt af det chromosomale DNA fra *Kluyveromyces* sp. (Das, S. og Hollenberg, C.P., Current Genetics 6, (1982) 123-128; International patentansøgning WO 83/04050, offentliggjort 24.11.1983; International patentansøgning WO 83/04051, offentliggjort 24.11.1983). Sådanne vektorer er kun af moderat interesse, da deres spaltning under mitotisk celledeling er særdeles inhomogen, hvilket bevirker i at de tabes fra cellerne med en høj frekvens, selv om disse dyrkes under selektionstryk. Ydermere, disse vektorer muliggør ikke opnåelsen af de sekreterede proteiner i industriskala (US patentnummer 4 859 596).
- iii) Replicerende vektorer, der stammer fra naturligt forekommende gærplasmider, enten fra det lineære dræberplasmid pGK1-1 (k1) isoleret fra *K. lactis* (de Louvencourt, L. et al., J. Bacteriol. 154 (1982) 737-742; europæisk patentansøgning EP 0 095 986 offentliggjort 07.12.1983) eller fra det cirkulære plasmid pKD1 isoleret fra *K. marxianus* var. *drosophilum* (europæisk patentansøgning EP 0 241 435 A2, offentliggjort 14.10.1987). Vektorer indeholdende replikationsekvenser stammende fra det lineære dræberplasmid er ikke af nogen praktisk anvendelighed ved masseproduktion af heterologe proteiner, da et specielt næringsmedium er nødvendig for at opretholde dem, og da de tabes i 40-99% af cellerne i en given population efter kun 15 generationer, selv under selektionstryk (europæisk patentansøgning EP 0 095 986 A2, offentliggjort 07.12.1983). Det mest ef-

fektive vektorsystem til transformationen af slægten Kluyveromyces beskrevet indtil nu stammer fra det endogene plasmid pKD1: konstruktioner indeholdende hele sekvensen af pKD1 kan overføres med høj frekvens, forefindes i cellerne i 70-100 kopier og, hvad der er vigtigt, har en relativt høj stabilitet under ikke-selektive betingelser. Ikke desto mindre forbliver anvendeligheden af vektorerne beskrevet i EP 0 241 435 begrænset til anvendelse ved videnskabelige undersøgelser, fordi der er industrielt-skala forgøringer kræver en stabilitet af plasmidet gennem mindst 40 generationer. Selv den mest effektive vektor (P3) beskrevet i EP 0 241 435 tabes af ca. 70% af cellerne i en given population efter kun 6 generationer i et ikke-selektivt medium (europæisk patentansøgning EP 0 241 435 A2, offentliggjort 14.10.1987). Selv om det er teknisk muligt at opretholde et selektionstryk under fermentering i stor målestok, bevirker anvendelse af selektivt medium ofte en betydelig lavere celletæthed, og kræver anvendelsen af veldefinerede stammer, hvilket gør denne metode mindre attraktiv og kostbar. Yderligere indeholder EP 0 241 435 ikke et enkelt eksempel på udtrykkelse af et heterologt protein af kommerciel interesse. Faktisk er det eneste "heterologe" gen, der viser sig at blive udtrykt af vektorer stammende fra pKD1 URA3 genet af gæren *S. cerevisiae*. Det forbliver derfor tilbage at bevise, at indførelsen af ikke-gærgen f.eks. et gen af pattedyrsoprindelse i pKD1 og det overudtrykkelse i *Kluyveromyces* ikke bevirker forøget plasmid instabilitet. EP-A-0 301 370 beskriver produktion af human serum albumin af *K. lactis* med et plasmid omfattende en autonom udtrykkelsessekvens, der er funktionel i *E. coli* og et andet udtrykkelsesorigin, der er funktionelt i værtsceller. pKD1 nævnes som værende sandsynlig til tilvejebringelse med udtrykkelsessekvenser anvendelige i *Kluyveromyces*, men ingen information gives angående de væsentlige karakteristika af et "funktionelt" pKD1.

Den foreliggende opfindelse har til hensigt at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte vektorer, der er i stand til at transformere gærarter af slægten Kluyveromyces, og som er i besiddelse af stabilitetsegenskaber, der er betydeligt bedre end de, der er beskrevet i patentansøgning EP 0 241 435. Det vises, at de beskrevne konstruktioner ifølge opfindelsen opretholdes i højt kopiantal i 85-90% af cellerne efter 50 generationers vækst i ikke-selektivt medium. Det er således muligt at frembringe heterologe proteiner ud fra stabile multikopi-vektorer under anvendelse af industrielle stammer af slægten Kluyveromyces, der er blevet anvendt i mange år på grund af deres optimale vækstegenskaber og høje celletætheder.

Den foreliggende opfindelse angår specielt en fremgangsmåde til fremstilling af human serum albumin (HSA), ved hvilken metode en gær af slægten Kluyveromyces transformeret med et udtrykkelsesplasmid, der omfatter:

- funktionelle gener A, B og C af plasmid pKD1,
- de omvendte gentagelser af plasmid pKD1 (IR),
- stabilitetsstedet af pKD1,
- originen for replikation af pKD1 og en udtrykkelseskasse, der indeholder et ikke-gær DNA, der koder det strukturelle gen for human serum albumin under kontrollen af sekvenser, der muliggør dets udtrykkelse i gæren,
- en selekterbar markør for den transformerede gær, og
- eventuelt en origin for replikation og en selekterbar markør for Escherichia coli,

dyrkes i et vækstmedium.

Den høje stabilitet af vektorerne beskrevet i forbindelse med den foreliggende opfindelsen er blevet opnået ved
5 fuldstændig at udnytte egenskaberne ved plasmid pKD1. Vektorer stammende fra pKD1 er forskellig fra alle andre kendte Kluyveromycesvektorer ved at de indeholder et specialiseret replikationssystem, der er ansvarlig for stabil plasmid vedligeholdelse i højt kopiantal. Udover
10 en origin for replikation omfatter dette system to omvendte gentagelser, hver af 346 nucleotiders længde, og tre åbne aflæsningsrammer (generne A, B og C), der er integrerede dele af plasmidet (Chen, X.J. et al., Nucl. Acids Res. 14, (1986) 4471-4481). Bibeholdelse af disse
15 replikations- og stabilitetselementer, generne A, B og C og omvendte gentagelser (IR) resulterer i vektorer, der udviser en særdeles høj mitotisk stabilitet. Ved analogi med det grundigst undersøgte system, systemet af det strukturelt beslægtede 2 μ plasmid fra *S. cerevisiae*, er
20 proteinerne kodet af disse gener (B og C) sandsynligvis involveret i plasmidfordeling under mitotisk celledeling og kan spille en rolle i den negative regulering af gen A, der koder en plads-specifik rekombinase (FLP; Fitcher, A.B., Yeast 4 (1988) 27-40). FLP-medieret rekombination
25 mellem de omvendte gentagelser af 2 μ DNA har vist sig at ændre plasmidet fra en normal replikationsmåde (en fordobling af 2 μ plasmider pr. celledeling) til en rullende cirkeltype af replikation (kopiantalsformering til ca. 50 kopier pr. celle; *ibid.*). Denne ændring i den normale replikationsmåde induceres så snart plasmidkopiantallet
30 bliver for lavt til at muliggøre frembringelsen af tilstrækkelige mængder af gen B og C produkter, der virker som repressor for gen A, der koder FLP rekombinasen. Ved hjælp af denne mekanisme opretholdes kopiantallet af 2 μ
35 (og hvad sandsynligt af strukturelt lignende plasmider som f.eks. pKD1) på høje niveauer på en autoreguleret måde og er uafhængig af tilstedeværelsen af en selekterbar mar-

kør.

5 Vektorerne tidligere beskrevet i EP 0 241 435 indeholder enten kun en del af pKD1 (A15) eller indeholder et afbrudt gen A (P1 og P3, hvori PstI kloningsstedet er beliggende inden i kodesekvensen af gen A (europæisk patentansøgning nr. EP 0 241 435 A2 offentliggjort 14.10.1987), hvorved det autoregulerende replikationssystem ødelægges, der er en af de karakteristiske egenskaber ved det residente plasmid pKD1. I modsætning hertil respekterer plasmidkonstruktioner afledt af pKD1 beskrevet i forbindelse med den foreliggende opfindelse den funktionelle integritet af alle de vigtige åbne læserammer af pKD1. Som en følge heraf er stabiliteten af plasmiderne beskrevet nedenfor betydeligt forøget med hensyn til plasmider P1 og P3, og kopiantallet af vektorerne ifølge opfindelsen opretholdes på et højt niveau gennem hele cellepopulationen.

20 I forbindelsen med den foreliggende opfindelse anvendes udtrykket HSA om et hvilket som helst serumalbumin af human oprindelse eller et hvilket som helst protein isoleret fra gærceller og som er i besiddelse af den samme aminosyresekvens, tertiære struktur og fysisk-kemiske egenskaber som nativt HSA af human oprindelse. Yderligere skal ved HSA varianter forstås, naturlige varianter, såvel som molekyler med samme aktivitet som HSA, men fra hvilket, hvor det er passende, områder, der ikke er af nødvendighed for den pågældende aktivitet, er blevet afskåret.

35 Den foreliggende opfindelse angår frembringelsen ved genetisk manipulering af vektorer ifølge opfindelsen, der muliggør at HSA kan frembringes i en let oprenselig form under anvendelse af gærceller som en eukaryotisk mikrobiel vært. Et træk ved produktionsmetoden er at den effektive udskillelse af modent, nativt HSA i vækstmediet

for gæren, hvorved rensning af det rekombinante protein lettes betydeligt. Produktion af HSA opnås ved at dyrke gærarter transformeret med et rekombinant plasmid, der omfatter en transskriptions- og translationsinitiations-region, der virker effektivt i værten, og en åben læse-
5 ramme, der koder HSA, der forud har et sekrekationssignal, der dirigerer det rekombinante protein til gærarternes secernerende veje.

10 Konstruktionerne ifølge opfindelsen omfatter udtrykkelseskassetter, der indeholder det strukturelle gen for HSA eller en af dets varianter. Konstruktionerne fremstillet sædvanligvis trinvis under anvendelse af passende vekto-
15 rer, indtil elementerne, der er essentielle for udtrykkelse, sekretion eller plasmidopretholdelse er blevet kombineret til dannelse af en vektor, der herefter kan indføres i den/de definerede vært/værter, således at det ønskede protein udtrykkes og udskilles. De anvendte værter er af eukaryotisk oprindelse, specielt gærarter, mere
20 specielt af slægterne *Saccharomyces* eller *Kluyveromyces* og fortrinsvis specien *Kluyveromyces marxianus* herunder alle dens varieteter, specielt *K. marxianus* var. *lactis*. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er konstruktionerne, der fremstilles og beskrives, eksempler på eukaryo-
25 tiske organismer af mikrobiologisk oprindelse, men er fortrinsvis rettet mod *Kluyveromyces*.

De specielle værter, der skal anvendes, vil fortrinsvis være industrielle stammer, der er stabile, vokser til
30 høje celletætheder i passende medier og har et højt produktionsniveau.

Blandt stammer, der kan transformeres med pKD1-afledte plasmider, skal mere specielt nævnes stammer af *K. wickerhamii*, *K. waltii* og specielt *K. marxianus* var. *bulgaricus* (*K. bulgaricus*), *K. marxianus* var. *drosophilum* (*K. drosophilum*), *K. marxianus* var. *marxianus*

(*K. fragilis*) og *K. marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*).

5 HSA kodesekvensen kan opnås på en hel række måder, idet den simpleste består i at isolere messenger RNA fra human lever og syntetisere kopier heraf i form af komplementært DNA (cDNA). Den klonede sekvens kan herefter modificeres ved forskellige metoder som f.eks. in vitro plads-dirigeret mutagenese, primerforlængelse, restriktion, indførsel af adaptorer eller ligation med oligodeoxy-nucleotidlinkere. Kodesekvensen kan f.eks. være tilpasset til anvendelsen af foretrukne codoner i gær for at optimere effektiviteten af proteinsyntese (translation) i værten.

15 Ved den N-endestillede del af proteinsekvensen, kan et signalpeptid (presekvens) indføres, således at det nascente protein dirigeres til værtscellens secernerende dele. Denne presekvens kan svare til den naturlige N-endestillede leder af proteinet, specielt albumin, eller
20 den kan være af anden oprindelse, f.eks. kan den være opnået fra gærgener som de, der koder α -pheromon eller dræbertoxinet.

Yderligere kan en prosekvens, der koder en anden peptid-udstrækkelser, anbringes mellem sekretionssignalsekvensen og den kodende sekvens for modent albumin. Denne prosekvens er normalt forbundet til kodesekvensen ved hjælp af et sted til spaltning med en specifik protease, der normalt involverer mindst to basiske aminosyrer, fortrinsvis
30 Lys-Arg eller Arg-Arg.

Udtrykkelseskassetten vil omfatte en transskriptions- og translationsinitiationsregion knyttet til 5'-endestillingen af den kodende sekvens, således at transskriptionen og translationen af sekvensen dirigeres og reguleres. Ud-
35 vælgelsen af disse promotorregioner kan variere afhængig af den specielt anvendte vært. Disse sekvenser udvælges

sædvanligvis fra promotorer afledt af gærgener. Af særlig interesse er visse promotor- og/eller terminatorregioner, der stammer fra glycolytiske gener af *Saccharomyces* eller *Kluyveromyces* type gær som f.eks. generne, der koder

5 phosphoglyceratkinase (PGK), glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GDP), enolaser (ENO), alkoholdehydrogenaser (ADH) eller stammer fra andre stærkt udtrykte gener som f.eks. lactase (LAC4), den sure phosphatase (PHO5) og lignende. Disse kontrolregioner kan være modificeret

10 f.eks. ved in vitro mutagenese, ved indførsel af yderligere kontrolelementer eller syntetiske sekvenser eller ved deletioner. F.eks. kan transskriptionsregulerende elementer, som f.eks. det såkaldte UAS (opstrømsaktiverende sekvenser), der stammer fra en anden promotor

15 f.eks. den fra *S. cerevisiae* GAL10 eller *K. lactis* LAC4 genet anvendes til at konstruere hybride promotorer, der muliggør at vækstfasen af en gærkultur kan adskilles fra udstrykkesfasen af et heterologt gen, afhængig af den udvalgte carbonkilde. En transskriptions- og translationsafslutningsregion, der virker i den påtænkte vært, vil være anbragt ved 3'-enden af kodesekvensen.

20

Den således konstruerede udtrykkelseskassette kobles til en eller flere markører, hvilket muliggør at den transformerende vært kan selekteres. Foretrukne gærmarkører er

25 dominante markører dvs. markører, der bliver resistens overfor antibiotika som f.eks. geneticin (G418) sådan som det er tilfældet med udtrykkelsen i gæren af aph(3')-I genet (aph) af den bakterielle transposon Tn903 eller en

30 hvilken som helst anden toxisk forbindelse som f.eks. kobberioner, specielt da sidstnævnte kan anvendes uden specielt værtsspecificitet. Sådanne resistensgener vil blive anbragt under kontrollen af passende transskriptions- og translationssignaler i den pågældende vært. Det

35 er også muligt at anvende markører, der komplementerer auxotrofi som f.eks. URA3 eller LEU2 gener fra *S. cerevisiae*.

Samlingen, der består af af udtrykkelsekassetten og den selekterbare markør, kan anvendes enten til direkte transformering af værten eller kan indføres i en replikativ vektor. Når det drejer sig om en direkte transformation er sekvenser homologe med regioner, der forefindes på et kromosom eller på et iboende plasmid koblet til denne samling. Sådanne sekvenser vil blive anbragt på hver side af udtrykkelsekassetten, således at der induceres et indskud ved det homologe sted ved in vivo rekombination. Udtrykkelsekassetten kan også være kombineret med et replikationssystem, der fungerer i den pågældende vært. Et foretrukket replikationssystem for *Kluyveromyces* er afledt af plasmidet pKD1, der oprindeligt blev isoleret fra *K. drosophilorum* (Falcone, C. et al., Plasmid 15 (1986) 248-252; Chen, X.J. et al., Nucl. Acids Res. 14 (1986) 4471-4481). Et foretrukket replikationssystem for *Saccharomyces* er afledt af gær 2 μ plasmidet. Udtrykkelsesplasmidet kan indeholde alle eller en del af replikationssystemerne eller kan kombinere elementer stammende både fra pKD1 såvel som fra 2 μ plasmidet. Foretrukne konstruktioner er sådanne, der indeholder hele sekvensen af plasmid pKD1, dersom der ønskes udtrykkelse i *Kluyveromyces*. Mere specielt er foretrukne konstruktioner de, hvori indskudsstedet for de fremmede sekvenser i pKD1 er beliggende i en 197 bp region, der ligger mellem SacI stedet (stilling 4714 af B-formen af pKD1; Chen, X.J. et al, Nucl. Acids Res. 14 (1986) 4471-4481) og MstII stedet (stilling 154 af B-formen af pKD1; *ibid.*), eller ved en af disse to steder eller alternativt SphI stedet af plasmid pKD1.

Af bekvemmelighedshensyn kan plasmidet være en shuttlevektor: som sådan kan den overføres til en bakteriel vært som f.eks. *E. coli*, hvor den lettere kan manipuleres end i gær ved hvert konstruktionstrin. I dette tilfælde kræves en origin for replikation og en selekterbar markør, der fungerer i den bakterielle vært. Det er også muligt

at anbringe restriktionssteder, der er unikke på udtrykkelsesvektoren, således at de flankerer de bakterielle sekvenser. Dette muliggør at den bakterielle origin for replikation kan fjernes ved spaltning, og at vektoren kan redigeres inden transformation af gærcellerne, og dette kan bevirke et højere plasmidkopi antal og forøget plasmidstabilitet. Bekvemme pladser som f.eks.

5'-GGCCNNNNNGCC-3' (SfiI) eller 5'-GCGGCCGC-3' (NotI) kan f.eks. anvendes specielt da de er umådeligt sjældne i gær og sædvanligvis mangler i et udtrykkelsesplasmid. Disse steder kan indføres i vektoren ved oligodeoxynucleotid-dirigeret mutagenese eller ved at tilsætte specifikke oligodeoxynucleotidlinkere eller adaptorer.

15 Når først konstruktionen af udtrykkelsesvektoren er fuldført, indføres denne i den pågældende vært. Forskellige metoder til transformation er blevet beskrevet når det drejer sig om gærarter. (Sherman, F. et al., "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Transformanterne kan herefter dyrkes i et passende medium for at frembringe det ønskede produkt.

25 Dersom det ønskede produkt udskilles, kan det renses på forskellig måde fra den supernatante del af kulturen. Det kan cryoudfældes eller ekstraheres under anvendelse af affinitetskromatografi, elektrophorese eller andre almindeligt anvendte metoder. Det udskilte protein kan udvindes fra en batchkultur eller en kontinuer kultur.

30 Følgende eksempler beskriver opfindelsen nærmere.

Under henvisning til tegningen skal bemærkes at afbildningen af plasmiderne i figurerne ikke er optegnet i skala, og at kun restriktionssteder, der er vigtige ved konstruktionerne er angivet. Under henvisning til tegningen viser

fig. 1 konstruktion af plasmid pXL276 indeholdende den fuldstændige sekvens, der koder Met-HSA, der er opnået fra tre cDNA kloner (se teksten) afledt af poly(A)-mRNA isoleret fra human lever,

fig. 2 rekonstituering af prepro-sekvensen af albumin fra fire syntetiske oligodeoxynucleotider: konstruktion af plasmid pXL290,

fig. 3 konstruktion af plasmid pXL299,

fig. 4 konstruktion af plasmid pXL322,

fig. 5 konstruktion af plasmid pXL855,

fig. 6 konstruktion af plasmid pXL869,

fig. 7 nucleotid- og aminosyresekvens af HindIII fragmentet stammende fra plasmidet pXL869 og indeholdende det prepro-HSA strukturelle gen. De kraftige pile indicerer enden af "pre" og "pro" regioner,

fig. 8 konstruktion af plasmid pUC-URA3,

fig. 9 konstruktion af plasmid pCXJ1,

fig. 10 konstruktion af plasmid pkl-PS1535-6,

fig. 11 konstruktion af plasmid pUC-kan202,

fig. 12 nucleotidsekvens af ORF1 promotoren af plasmid k1
fra ScaI restriktionsstedet og omfattende bindingen
mellem ORF1 og 5' regionen af det bakterielle gen, der
koder amioglycosidphosphotransferase stammende fra Tn903,

5

fig. 13 konstruktion af plasmid pKan707,

fig. 14 stabilitetskurve af plasmid pKan707 i stamme
MW98-8C under ikke-selektive vækstbetingelser,

10

fig. 15 konstruktion af plasmid pYG11,

fig. 16 konstruktion af plasmid pYG18,

15

fig. 17 konstruktion af plasmid pYG19,

fig. 18 illustration af plasmiderne pYG19 (prepro-HSA) og
pYG23 (Met-HSA). Nucleotidsekvensen, der forekommer under
hvert plasmid, er bindingen mellem PGK gen promotoren og
de strukturelle gener for de forskellige former af HSA,

20

fig. 19 konstruktion af plasmiderne pYG208, pYG210 (bane
A) og pYG221B (bane B),

25

fig. 20 konstruktion af plasmiderne pYG14, pYG26 og
pYG29,

fig. 21 A. Mutagenese af PGK promotoren af *S. cerevisiae*
for at indføre NotI steder, der omgiver UAS
regionen. De fire basepase ændret ved plads-
dirigeret mutagenese er angivet ved stjerner
under NotI stederne,

30

35

B. Utranslaterede PGK ledersekvenser i konstruktionerne pYG19 og pYG44. HindII stedet indført ved -25 regionen af wild-type PGK promotoren ved pladsdirigeret mutagenese er angivet ved en indramning,

fig. 22 ombytning af UAS_{PGK} med et syntetisk DNA fragment indeholdende UAS af LAC4 promotoren af K. lactis og rekonstituering af PGK wild-type ATG konteksten via ligation af en syntetisk adaptor til den mutageniserede PGK promotor,

fig. 23 SalI-SacI udtrykkelseskassetter med forskellige promotor og signalsekvenser til stede inden i pKan707 afledte plasmider, der dirigerer udskillelsen af HSA i vækstmediet,

fig. 24 plasdirigeret mutagenese af PHO5 promotoren af S. cerevisiae for at indføre et HindIII sted ved stilling -20,

fig. 25 nucleotisekvensen af promotorregionen nær ATG initiatorcodonen i konstruktionen pYG51,

fig. 26 rekonstituering af et syntetisk HindII-DraI DNA fragment indeholdende den 5' ikke-translaterede ledersekvens af PGK promotoren, signalsekvensen af dræbertoxinet af K. lactis (pre-region) og de første få codoner af pro-HSA genet, konstruktion af plasmid pYG56,

fig. 27 skematisk afbildning af plasmiderne p31/RAG2:URA3, pYG60-5 og pYG60-21,

fig. 28 mitotisk stabilitet af HSA udtrykkelsesplasmider pYG19 og pYG23 under ikke-selektive vækstbetingelser; lukkede firkanter, stamme MW98-8C transformeret med plas-

mid pYG19; åbne firkanter, stamme MW98-8C transformeret med plasmid pYG23; åbne trekkanter, stamme CBS683 transformeret med plasmid pYG19,

5 fig. 29 8,5% SDS-polyacrylamidgel efter farvning med Coomassie Blåt, hvilket viser udtrykkelsen og udskillelsen af HSA fra stamme MW98-8C. Bane 1-4: referencealbumin ekstraheret fra humant plasma (Sigma) afsat pletvis i stigende koncentrationer: 0,2 µg, 0,6 µg, 2 µg og 6 µg
10 pr. bane. pYG19 (prepro-HSA), pYG23 (Met-HSA) og pYG25 (kontrolvektor uden udtrykket kassette): hver bane svarer til en mængde protein svarende til 100 µl af den oprindelige kultur. a) opløselige fraktioner; b) uopløselige fraktioner; c) supernatante dele af kulturen,

15 fig. 30 immunoaftrykning af en 7,5% polyacrylamidgel aftrykt på nitrocellulose som beskrevet i teksten. Bane 1-5: referencealbumineksktraheret fra humant plasma (Sigma), der var blevet opløst i et YPD medium i forskellige koncentrationer og udfældet med TCA (5% slutkoncentration)
20 som beskrevet. Prøverne af HSA standarderne er derefter blevet behandlet på samme måde som kulturens supernatante dele. I begge tilfælde svare gelpletterne til lige rumfang. 1) udfældningsforsøg med en koncentration af HSA på
25 100 mg/liter; 2) 50 mg/liter; 3) 25 mg/liter; 4) 12,5 mg/liter; 5) 6 mg/liter. pYG19 (prepro-HSA) og pYG23 (Met-HSA): hver bane svarer til en mængde proteiner svarende til 20 µl af den oprindelige kultur. a) dyrkningssupernatante dele; b) uopløselige fraktioner; c)
30 opløselige fraktioner,

fig. 31 8,5% polyacrylamidgel efter farvning med Coomassie Blåt, da de demonstrerer udskillelseskinetikken af HSA fra stamme MW98-8C,

35 A. banerne a-e: reference HSA (Sigma), der er blevet opløst i YPD medium i forskellige koncentrationer og udfæl-

det med TCA (5% slutkoncentration) således som beskrevet (se forklaring til fig. 21). 1) koncentration af HSA (Sigma) på 6 mg/liter; 2) 12,5 mg/liter; 3) 25 mg/liter; 4) 50 mg/liter; 5) 100 mg/liter. pYG19-medieret sekre-
5 tion af HSA som en funktion af kulturens alder, 16-61 ti-
mer, således som angivet. Hver prøve svarer til ækviva-
lenten af 160 µl kultursupernatant.

B. banerne a-e: reference HSA (Sigma), udklækket i sti-
10 gende koncentrationer: 0,4 µg, 0,6 µg, 0,8 µg, 1,0 µg og
1,2 µg pr. bane. pYG19: pYG19-medieret sekrektion af HSA
som en funktion af kulturens alder, 72-240 timer, således
som angivet. Hver prøve svarer til den ækvivalente af 25
15 µl kultursupernatant,

fig. 32 A. grafisk afbildning af udskillelseskinetikken
af HSA fra stamme MW98-8C transformeret med plasmid pYG19
og dyrket i en Erlenmeyer kolbe således som beskrevet i
teksten. Koncentrationen af målt albumin i vækstmediet
20 (mg/liter) er angivet som en funktion af kulturens alder
(timer). resultaterne af fire uafhængige undersøgelser er
angivet.

B. vækstkurver af stamme MW98-8C transformeret med plas-
25 mid pYG19,

fig. 33 virkning af carbonkilden på effektiviteten af
albuminsekretionen under kontrol af PGK eller en PGK/LAC4
hybrid promotor: SDS-PAGE analyse af dyrkningssupernatan-
30 te dele farvet med Coomassie Blåt af K. lactis stamme
MW98-8C transformeret med plasmiderne pYG19 og pYG44,

A. supernatanter (12,5 µl pr. bane) fra rystet kolbekul-
turer dyrket i 211 timer enten i YPD (indeholdende 2%
35 glucose) (bane 1-3) eller i YPD medium, hvortil 2% lac-
tose er sat efter 43 timers vækst (bane 4-6). Baner a og
b: HSA Sigma 0,5 og 1,0 µg; bane 1 og 4: plasmid pYG44-5;
bane 2 og 5: plasmid pYG44-7; bane 3 og 6: plasmid pYG19,

B. supernatanter (25 μ l pr. bane) fra rystet kolbekulturer dyrket i 113 timer enten i YPD (indeholdende 2% glucose) (bane 1, 4 og 7), YPL (indeholdende 2% lactose (bane 3, 6 og 9) eller i YPD medium, hvortil 2% lactose var sat efter 43 timers vækst (bane 2, 5 og 8); bane a, b og c: HSA Sigma henholdsvis 0,25, 0,5 og 1,0 μ g; bane 1-3: plasmid pYG44-5; bane 4-6: plasmid pYG19-7; bane 7-9: plasmid pKan707 uden udtrykkelseskassette;

fig. 34 virkning af promotor og signalsekvenssubstitutioner på effektiviteten af albuminsekretion: SDS-PAGE analyse af kultursupernatanter farvet med Coomassie Blåt af K. lactis stamme MW98-8C transformeret med plasmiderne pYG51, pYG19 og pYG58,

A. supernatanter (25 μ l pr. bane) fra rystet kolbekulturer dyrket i 115 timer YPD medium, hvortil 2% lactose er sat efter 43 timers vækst. Bane a, b og c: HSA Sigma henholdsvis 0,2, 0,5 og 1,0 μ g; bane 1: plasmid pYG51 (PH05 promotor); bane 2: plasmid pYG19 (PGK promotor),

B. supernatanter (25 μ l pr. bane) fra rystet kolbekulturer dyrket i 66 timer (bane 1-3) eller 138 timer (bane 4-6) i YPD medium. Bane a, b og c: HSA Sigma henholdsvis 0,25, 0,5 og 1,0 μ g; bane 1, 2, 4 og 5: plasmid pYG58 (dræbertoxinsekretionssignal, to uafhængige transformanter); bane 3 og 6: plasmid pYG19 (albuminsekretionssignal),

fig. 35 virkning af carbonkilde på effektiviteten af albuminsekretion under kontrol af LAC4 eller PGK promotoren: SDS-PAGE analyse af kultursupernatante dele farvet med Coomassie Blåt af K. lactis stamme CBS2359 transformeret med plasmiderne pYG404 og pYG19,

supernatanter (25 μ l pr. bane) fra rystet kolbekulturer dyrket i 166 timer enten i YPD (indeholdende 2% glucose)

(bane 1 og 4), YPL (indeholdende 2% lactose) (bane 3 og 6) eller i YPD medium hvortil 2% lactose var sat efter 48 timers vækst (bane 2 og 5). Bane a, b og c: HSA Sigma henholdsvis 0,25, 0,5 og 1,0 µg; bane 1-3: plasmid pYG404; bane 4-6: plasmid pYG19,

fig. 36 effektiviteten af albuminsekretion under kontrol af en integreret i forhold til et plasmid baseret PGK udtrykkelseskassette: SDS-PAGE og immunoaftryksanalyse af kultursupernatanter af *K. lactis* integrant stammerne MW98-8C::60-5 og MW98-8C::60-21 og af stamme MW98-8C transformeret med plasmid pYG19. Supernatanter (25 µl pr. bane) blev udtaget fra rystekolbekulturer dyrket i YPD i 137 timer,

A. PAGE-SDS: bane a, b, c og d: HSA Sigma henholdsvis 0,1, 0,25, 0,5 og 1,0 µg; bane 1: stamme MW98-8C transformeret med plasmid pYG19; bane 2-7: 6 uafhængige integrantstammer henholdsvis (MW98-8C::60-5 nr. 6, MW98-8C::60-21 nr. 9, MW98-8C::60-21 nr. 7, MW98-8C::60-5 nr. 4, MW98-8C::60-5 nr. 8, MW98-8C::60-21 nr. 11; se kapitel E.3.7),

B. Western aftryksanalyse: samme prøver som angivet under A (25 µl supernatant anbragt pr. bane);

fig. 37 effektiviteten af albuminsekretion i forskellige *Kluyveromyces* stammer transformeret med plasmiderne pYG19 og pYG221B: SDS-PAGE analyse af koncentrerede kultursupernatanter farvet med Coomassie Blåt. Celler blev dyrket i YPD medium tilsat G418 (200 µg/ml) i 89 timer. Supernatanter blev koncentreret ti gange med mikrofiltrering under anvendelse af centricon 30 mikrofiltreringsenheder (Amicon). Rumfanget af koncentreret supernatant anbragt pr. bane blev standardiseret som en funktion af biomasseproduktion og ligger mellem 9 og 25 µl.

Bane a og b: HSA Sigma henholdsvis 0,5 og 1,0 μ g; bane c og d HSA Sigma underkastet mikrofiltrering. En opløsning af HSA i YPD medium (10 mg/l) blev koncentreret ti gange ved mikrofiltrering. 25 og 2,5 μ l af den koncentrerede standard blev anbragt henholdsvis på bane c og d. Bane 1: stamme ATCC 16045 (*K. marxianus* var. *bulgaricus*) transformeret med plasmid pYG221B; bane 2: stamme ATCC 24178 (*K. wickerhamii*) transformeret med plasmid pYG221B; bane 2: stamme ATCC 12424 (*K. marxianus* var. *marxianus*) transformeret med plasmid pYG19; bane 4: stamme ATCC 56500 (*K. waltii*) transformeret med plasmid pYG19; bane 5: stamme ATCC 36906 (*K. var. drosophilae*) transformeret med plasmid pYG221B; bane 6: stamme CBS4574 (*K. marxianus* var. *lactis*) transformeret med plasmid pYG19; bane 7: stamme CBS683 (*K. marxianus* var. *lactis*) transformeret med plasmid pYG19; bane 8: stamme MW98-8C (*K. marxianus* var. *lactis*) transformeret med plasmid pYG19; bane 9: stamme MW98-8C (*K. marxianus* var. *lactis*) transformeret med plasmid pKan707 (kun vektor); bane 10: stamme MW98-8C (*K. marxianus* var. *lactis*) transformeret med plasmid pYG221B,

fig. 38 elektrophoretiske teknikker (S = standard, L = gæralbumin)

A - PAGE-SDS (Phast gel, Pharmacia, gradient 8-25%) farvning med sølvsalte (S = 1 μ g, L: fra 0,05 til 0,25 μ g,

B - Isoelektrisk fokusering (Phas gel, pH 4,5-6,0), farvning med Coomassie Blåt, pletter = 1 μ g,

C - PAGE-SDS (7,5%) farvning med Coomassie Blåt,

S = 0,2-1,0 μ g, L = 0,25-2,5 μ g,

fig. 39 Ionbytterkromatografi - Mono Q (pharmacia). For-
neden: gær HSA 40 μ g, foroven: standard HSA 50 μ g,

fig. 40 omvendt fasekromatografi = nucleosil C4. a) standard HSA; b) gær HSA,

5 fig. 41 tryptophan fluorescensemissionsspektrometri. Fuldt optrukken linie: standard HSA; stiplet linie: gær HSA,

10 fig. 42 termisk stabilitet ved 75 °C. Fuldt optrukken linie: standard HSA; stiplet linie: gær HSA,

15 fig. 43 regioner af albuminet genkendt med forskellige monoklonale antistoffer, der anvendes til antigen karakterisering,

20 fig. 44 A,B,C: hæmningskurver (se teksten) med hensyn til ni monoklonale antistoffer, hvis specificitet er angivet i fig. 43: den procentige hæmning som en funktion af albuminkoncentrationen ($\mu\text{g/ml}$); åbne kvadrater: standard HSA; udfyldte kvadrater: gær HSA,

EKSEMPLER

Generelle kloningsteknikker

25 Klassiske metoder indenfor den molekylære biologi som f.eks. cæsiumchlorid-ethidiumbromidgradientcentrifugering af plasmid DNA, restriktionsenzymnedbrydning, gelelektrophorese, elektroeluering af DNA fragmenter fra agarosegeler, transformation i E. coli og lignende er beskrevet
30 i litteraturen (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning:

a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel, F.M. et al., (udg), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York 1987).

5

Restriktionsenzymene blev leveret af New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) eller Amersham.

10

For at ligere adskilles DNA fragmenter efter størrelse på 0,7% agarose eller 8% acrylamidgeler, renses ved elektroeluering, ekstraheres med phenol, udfældes med ethanol og inkuberes herefter i en puffer bestående af 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, pH 7,4 i nærværelse af phag T4 DNA ligase (Biolabs).

15

Hvor det er nødvendigt dephosphoryleres DNA fragmenter med 3' tilbagetrukne endestillinger ved behandling med kalve-intestinal alkalisk phosphatase (CIP Pharmacia) ved 37 °C i 30 minutter i følgende puffer: 100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH 10,5. Den samme metode anvendes til dephosphorylering af 5' tilbagetrukne eller stumpafsluttede endestillinger, men behandlingen er 15 minutter ved 37 °C og derefter 15 minutter ved 56 °C. Enzymet inaktiveres ved opvarmning af reaktionsblandingen til 68 °C i 15 minutter i nærværelse af 1% SDS og 100 mM NaCl efterfulgt af ekstraktion med phenol/chloroform og ethanoludfældning.

20

25

30

35

Udfyldning af 3' tilbagetrukne endestillinger udføres med Klenow fragmentet af E. coli DNA polymerase I (Biolabs). Omsætningen udføres ved stuetemperatur 30 minutter i en puffer, der består af 50 mM Tris-HCl, 0,4 mM dNTPs, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM dithiothreitol, 50 µg/ml BSA (bovint serumalbumin) pH 7,2. Stumpafslutning af 5' tilbagetrukne endestillinger udføres i nærværelse af phag T4 DNA polymerase (Biolabs) som anbefalet af leverandøren. Nedbryd-

ning af tilbagetrukne ender udføres ved begrænset behandling med S1 nuclease (BRL) således som anbefalet af fabrikanten.

- 5 In vitro oligodeoxynucleotid-dirigeret mutagenese udføres efter metoden udviklet af Tayloe et al., (Taylor, J.W. et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764), under anvendelse af udstyret fabrikeret af Amersham. Nucleotidsekvensering udføres efter kædeafslutningsmetoden (Sanger
10 F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467). Enzymatisk forstærkning af specifikke DNA fragmenter udføres ved hjælp af polymerasekædereaktionsmetoden (Mullis, K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350; Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354)
15 med en "DNA termisk cykler" (Perkin Elmer Cetus), idet man arbejder som anbefalet af fabrikanten.

- Ligeret DNA anvendes til at transformere kompetente celler opnået fra følgende stammer: E. coli MC1060
20 ([lacIPOZYA], X74, galU, galK, strA^r) eller TG1 ([lacpro A,B], supE, thi, hsdD5/F'traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZ M15). Plasmid DNA renses fra ampicillin- eller etetracyclin-resistente transformanter afhængig hvad der er passende. Ekstraktion af plasmid DNA udføres således som
25 beskrevet af Maniatis et al., (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982), som er afledt af den alkaliske lysemetode beskrevet af Birnboim and Doly (Birnboim, H.C. and Doly, J., Nucleic Acids Res.
30 7 (1979) 1513-1523). Til hurtig plasmidanalyse fremstilles bakterielle lysater således som beskrevet af Holmes og Quigley (Holmes, D.S. and Quigley, M., Anal. Biochem, 114 (1981) 193-197) og underkastes agarosegelelektrophoreseanalyse uden forudgående rensning. Efter endonuclease
35 restriktionsanalyse fremstilles rekombinante plasmider, der udviser den ønskede struktur, i stor målestok efter den alkaliske lysemetode (Maniatis, T. et al., "Molecular

Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982) under anvendelse af 0,5 til 1 liter kulturer og renses ved cæsiumchloriddensitetscentrifugering.

5

Transformation af *K. lactis* med fremmed DNA og rensning af plasmid DNA fra *K. lactis* er beskrevet i teksten.

EKSEMPEL 1

10

Kloning af en kassette indeholdende det prepro-HSA strukturelle gen

15

E.1.1 Isolering af en komplementær DNA (cDNA) klon, der koder HSA

20

25

30

Konstruktionen af rekombinante plasmider, der muliggør udtrykkelse af HSA i *E. coli* er detaljeret beskrevet i den tidligere patentansøgning EP 0 198 745 (europæisk patentansøgning nr. EP 198 745 offentliggjort 22.10.1986). Kort fortalt blev cDNA opnået fra poly(A)mRNA isoleret fra human lever efter guanidinthiocyanatmetoden (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry 18 (1979) p. 5294). DNA sekvensanalysen muliggjorde isolering af tre kloner (pT1B11, pAA38 og p6D8, fig. 1), der indeholdt overlappende fragmenter af det albuminstrukturelle gen og var i besiddelse af fælles restriktionssteder inden for disse overlapninger. Disse steder blev anvendt ved konstruktionen af en cDNA klon for HSA (fig. 1), der er komplet bortset fra prepro-sekvensen.

E.1.2 Syntese af HSA prepro-sekvensen

35

I plasmid pXL276, hvis konstruktion detaljeret er beskrevet i patentansøgning EP 0 198 745, var kodesekvensen for moden HSA blev koblet i ramme til ATG codonen af ribosombindingsstedet (RBS) af cII genet af bakteriofag

lambda (fig. 2). Dette frembragte et NdeI sted umiddelbart opstrøms for translationsinitiationscodonen af HSA genet. pXL276 anvendes til at rekonstituere prepro-regionen af HSA, der viser sig at være stumpafsluttet i cDNA

5 lige opstrøms for TaqI stedet ved aminosyre "-1". Rekonstituering opnås ved at indføre et DNA fragment svarende til HSA preprosekvensen i form af fire oligodeoxynucleotider 33-36 baser lange (Sq32, Sq34, Sq35 og Sq38; fig. 2) og 120 bp EcoRI-NdeI fragment afledt af pXL276, der

10 bærer udtrykkelsessignaler fra E. coli gener mellem EcoRI og AccI stederne af plasmid pUC8. TaqI stedet genoprettes således ved den ene ende af indskuddet i dette plasmid betegnet pXL290 (fig. 2). Det lille HindIII-TaqI fragment, der bærer RBS og prepro-sekvensen ovenfor TaqI ste-

15 det ligeres med TaqI-PstI fragmentet af HSA cDNA klonen (plasmid p1B11, indeholdende 5' enden af HSA) mellem HindIII og PstI stederne af pUC8 til opnåelse af plasmid pXL299 (fig. 3). Plasmid pXL322 konstrueres ved ligering af HindIII-PvuII fragmentet af pXL299, der bærer RBS og

20 prepro-HSA sekvensen op til PvuII stedet, med det store PvuII-EcoRI fragmentet af pXL276, der bærer repliconen og 3' enden af den HSA kodende sekvens, og med EcoRI-HindIII fragmentet af pXL276 indeholdende promotoren (fig. 4).

25 E.1.3. Frembringelse af et HindIII sted opstrøms for HSA translationsinitiationscodonen

For at opnå en prepro-HSA kassette, der er i stand til

30 let at integreres i udtrykkelsesvektorer, ændres NdeI stedet af plasmid pXL322, beskrevet ovenfor, til et HindIII sted ved oligodeoxynucleotid-dirigeret mutagenese. Til dette formål subklones HindIII-BglII fragmentet af pXL322 indeholdende 5' enden af prepro-HSA genet i M13mpl8 og mutageniseres ved hybridisering af det syn-

35 tetiske oligodeoxynucleosie

5'-ATCTAAGGAAATACAAGCTTATGAAGTGGGT-3' til den enkeltstrengede skabelon (henholdsvis de understregede og med

fed type angivne sekvenser, der repræsenterer HindIII
stedet og translationsinitiationsstedet. Plasmid pXL855
blev således fremstillet (fig. 5), af hvilket nucleotid-
sekvensen af den mutageniserede region blev verificeret
5 under anvendelse af kædeafslutningsmetoden. Sekvensen,
der koder det fuldstændige prepro-HSA genoprettes ved
indførsel af HindIII-PvuII fragmentet af den mutagenise-
rede phag og PvuII-HindIII fragmentet af pXL322, der
indeholder 3' enden af det strukturelle gen, ind i
10 HindIII stedet af pUC8 til opnåelse af plasmid pXL869
(fig. 6). Dette plasmid indeholder således et 1,87 kb
HindIII fragment indeholdende det fuldstændige prepro-HSA
strukturelle gen såvel som en ikke-translateret 61 bp re-
gion ved dens 3' ende. Den fuldstændige sekvens af
15 HindIII fragmentet såvel som aminosyresekvensen af det re-
kombinante HSA er afbildet i fig. 7. En HindIII kassette
indeholdende det Met-HSA strukturelle gen uden nogen
sekretionssignal konstrueres ved at anvende samme metode,
bortset fra at et M13 derivat af plasmid pXL276 mutageni-
20 seres under anvendelse af det syntetiske oligodeoxynu-
cleotid 5'-ATCTAAGGAAATACAAGCTTATGGATGCACAC AAG-3'. Gen-
oprettelse af den fuldstændige Met-HSA kodesekvens i pUC8
giver plasmid pXL868, der er fremstillet på samme måde
som plasmid pXL869.

EKSEMPEL 2

Konstruktion af gærkloningsvektorer

E.2.1 Isolering og rensning af plasmid pKD1

Plasmid pKD1 kan renses fra en sen logaritmisk fasekultur
af *K. drosophilae* stamme UCD 51-130 (U.C.D. collection,
University of California, Davies, CA 95616) efter meto-
35 den, der er afledt af den, der er beskrevet af Fleer et
al., (Mol. Cell.Biol. 7 (1987) 1180-1192). En 1 liters
kultur i YPD medium (1% gærekstrakt, 2% Bacto-pepton

(Difco), 2% glucose) centrifugeres, vaskes og genopslæmmes i en 1,2 M sorbitolopløsning, og cellerne omdannes til spheroplaster i nærværelse af zymolyase (300 µg/ml), 25 mM EDTA, 50 mM phosphat og β-mercaptoethanol (1 µg/ml). Efter vask i 1,2 M sorbitolopløsning genopslæmmes spheroplasterne (svarende til 250 ml af den oprindelige kultur pr. rør) i 2,5 ml 1,2 M sorbitol og det samme rumfang puffer bestående af 25 mM Tris-HCl, 50 mM glucose og 10 mM EDTA, pH 8,0 tilsættes. De efterfølgende trin svarer til den alkaliske lysemetode allerede beskrevet (Maniatis, T. et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982), bortset fra at udfældningen af DNA, der udføres ved 23 °C i 15 minutter ved tilsætning af 14 ml isopropanol. Det frembragte materiale behandles med RNase (50 µg/ml) ved 37 °C i 20 minutter og derefter med proteinase K (150 µg/ml) i en opløsning bestående af 0,5 M NaCl, 0,5% sarkosyl og 25 mM EDTA i 1 time ved 60 °C. Efter centrifugering i en Eppendorf mikrocentrifuge udfældes de supernatante dele med ethanol i 10 minutter ved -70 °C, hvorefter pellets opløses, og DNA'et renses ved CsCl densitets-gradientcentrifugering i nærværelse af ethidiumbromid.

25 E.2.2 Konstruktion af plasmid pCXJ1

Konstruktionsmellemproduktet pUC-URA3 (fig. 8) består af et 1,1 kb HindIII fragment indeholdende URA3 genet fra *S. cerevisiae* indført i det unikke NarI sted af plasmid pUC19 (Yanisch-Perron, C. et. al., Gene 33 (1985) 103-119). HindIII fragmentet stammer fra plasmid pG63 (Gerbaud, C. et al., Curr. Genet. 3 (1981) 173-180), der er blevet nedbrudt med HindIII og herefter behandlet med Klenow fragmentet af *E. coli* DNA polymerase I til frembringelse af stumpafsluttede ender. 1,1 kb fragmentet indeholdende URA3 genet renses og indføres derefter i pUC19, der selv er afskåret med NarI, og behandles med

Klenow fragmentet af *E. coli* DNA polymerase I. Plasmid pUC-URA3 indeholder herefter: et origin for replikation for vedligeholdelse af plasmidet i *E. coli*, ampicillinresistensmarkøren til transformationer i *E. coli*, lacZ genet indeholdende en polylinker (EcoRI, SacI, KpnI, BamHI, XbaI, Sall, SphI, HindIII som unikke steder) og URA3 genet fra *S. cerevisiae*, der tjener som en selekterbar markør i *uraA* mutanter af *K. lactis*.

Plasmid pCXJ1 (fig. 9) indeholder den komplette sekvens af plasmid pKD1 indført i det unikke AatII sted af pUC-URA3. Denne konstruktion er blevet opnået ved at linearisere pKD1 ved EcoRI stedet og herefter behandle dette plasmid med Klenow fragmentet af *E. coli* DNA polymerase I. Dette DNA fragment liggeres med pUC-URA3, der forud er skåret med AatII og behandlet med T4 DNA polymerase. Ligation af disse to fragmenter muliggør genopretning af EcoRI restriktionsstederne. Indførslen af DNA'et af pUC-URA3 ved EcoRI stedet af plasmid pKD1 inaktiverer ikke noget gen, der er nødvendigt for at opretholde plasmidstabilitet og kopiantal (EcoRI stedet er beliggende 205 nucleotider (nt) ovenfor ATG codonen af gen B; Chen, X.J. et al., Nucl. Acids Res. 14 (1986) 4471-4481). Som en følge heraf opformeres plasmid pCXJ1, der transformerer *K. lactis uraA* cir^o celler med høj frekvens, til ca. 70-100 kopier pr. celle og opretholde stabil selv uden selektionstryk. På grund af originen for replikation til-
delt af pUC-URA3 kan plasmid pCXJ1 også formeres i *E. coli*, hvorved plasmidkonstruktionen og rensningstrinnene lettes. De unikke steder af plasmid pCXJ1, der kan anvendes til at indføre fremmed DNA, er HindIII og Sall stederne fra pUC19 polylinkeren.

E.2.3. Konstruktion af en fusion mellem *K. lactis* P_{kl} promotor og 3'-aminoglycosidphosphotransferasegenet af Tn903

Anvendelsen af pCXJ1 som en vektor til transformation af *K. lactis* og andre *Kluyveromyces* species forbliver begrænset til stammer, der bærer den kromosomale *uraA* mutation som en auxotrop markør. For at være i stand til at transformere industrielle wild-type stammer af *Kluyveromyces*, valgte man 3'-aminoglycosidphosphotransferase (*aph*) genet fra den bakterielle transposon Tn903 som en dominant antibiotisk resistensmarkør, der blev indført i pCXJ1. *aph* genet bliver resistens overfor kanamycin i *E. coli*, og dersom det udtrykkes i wild-type gærstammer bliver det resistens overfor antibiotikummet G418 (geneticin), der er en kraftig hæmmer af cellevækst (Jimenez, A. and Davis, J., *Nature* 287 (1980) 869-871). For at muliggøre en tilstrækkelig kraftig udtrykkelse af *aph* genet i *K. lactis* erstattes de bakterielle transskriptionssignaler af *aph*-genet med ORF1 promotoren (P_{k1}) isoleret fra dræberplasmidet K1 af *K. lactis*.

Konstruktionen af P_{k1} -*aph* fusionen udføres i flere trin (fig. 10-12). I første række subklones et 1,5 kb *ScaI*-*PstI* fragment af plasmid k1 mellem de unikke *ScaI* og *PstI* steder af pBR322; det ampicillin-følsomme og tetracyclin-resistente rekombinante plasmid betegnes *pk1*-PS1535-6 (fig. 10). Det 1,5 kb *ScaI*-*PstI* subklonede fragment stammer fra en ydre del af det lineære dræberplasmid: det indeholder 5' halvdelen af ORF1 båret af plasmid k1 og ca. 220 basepar opstrøms (Sor, F. and Fukuhara, H., *Curr. Genet.* 9 (1985) 147-155). Da *ScaI* stedet er beliggende kun 22 basepar fra den venstre udstrækning af k1 (fig. 10), indeholder 1,5 kb *ScaI*-*PstI* fragmentet sandsynligvis hele promotorregionen af ORF1 (P_{k1}). Nedbrydning af *pk1*-PS1535-6 med *DdeI* giver et 266 bp fragment indeholdende 17 bp, der stammer fra pBR322 med en af dens ydre dele (tæt på *ScaI*) og de første 11 codoner af ORF1 ved den anden ydre ende. Efter behandling med Klenow fragmentet af *E. coli* DNA polymerase I indføres det rensede fragment i det unikke *XhoI* pladssted af plasmid pUC-kan1 (fig.

11). Sidstnævnte plasmid blev fremstillet ved indførsel af et 1,25 kb EcoRI fragment indeholdende aph-genet stammende fra Tn903 ("Kanamycin Resistance Gene Block", Pharmacia) i det unikke EcoRI sted af pCU19. Plasmid pUC-kan202 opnås ved at udføre en nedbrydning af pUC-kan1 med XhoI, efterfulgt af en kort nedbrydning med S1 nuclease, hvilket giver stumpafsluttet endestillinger, efterfulgt af ligation med DdeI fragmentet af p_{k1}-PS1535-6, der gøres stumpafsluttede med Klenow fragmentet af E. coli DNA polymerase I (fig. 11). Denne konstruktion muliggør en i-rammefusion kan opnås mellem de første 11 aminosyrer af ORF1 genet af det lineære plasmid k1 og den 5' stumpafsluttede ende af aph-genet af Tn903. Faktisk genopretter sammenbindingen mellem ORF1 og aph den tolvte codon af aph (AGG), således at de første elleve aminosyrer af aph er blevet erstattet med de første 11 aminosyrer af ORF1. Den fuldstændige sekvens af ORF1 promotoren anvendt til P_{k1}-aph fusionen sammen med begyndelsen af det strukturelle gen, der koder aph, er vist på fig. 12.

20

E.2.4. Konstruktion af plasmid pKan707

Plasmid pKan707 (fig. 13) er et derivat af plasmid pCXJ1 beskrevet ovenfor. Det er opbygget ved at skære plasmid pCXJ1 med HindIII og herefter behandle med Klenow fragment af E. coli DNA polymerase I. Det lineariserede plasmid med stumpafsluttede ender ligesom herefter med et 1,2 kb ScaI-HincII fragment stammende fra plasmid pUC-Kan202, der bærer P_{k1}-aph fusionen (fig. 13). Nedbrydning af pUC-Kan202 med ScaI og HincII giver en stumpafsluttet kanamycinresistenkassette, der ikke længere indeholder den oprindelige bakterielle promotor. Det opnåede plasmid, pKan707, giver resistens overfor meget høje niveauer af G418 (>2,5 g/l) i K. lactis stammer. Som i tilfældet med pCXJ1 kan plasmid pKan707 indføres i K. lactis cir^o stammer med høj frekvens, forstærkes til 70-100 kopier pr. celle og stabilt opretholdes uden selektionstryk

35

(fig. 14). Den store følsomhed overfor G418 af de fleste Kluyveromyces stammer kombineret med tilstedeværelsen af en effektiv dominant markør, der muliggør transformation af industrielle stammer, gør at pKan707 er en særdeles
5 værdifuld kloningsvektor for gær af slægten Kluyveromyces.

EKSEMPEL 3

10 Konstruktion af udtrykkelsesvektorer indeholdende udtryk- kelse og/eller sekretionskassetterne for albumin i gær

15 E.3.1. Konstruktion af udtrykkelseskassetter for Met-HSA og prepro-HSA under kontrollen af PGK promotoren af *S. cerevisiae*

Plasmid pYG12 (fig. 15) indeholder et 1,8 kb Sall-BamHI restriktionsfragment bestående af promotor- og terminatorregionerne af PGK genet af *S. cerevisiae*. Dette frag-
20 ment stammer fra et 3,0 kb HindIII genomt fragment, hvorfra et 1,2 kb fragment svarende til det strukturelle gen er blevet deleteret og omfattende en region mellem translationsinitiations ATG og BglII stedet beliggende 30 codoner opstrømt for TAA codonen, der specificerer afslut-
25 ningen af translation (mellor, J. et al., Gene 24 (1983) 1-14). HindIII stederne, der omgiver 1,8 kb fragmentet, der herved opnås, ødelægges herefter og erstattes med et Sall og BamHI sted, henholdsvis opstrøms for promotorregionen og nedenstrøms for PGK transskriptionsterminato-
30 ren. Et HindIII sted indføres herefter ved sammenbindingen mellem promotor- og terminatorregioner; da stedet er unikt, muliggør det at heterologe gener let kan indføres. Nucleotidsekvensen af denne region er vist på fig. 15. 1,8 kb HindIII fragmentet stammende fra plasmid pXL868
35 (se E.1.3) og som koder Met-HSA indføres herefter i HindIII stedet af plasmid pYG12 til opnåelse af det rekombinante plasmid pYT10. På samme måde frembringes

plasmid pYG11 ved indførsel i pYG12 af et HindIII fragment stammende fra plasmid pX1869 (se E.1.3) og som koder prepro-HSA (fig. 15). Som en følge heraf frembringes to Sali-BamHI udtrykkelseskassetter af ca. 3,6 kb størrelse omfattende PGK genpromotoren af *S. cerevisiae* (P_{PGK}), efterfulgt af genet, der koder enten Met-HSA eller prepro-HSA og endelig regionen svarende til transskriptions-terminatoren af PGK genet (T_{PGK}), en region, der omfatter polyadenyleringsstedet af mRNA'et.

E.3.2 Konstruktion af udtrykkelsesplasmiderne pYG19, pYG23 og pYG221

Med den hensigt at indføre udtrykkelseskassetterne beskrevet ovenfor i vektoren pKan707 subklones 3,7 Sali-BamHI fragmenterne afledt af plasmiderne pYG10 og pYG11 i et første trin i de tilsvarende steder af plasmid pIC-20R (Marsh, L. et al., *Gene* 32 (1984) 481-485), til fremstilling af på denne måde plasmidkonstruktionerne pYG18 (prepro-HSA) (fig. 16) og pYG22 (Met-HSA). Disse konstruktionsmellemprodukter foranlediger opståelsen af P_{PGK} /Met-HSA/ T_{PGK} og P_{PGK} /prepro-HSA/ T_{PGK} udtrykkelseskassetter i form af Sali-SacI restriktionsfragmenter, der direkte kan indføres i de tilsvarende steder af pKan707 (fig. 17). Nedbrydning af sidstnævnte med enzymerne Sali og SacI fører til deletion af URA3 markøren såvel som deletion af et 35 bg fragment beliggende opstrøms for gen B af pKD1. De herved fremstillede konstruktioner betegnet pYG19 (prepro-HSA) (fig. 18) og pYG23 (Met-HSA) omfatter P_{PGK} /HSA/ T_{PGK} udtrykkelseskassetterne, bogstaveligt talt den fulde sekvens af *K. drosophilae* plasmid pKD1, de sekvenser, der tillader autonom replikation i *E. coli* såvel som generne, der koder for β -lactamase og 3'-amino-glycosidphosphotransferase (under kontrollen af P_{kl} promotoren) hvilket muliggør at henholdsvis *E. coli* kan selekteres i nærværelse af ampicilling og *K. lactis* i nærværelse af G418.

HSA-sekretionsvektorer, der stadig indeholder URA3 genet af plasmid pKan707 er også blevet konstrueret. Som angivet i fig. 19A stammer plasmid pYG208 fra plasmid pYG12 ved indførsel af en BamHI/SalI adaptor (5'-GATCCGTCGACG-3') nedenstrøms for PGK terminatoren. HindIII fragmentet, der koder prepro-HSA, renses ved elektroeluering fra plasmid pXL869 (prepro-HSA) og klones i den korrekte orientering ind i HindIII stedet af vektor pYG208 til frembringelse af plasmid pYG210; SalI udtrykkelseskassetten frembragt på denne måde (PGK promotor/prepro-HSA/PGK terminator) renses ved elektroeluering og klones ind i SalI stedet af plasmid pKan707 til frembringelse af udtrykkelsesplasmiderne pYG221A og pYG221B (fig. 19B), der kun er forskellig fra hinanden med hensyn til den relative orientering af SalI udtrykkelseskassetten med hensyn til vektoren pKan707. I plasmid pYG221B er orienteringen af SalI udtrykkelseskassetten i forhold til Km^r genet, der koder for resistens overfor G418, identisk med orienteringen af SalI-SacI udtrykkelseskassetten båret af plasmid pYG19.

E.3.3 Konstruktion af en PGK/LAC hybridpromotor med optimeret ATG kontekst

For at fremstille et inducerbart derivat af PGK promotoren, der findes i udtrykkelsesplasmidet pYG19, blev UAS af PGK promotoren erstattet med UAS stammende fra LAC4 promotoren fra *K. lactis* (Breunig, K.D. et al., Nucl. Acid Res. 12 (1984) 2327-2341). Til dette formål blev SalI-HindIII fragmentet af pYG12 indeholdende PGK promotoren klonet i bakteriofag M13mpl8 til opnåelse af konstruktion af pYG14 (fig. 20). Under anvendelse af den ovenfor beskrevne metode blev to NotI steder herefter indført i PGK promotorregionen via stedsdirigeret mutagenese, hvilket frembragte konstruktionen pYG26 (fig. 20). De syntetiske oligonucleotider, der blev anvendt til dette formål, var:

5'-CAAAACCTGTGA GCGGCCGCTAGGACCTTG-3'

5'-GG TAATTTCTTTCTCGATAA GCGGCCGCGTGCTTT ATG-3' (Sq416).

Herved blev indført ialt fire baseparændringer (understreget) ved stillingerne -397, -399, -536 og -541 (i forhold til ATG initiatorcodonen defineret som +1; fig. 21). De to NotI steder (fede typer) opnået på denne måde omgiver regionen af PGK promotoren, der tidligere er beskrevet for at indeholde to funktionelle distinkte domæner (A og M i fig. 21A) af UAS_{PGK} (Stanway, C. et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 6855-6873). Nedbrydning af dette PGK derivat med enzymet NotI muliggør deletion af UAS_{PGK} og efterfølgende ombytning heraf med et syntetisk fragment indeholdende UAS_{LAC} omgivet af NotI steder (fig. 22) klonet i den ene eller anden retning i forhold til PGK promotoren. UAS_{LAC} fragmentet blev opnået ved hybridisering og efterfølgende ligation af følgende fire oligodeoxy-nucleotider:

Sq526, øvre streng, fragment 1:

(-448) 5'-GGC CGC TGT GAA AAG TGT AGC GGA AAT ATG TGG TCC GAG CAA CAG CGT CTT TTT CTA GTA GTG CGG-3' (-389)

Sq527, øvre streng, fragment 2:

(-388) 5'-TCG GTT ACT TGG TTG ACA TTG GTA TTT GGA CTT TGT TGC TAC ACC ATT CAC TAC TTG AAG TCG AGT GTG AGC-3' (-319)

Sq528, øvre streng, fragment 1:

(-319) 5'-GGC CGC TCA CAC TCG ACT TCA AGT AGT GAA TGG TGT AGC AAC AAA GTC CAA ATA CCA ATG TCA ACC AAG T-3' (-382)

Sq525, nedre streng, fragment 2:

(-383) 5'-AAC CGA CCG CAC TAC TAG AAA AAG ACG CTG TTG CTC GGA CCA CAT ATT TCC GCT ACA CTT TTC ACA GC-3' (-448)

Antallet i parentes viser stillingen af hver oligodeoxy-nucleotid i forhold til ATG codonen (+1) i wild-type LAC4

promotoren (Beunig, K.D. et al., Nucl. Acids Res., 12 (1984) 2327-2341). Denne region spænder over stillingerne -328 til -435 og har vist sig at indeholde de første af tre UAS elementer fundet i LAC4 promotoren (Breunig, K.D. et al., 5th Internat. Sympos. Genet. Industr. Microorgan. (1986) Alacevic M. et al., (udg.) 551-560; Leonardo, J.M. et al., Mol. Cell. Biol. 7 (1987) 4369-4376). Bogstaver trykt i fed skrift repræsenterer nucleotider, der er del af de to NotI steder, der omgiver UAS af LAC4 genet af K. lactis; bindingssekvensen af Sq527 komplementær med Sq525 er understreget.

Da nucleotidsekvensen nær initiator ATG'et af højt udtrykte eukaryotiske gener antages at have indflydelse på effektiviteten af translationsinitiation (Koxak, M., Microbiol. Rev. 47 (1983) 1-45; Hamilton, R. et al., Nucl. Acid Res. 15 (1987) 3581-3593) blev ATG konteksten af PGK promotoren modificeret på følgende måde: via pladsdirigeret mutagenese blev et yderligere HindIII restriktionssted (fed skrift) indført ved stilling -25 af PGK promotoren båret på pYG26, hvorved plasmid pYG29 blev frembragt (fig. 20). Det syntetiske oligodeoxynucleotid anvendt til dette forsøg var

5'-TATATTTGTTGTAAAGCTTAGATAATTACTTCC-3' (sq449). UAS_{LAC} fragmentet beskrevet ovenfor blev herefter klonet ind i NotI stederne af pYG29 hvilket bevirkede frembringelse af plasmiderne pYG63-1 og pYG63-2 (fig. 22). PGK/LAC4 hybridpromotorregionerne af sidstnævnte plasmider blev renset som SalI-HindIII fragmenter og ligeret til en syntetisk HindIII/BstEII adaptor bestående af følgende to komplementære oligodeoxynucleotider: (i)

5'-AGC TTT ACA ACVA AAT ATA AAA ACA ATG AAG TGG-3' (Sq451) og (ii)

5'-GT TAC CCA CTT CAT TGT TTT TAT ATT TGT TGT AA-3' (Sq452) (prepro-HSA initiatorcodonen er afbildet i fede typer). Denne adaptor genopretter de 22 bp umiddelbart opstrøms for wild-type PGK promotoren (fig. 21B) og

omfatter de første fire codoner af det prepro-HSA strukturelle gen indtil et naturligt forekommende BstEII sted. SalI-BstEII fragmenterne opnået på denne måde (der bærer PGK/LAC4 hybridpromotoren med et optimeret initiator ATG kontekst) blev herefter anvendt for at opbytte det tilsvarende restriktionsfragment (der indeholder den ikke-mutageniserede PGK promotor) i konstruktion pYG18 (jævnfør fig. 16). Ved at følge denne strategi blev opnået to konstruktionsmellemprodukter, der kun er forskellige med hensyn til orienteringen af UAS_{LAC} i forhold til PGK promotoren. Disse nye konstruktioner blev anvendt til at frembringe SalI-SacI udtrykkelseskassetter, der blev klonet ind i de tilsvarende restriktionssteder af pKan707 (jævnfør fig. 13), hvilket gav plasmiderne pYG44-5 og pYG44-7 (fig. 23). Disse plasmider er isogene bortset fra, at det syntetiske NotI fragment, der indeholder UAS_{LAC} er en wild-type orienteringen for pYG44-5 og i den modsatte orientering for plasmid pYG44-7.

E.3.4 Konstruktion af en vektor for prepro-HSA sekretion under kontrol af PHO5 promotoren af *S. cerevisiae*

Vektor pEPHO (fig. 24) indeholder et 0,94 kb BamHI-PstI restriktionsfragment, der huser promotor- og terminator-regionen af det sure phosphatasegen (PHO5) fra *S. cerevisiae*. Dette fragment stammer fra et 2,03 kb genomt BamHI-PstI fragment (Bajwa, W. et al., Nucl. Acid Res. 12 (1984) 7721-7739) ved deletion af det PHO5 strukturelle gen. Denne deletion omfatter stillinger -3 (i forhold til ATG initiatorcodonen +1) og +1109 (Sau3A stedet beliggende opstrøms for TAG initiatorcodonen). En polylinker EcoRI/SmaI/BamHI blev indført ved sammenbindingen mellem promotor og terminator og kan anvendes som kloningssted for indførslen af et heterologt gen. Sammenbindingen mellem PHO5 promotoren og denne polylinker er angivet nedenfor (idet nucleotidsekvensen svarende til polylinkeren er understreget):

5'-AAATTCGAGATTAG GAATTCCCGGGGATCC-3'

For at opnå en konstruktion, hvori HSA-genet er udtrykt under kontrollen af PHO5 promotoren og den ikke-translaterede lederregion af PGK genet, blev et HindIII sted indført ved stilling -20 af PHO5 promotorfragmentet afledt af plasmid pEPHO. Til dette formål blev 0,83 kb Sall-EcoRI fragmentet af pEPHO subklonet i polylinkeren af bakteriofag M13mp9, og den fremstillede enkeltstregede skabelon (pYGRF3) blev derefter mutageniseret under anvendelse af oligodeoxynucleotidet

5'-CCTAATCTCGAATAAGCTTGCTCTATTTG-3' (Sq487; det indførte HindIII sted er angivet i fede typer) som mutagen primer, hvilket resulterede i plasmid pYGRF4 (fig. 24).

For et lette konstruktionen af en række udtrykkelseskassetter indeholdende forskellige promotorer og/eller terminatorer blev et derivat af plasmid pIC-20R (se fig. 16) frembragt, hvori HindIII stedet af polylinkeren var ødelagt ved behandling af de klæbrige ender med det store fragment af polymerase I (Klenow) af E. coli. Denne ny kloningsvektor (pIC-20RAH3) blev herefter anvendt til at indføre Sall-BamHI fragmentet af plasmid pYG12 (se fig. 15) indeholdende promotor- og terminatorregionerne af PGK genet, hvorved plasmid pYG61 blev frembragt. Under anvendelse af promotormoduler som Sall-HindIII fragmenter og terminatormoduler som HindIII-BamHI fragmenter, kan udtrykkelseskassetter med en hvilken som helst kombination af transskriptionelle initiations- og terminations-signaler, i hvilket det strukturelle gen, der skal udtrykkes, er blevet klonet som et HindIII restriktionsfragment. Nedbrydning af disse konstruktionsmellemprodukter med enzymerne Sall og SacI muliggør efterfølgende indførsel af de nye udtrykkelseskassetter i de tilsvarende steder af gærkloningvektoren pKan707 (se fig. 17 og 18).

Under anvendelse af denne basale strategi blev Sali-HindIII PGK promotorfragmentet af plasmid pYG61 ombyttet med Sali-HindIII fragmentet af pYGRF4, der huser PH05 promotoren. Indførsel af det prepro-HSA strukturelle gen isoleret fra plasmid pYG44-5 som HindIII fragment (se fig. 23) og overførsel af den fremkomne udtrykkelseskas-

5 sette som Sali-SacI fragment i plasmid pKan707 foranlægger sekretionsvektor pYG51 (fig. 23). Plasmidet indeholder således PH05 promotoren af *S. cerevisiae* indtil

10 stilling -17 (herunder alle transskriptionsinitiationssteder (Rudolph, H. and Hinnen, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 1340-1344), (fig. 25), efterfulgt af 21 bp af den ikke-translaterede PGK ledersekvens, det prepro-HSA strukturelle gen og endelig PGK terminatoren.

15 E.3.5 Konstruktion af en vektor for HSA sekretion under kontrol af LAC4 promotoren fra *K. Lactis*

Under anvendelse af polymerasekædereaktions (PCR) metoden (Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym, 155 (1987) 335-350; Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354), blev LAC4 promotoren fra *K. Lactis* forstærket fra gærgenom DNA som et Sali-HindIII restriktionsfragment. Totalt genomt DNA isoleret fra stamme CBS2359 tjente som skabelon, og følgende syntetiske oligodeoxynucleotider blev anvendt som primere for Taq-polymerasereaktionen (Sali og HindIII steder indført opstrøms og nedenstrøm for LAC4 promotoren fra *K. Lactis* er angivet i fede typer):

25

- 30
- 1) 5'-CCC **GTCGAC** ATGTAGAGTAGACAACAGACAGGGAGGGC-3'
 - 2) 5'-A **AAGCTT** ATCTTTCAGTTCTCGATGAGTATGTGTGTT-3'

Opbygningen af disse primere var baseret på LAC4 sekvensen tidligere publiceret af Leonardo J.M. et al., (Mol. Cell. Biol. 7 (1987) 4369-4376). Sali-HindIII restriktionsfragmentet fremstillet på denne måde indeholder

35

LAC4 promotorregionen, der spænder fra stillingerne -1198 til -1 (idet ATG initiatorcodonen er defineret som +1). Det forstærkede materiale blev nedbrudt med enzymerne SalI og HindIII, klonet i plasmid pYG61 (jævnfør afsnit E.3.4), og nucleotidsekvensen heraf blev bekræftet under anvendelse af dideoxykædeafslutningsmetoden (Sanger F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467).

Ved at følge det generelle skema beskrevet i det tidligere kapitel blev opnået et pKan707 derivat, betegnet pYG404 (fig. 23) hvori prepro-HSA genet er udtrykt under kontrollen af den lactose/galactoseinducerbare LAC4 promotor fra K. Lactis. Sekvensen umiddelbart opstrøms for HSA initiatorcodonen i denne specifikke konstruktion stammer fra plasmid pYG44-5 (fragment HindIII) og indeholder derfor del af den utranslaterede leder af PGK genet (jævnfør afsnit E.3.3).

E.3.6 Konstruktion af en vektor for HSA sekretion under kontrol af PGK promotoren fra S. cerevisiae og dræbertoxinsekretionssignalet fra K. Lactis

Under anvendelse af to par komplementære syntetiske oligodeoxynucleotider blev et HindIII-DraI fragment genopbygget, der indeholder følgende elementer: (i) de ATG proximale 21 bp af PGK promotoren, (ii) sekretionssignalsekvensen ("pre"-region) af dræbertoxingenet fra plasmid k1 fra K. Lactis (Stark M.J.R. and Boyd A., EMBO J. 5 (1986) 1995-2002), og (iii) de første 17 aminosyrer af pro-HSA genet indtil N-endestillede DraI sted koblet i ramme til dræbertoxin pre-regionen. De fire oligodeoxynucleotider, der blev anvendt i denne konstruktion, var følgende:

Sq1000, øvre streng, fragment 1:

5'-

AGCTTAGCTTTACAACAAATATAAAACAATGAATATATTTTACATATTTTGT

TGCTGTC-3'

Sq998, øvre streng, fragment 2:

5'-

5 ATTCGTTCAAGGTAGGGGTGTGTTTCGTCGAGATGCACACAAGAGTGACCTTCCTCA
TCGGTTT-3'

Sq996, nedre streng, fragment 1:

5'-

10 AAAAACAAAAATATGTAAAATATATTCATTGTTTTATATTTGTTGTAAAGCTA-3'

Sq997, nedre streng, fragment 2:

5'-

15 AAACCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCGACGAAACACACCCCTACCTTG
AACGAATGACAGC-3'

20 Bogstaver printet med fed type repræsenterer nucleotider, der er del af HindIII og DraI stederne anvendt ved dette forsøg; sammenbindensekvensen af Sq998 komplementær med Sq996 er streget under.

25 Efter phosphorylering af oligodeoxynucleotiderne Sq996 og Sq998 blev frembragt et dobbeltstrenget HindIII-DraI fragment efter skemaet angivet i fig. 26. Dette 130 bp fragment blev renset ved gelelektrophorese og ligeret til et 1,04 kb DraI-XbaI fragment indeholdende en del af det HSA strukturelle gen isoleret fra plasmid oXL869 (se fig. 6). HindIII-XbaI fragmentet isoleret på denne måde blev herefter klonet ind i bakteriophag M13mp10, hvilket frembragte konstruktionen pYG56 (fig. 26). Den korrekte nucleotidsekvens af dette mellemprodukt blev bekræftet ved dideoxysekvensering.

35 Hele det prepro-HSA strukturelle gen kan herefter genopbygges ved ligation af følgende tre elementer: (i) 1,17 kb HindIII-XbaI fragmentet stammende fra pYG56 konstruktionen netop beskrevet ovenfor, (ii) XbaI-BamHI

fragmentet fra pYG18 (se fig. 16) indeholdende den carboxy-endestillede halvdel af HSA genet såvel som PGK terminatorregionen og (iii) et BamHI-HindIII fragment af plasmid pYG62. Sidstnævnte plasmid er et derivat af konstruktionen pYG61 (se afsnit E.3.4), hvori Sall-HindIII fragmentet, der bærer PGK promotoren, er blevet erstattet med det ækvivalente restriktionsfragment stammende fra plasmid pYG29 (se fig. 20). BamHI-HindIII fragmentet fra plasmid pYG62 anvendt i denne konstruktion indeholdt således *E. coli* originen for replikation, ampicillin resistensgenet og PGK promotoren med et HindIII sted indført ved stilling -25 (se afsnit E.3.4). Det fremstillede pIC derivat blev betegnet pYG57. Sidstnævnte plasmid blev anvendt som en kilde for et Sall-SacI fragment, der blev klonet ind i de tilsvarende steder af gærkloningsvektor pKan707, hvilket gav anledning til fremstilling af udtrykkelsesvektor pYG58 (fig. 23).

E.3.7 Konstruktion af en integrativ vektor til at dirigere en PGK/prepro-HSA udskillelseskassette til RAG2 stedet af *K. Lactis*

Plasmid p31/RAG2:URA3 (fig. 27) leveret af Dr. M. Wesolowski-Louvel (Institut Curie, Orsay, France), indeholder et 2,3 kb genomt NheI fragment, der huser promotoren og den N-endestillede region af det RAG2 strukturelle gen af *K. Lactis*, der højst sandsynligt koder en phosphoglucoseisomerase (Wesolowski-Louvel M. et al., Nucl. Acid Res., 16 (1988) 8714). Plasmid p31/RAG2:URA3 blev konstrueret ved indførsel af et 1,6 kb EcoRI fragment stammende fra plasmid pCXJ1 (fig. 9), der huser URA3 genet af *S. cerevisiae*, i EcoRI stedet af RAG2 promotoren. Det 3,9 kb NheI fragment opnået på denne måde blev herefter klonet i det unikke NheI sted af plasmid pBR322.

35

Ved at skære plasmid pYG18 (fig. 16) med restriktionsenzymene EcoRV og SmaI opnåede man et 3,7 kb fragment

indeholdende den samme PGK/prepro-HSA udtrykkelseskassette som den, der blev anvendt i gærsekretionsvektor pYG19 (fig. 18). Indførsel af denne kassette i det unikke SmaI sted af plasmid p31/RAG2:URA3 (beliggende 3' for URA3 markørgenet) frembragt af konstruktionerne pYG60-21 og pYG60-5 (fig. 27), der kun er forskellig fra hinanden med hensyn til orienteringen af prepro-HSA udtrykkelseskassetten.

Ved at skære plasmider pYG60-21 og pYG60-5 med enzymet NheI frembragte man et 7,7 kb fragment indeholdende HSA udtrykkelseskassetten og URA3 markørgenet omgivet af RAG2 afledte sekvenser. Disse sidstnævnte sekvenser tjente til at målrette integrationen af hele fragmentet til RAG2 stedet af *K. Lactis* stamme MW98-8C via homolog rekombination (Rothstein R.J., *Methods in Enzymol.* 101 (1983) 202-211). Integration ved RAG2 stedet blev bekræftet ved Southern analyse af tre ud af seks undersøgte integranter (MW98-8C::60-5 integrantklon nr. 6 og MW98-8C::60-21 integrantkloner nr. 7 og 9). De øvrige tre integranter viste sig at bære en (MW98-8C::60-5 integrantklon nr. 8 og MW98-8C::60-21 integrantklon nr. 11) eller to (MW98-8C::60-5 integrantklon nr. 4) HSA udtrykkelseskassette integreret ved andre steder end RAG2. Alle seks af de bekræftede integranter blev undersøgt for evne til HSA udskillelse.

EKSEMPEL 4

Transformation af *Kluyveromyces* species med plasmider, der udtrykker HSA

E.4.1 Transformationsmetoder

Transformanter af *K. Lactis* stamme MW98-8C (α uraA arg lys K^+ pKD1^o) blev opnået enten ved spheroplastdannelsemetoden oprindeligt beskrevet af Hinnen et al., (Hinnen,

A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1929-1933) og passende tilpasset, eller ved at man behandlede hele cellevært med lithiumacetat (Ito, H. et al., J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), der favoriserer DNA
5 inkorporering i nærværelse af polyethylenglycol (PEG 4000, Sigma). Transformanter af alle andre Kluyveromyces stammer beskrevet nedenfor blev udelukkende opnået ved behandling med lithiumacetat.

10 En prøve af stamme MW98-8C blev deponeret i Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) i Baarn i Holland i overensstemmelse med Budapesttraktaten, hvor den blev registreret den 16.09.1988 under nummeret CBS 579.88.

15 Modifikationerne i forbindelse med spheroplastdannelsen er allerede blev beskrevet (Bianchi, M. et al., Curr. Genet. 12 (1987) 185-192). Dersom metoden med lithiumacetat blev anvendt udføres celledyrkning ved 28 °C i 50
20 ml YPD medium under omrøring og til en optisk densitet ved 600 nm (OD_{600}) mellem 0,6 og 0,8. Cellerne høstes ved centrifugering ved lav hastighed, vaskes i sterilt TE opløsning (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA), genopslæt i 3-4 ml lithiumacetatopløsning (0,1 M i TE) til opnåelse
25 af en celledensitet på ca. 2×10^8 c/ml og inkuberes dernæst 1 time ved 30 °C under moderat omrøring.

0,1 ml prøver af den fremstillede suspension af kompetente celler inkuberes ved 30 °C i 1 time i nærværelse af
30 DNA og PEG 4000 til en slutkoncentration på 35%. Efter et varmeshock på 5 minutter ved 42 °C vaskes cellerne to gange med sterilt vand, genopslættes i 0,2 ml sterilt vand og overføres til 10 ml rør. YPD medium indeholdende 0,7% agar og holdt smeltet ved 46 °C tilsættes herefter
35 (5 ml), og blandingen udhældes straks på YPD plader. Efter størkning tilsættes et yderligere dæklag bestående af 5 ml dækagar. Efter 18-24 timers inkubation ved 28 °C

spredes 0,16 ml G418 opløsning (Geneticin 50 mg/ml, GIBCO, Grand Island, N.Y.) udover pladerne, og transformanterne tælles efter yderligere 4-5 dages inkubation ved 28 °C.

5

Direkte udstrykning af cellerne på YPD + G418 plader (dvs. uden anvendelse af dækagar) bevirker tilsynecomsten af kloner af større størrelse for de transformerede *K. Lactis* celler. Imidlertid må man anvende en lavere koncentration af G418 (slutkoncentration 50 µg/ml) for at observere kolonier, der fører til selektionen af mutanter specielt resistente overfor G418 og afledt af ikke-transformerede celler. Herudover er transformationseffektiviteten mindst ti gange lavere end den effektivitet, der ses efter phenotypens udtrykkelse af resistensgenet i 18-24 timer.

15

E.4.2 Mitotisk stabilitet af HSA-udtrykkende pKD1 afledte plasmider under ikke selektive vækstbetingelser

20

Den mitotiske stabilitet af plasmider pYG19 og pYG23 måles med forskellige tidsintervaller efter vækst i ikke-selektivt medium; den bestemmes som forholdet mellem slut- og begyndelsesprocentdelen af celler, der vokser på YPD plader indeholdende 200 µg/ml G418. Som vist i fig. 28 er begge plasmider ekseptionelt stabile på trods af det høje udtrykkelsesniveau af et heterologt gen. Når transformanter af stamme MW98-8C dyrkes i et ikke-selektivt medium i 40 cellegenerationer opretholder 40-45% af cellerne disse plasmider. Plasmid pYG19 viser endog højere mitotisk stabilitet i *K. Lactis* stamme CBS683: over 80% af cellerne opretholder plasmidet efter 40 generationer af ikke-selektivt vækst.

25

30

35

E.4.3 pYG19 og pYG123 transformanter af *K. Lactis* MW98-8C:HSA udtrykkelse og sekretion

Udtrykkelles- og sekretionsniveauerne af K. Lactis MW98-8C celler indeholdende plasmiderne pYG19 (prepro-HSA) og pYG23 (Met-HSA) bestemtes med forskellige tidsintervaller efter dyrkning ved 28 °C i ikke-selektivt YPD-medium og under konstant omrøring. Disse kultursupernatante dele fås ved to efter hinanden følgende centrifugeringer (5 minutter ved 4000 omdrejninger pr. minut) i en Kontron Hermle Z-365 K centrifuge) og derefter 10 minutter ved 12000 omdrejninger pr. minut) for at fjerne eventuel kontaminering med celler. En prøve af den anden supernatante del (0,5 ml) opvarmes til 95 °C i 15 minutter i nærværelse af lige rumfang prøvepuffer indeholdende 0,125 M Tris-HCl, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol (β -ME), 4,6% natriumdodecylsulfat (SDS) og 0,4% bromphenolblåt. Dersom der ønskes en koncentration af de tilstedeværende proteiner i den supernatante del tilsættes 0,4 ml af en 100 vægt/rumfang-% trichloreddikesyreopløsning (TCA) til 8 ml af supernatanten, og proteinerne udfældes på is i 1 time. Det udfældede materiale udvindes ved centrifugering i 20 minutter ved 15000 omdrejninger pr. minut og resolubileres herefter ved opvarmning til 95 °C i 15 minutter i 0,2 ml prøvepuffer indeholdende 63 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 5% β -Me, 2,3% SDS og 0,2% bromphenolblåt.

Den intracellulære udtrykkelse af albumin detekteres under anvendelse af celleekstrakter fremstillet på følgende måde: ækvivalenten svarende til 0,25 ml af en cellepellet (vasket en gang i saltvandspuffer) genopslømmes i det samme rumfang af lysepuffer holdt på is og indeholdende 67 mM phosphat, pH 7,5 mM β -ME, 1 mM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2 μ M leupeptin og 2 μ M pepstatin A (Sigma). Efter tilsætning af 0,5 ml zirconiumkugler (0,5 mm diameter) anbragt i phosphatpuffer (67 mM, pH 7) ved 4 °C itubrydes cellerne ved 7 efter hinanden følgende 30 sekunders perioder med en celleitubryder (Biospec Mini Bead-Beater, Biospec Products) afbrudt af 2 minutters køleperioder på is. Under disse betingelser er effektiv-

teten af celleitubrydningen mere end 90% bedømt ved at tælle cellerne under et fasekonstrastmikroskop. Væskefraktionen uden zirconiumkugler overføres til et Eppendorf rør, og kuglerne vaskes tre gange med 0,2 ml lysepuffer og opsamles herefter i det samme Eppendorf rør. Ved centrifugering af røret i 15 minutter ved 4 °C og ved 12000 g opnås en opløselig proteinfraktion (supernatantdel) og en uopløselig proteinfraktion (pellet). Disse to fraktioner adskilles og optages herefter i det samme slutrumfang af en opløsning af prøvepuffer efter fortynding. Disse prøver opvarmes 15 minutter ved 95 °C og anbringes på en 8,5% SDS-polyacrylamidgel dækket med en 5% dækgel (Laemli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) og underkastes herefter en strøm på 25 mA, indtil bromphenolblåtfarven når den nederste del af gelen.

Fig. 29 viser resultaterne af et typisk forsøg, der muliggør at der kan foretages en bestemmelse af udtrykkelsen og sekretionen af albumin, der er opnået med K. Lactis stamme MW98-8C transformeret med plasmiderne pYG19 (prepro-HSA), pYG23 (Met-HSA) og pYG25 (vektor uden en udtrykkelseskassette) efter dyrkning i 50 ml YPD medium uden G418 ved 28 °C i 68 timer. Hver prøve svarer til 100 µl af den oprindelige kultur og muliggør at de opløselige fraktioner, uopløselige fraktioner og de dyrkningssupernatante dele kan sammenlignes efter vandring i 8,5% polyacrylamidgel og Coomassie Blåt farvning. Et proteinbånd, der vandrer sammen med kommercielt humant albumin (Sigma) tjener som en molekylvægtsreference og afsløres i prøverne, der stammer fra cellerne transformeret med plasmiderne pYG19 eller pYG33, men ikke med cellerne indeholdende vektor pYG25, der ikke indeholder HSA genet. Det skal bemærkes, at medens bogstaveligt talt alt albuminet udtrykt af pYG19 (prepro-HSA) eksporteres til kulturens supernatante del, forefindes al albuminet frembragt under anvendelse af plasmid pYG23 (Met-HSA) i den uopløselige cytoplasmiske proteinfraktion. Herudover vi-

ser resultaterne i fig. 29, at albumin secerneret af celler indeholdende plasmid pYG19 er det eneste tilstedeværende ekstracellulære protein i signifikante mængder. I den supernatante del af en rystekolbekultur af MW98-8C transformeret med plasmid pYG19 og dyrket under passende betingelser (se afsnit E.4.6) kan albuminkoncentrationen nå 150 mg HSA/liter.

E.4.4 Immunologisk detektion af albumin ved fremgang af K. Lactis

Identiteten af gærproteinerne, der vandrer sammen med albuminstandard, kan undersøges ved immunologisk detektion. Til dette formål aftrykkes en polyacrylamidgel på et nitrocellulosefilter (Schleicher and Schuell, 0,45 μ m) under anvendelse af et halvtørt aftryksapparat (Biometra) i en overførselspuffer indeholdende 25 mM Tris base, 150 mM glycine og 10% methanol. Aftrykstiden er 30 minutter under anvendelse af en strøm på omtrent 0,85 mA/cm² genoverflade. Efter overførsel inkuberes filteret tre gange 3 minutter med 50 ml puffer A (5% skummetmælkpulver, 0,2% Tween 20 i PBS puffer [127 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄]), efterfulgt af inkubation i 30 minutter i 40 ml puffer A indeholdende kaninpolyklonale antistoffer rettet mod HSA og fortyndet 1:1000. Efter tre afvaskninger af filteret med puffer A tilsættes et andet, biotinylet antistof, der genkender kaninantistoffer, Vectastain ABC Immuno Peroxidase Kit, Vector Laboratories), på basis af en dråbe pr. 50 ml puffer A. Efter inkubering af filteret i 30 minutter vaskes filteret tre gange med puffer B (0,2% Tween 20 i PBS) og inkuberes herefter i nærværelse af et avidin DH/biotinylet peroxidase H kompleks. Det avidin/biotinylede peroxidasekompleks fremstilles lige inden brugen ved at fortynde 1 dråbe af hver af reagenserne A og B fra kittet i 5 ml puffer B efter inkubation ved 23 °C i 30 minutter. Filteret inkuberes i en 1:10 fortynding af komplekset i puffer B (ialt 50 ml) i 30

minutter. Filteret renses atter med puffer B i tre 5
minutters perioder og fremkalder 2-3 minutter i 10 ml af
en opløsning indeholdende 0,02% H_2O_2 og 10 ml af en
opløsning indeholdende 1 mg/ml diaminobenzidin og 0,4
5 mg/ $NiCl_2$ i 0,1 M Tris-HCl pH 7,4. Fig. 30 viser, at K.
Lactis MW98-8C udtrykker (pYG23) og secernerer (pYG19) et
protein, der genkendes af anti-HSA polyklonale antistof-
fer. Dette antigene materiale er specifikt forbundet med
tilstedeværelsen af en albumin-udtrykkende kassette, da
10 det ikke afsløres i celleekstrakter eller dyrkningssuper-
natanter fra gær transformeret med vektoren uden en ud-
trykkelseskassette.

E.4.5 Kinetikken ved HSA sekretion

15 Som angivet i fig. 31A foregår sekretionen af albumin med
relativ langsom kinetik i en Erlenmeyer. Maksimumudskil-
lelsesniveauerne synes at foregå efter 70-100 timers
inkubation af en kultur oprindeligt inoculeret med 10^5
20 celler/ml (fig. 31B). Der kan ikke afsløres nogen signi-
fikante stigninger eller fald mellem 100 og 240 timers
dyrkning, hvilket antyder en god stabilitet HSA under
disse vækst- og temperaturbetingelser. Da der ikke er
nogen akkumulering af proteolytisk nedbrydeligt materiale
25 under denne periode, kan det konkluderes, at intet
ekstracellulært protease, der kunne nedbryde det udskilte
albumin, er tilstede.

En grafisk afbildning af kinetikken ved udskillelse (A)
30 såvel som vækstkurven af stamme MW98-8C transformeret med
plasmid pYG19 (B) er angivet i fig. 32; disse resultater
viser, at udskillelsen af albumin fortsætter efter at
cellerne har nået den stationære væksthase. Denne obser-
vation er i overensstemmelse med tidligere observationer
35 i forbindelse med andre udtrykkelsessystemer i gær
(Tschopp, J.F. et al., Bio/Technology 5 (1987) 1305-
1308).

E.4.6 Effektiviteten af HSA sekretion med plasmiderne pYG44, pYG51, pYG404 og pYG58

Effektiviteten af HSA sekretionen er blevet undersøgt
5 under kontrol af PGK promotoren fra *S. cerevisiae* (plasmiderne pYG19, fig. 29-32), en PGK/LAC4 hybrid promotor med optimeret ATG kontekst (plasmiderne pYG44-5 og pYG44-7; fig. 33), PH05 promotoren fra *S. cerevisiae* (plasmid pYG51; fig. 34 A) og LAC4 promotoren af *K. lactis* (plasmid pYG404; fig. 35). Herudover er sekretionssignalsekvensen (præ-region) af dræbertoxinet af *K. lactis* blevet koblet i ramme til det pro-HSA strukturelle gen (plasmid pYG58; fig. 34 B) og sekretionseffektiviteten af funktionsproteinet sammenlignet med effektiviteten af det
10 naturlige præpro-HSA (med hensyn til detaljer af plasmidkonstruktioner se afsnit 3). Resultaterne opnåede med disse konstruktioner er opsummeret nedenfor:

niveauet af HSA serneret ud i dyrkningsmediet, hvor det
20 udtrykkes fra PGK/LAC4 hybridpromotoren tilstede i plasmid pYG44, øges to til tre fold, dersom celler dyrkes i glucoseholdigt medium, hvortil lactose er sat mellem midt-log og den tidlige stationære vækstfase (fig. 33). Denne virkning ses ikke, dersom tilsætningen af lactose erstattes med en tilsvarende mængde glucose (resultater ikke angivet). Dersom celler dyrkes i medier indeholdende lactose som eneste carbonkilder, er niveauerne for secereret HSA ikke højere end de, der opnås med glucoseholdige medier (fig. 33 B). Den lactoseformidlede stigning
25 af HSA udskillelse observeret efter "induktion" af celler efter en første dyrkning i glucose er imidlertid ikke afhængig af tilstedeværelsen af UAS elementet fra LAC4 promotoren af *K. lactis*. Denne lactoseformidlede stigning findes ligeledes, dersom HSA sekretion er dirigeret af
30 PGK promotoren (fig. 33 A, B for stamme MW98-8C transformanter; fig. 35 for CBS2359 transformanter) eller PH05 promotoren af *S. cerevisiae* (resultater ikke vist).

HSA sekretion under kontrol af LAC4 promotoren af *K. lactis* bevirker lavere HSA niveauer end de, der opnås med PGK promotoren af *S. cerevisiae* (fig. 35). På den anden side er LAC4 dirigeret HSA udtrykkelse let reguleret; intet udskilt HSA kunne afsløres i kulturens supernatante dele fra CBS2359 transformanter, dersom glucose var den eneste tilgængelige carbonkilde (fig. 35).

Dersom celler dyrkes i komplet medium (YPD) er effektiviteten af PHO5 dirigeret HSA sekretion overraskende kun lidt under den, der observeres med konstruktioner indeholdende den glycolytiske PGK promotro (fig. 34 A).

Erstatning af HSA sekretionssignalet med præ-regionen af dræbertoxinet af *K. lactis* har heller ingen indflydelse på kinetiken eller effektiviteten af HSA sekretion (fig. 34).

E.4.7 Effektivitet af HSA sekretion med integrerede udtrykkelseskassetter

PGK-præproHSA udtrykkelseskassetten, der findes i plasmid pYG19, er blevet integreret i det *K. lactis* chromosomale DNA blev hjælp af entrinsgen i afbrydelsesmetoden beskrevet af Rothstein, RJ. (Methods in Enzymol. 101 (1983) 202-211; med hensyn til eksperimentelle detaljer se afsnit E.3.7). Som angivet i fig. 36 er niveauerne af HSA secerneret ud i dyrkningsmediet af de integrante stammer (bane 2-7) mindst 20 gange under de, der opnås med PKD1 derivatet pYG19 (bane 1). HSA sekretion var fundamental den samme hvad enten integration af udtrykkelseskassetten forekom på RAG2 stedet eller noget andet sted i *K. lactis*genomet (fig. 36). Yderligere havde orienteringen af udtrykkelseskassetten i forhold til den URA3 selekterbare markør ikke nogen signifikant indflydelse på HSA sekretionsniveauerne (fig. 36, bane 2 og 3). Et tofoldsstigning af udskilt HSA blev inidlertid observeret med trans-

formanter, hvor to udtrykkelseskassetter var blevet integreret i genomet (fig. 36, bane 5). Alt i alt synes effektiviteten af HSA sekretion at være direkte forbundet med antallet af kopier af det strukturelle gen der findes i en transformeret gærcelle.

E.4.8 Sekretion af HSA i en række species og stammer af slægten *Kluyveromyces*

Plasmiderne pYG19, pYG221B eller pKan707 er blevet anvendt til at transformere følgende stammer af *Kluyveromyces*: ATCC16045 (*K. marxianus* var. *bulgaricus*), ATCC24178 (*K. wickerhamii*), ATCC12424 (*K. marxianus* var. *marxianus*), ATCC56500 (*K. waltii*), ATCC36906 (*K. marxianus* var. *drosephilarum*), CBS4574 (*K. marxianus* var. *lactis*), CB683 (*K. marxianus* var. *lactis*), and MW98-8C (*K. marxianus* var. *lactis*). Målelige niveauer af secernerede HSA blev opnået med alle undersøgte transformanter, skønt man observerede store variationer mellem de forskellige stammer. De højeste niveauer blev fundet under anvendelse af transformanter af stamme MW98-8C (CBS579.88) og CBS683, det laveste niveau blev observeret med stamme ATCC16045, hvor ikke-nedbrudt HSA kun kunne detekteres under anvendelse af immunologiske metoder (resultater ikke angivet). Plasmider pYG19 og pYG221B formidlede lignende niveauer af udskilt HSA i alle undersøgte stammer.

EKSEMPEL 5

30 Rensning af HSA uskilt i vækstmediet

I et typisk oprensningsforsøg blev stamme MW9808C transformeret med plasmid pYG19 dyrket i YPD medium i 72 timer under de allerede beskrevne standardbetingelser. En supernatant del fra kulturen (0,5 l) befries fra alt cellulær forurening ved centrifugering og inkuberes 15 minutter ved 4 °C i i nærværelse af 60% ethanol (rum-

fang/rumfang). Bundfaldet udvindes af centrifugering, genopslættes i 10 ml opløsning bestående af 50 mM Tris-HCl pH 8,0 og anbringes derefter på en Trisacryl blå søjle (I.B.F., Frankrig). Det humane albumin elueres fra denne søjle med 3M NaCl opløsning. Efter dialyse af fraktionerne, der indeholder HSA, overfor 50 mM Tris-HCl renses disse fraktioner på en MONO Q søjle (Pharmacia), og elueres ved en NaCl koncentration på 0,25 M. Til slut muliggør chromatografi på Superose 12 (Pharmacia) at HSA kan opnås med mere end 99% renhed bedømt ved sølvfarvning af SDS polyacrylamidgeler.

EKSEMPEL 6

15 Karakterisering af secereret og rensat albumin

Mangel på en undersøgelse der muliggør at de biologiske egenskaber ved albumin kan måles in vitro gør det ikke let at undersøge kvaliteten af det rekombinante albumin. Af denne grund karakteriseres albuminet udskilt af k. lactis derfor efter rensning ved hjælp af adskillige fysiske, kemiske og immunologiske undersøgelsesmetoder. Disse undersøgelser viser, at det rekombinante albumin udskilles af K. lactis i moden form og i dets native konfiguration; det kan ikke skælnes fra humant serumalbumin ekstraheret fra plasma med hensyn til alle disse kriterier.

E.6.1 PAGE-SDS: Coomassieblåt og sølvfarvning

30 Elektrophorese udføres på en SDS polyacrylamidgel (7,5%) (fig. 38 C) som beskrevet ovenfor eller ved hjælp af "Phast gel" systemet (Pharmacia, fig. 38 A). Forskellige mængder rekombinant albumin blev sammenlignet med et kommercielt præparat af standardalbumin (Sigma) ekstraheret fra humant plasma. Farvning af gelen med Coomassieblåt (fig. 38 C) eller med sølvsalte (fig. 38 A) viser

den fuldstændige homogenisitet af albuminprøverne fra gær.

E.6.2 Isoelektrofokucering

5

Isoelektrofokucering udføres mellem pH 4,5 og 6,0 (Phast gel, Pharmacia, fig. 38 B), og mellem pH 4,0 og 7,0 (Immobiline, LKB). De isoelektriske punkt af det rekombinante HSA er identisk med det referencehumane HSA (pI = 4,8).

10

E.6.3 Nativ PAGE og immunoaftrykning

Elektrophorese af det rekombinante HSA i en ikke-denaturerende polyacrylamid gel (10%), efterfulgt af aftryk på et nitrocellulosefilter og immunodetektion under betingelserne beskrevet i afsnit E.4.4 afslører en samtidig vandring med standardalbuminen ekstraheret fra humant plasma. Dette antyder strækt, at korrekt modning af det rekombinante præpro-HSA foregår under udskillelesesprocessen i K. lactis. Der kan ikke afsløres nogen forurering med ikke-modnet HSA, hvilket antyder, at spaltning af signalsekvensen og af pro-sekvensen af HSA foregår effektivt i denne gær.

15

20

25

E.6.4 Molekylar siechromatografi

Molekylar siechromatografi udføres med Superose 12 (Pharmacia). Strømningshastigheden af elueringspufferen (50 mM Tris-HCl pH 8,0) opretholdes med 1 ml/min. Koncentrationerne af rekombinant albumin og referencealbumin er henholdsvis 0,4 og 1 mg/ml. Elueringen af albumin detekteres ved at måle absorbansen ved 280 nm. I begge tilfælde er elueringsrumfanget identisk (11,5 ml).

30

35

E.6.5 Anionbytterchromatografi

Det rekombinante albumin elueres fra en Mone Q HR 5/5 søjle (Pharmacia) med en koncentration på 0,31 M NaCl som er referencealbuminet stammende fra humant plasma. Fig. 39 viser de opnåede chromatografiske profiler for injektioner af 100 µl rekombinant HSA (0,4 mg/ml) og af reference HSA (0,5 mg/ml) under anvendelse af en søjle bragt i ligevægt med 50 mM Tris-HCl pH 8,0 og en konstant strømningshastighed på 1 ml/min.

E.6.6 Omvendt-fasechromatografi

Opførslen af gæralbuminet i omvendt-fase analyseret på en nucleosil (C4) søjle med pufre A (vand indeholdende 0,1% trifluoreddikesyre (TFA)) og B (acetonitril indeholdende 0,1% TFA). Fig. 40 viser elueringen med en gradient på 20 til 80% B i A af gæralbumin, der udviser den samme tilbageholdelsestid som referencealbuminet.

E.6.7 Aminosyresammensætningen

Aminosyresammensætningen af det rekombinante HSA bestemtes ved omvendt fasechromatografi efter sur hydrolyse (6 N HCl) og phenylisothiocyanylderivatisering. De opnåede resultater ved denne metode viser klart en identisk sammensætning svarende til sammensætningen af referencealbuminet stammende fra humant plasma.

E.6.8 N-endestillet sekvens

Anvendelsen af et automatiseret apparat til Edman nedbrydning (Applies Biosystems) viser, at den N-endestillede sekvens af HSA udskilt af K. lactis er Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly.

Bestemmelsen af denne konsekvens bekræfter således resultaterne og opnået fra de native polyacrylamidgelelektrophoreseforsøg og viser den korrekte og fuldstændige modning af albuminet udskilt af *K. lactis* gær.

5

E.6.9 Tryptophanfluorescens

Efter excitation ved 295 nm viser fluorescensemissionen af det enkelte tryptophan den samme profil for både re-

10 kombinante og plasmaalbuminer (maksimum ved 337 nm), hvilket indikerer et identisk hydrofobt miljø rundt om denne aminosyre (fig. 41).

E.6.10 Termisk stabilitet

15

Referencealbuminet (Sigma) og albuminet udskilt af gæren havde identiske stabilitetsegenskaber ved 75 °C (fig. 42), hvilket antyder, at bindingerne, der stabiliserer proteinstrukturen (hydrofobe interaktioner og disulfid-

20 bindinger) er identiske i begge tilfælde.

E.6.11 Reaktivitet overfor monoklonerede antistoffer

Antigeniciteten af det rekombinante albumin blev undersøgt med forskellige monoklonale antistoffer rettet mod

25 humant albumin. Fig. 43 viser deres specificitet: Antistofferne HA10, HA11 og HA13 svarer til apitoperne, hvis bevarelse kræver integritet af hele molekylet. Antistofferne HA21, HA6, HA4, HA3, HA8 og HA1 svarer til epitoperne beliggende langs peptidkæden fra den N-endestillede

30 del til den C-endestillede del (Doyen, N. et al., Mol. Immun. 22 (1985) 1-10; Lapresle, C., Anal. Biochem. 174 (1988) 308-312).

35 Den anvendte undersøgelsesmetode er en ELISA hæmningsundersøgelsesmetode. De forskellige antistoffer absorberes på polystyrenplader, og en bindingskurve for albumin

mærket med alkaliskphosphatase etableres for hver antistof. Mætningskurvene for hvert antistof udviser en S-form, og mængden er mærket albumin svarende til 50% binding blev udvalgt til at undersøge hæmningen af hvert antistof.

Hæmningen blev udført med prøven af rekombinant og sammenlignet med prøven opnået med en prøve af plasmaet albumin (Sigma). Fig. 44 viser, at for de ni undersøgte antistoffer er det rekombinante albumin så hæmmende som det native albumin. Der må tages hensyn til den ekstreme følsomhed ved denne undersøgelse er de observerede forskelle sandsynligvis ikke signifikante.

En prøve af stamme MW98-8C er deponeret i Centraalbureau voor Schimmelkulturen (CBS) i Baarn i Holland under Budapest-traktaten som CBS nr. 579.88.

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af human serum albumin (HSA), k e n d e t e g n e t ved, at en gær af slægten Kluyveromyces transformeret med en udtrykkelsesplasmid omfattende:
 - 5 - funktionelle gener A, B og C af plasmid pKD1,
 - de omvendte gentagelser af plasmid pKD1,
 - stabilitetsstedet af plasmid pKD1,
 - originen for replikation af pKD1 og en udtrykkelseskas-
 - 10 sette indeholdende et ikke-gær DNA, der koder det strukturelle gen for human serum albumin under kontrollen af sekvenser, der muliggør dets udtrykkelse i gæren,
 - en selekterbar markør for den transformerede gær,
 - og eventuelt en origin for replikation og en selekterbar
 - 15 markør for Escherichia coli,
 - dyrkes i et vækstmedium.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at udtrykkelseskassetten og den selekterbare markør er indført i
- 20 EcoRI stedet af pKD1.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at udtrykkelseskassetten og den selekterbare markør er indført i en region på 197 nucleotider defineret af SacI og
- 25 MstII i stederne pKD1, eller SphI stedet af pKD1.
4. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at sekvenserne, der muliggør udtrykkelsen af det strukturelle gen, er valgt blandt promotorer stammende fra
- 30 gener af gær af slægten Saccharomyces eller Kluyveromyces.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved at promotorerne stammer fra de glycolytiske gener af gær af slægten Saccharomyces eller Kluyveromyces.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at sekvenserne, der muliggør udtrykkelsen af det strukturelle gen, er valgt blandt gener, der koder phosphorglyceratkinase (PGK), glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GPD), enolaser
5 (ENO), alkoholdehydrogenaser (ADH), lactase (LAC4) eller sur phosphatase (PHO5).

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at sekvenserne, der muliggør udtrykkelsen af det strukturelle
10 gen, er valgt blandt generne, der koder phosphorglyceratkinase (PGK) eller sur phosphatase (PHO5).

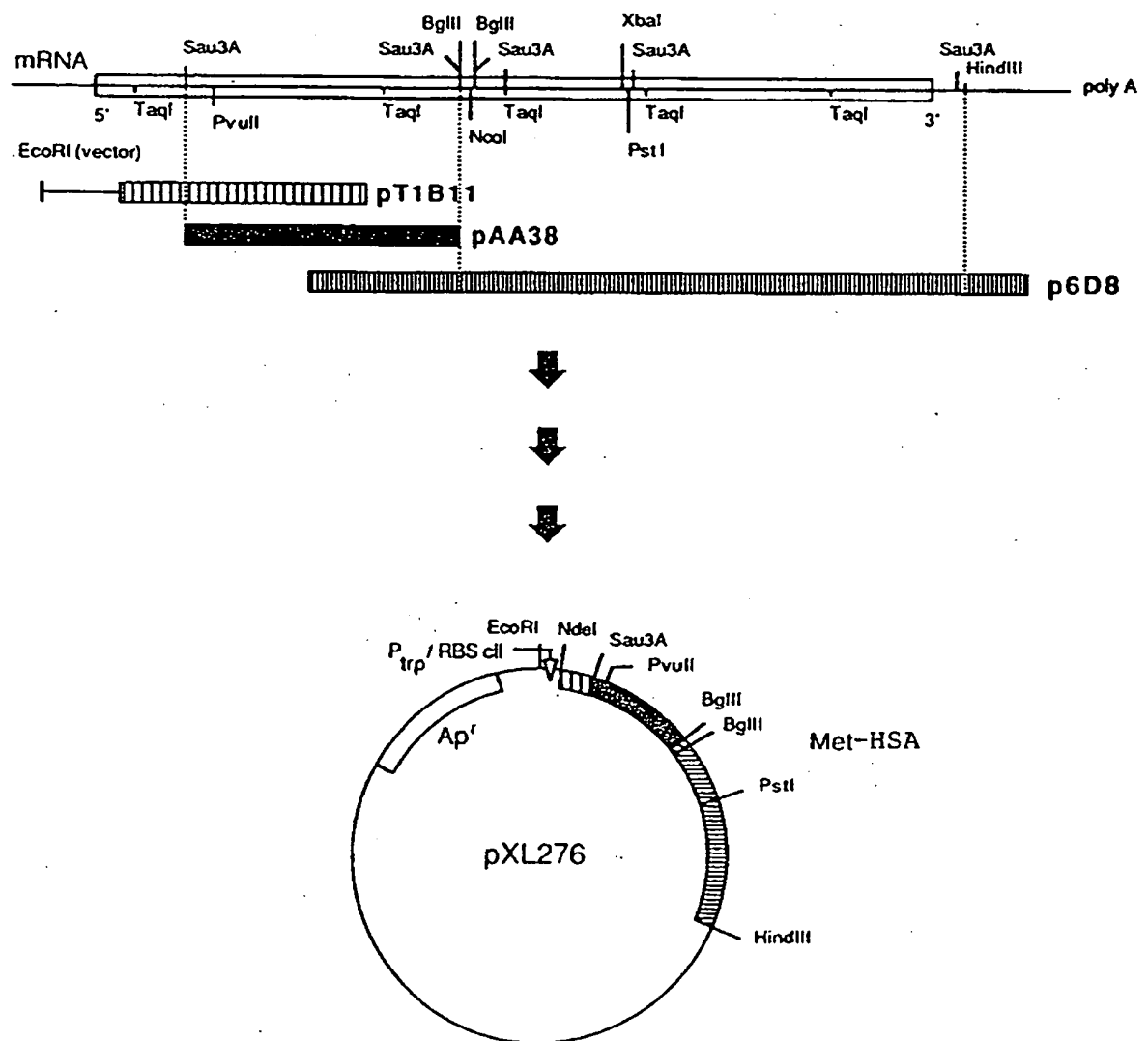
8. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-7, k e n d e -
t e g n e t ved, at sekvenserne, der koder proteinet, forud
15 har en protein-eksportsekvens, der er valgt blandt den naturlige N-endestillede leder af proteinet.

9. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-8, k e n d e -
t e g n e t ved, at sekvensen, der koder proteinet, forud har
20 en eksportsekvens, der er forskellig fra den naturlige sekvens.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at sekvensen, der koder eksportsignalet af human serum albumin,
25 er sekvensen opnået fra gærgener, der koder alfa-pheromonet eller dræber toxinet.

11. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-10, k e n -
d e t e g n e t ved, at sekvensen, der muliggør udskillelse af
30 human serum albumin, er den prepro-naturlige endestillede leder af albumin.

12. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-11, k e n -
d e t e g n e t ved, at de selekterbare markører for den
transformerede gær er valgt blandt gener, der giver resistens
over for antibiotika eller overfor kobberioner.
- 5
13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved,
at den selekterbare sekvens giver resistens over for G418,
- 10
14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved at
den selekterbare sekvens er en fusion mellem ORF1 promotoren
af det lineære plasmid kl af *K. lactis* og aminoglycosid-
phosphotransferasen af transposonen Tn903.
- 15
15. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-14, k e n -
d e t e g n e t ved, at den selekterbare markør er et gen der
komplementerer auxotrophi.
- 20
16. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-15, k e n -
d e t e g n e t ved, at stammen er af specien *K. marxianus*, *K.*
wicherhamii, *K. waltii*.
- 25
17. Fremgangsmåde ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved,
at stammen er af specien *K. bulgaricus*, *K. marxianus* var. *dro-*
sophilarum, *K. marxianus* var. *marxianus* og *K. marxianus* var.
lactis.
- 30
18. Fremgangsmåde ifølge vilkårlige af kravene 1-17, k e n -
d e t e g n e t ved, at gæren dyrkes i glucoseholdig medium,
hvortil lactose er sat mellem mid-log og den tidlige stationæ-
re vækstfase.

FIG. 1

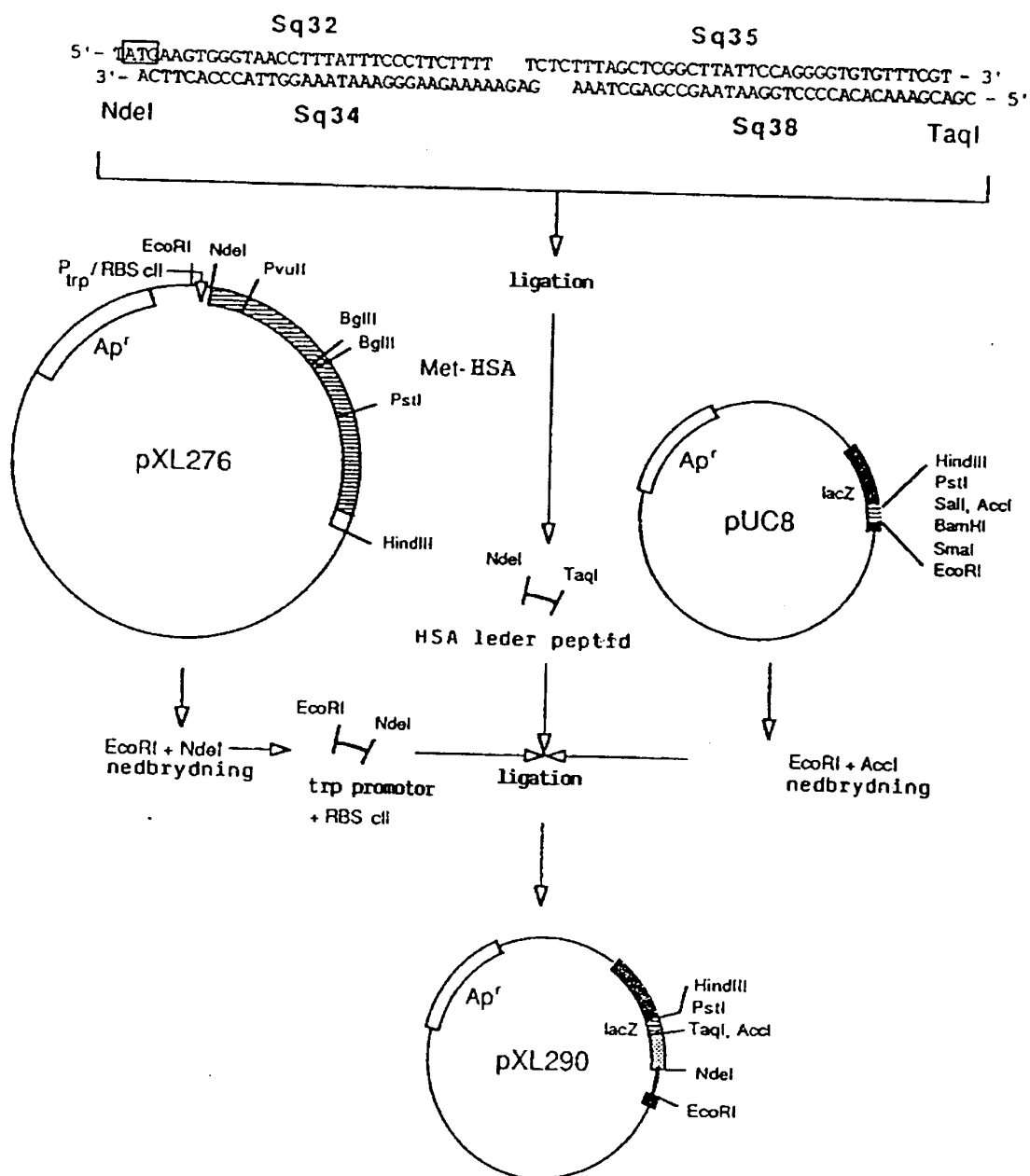
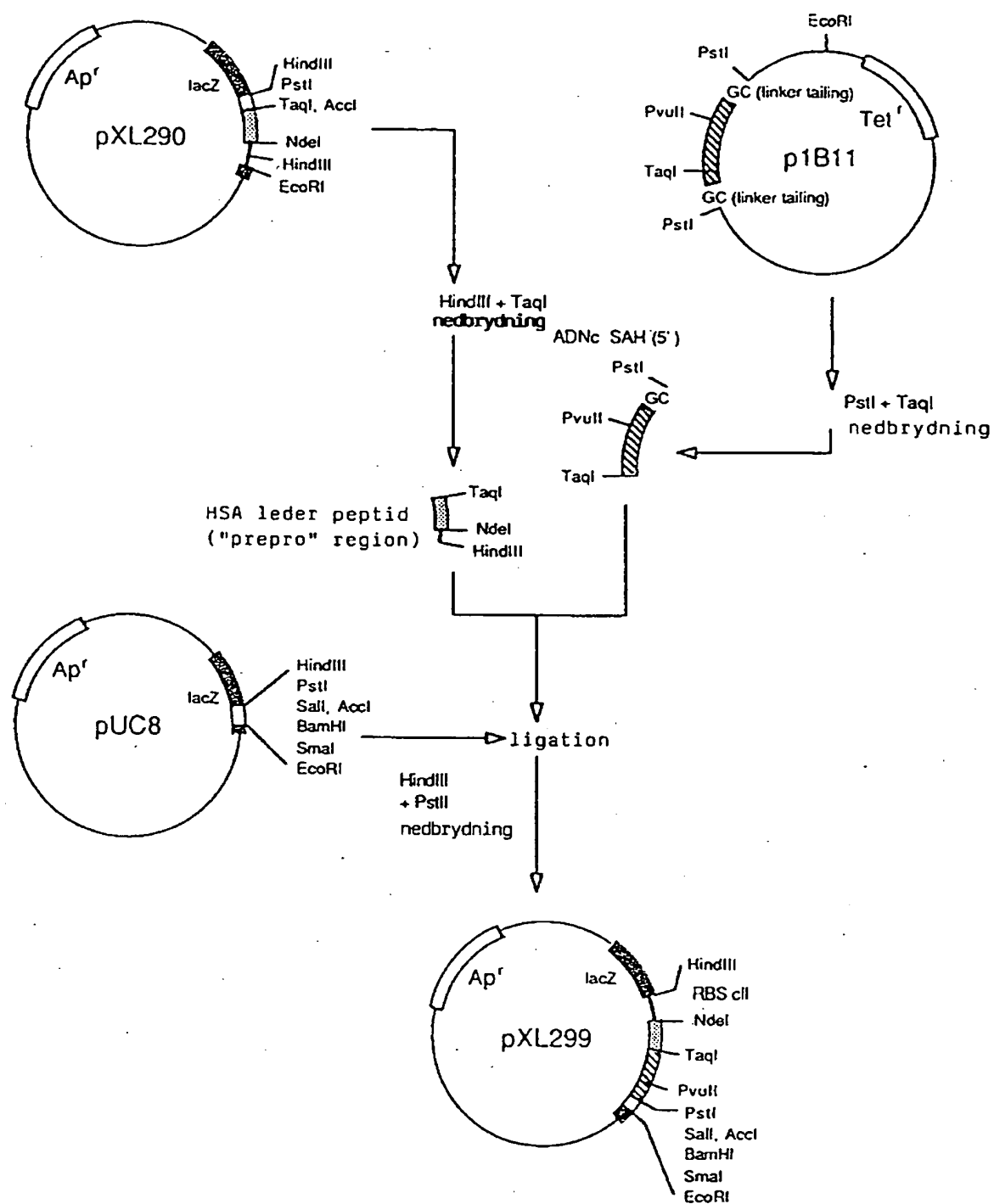


FIG. 2

FIG. 3

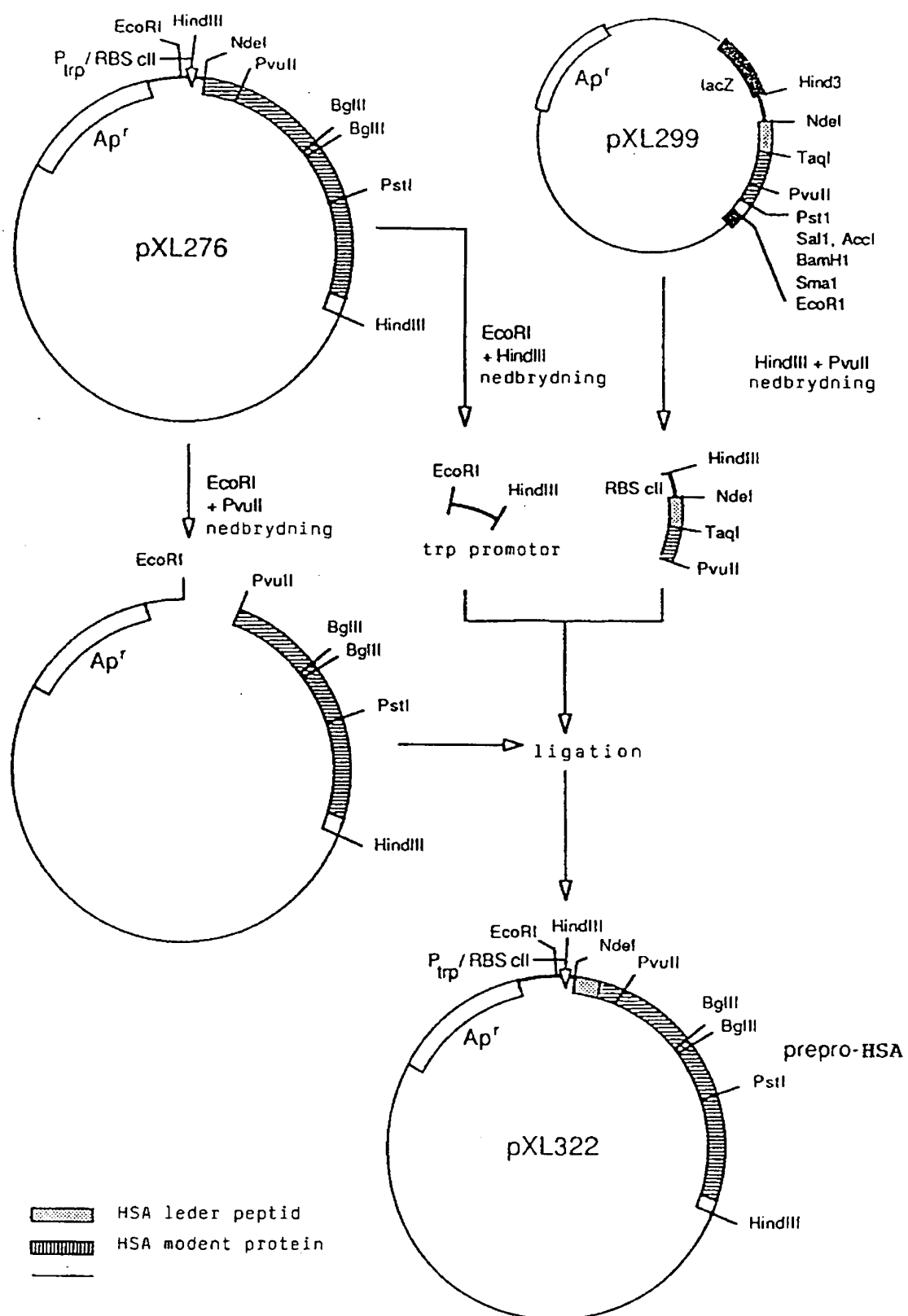


FIG. 4

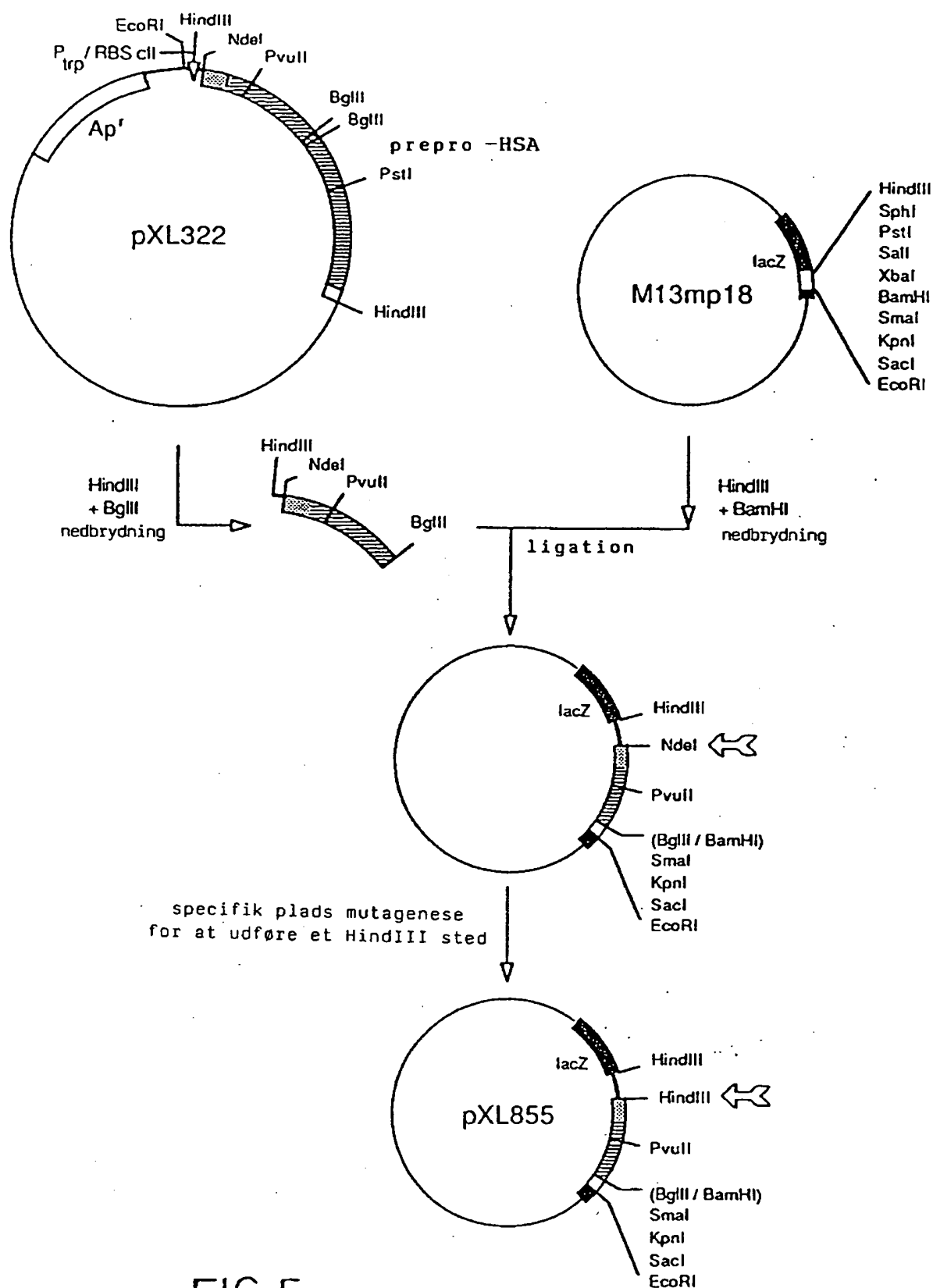


FIG. 5

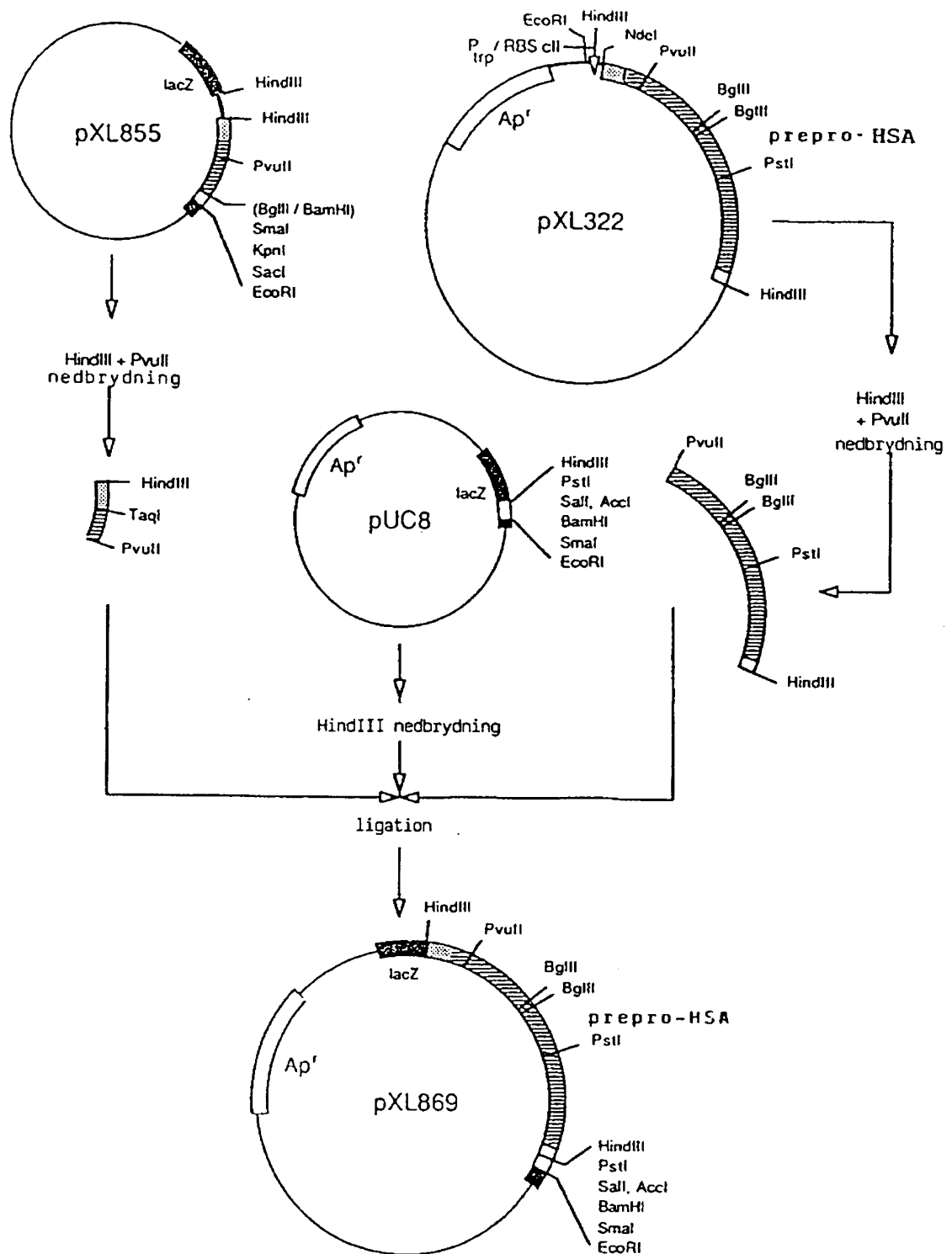


FIG. 6

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg
AAGCTTATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCAGGGGTGTGTTTCGT
1 11 21 31 41 51 61 71

Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
CGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGTTGTTG
76 86 96 106 116 126 136 146

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
ATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTT
151 161 171 181 191 201 211 221

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
GCAAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTGGAGACAAATTA
226 236 246 256 266 276 286 296

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
TGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAAT
301 311 321 331 341 351 361 371

Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
GAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAATCCAAATCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGC
376 386 396 406 416 426 436 446

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
ACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAGACATCCTTACTTT
451 461 471 481 491 501 511 521

Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
TATGCCCCGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAA
526 536 546 556 566 576 586 596

Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
GCAGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAG
601 611 621 631 641 651 661 671

Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
TGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCTC
676 686 696 706 716 726 736 746

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
AAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGAT
751 761 771 781 791 801 811 821

Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys
CTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAA
826 836 846 856 866 876 886 896

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro
CTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCT
901 911 921 931 941 951 961 971

Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp
GCTGACTTGCTTCATTAGCGGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAACTATGCTGAGGCAAGGAT
976 986 996 1006 1016 1026 1036 1046

Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu
GTCTTCTTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGAGACTT
1051 1061 1071 1081 1091 1101 1111 1121

FIG. 7

AlaLysThrTyrGluThrThrLeuGluLysCysCysAlaAlaAlaAspProHisGluCysTyrAlaLysValPhe
 GCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTTC
 1126 1136 1146 1156 1166 1176 1186 1196

AspGluPheLysProLeuValGluGluProGlnAsnLeuIleLysGlnAsnCysGluLeuPheGluGlnLeuGly
 GATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGA
 1201 1211 1221 1231 1241 1251 1261 1271

GluTyrLysPheGlnAsnAlaLeuLeuValArgTyrThrLysLysValProGlnValSerThrProThrLeuVal
 GAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAGTTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGCTCAACTCCAACCTTGTGA
 1276 1286 1296 1306 1316 1326 1336 1346

GluValSerArgAsnLeuGlyLysValGlySerLysCysCysLysHisProGluAlaLysArgMetProCysAla
 GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAAATGCCCTGTGCA
 1351 1361 1371 1381 1391 1401 1411 1421

GluAspTyrLeuSerValValLeuAsnGlnLeuCysValLeuHisGluLysThrProValSerAspArgValThr
 GAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGTTATGTGTGTCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACC
 1426 1436 1446 1456 1466 1476 1486 1496

LysCysCysThrGluSerLeuValAsnArgArgProCysPheSerAlaLeuGluValAspGluThrTyrValPro
 AAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCC
 1501 1511 1521 1531 1541 1551 1561 1571

LysGluPheAsnAlaGluThrPheThrPheHisAlaAspIleCysThrLeuSerGluLysGluArgGlnIleLys
 AAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAG
 1576 1586 1596 1606 1616 1626 1636 1646

LysGlnThrAlaLeuValGluLeuValLysHisLysProLysAlaThrLysGluGlnLeuLysAlaValMetAsp
 AAACAACTGCACTTGTGTGAGCTTGTGAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGAT
 1651 1661 1671 1681 1691 1701 1711 1721

AspPheAlaAlaPheValGluLysCysCysLysAlaAspAspLysGluThrCysPheAlaGluGluGlyLysLys
 GATTTTCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAAACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAA
 1726 1736 1746 1756 1766 1776 1786 1796

LeuValAlaAlaSerGlnAlaAlaLeuGlyLeu***
 CTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGCTTATAACATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAA
 1801 1811 1821 1831 1841 1851 1861 1871

GAGAAAGAAAATGAAGATCAAAAGCTT
 1876 1886 1896

FIG-7

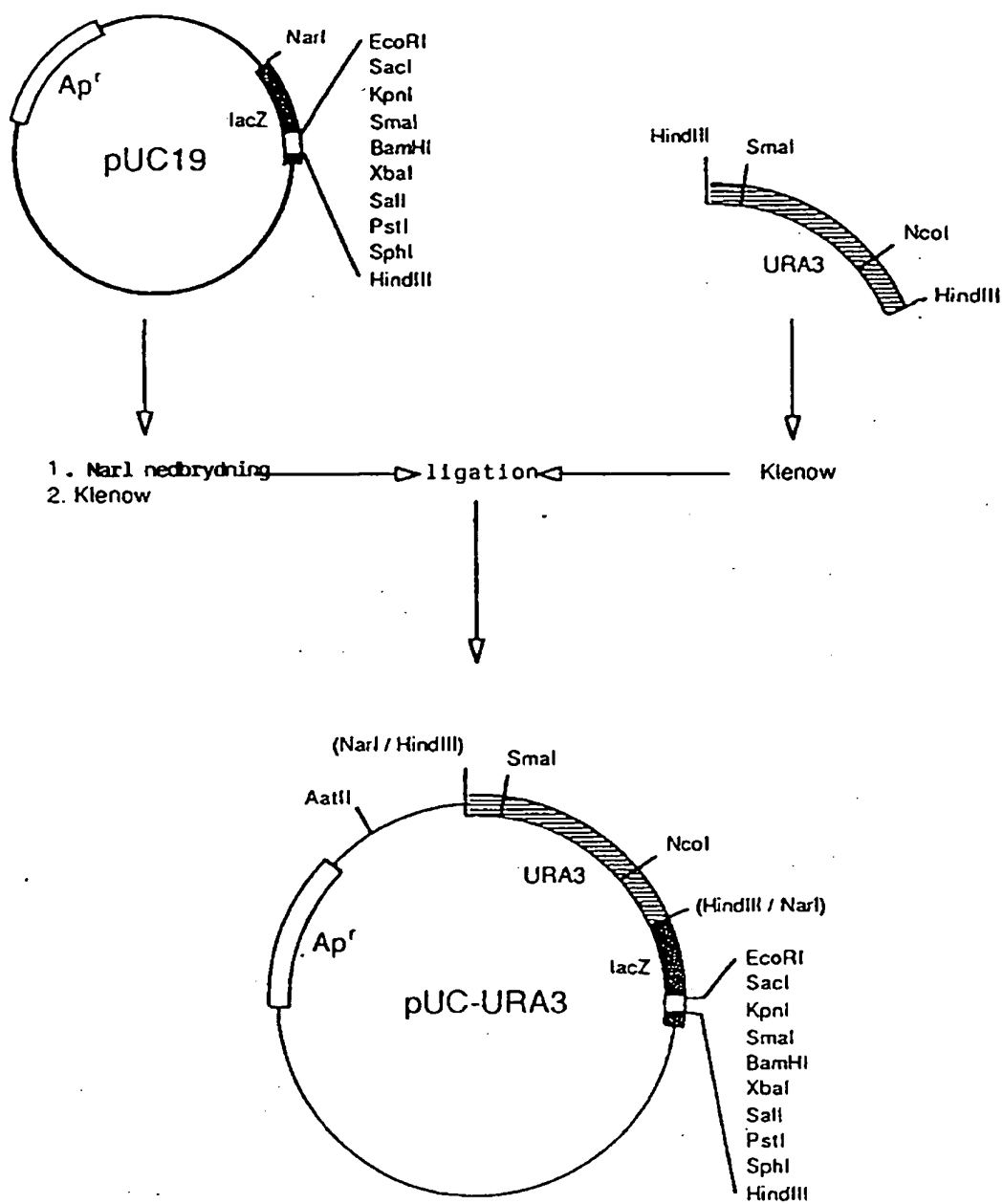
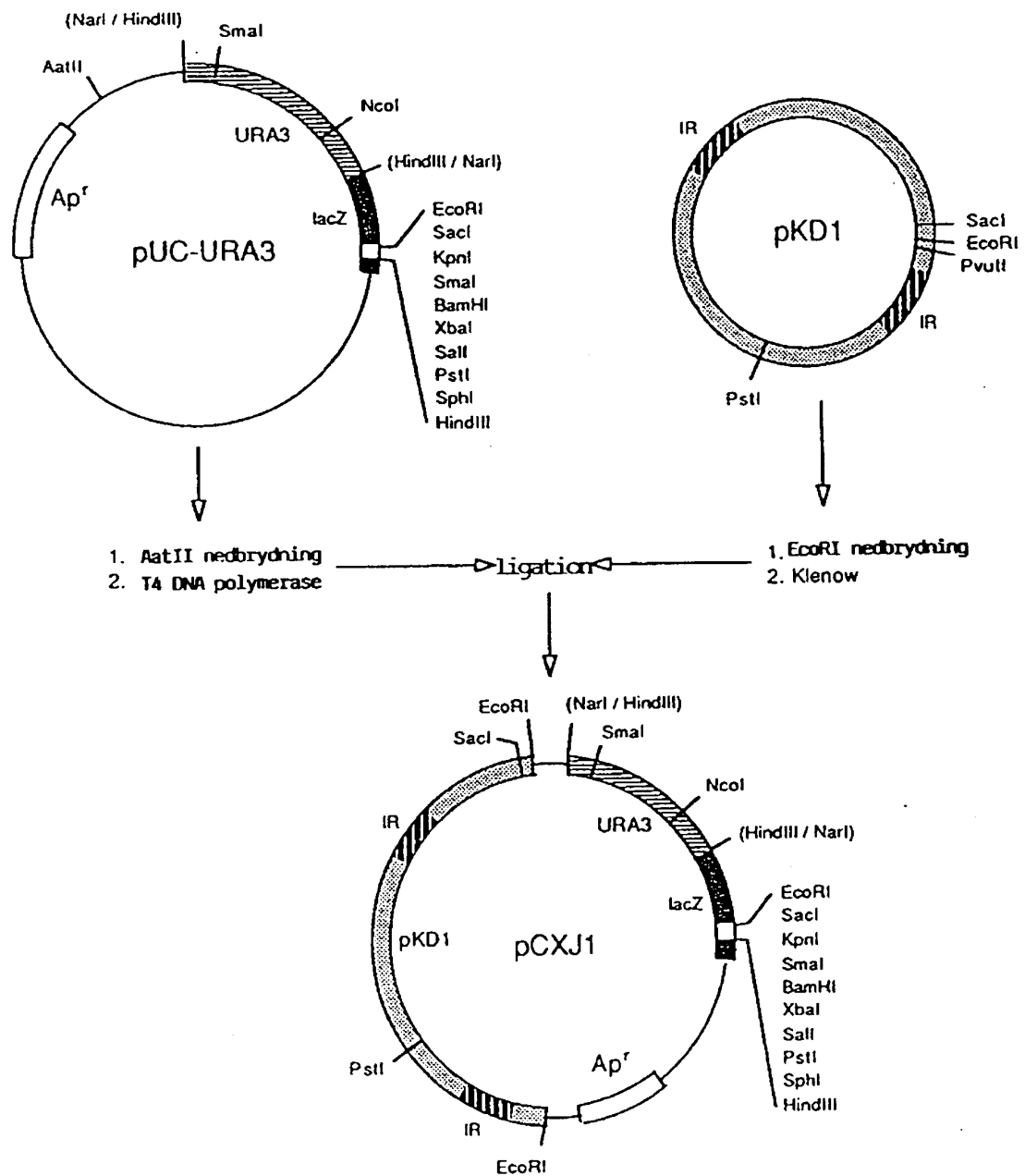
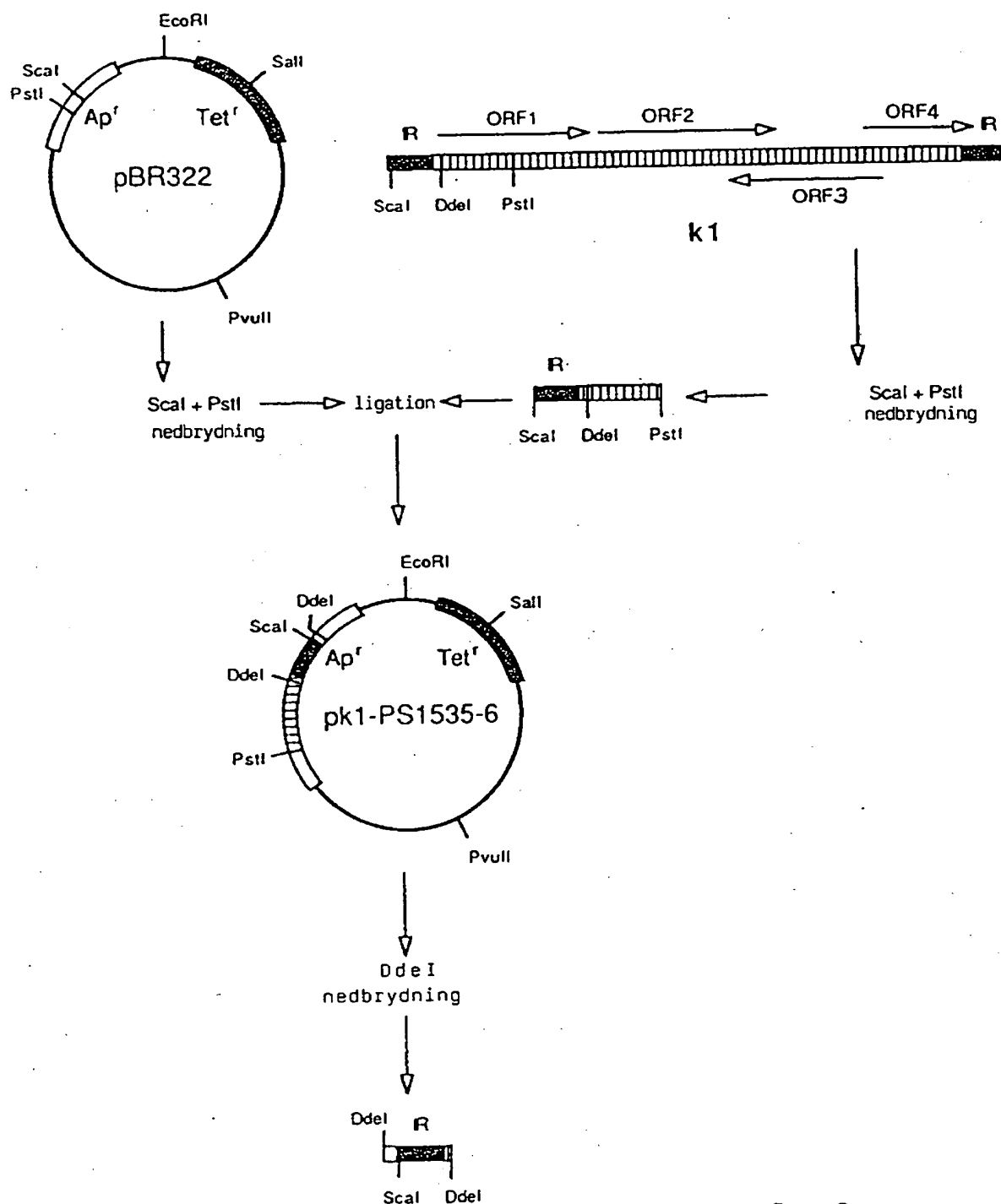


FIG. 8

FIG. 9

FIG. 10

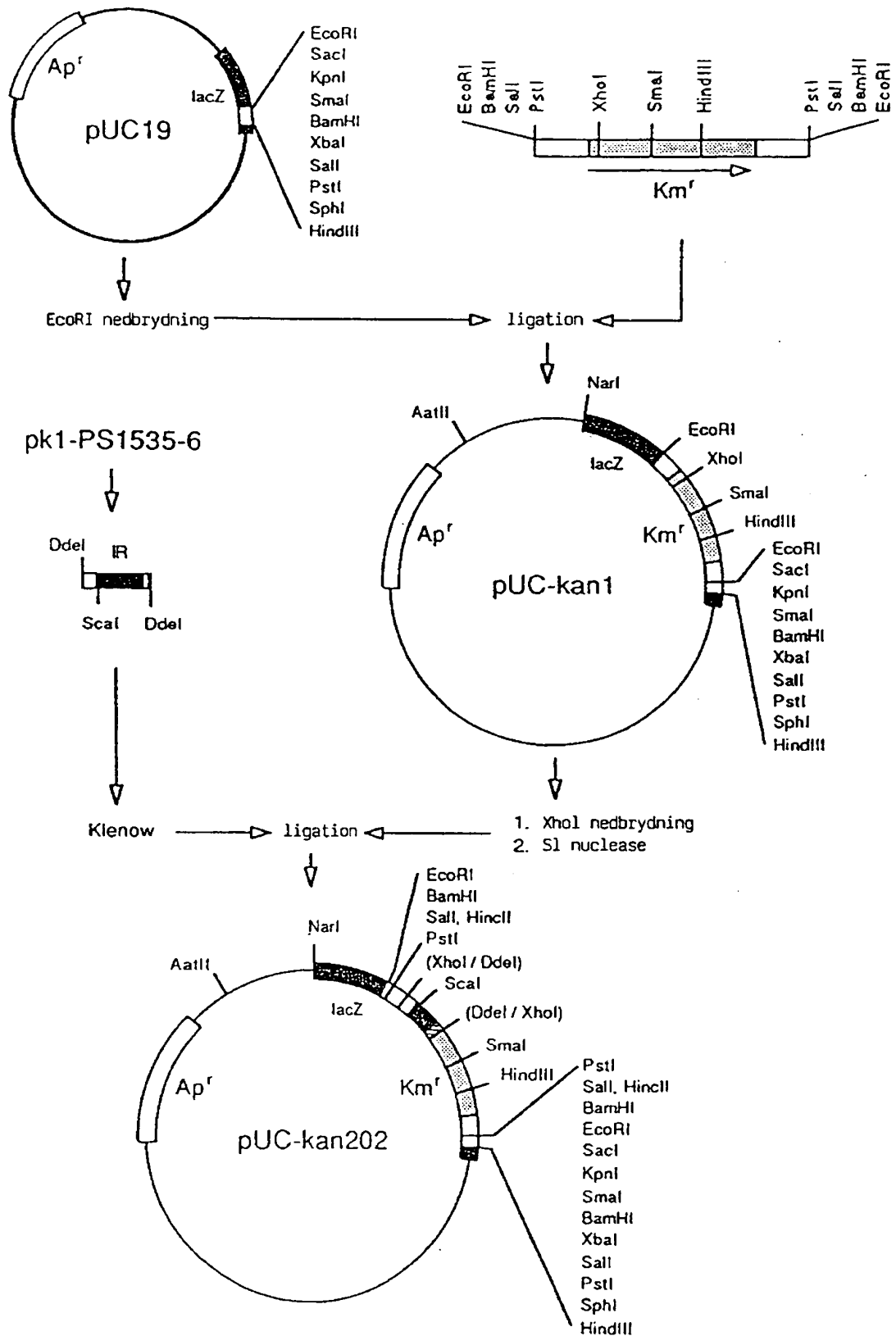


FIG. 11

[illegible]

FIG_12

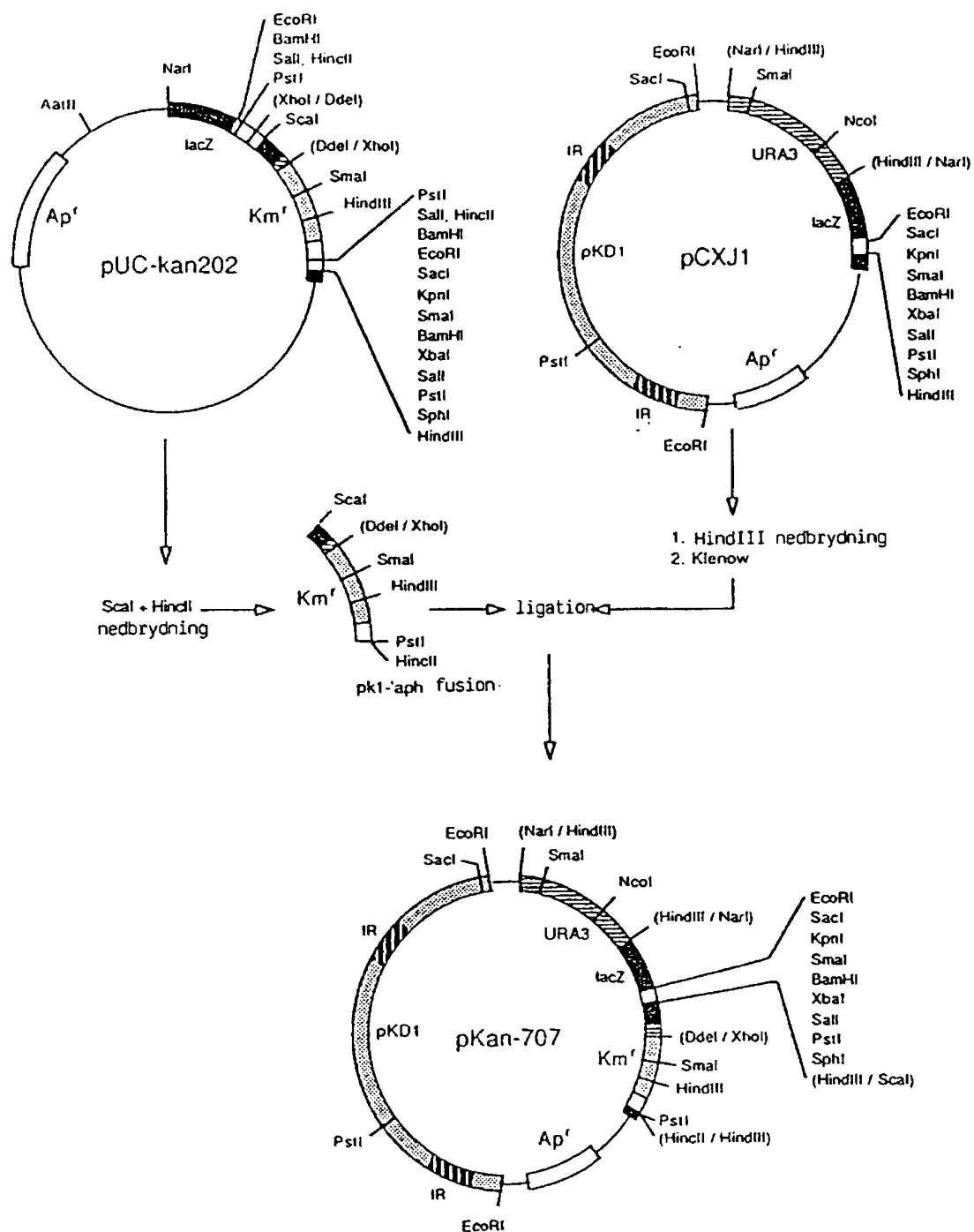
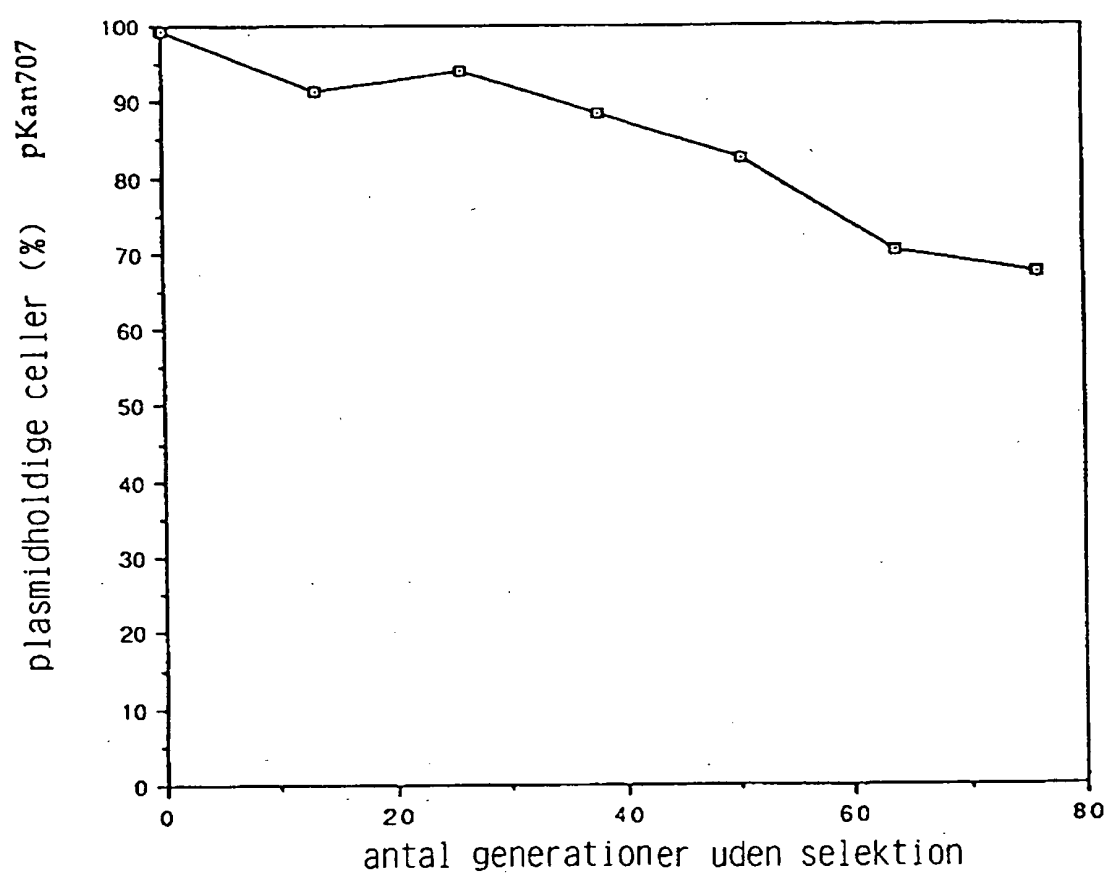


FIG. 13

FIG. 14

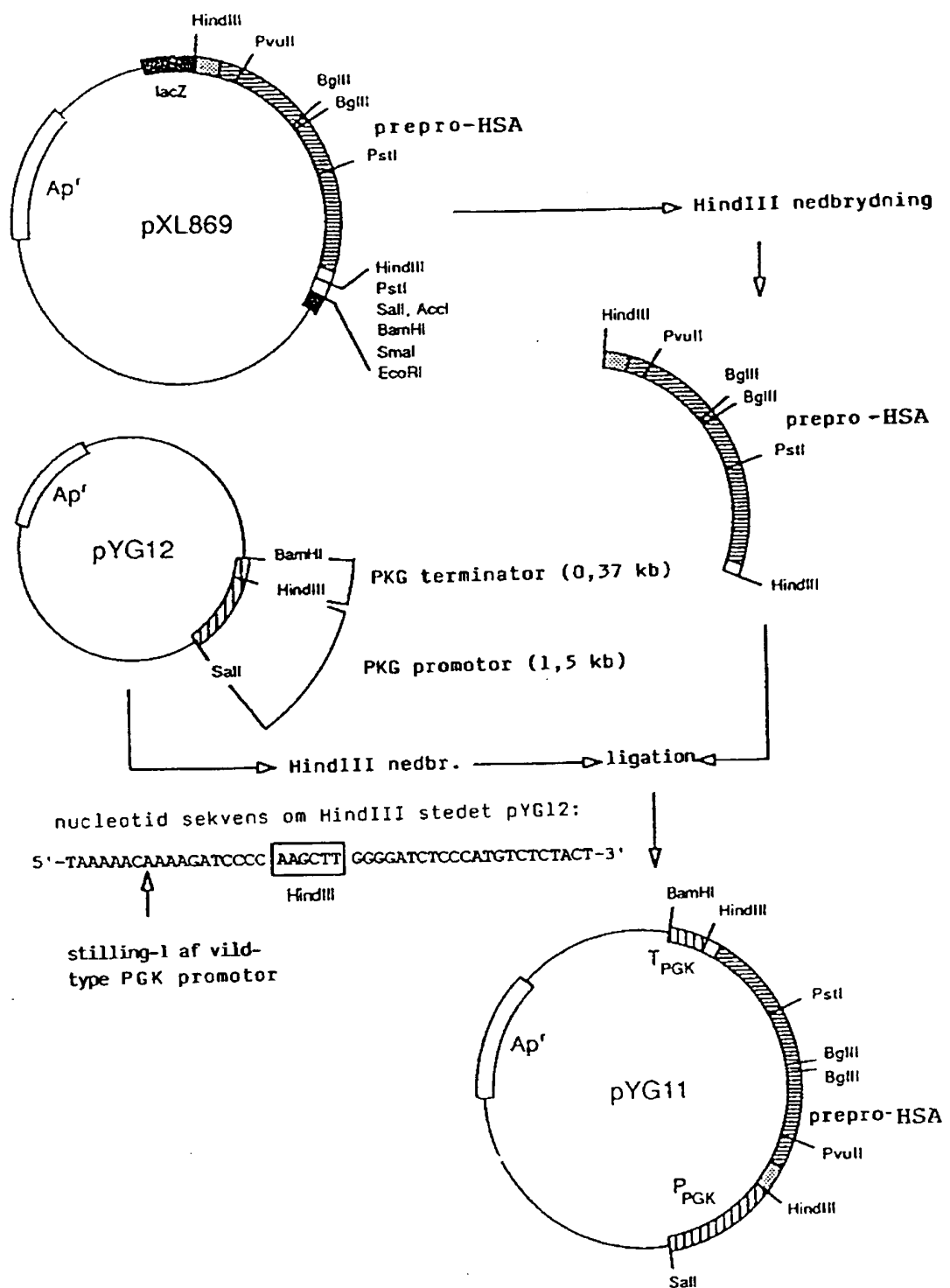


FIG.15

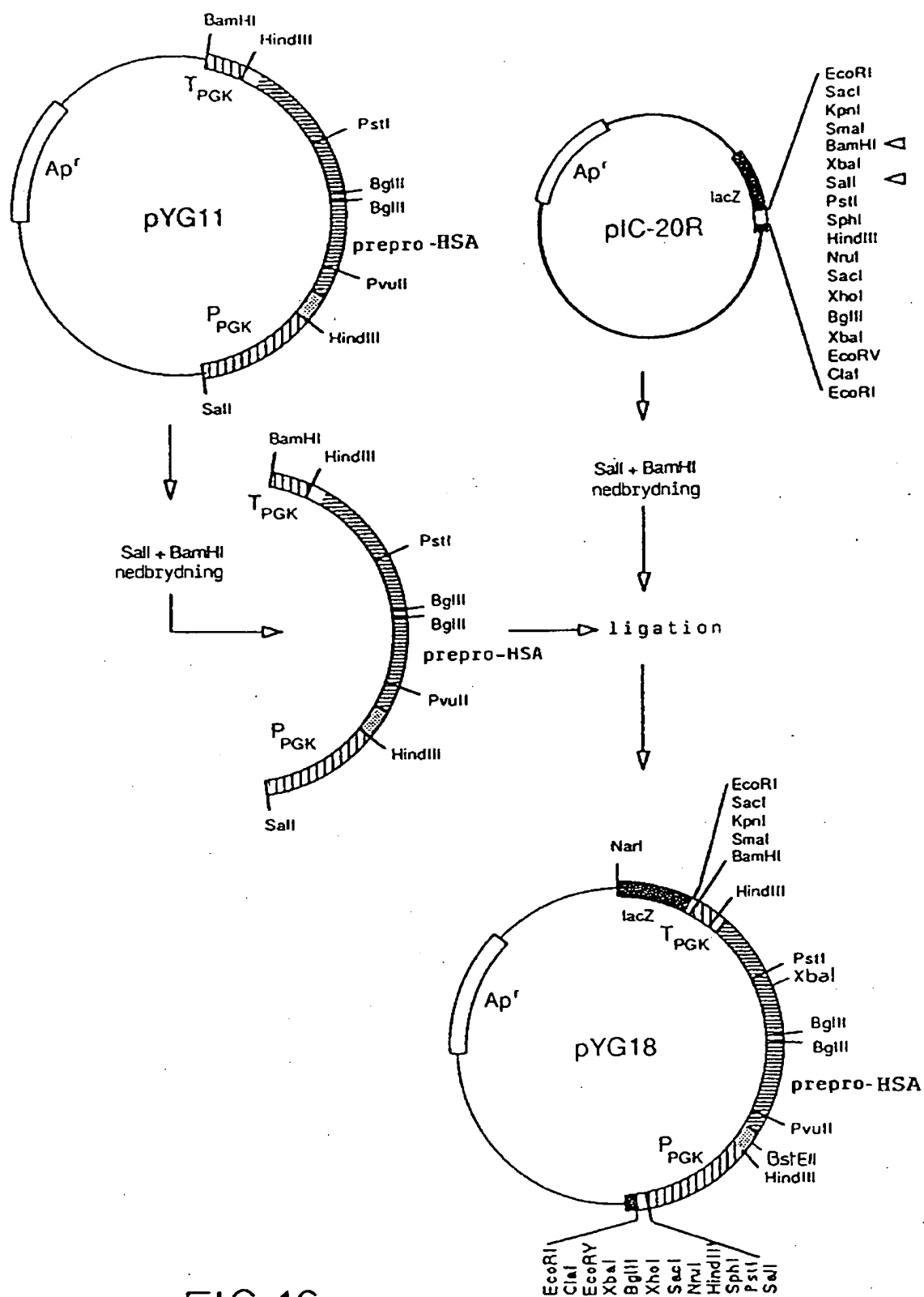


FIG. 16

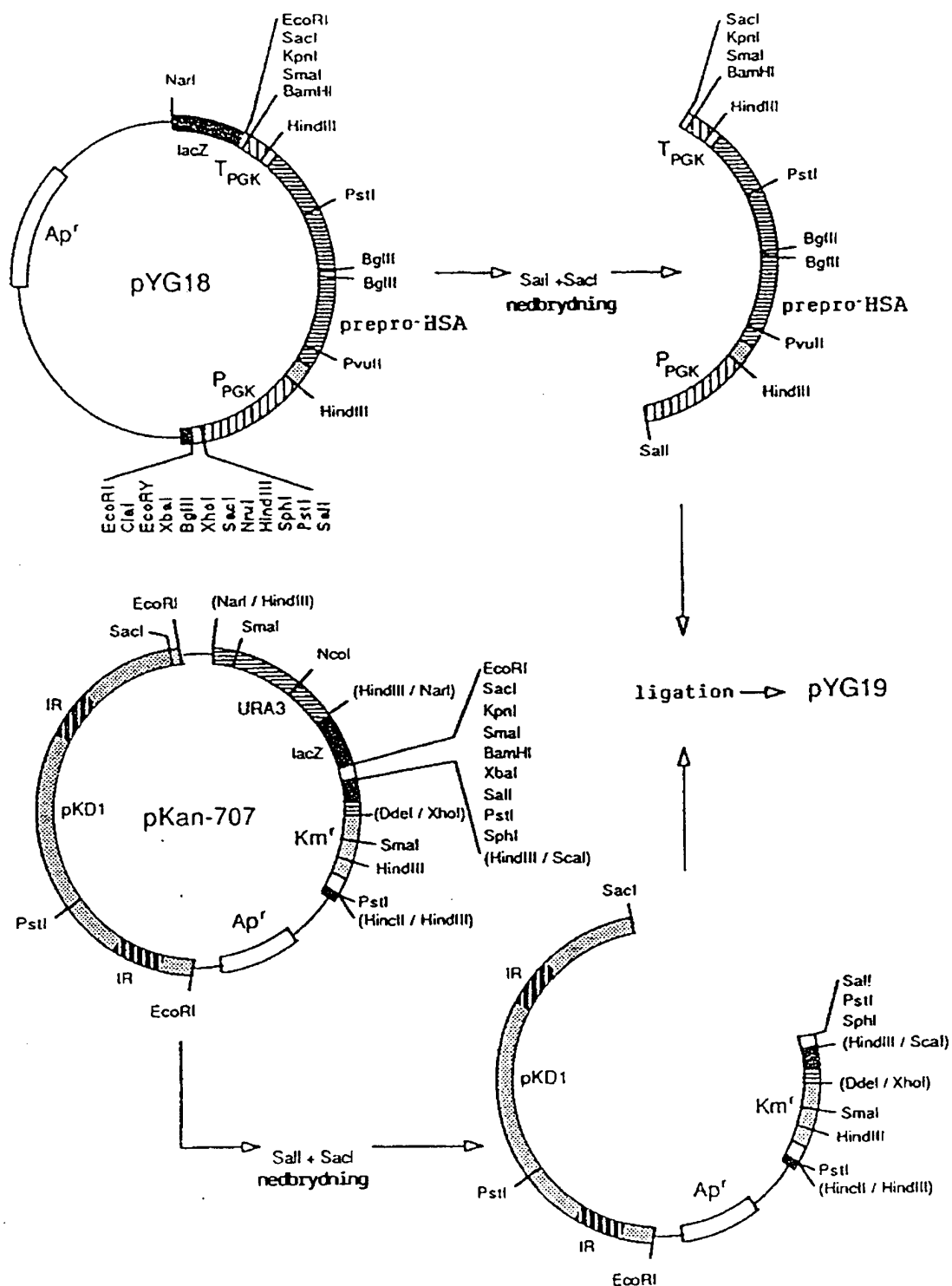


FIG. 17

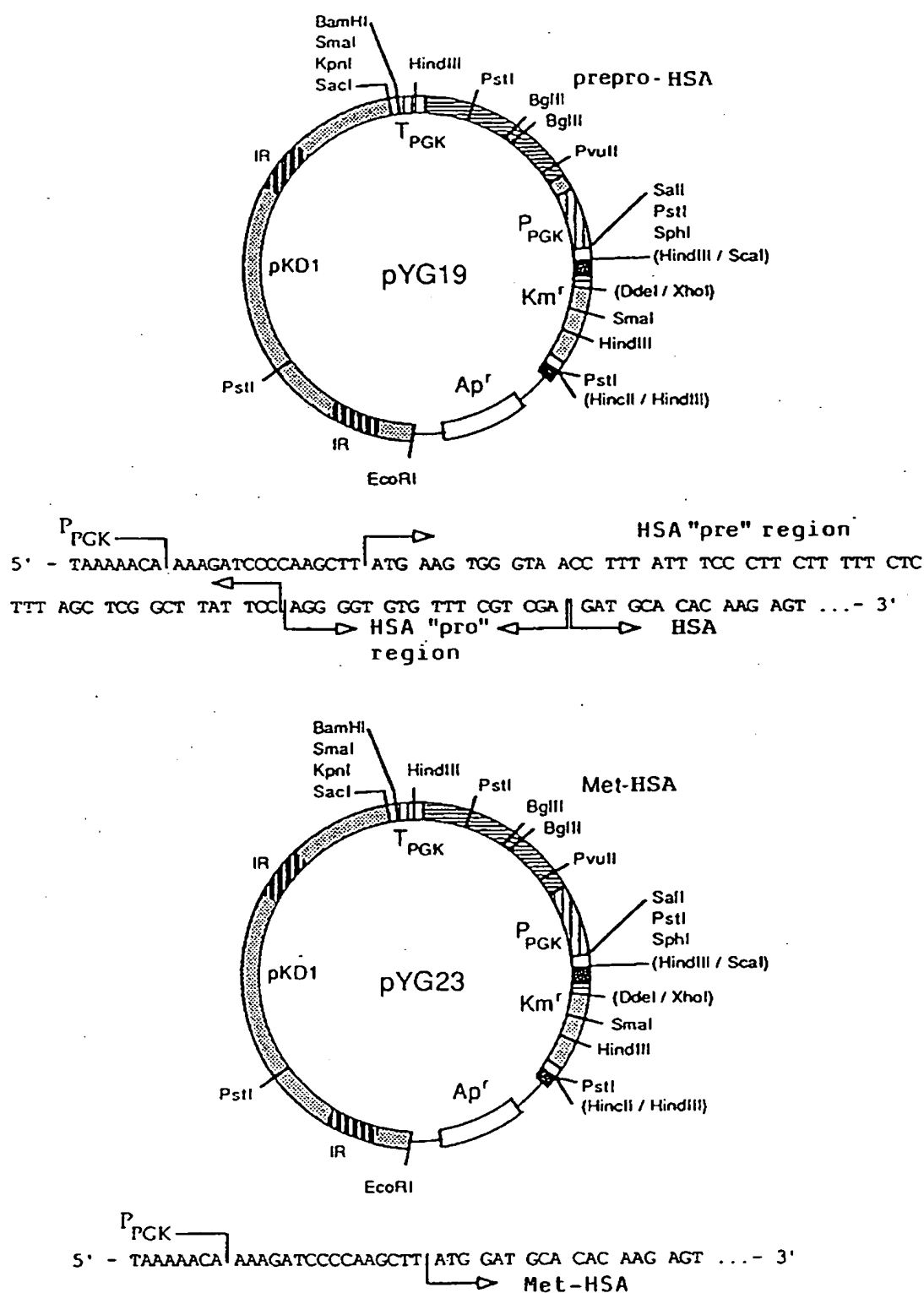


FIG.18

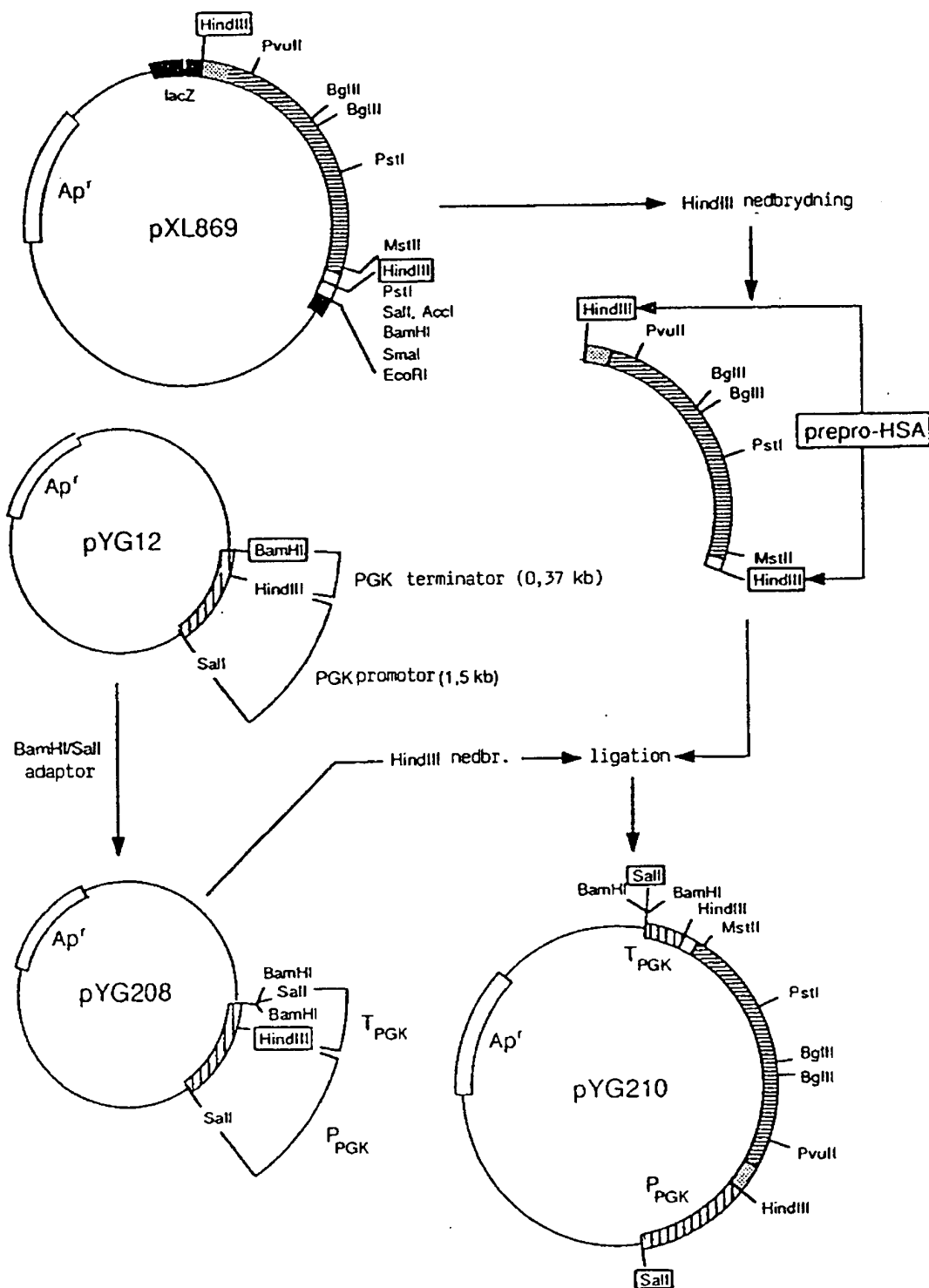
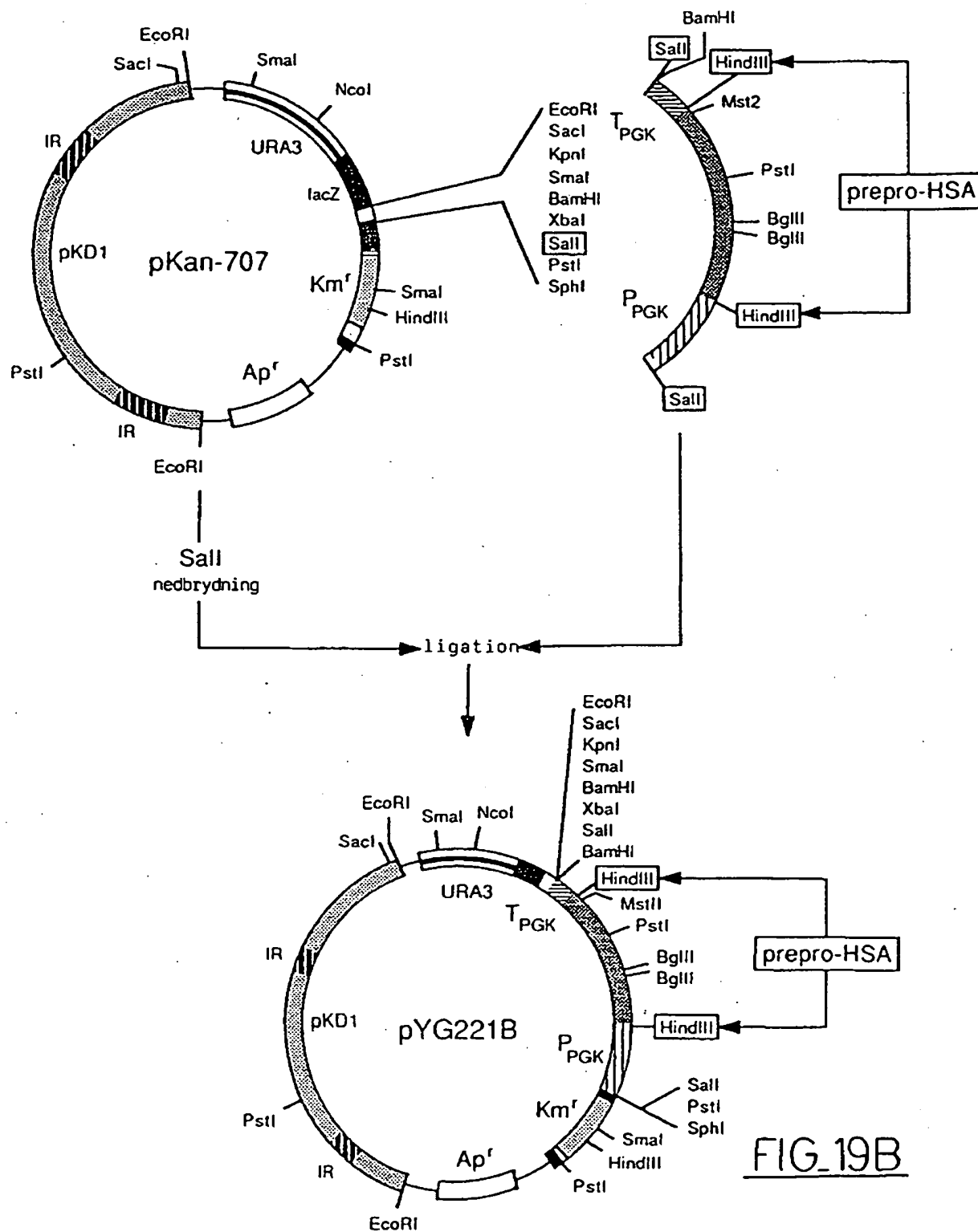


FIG. 19A



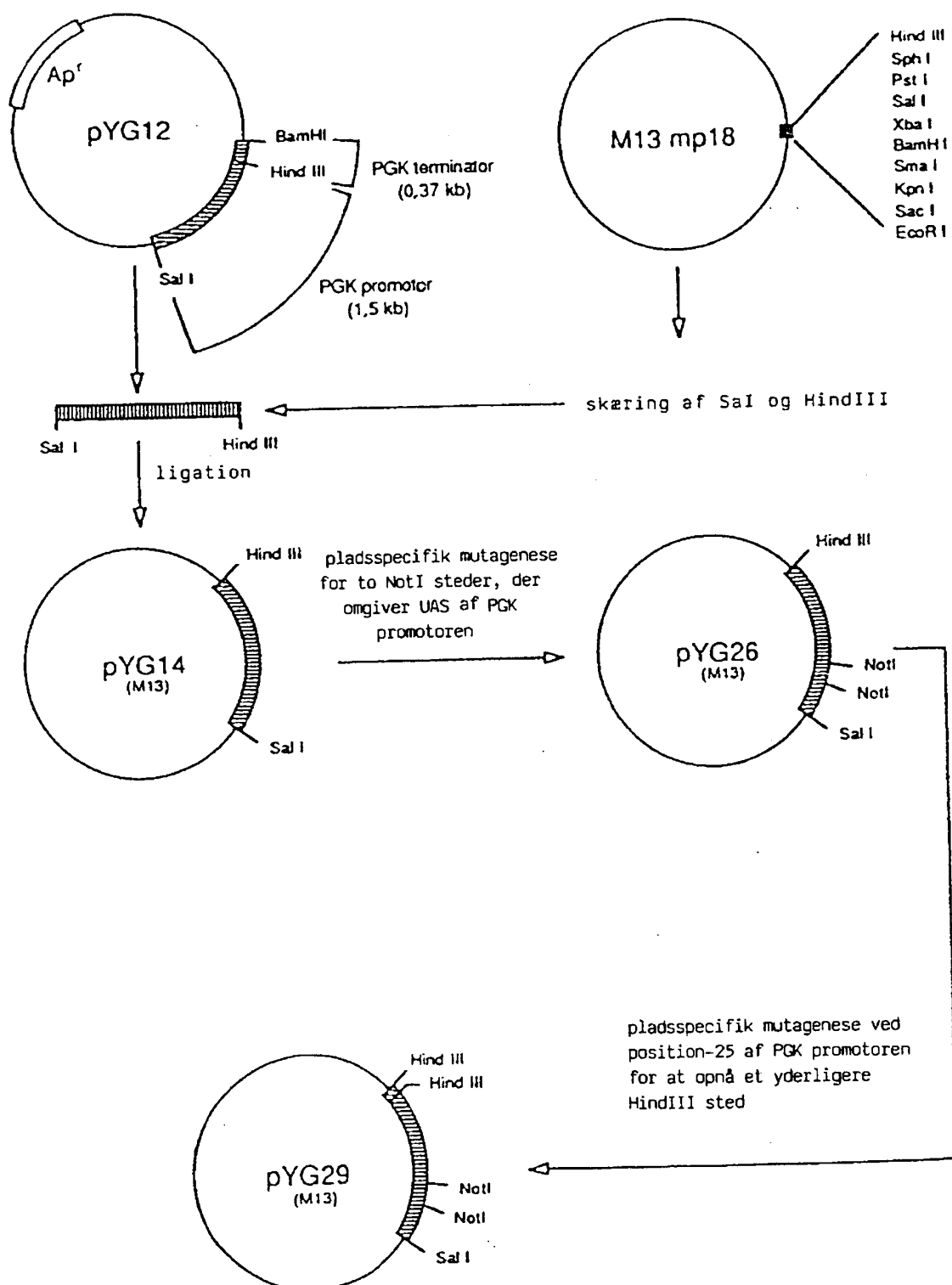


FIG. 20

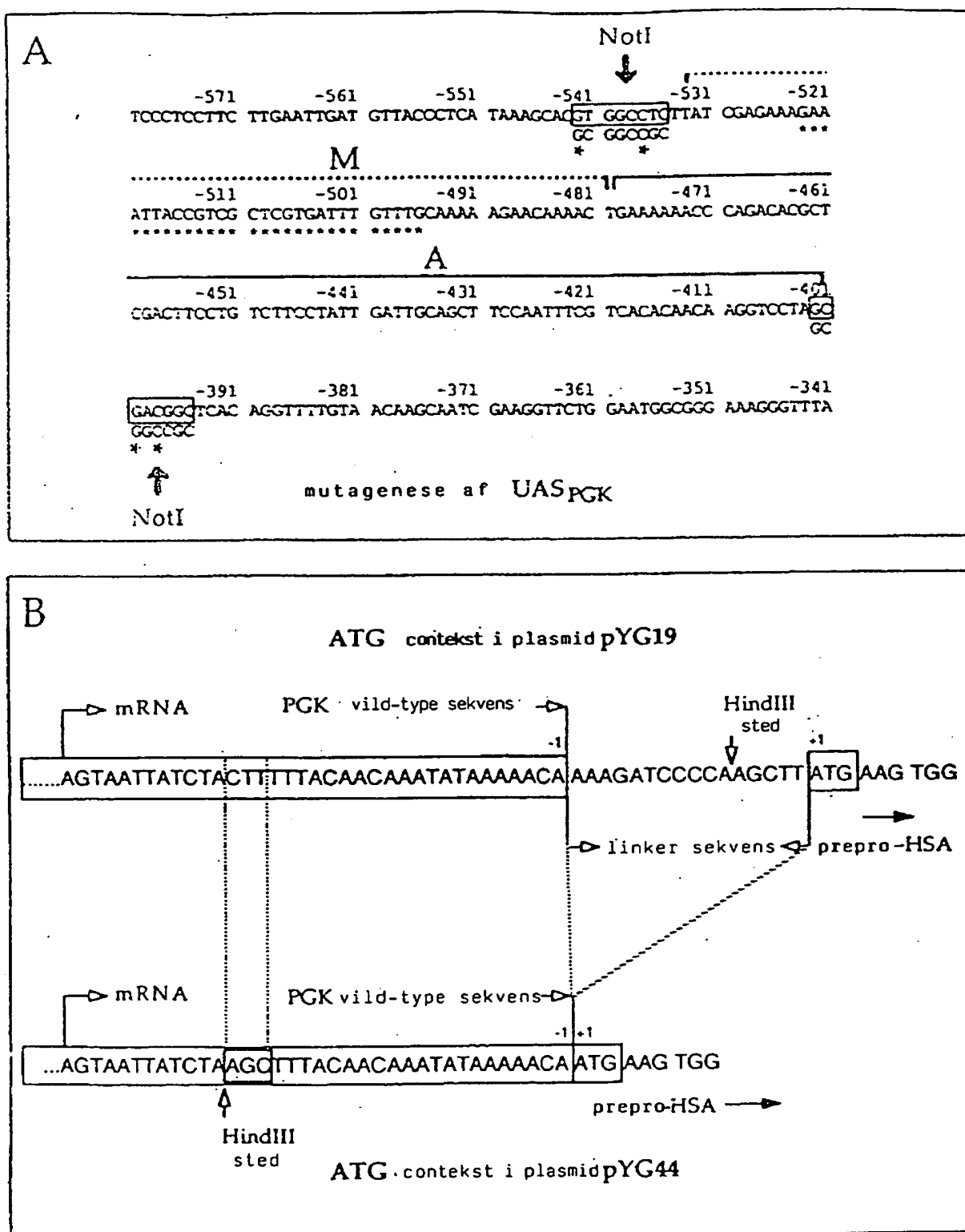


FIG. 21

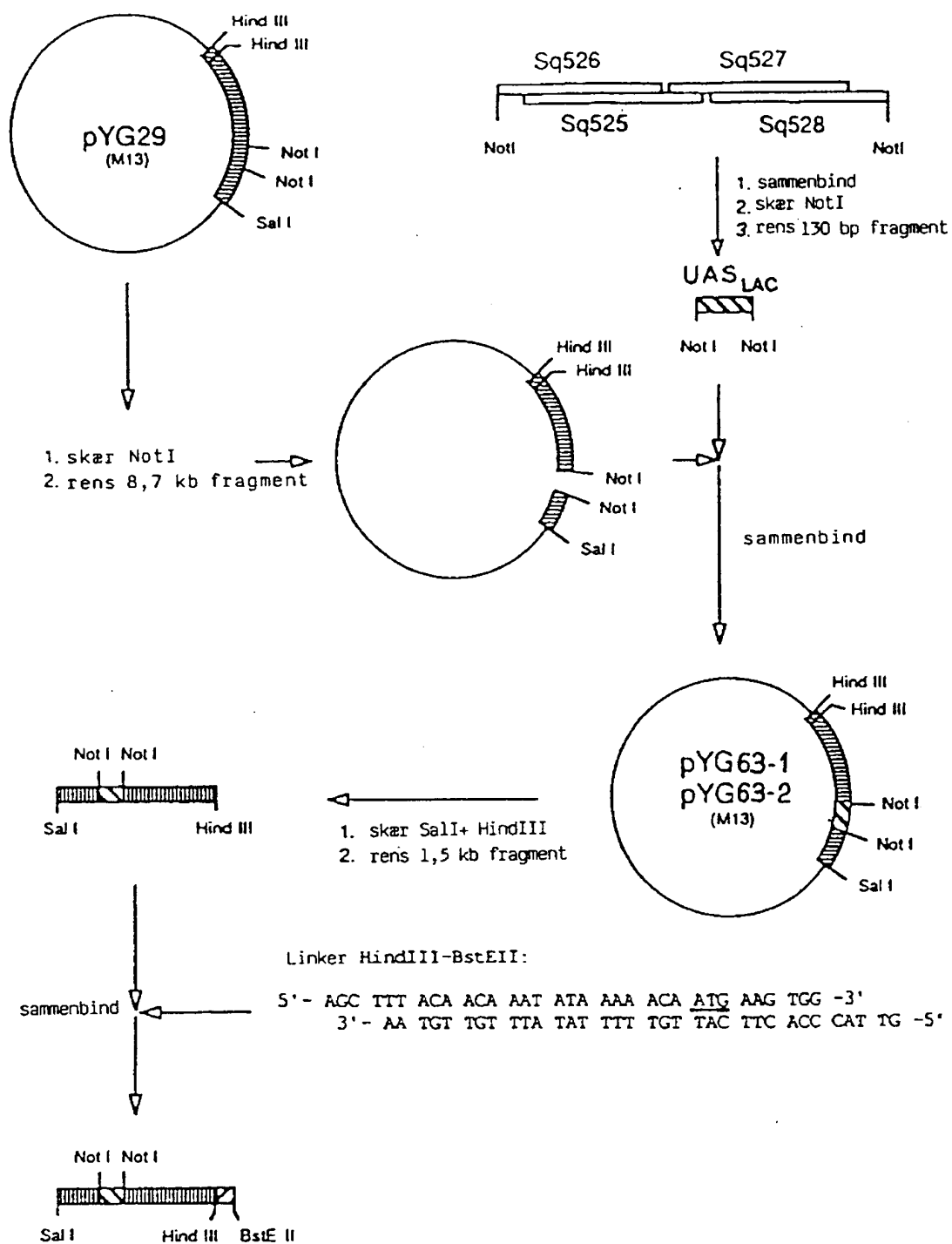


FIG. 22

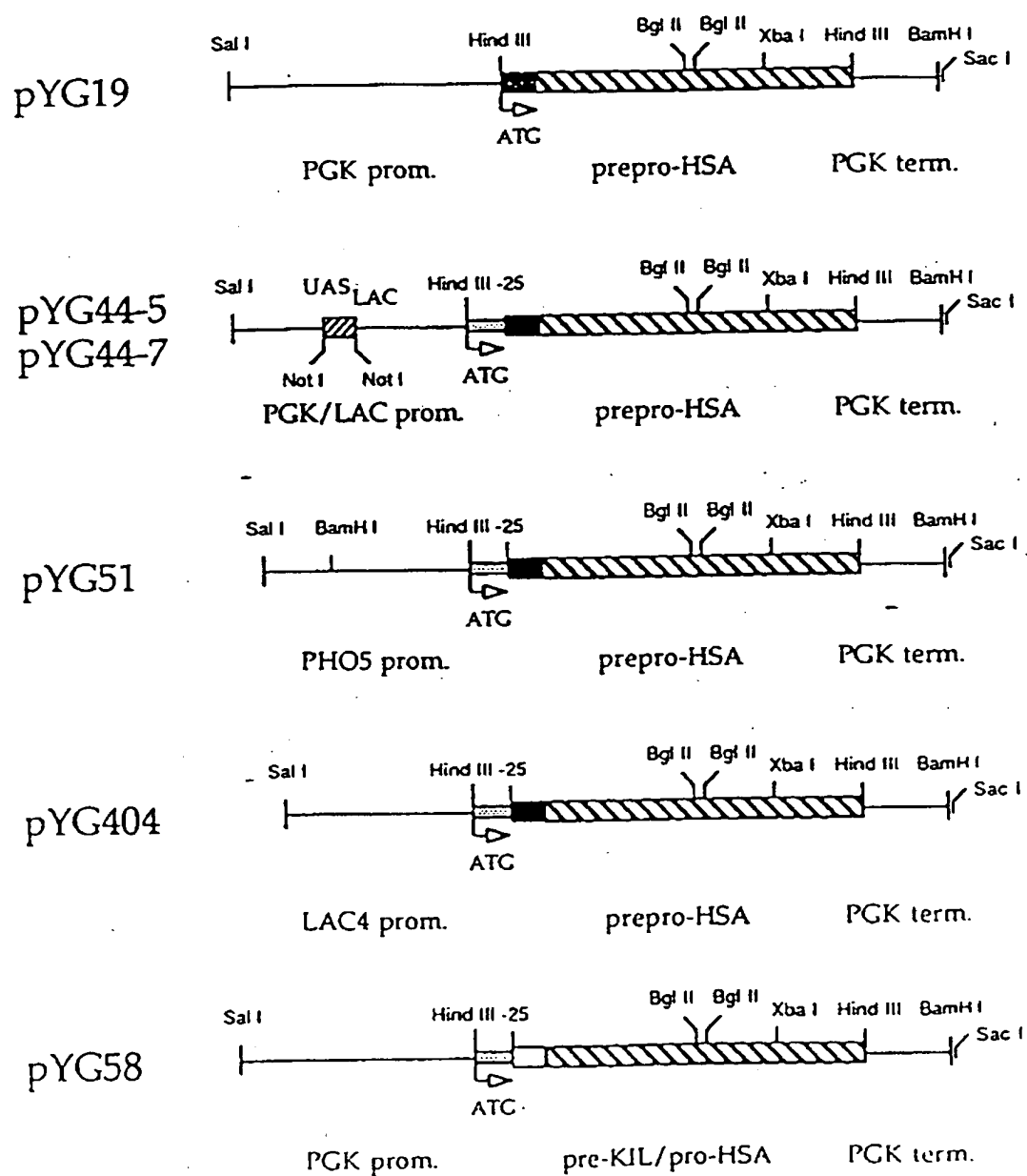


FIG. 23

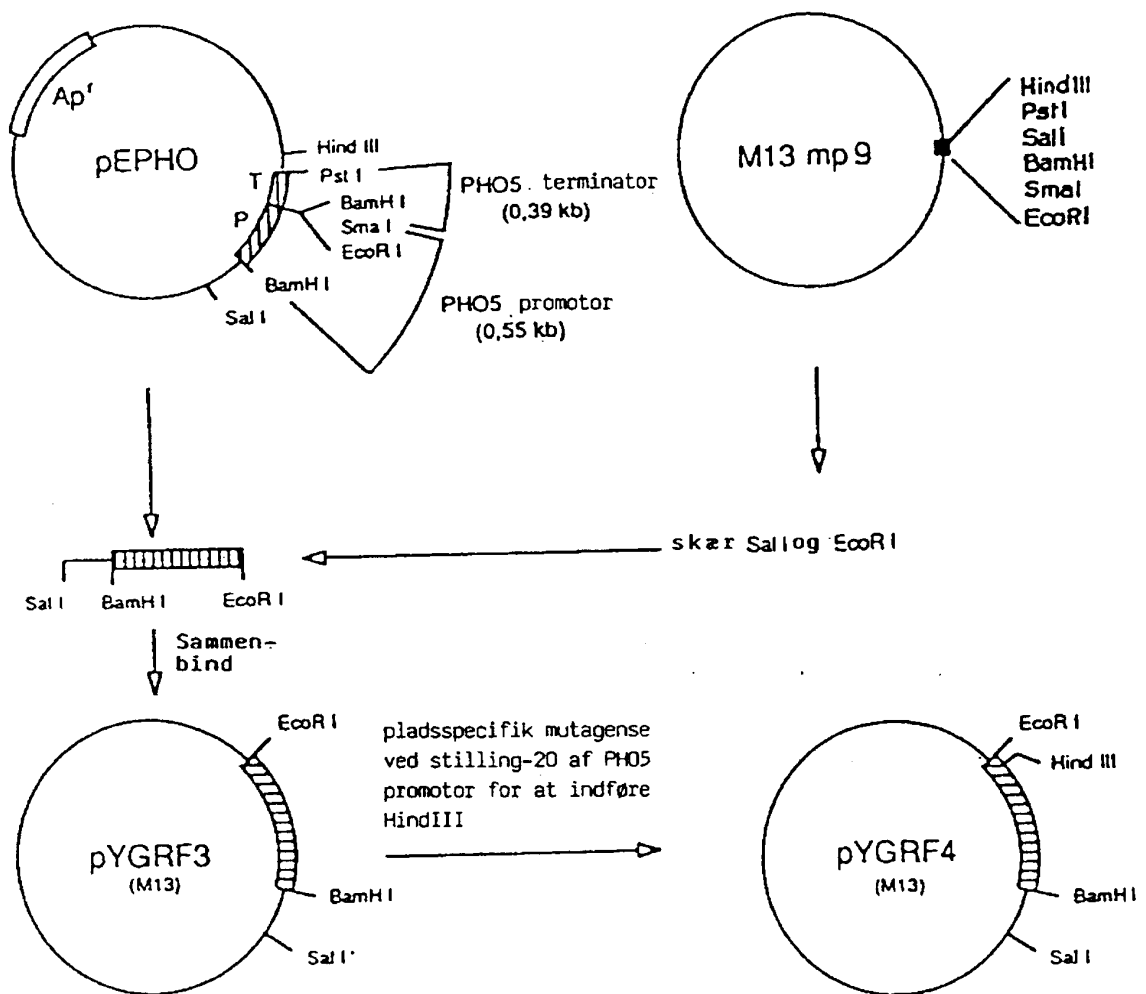


FIG. 24

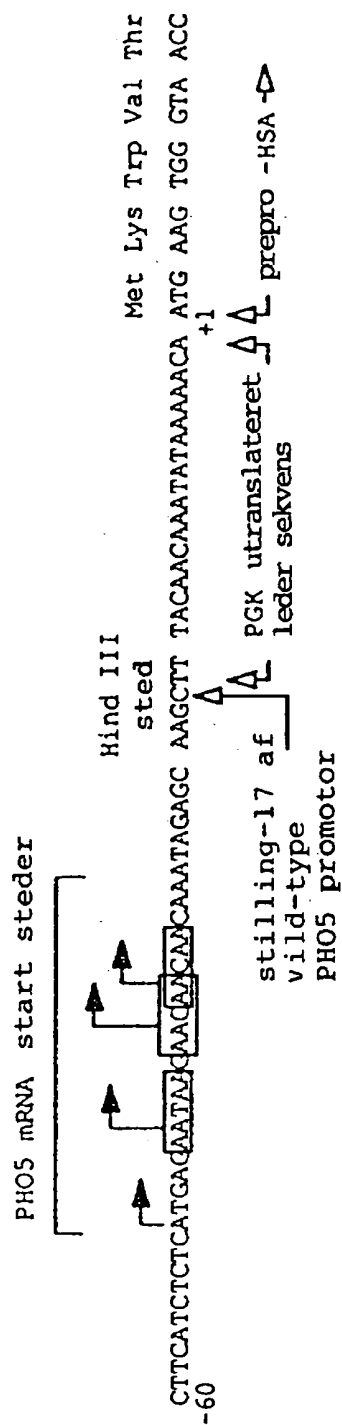


FIG. 25

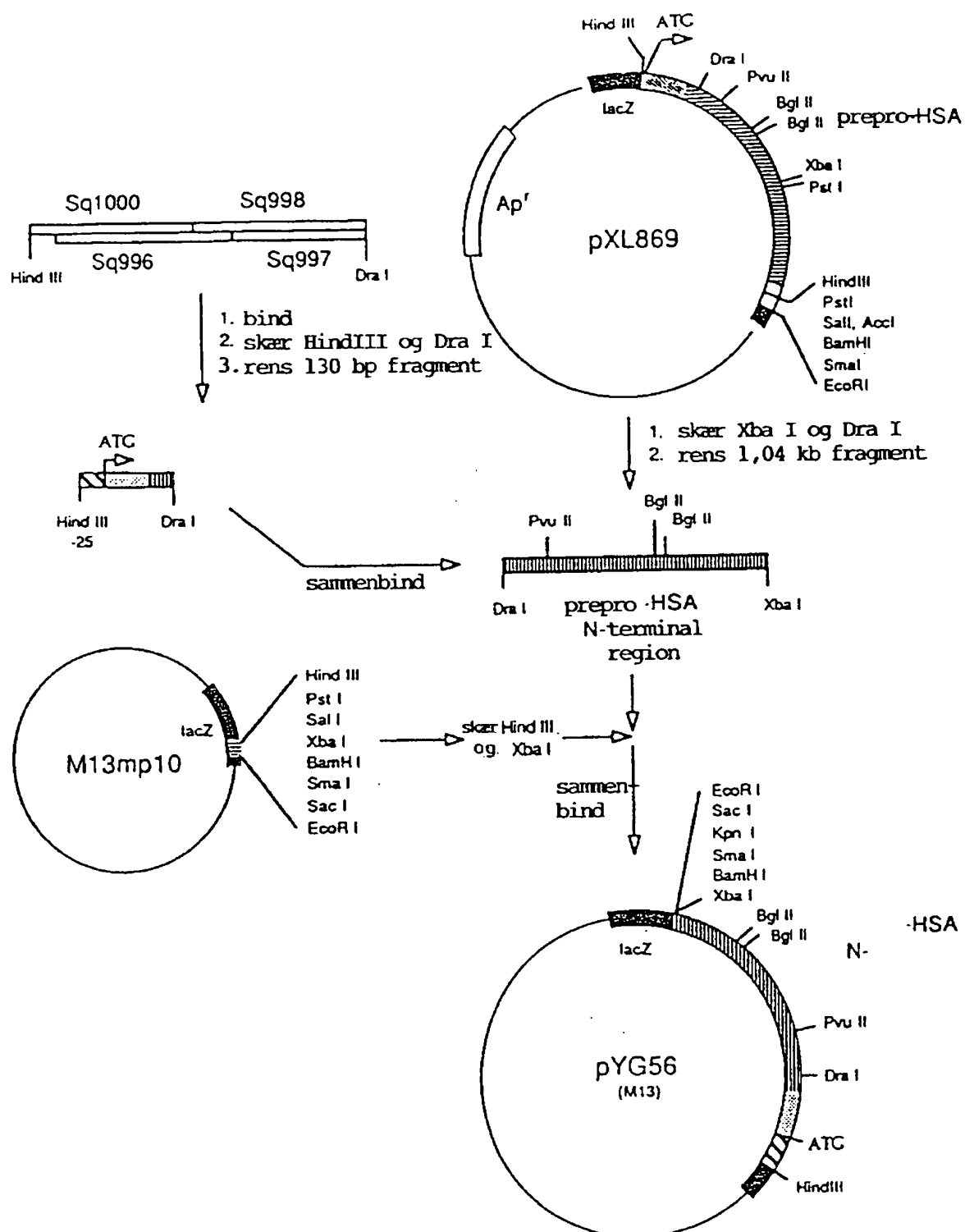


FIG. 26

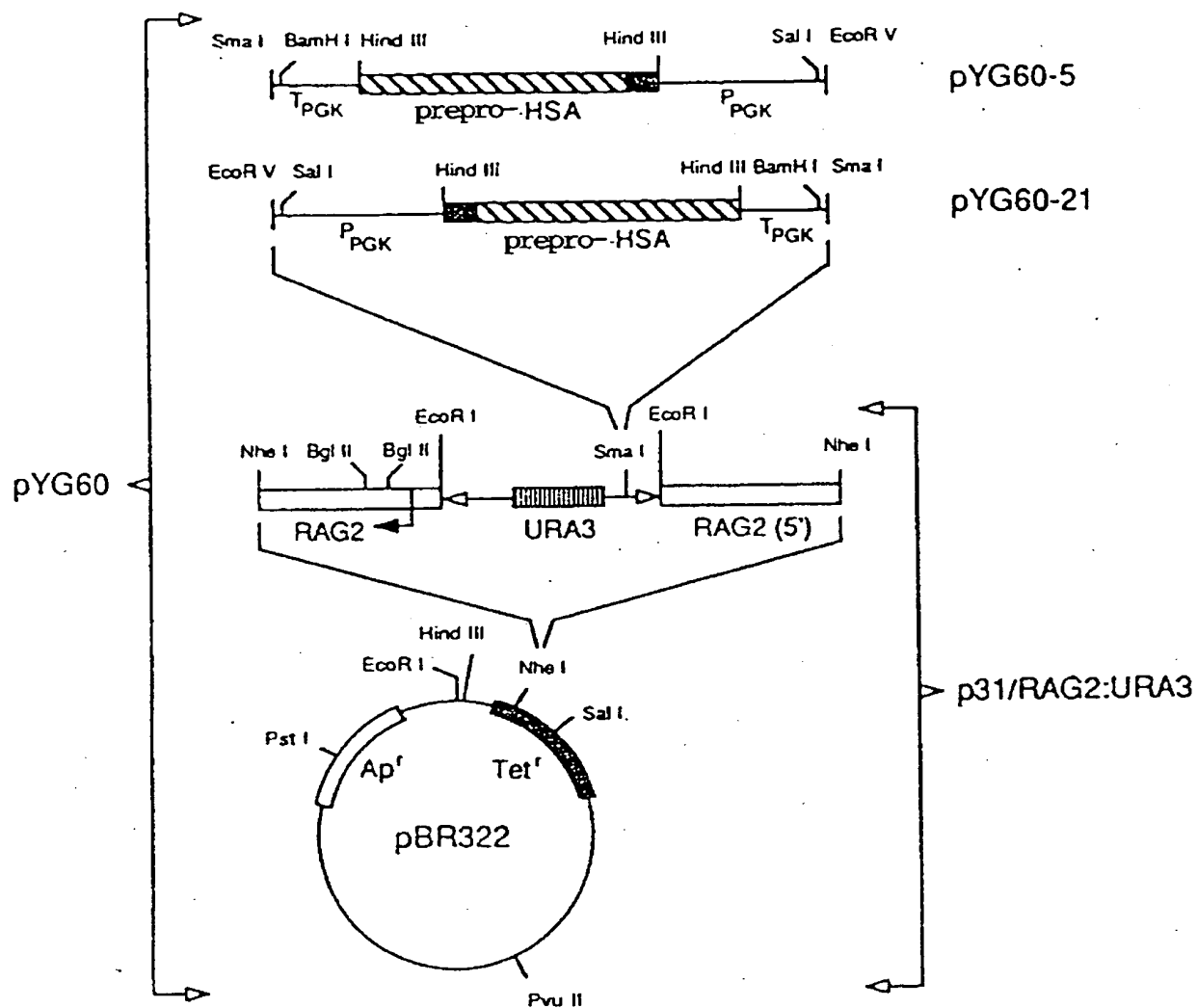


FIG. 27

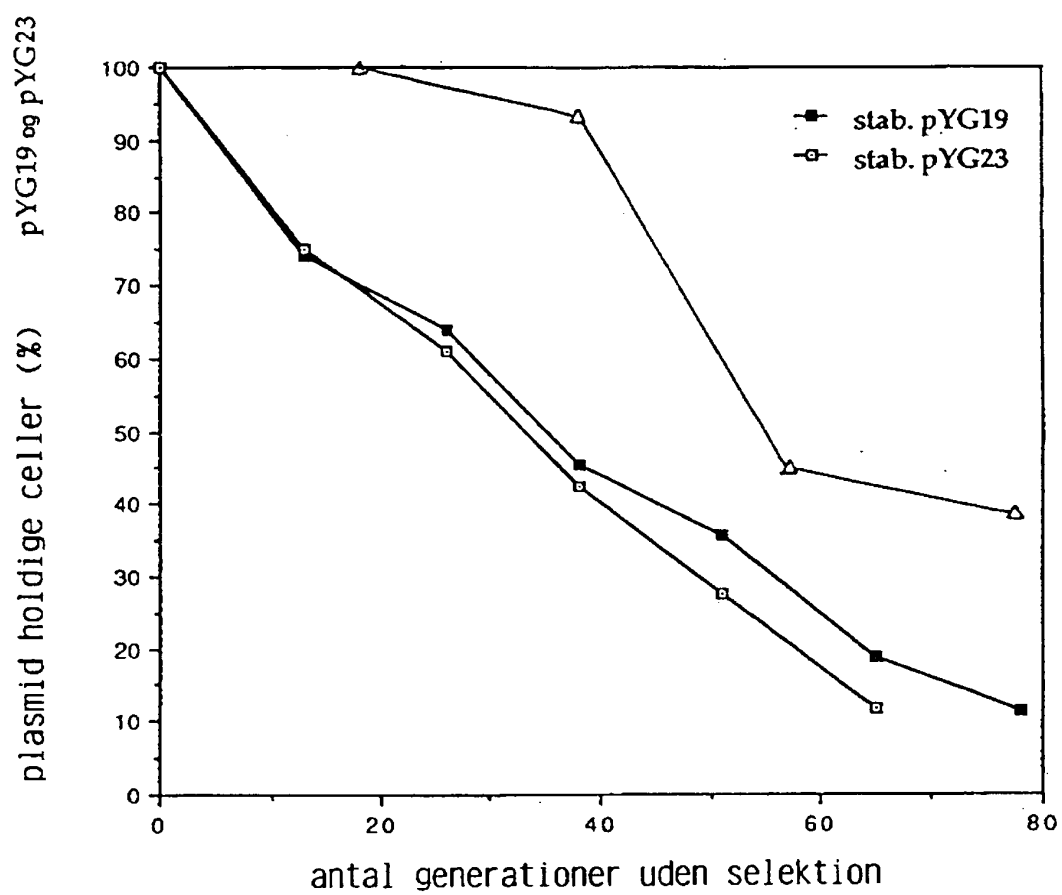
FIG. 28

FIG. 29

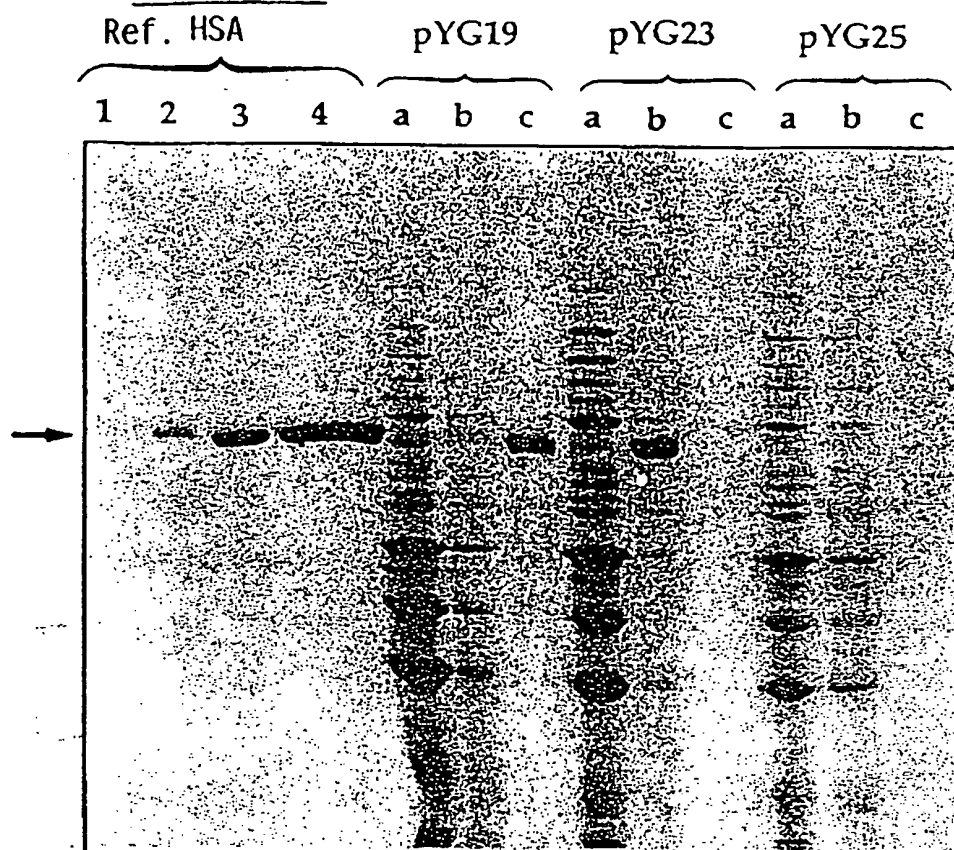
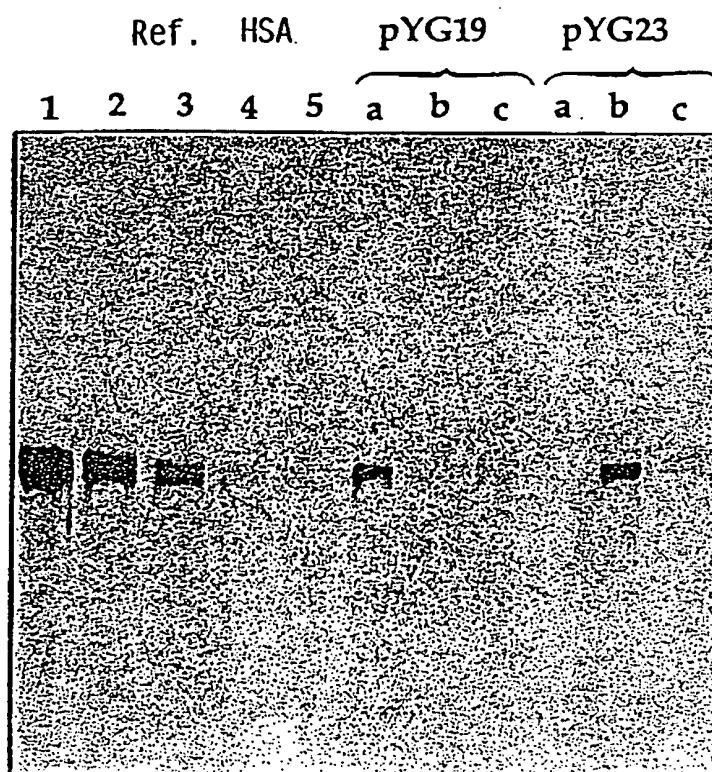
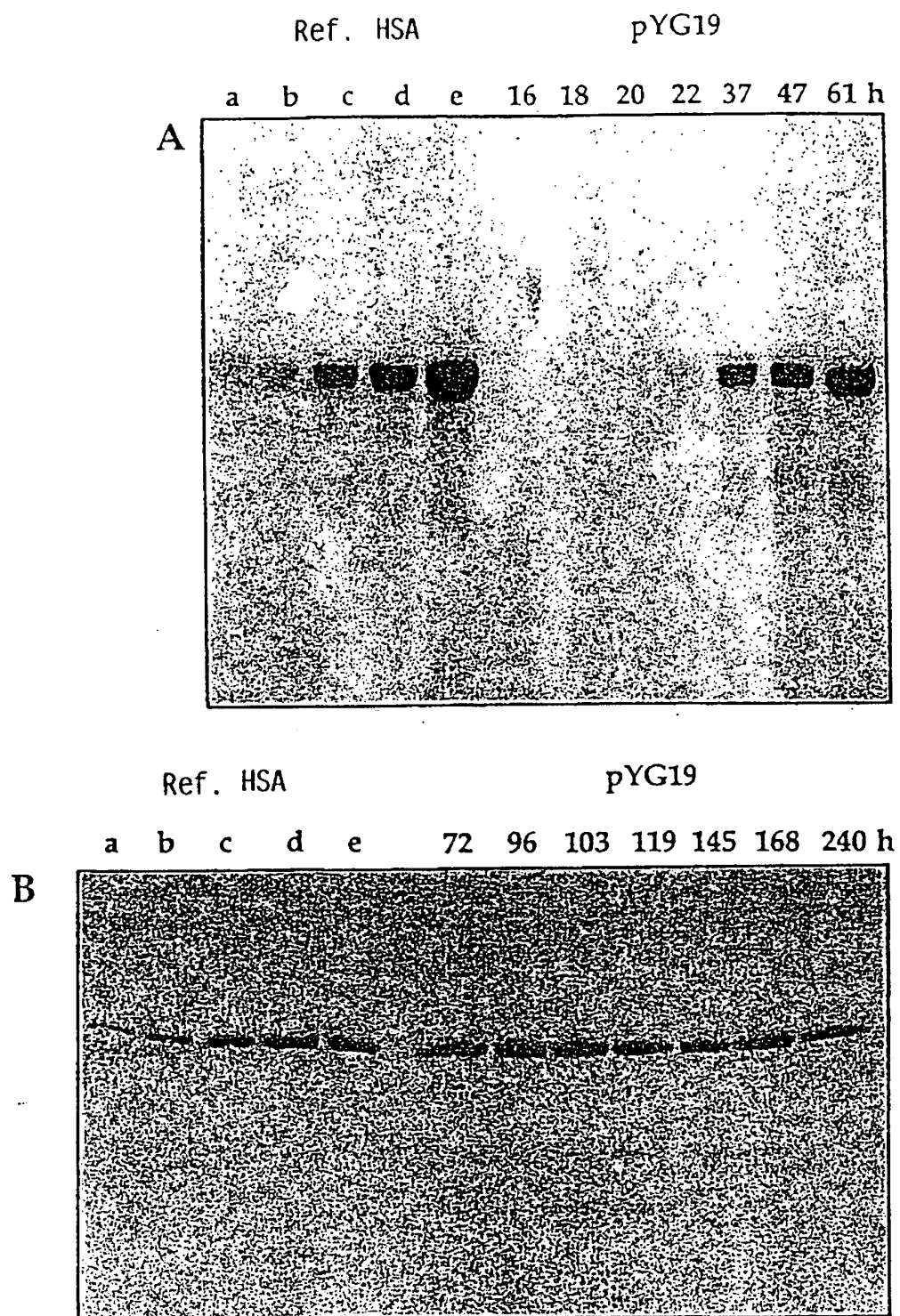
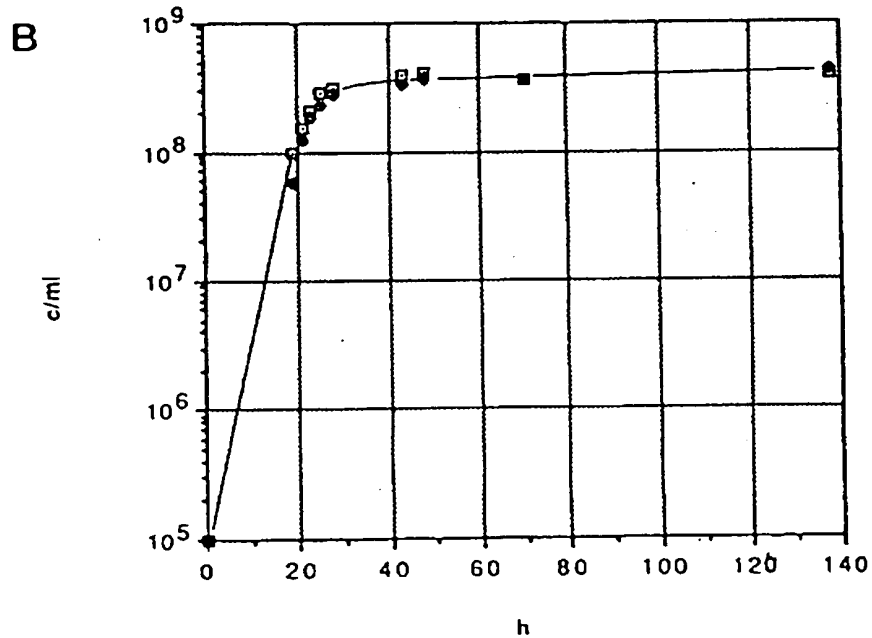
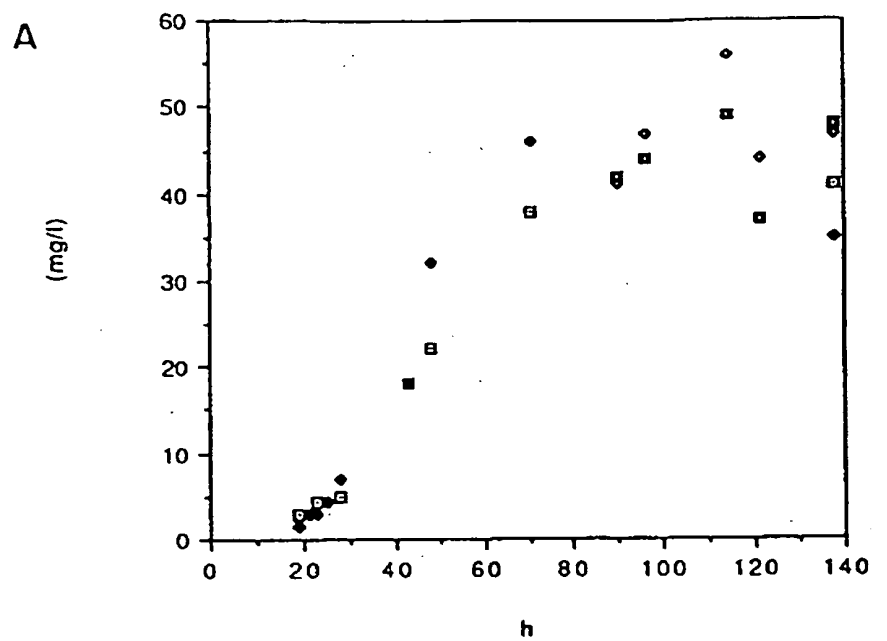


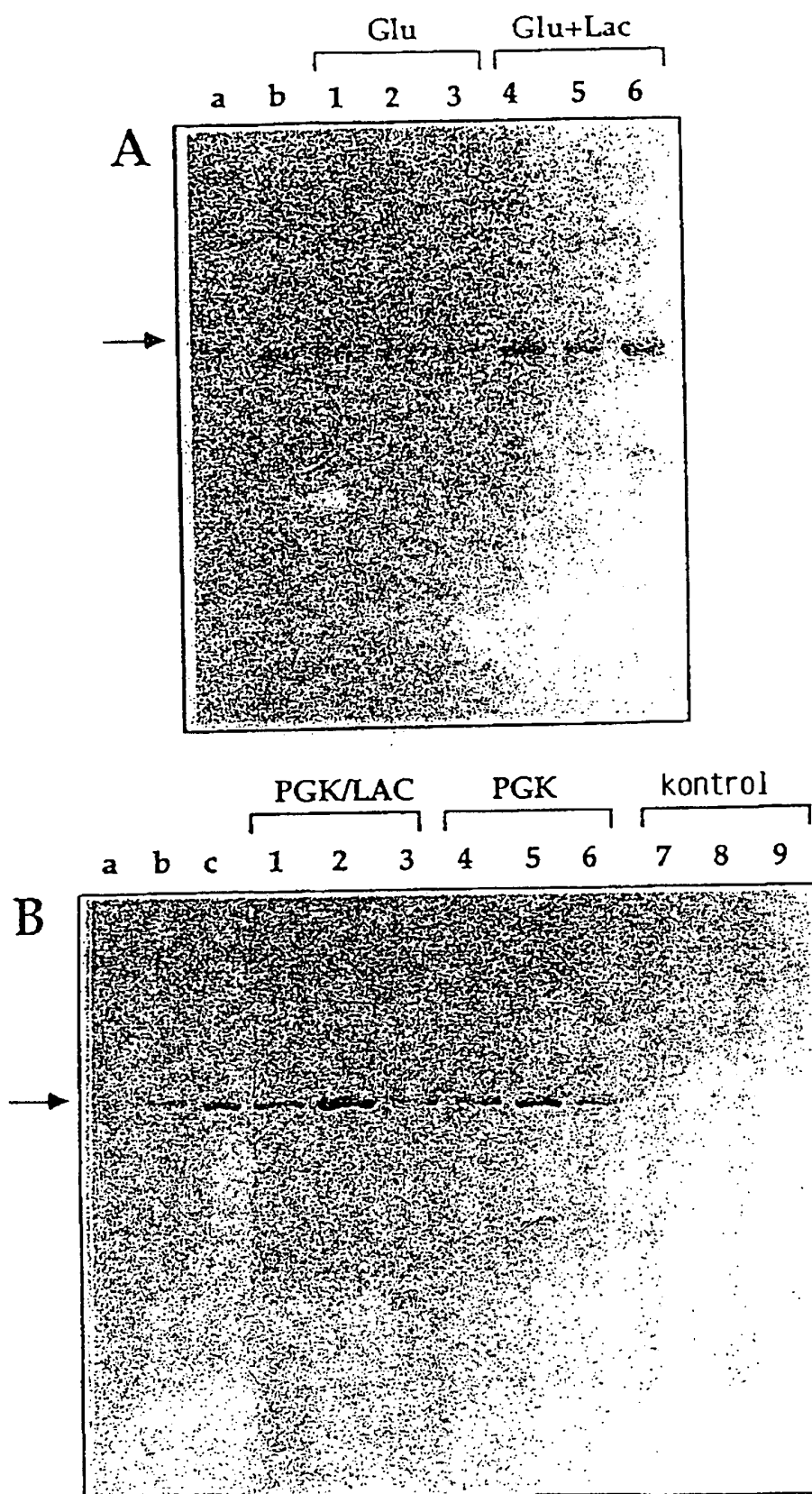
FIG. 30

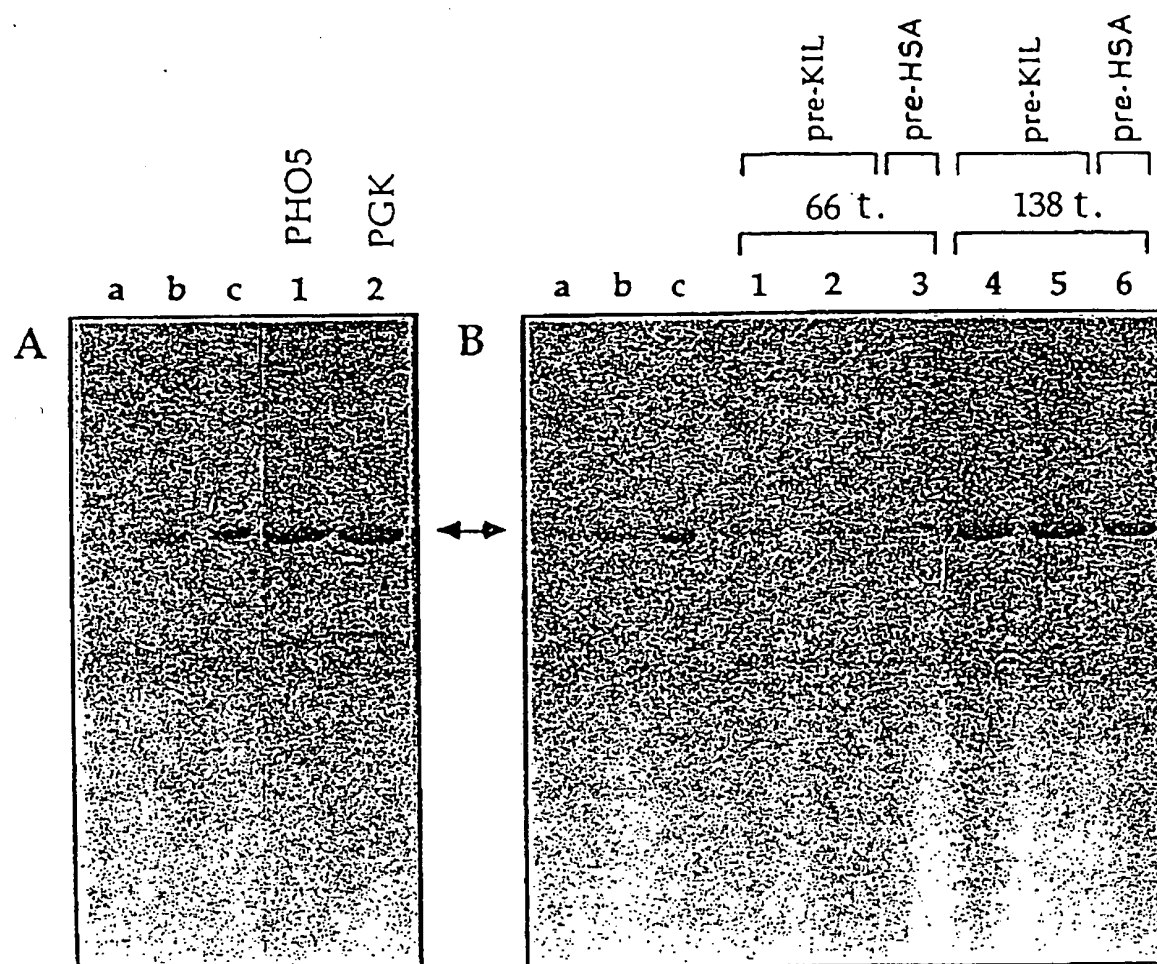




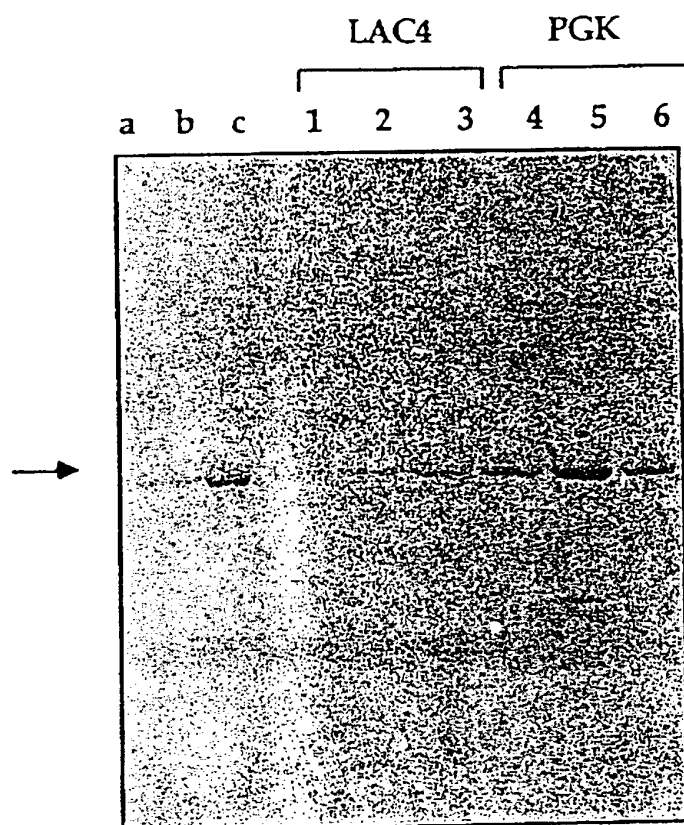
FIG_31

FIG. 32

FIG_33



FIG_34



FIG_35

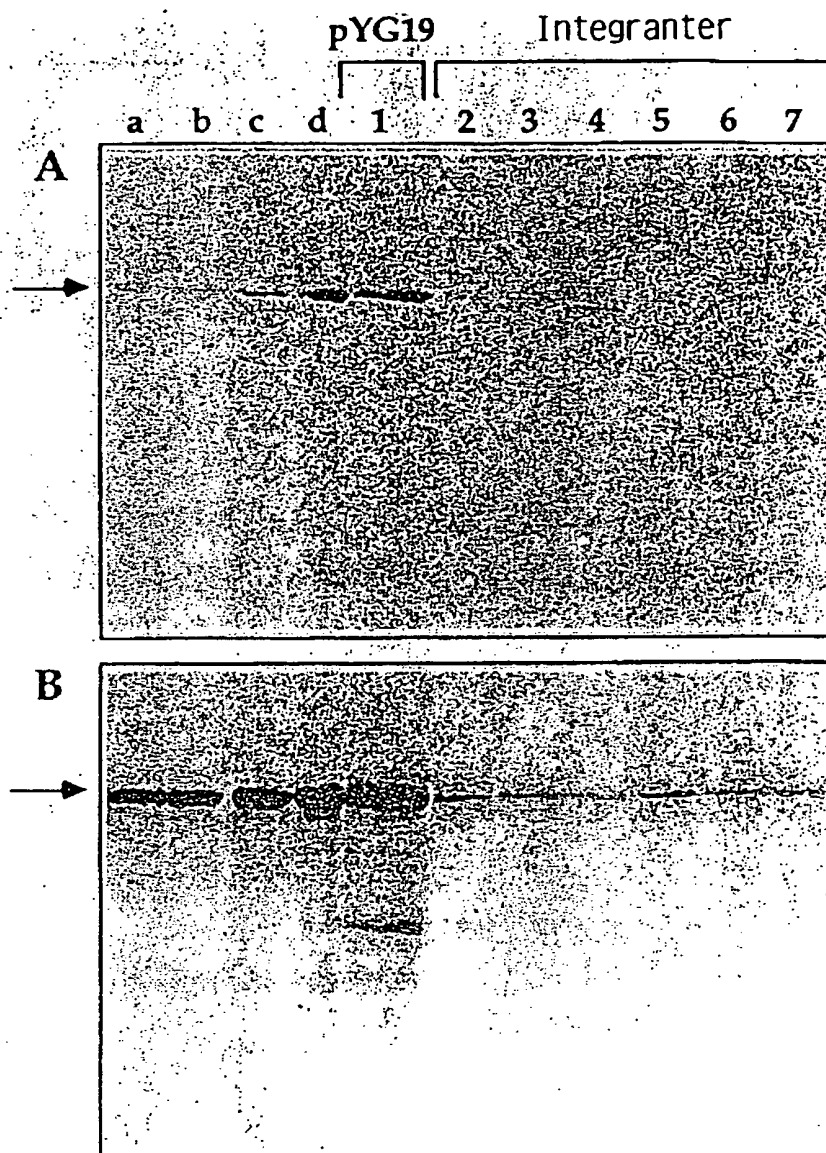
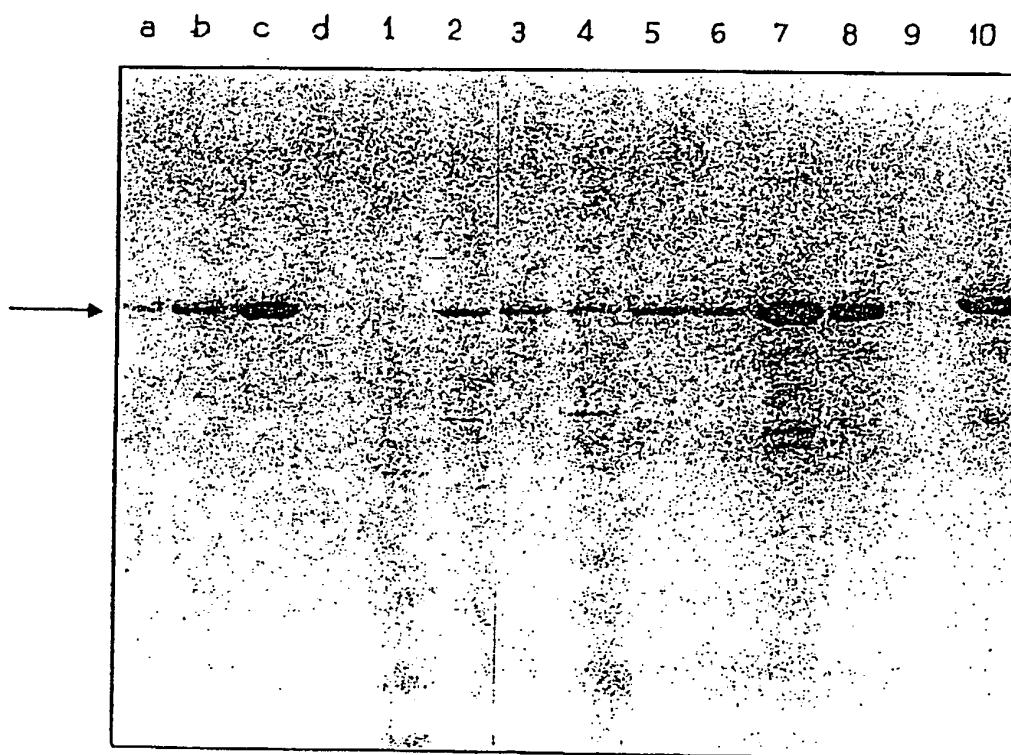
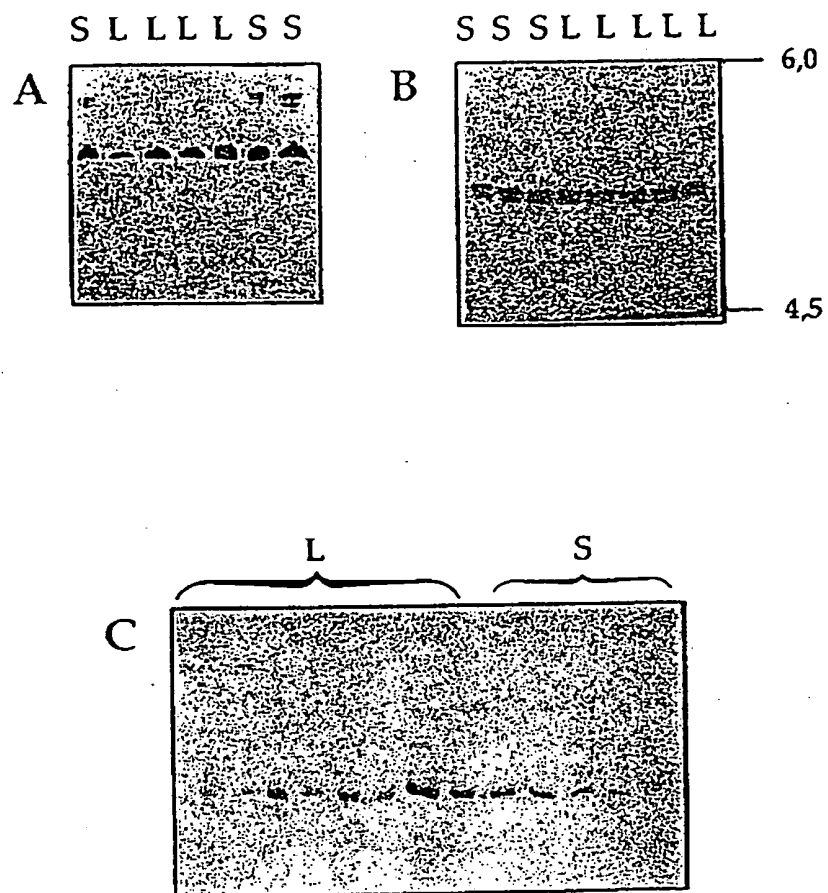


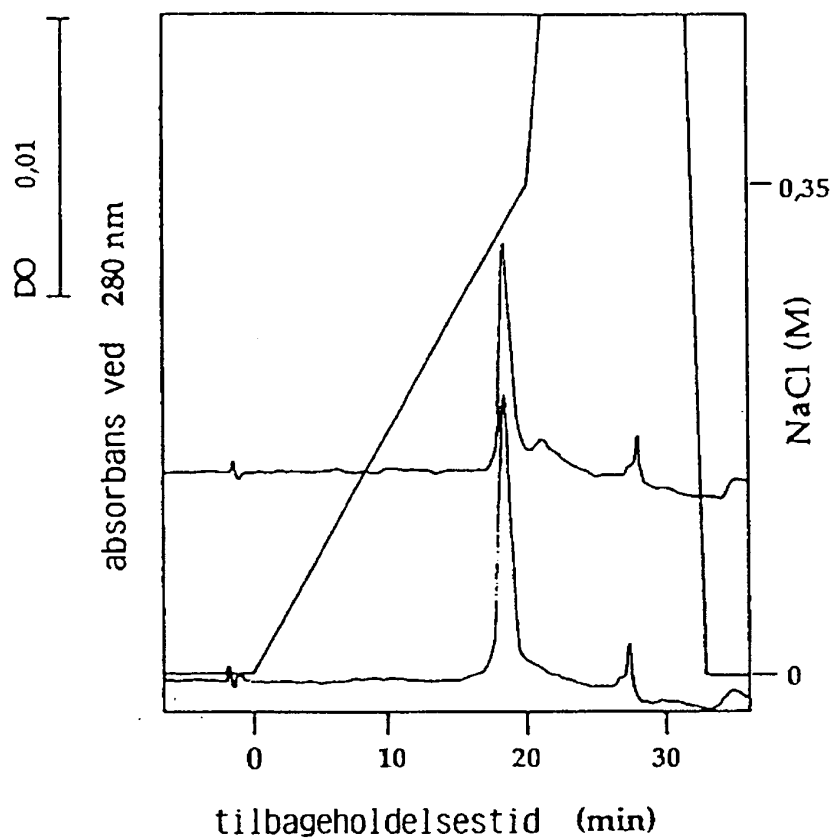
FIG _ 36

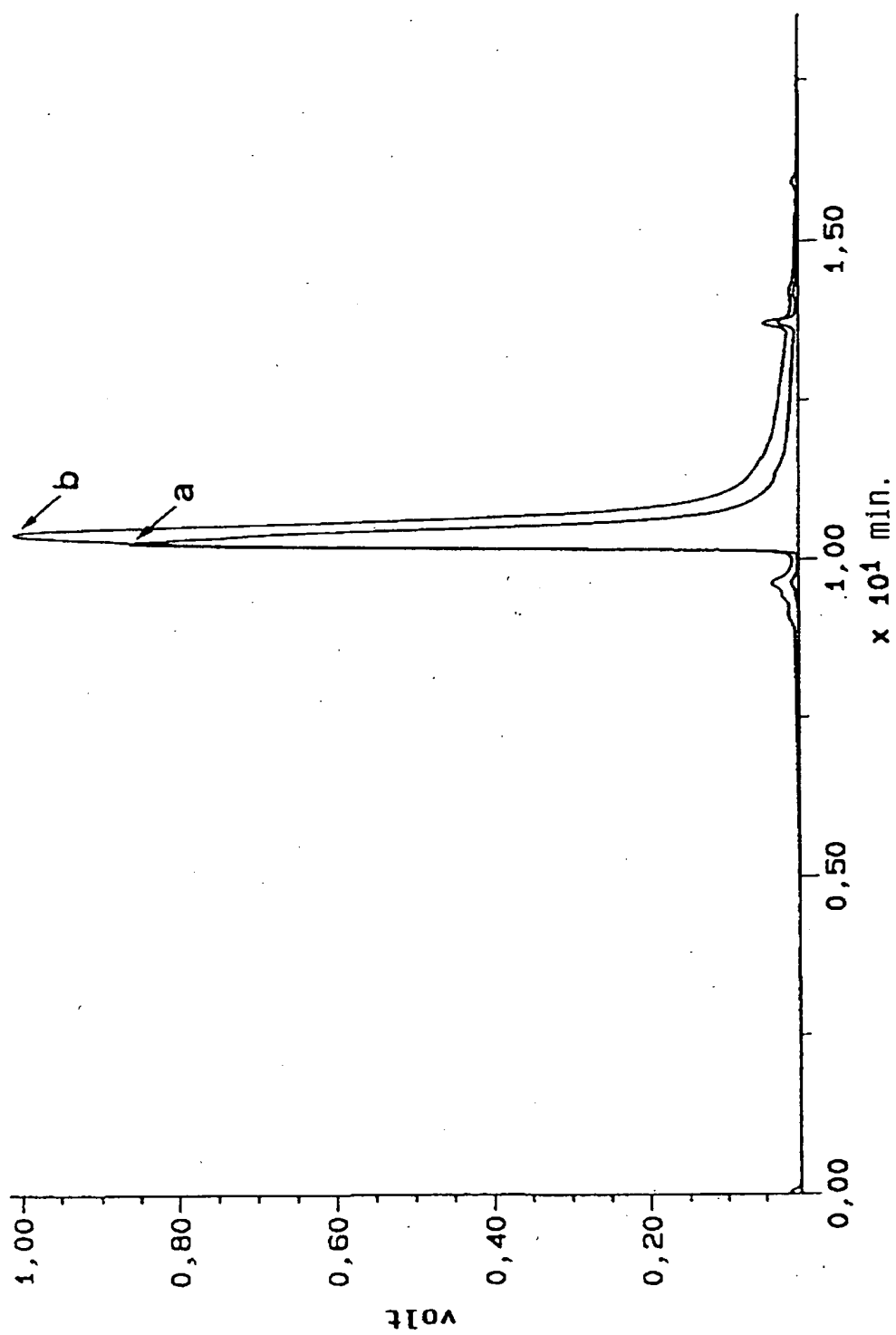


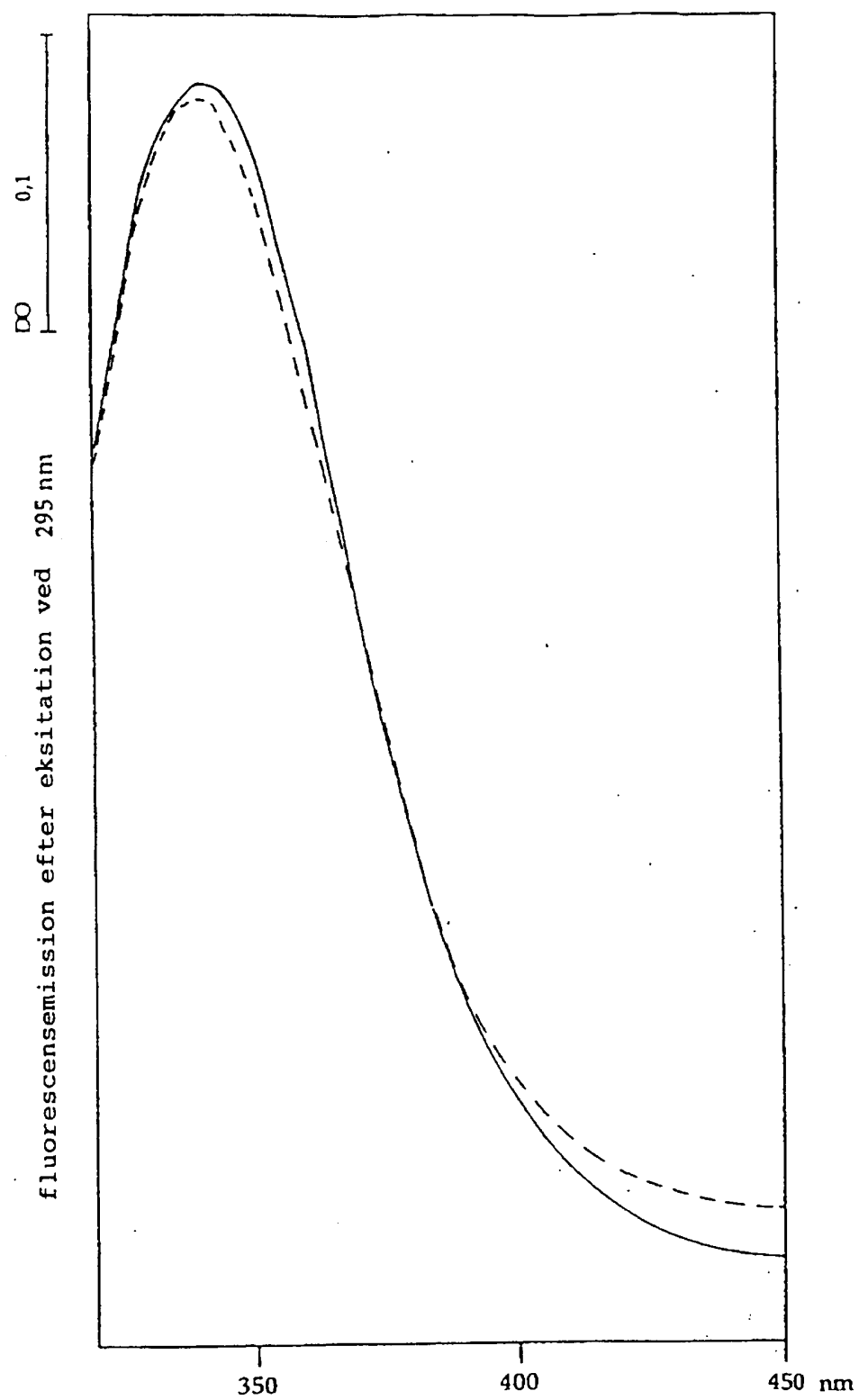
FIG_37

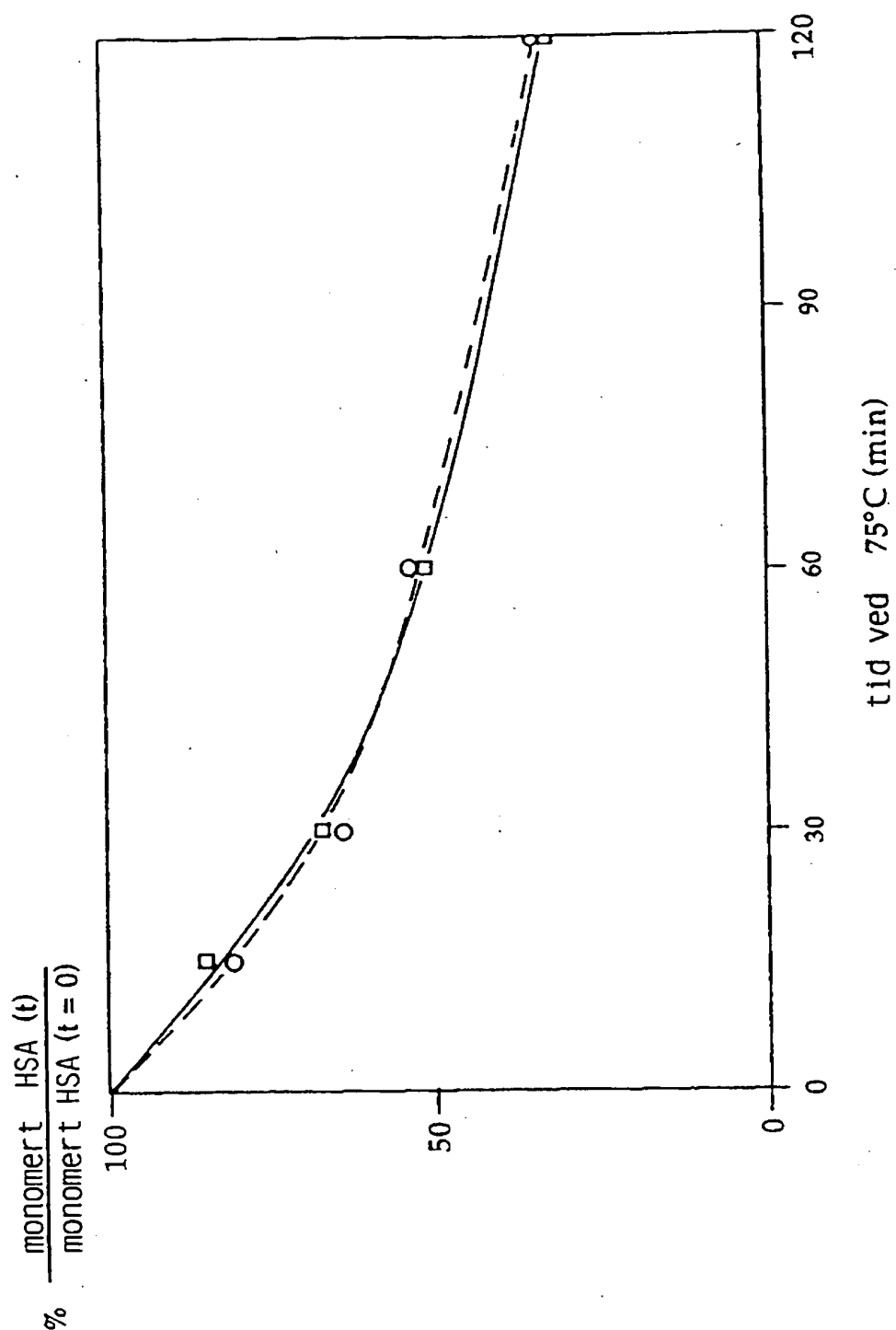


FIG_38

FIG. 39

FIG.40

FIG_41

FIG. 42

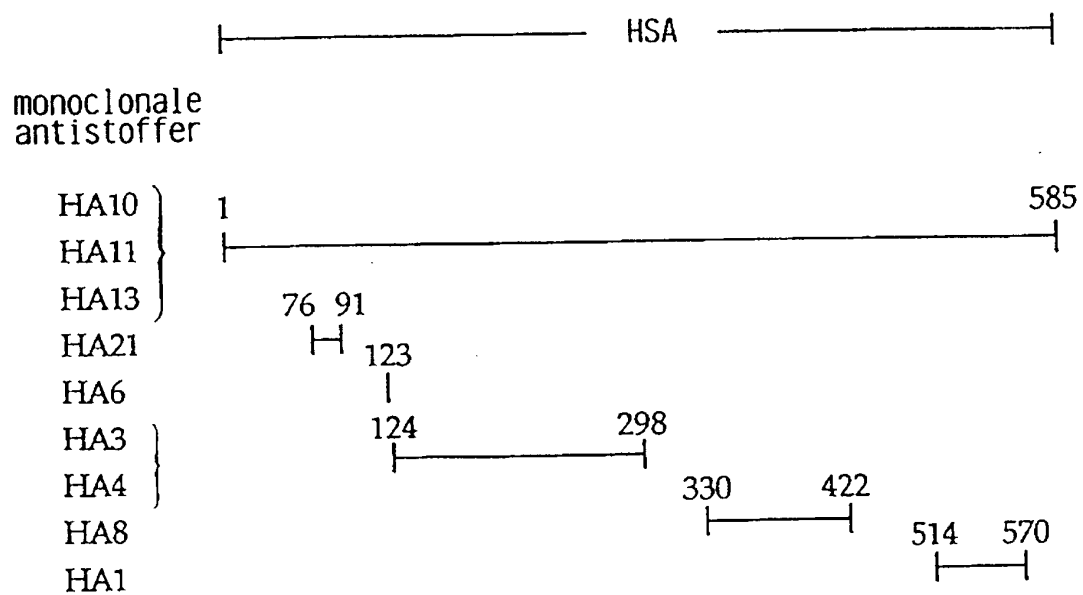
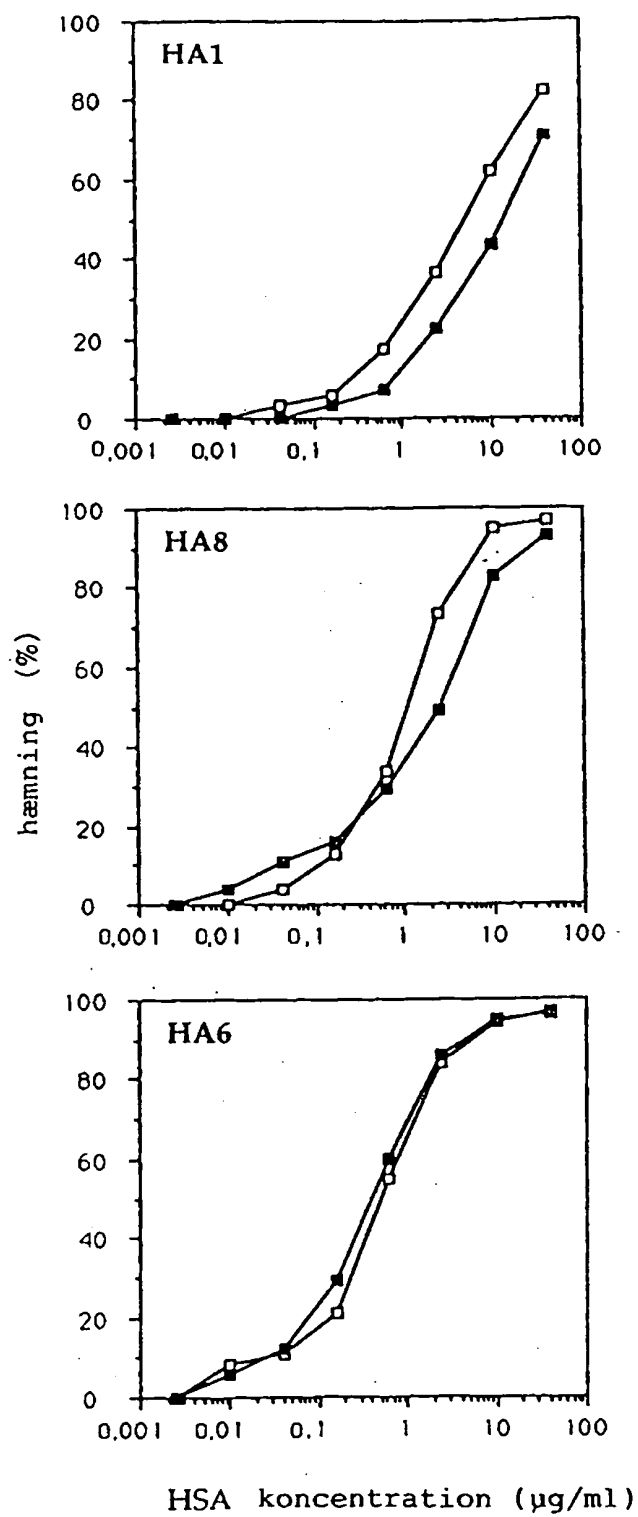
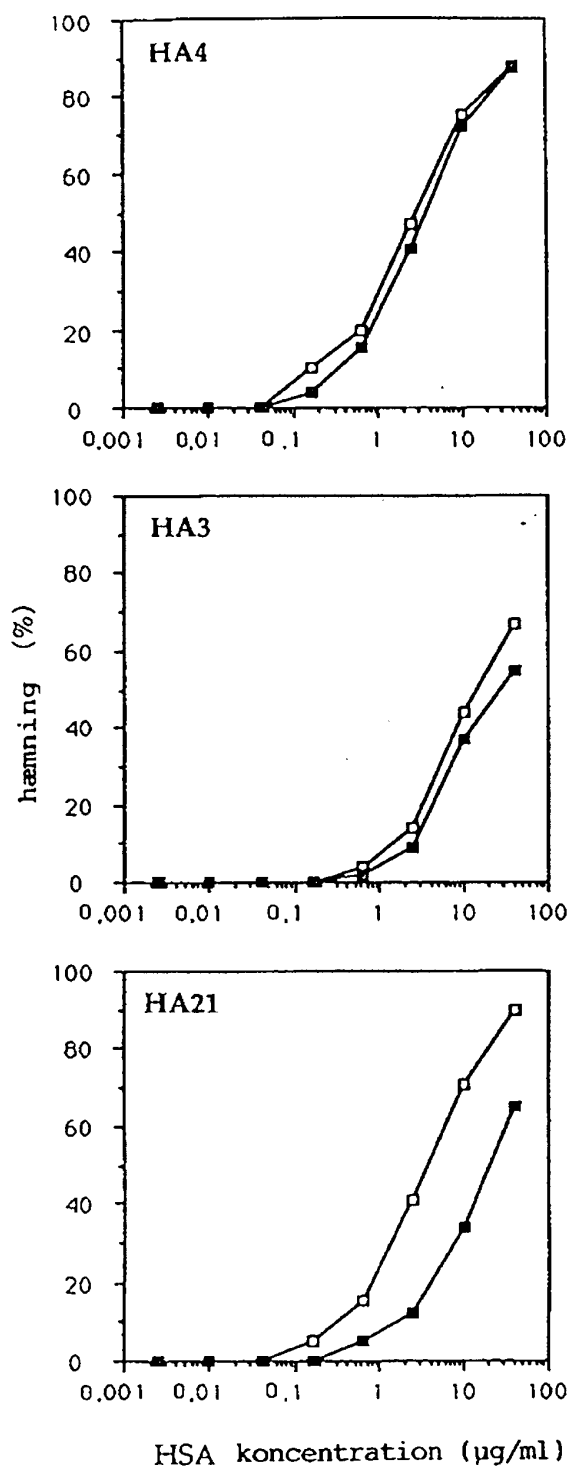
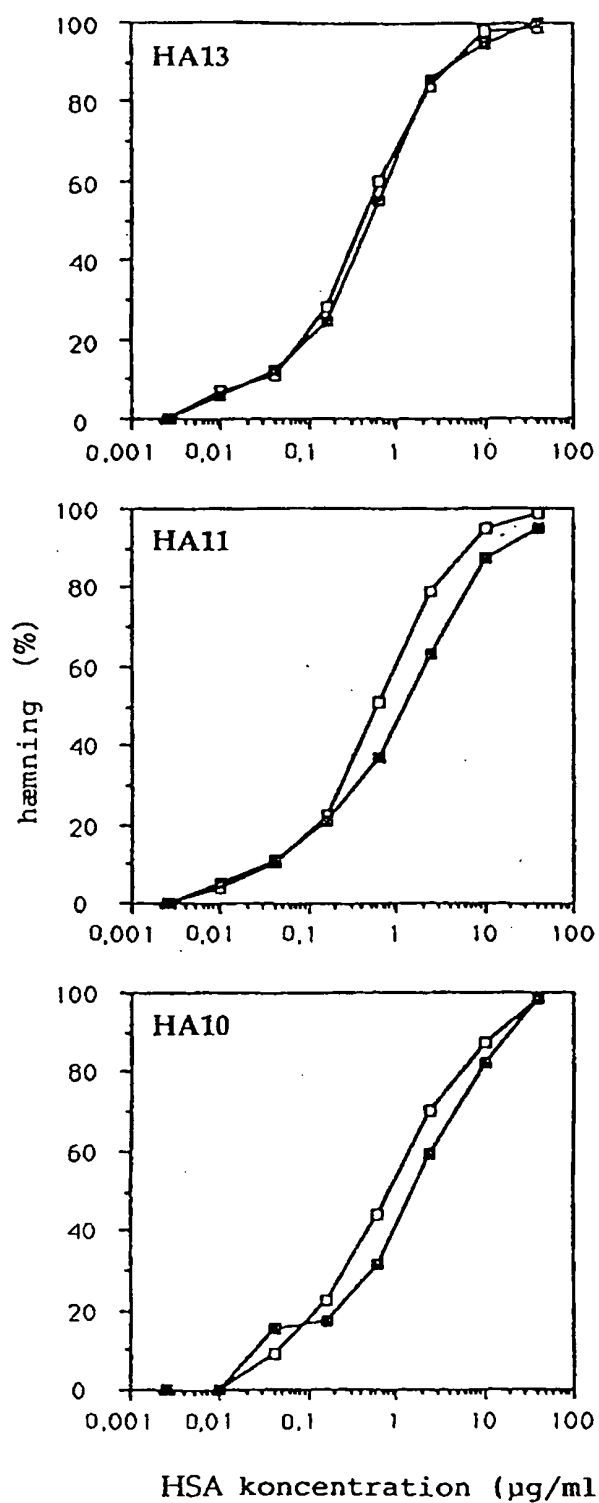


FIG. 43

FIG_44A

FIG_44B

FIG_44C