

2087/93

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

"A"

000000/93

57.948/BE

67448

NRO5 C12N 15/81, 1/19

K I V O N A T

C12P 21/02

Élesztő promoter és alkalmazása

Rhone-Poulenc Rorer S.A., Antony, Franciaország

A bejelentés napja: 1992. 04. 28.

Elsőbbsége: 1991. 04. 30. (91/05294)

Franciaország

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR92/00375

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/19751

A találmány olyan DNS szekvenciákra vonatkozik, amelyek a K. lactis PGK gén promoterének egészét vagy részét vagy származékát tartalmazzák, és transzkripciós promoter aktivitással rendelkeznek. A találmány az említett szekvenciáknak re-kombináns gének kifejezésére való felhasználására is vonatkozik.

A találmány a K. lactis PGK gén promoterének egészét vagy részét vagy származékát tartalmazzák, és transzkripciós promoter aktivitással rendelkeznek.

3087/92

**KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY**

57.948/BE

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
1011 Budapest, Dalszínház u. 10.
Tel: 153-3733, Fax: 153-3664

Y A Y

67448

WRO C 12 N 15/81, 1/19

C 12 P 21/02

Élesztő promoter és alkalmazása

RHONE-POULENC RORER S.A., Antony, FRANCIAORSZÁG

Feltalálók: FLEER Reinhard, GIF-SUR-YVETTE,

FOURNIER Alain, CHATENAY-MALABRY,

MAYAUX Jean-Francois, FONTENAY-AUX-ROSES,

YEH Patrice, PÁRIZS, FRANCIAORSZÁG

A bejelentés napja: 1992. 04. 28.

Elsőbbsége: 1991. 04. 30. (91/05294) FRANCIAORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/FR92/00375

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/19751

A találmány a molekuláris biológia területéhez kapcsolódik. Részletesebben kifejtve, a találmány egy transzkripció promoter aktivitást kifejtő új DNS szekvenciára vonatkozik, továbbá ezen szekvenciát tartalmazó expressziós vektorokra és ezek felhasználására proteinek, például heterológ proteinek termelésére. Vonatkozik még a találmány ezen DNS szekvenciát

tartalmazó rekombináns sejtekre is.

A molekuláris biológia területén megvalósult fejlődés lehetővé tette a mikroorganizmusok olyképpen való módosítását, hogy azok képesek legyenek heterológ proteinek termelésére. Különösen sok genetikai tanulmány foglalkozik az *E.coli* baktériummal. Mindazonáltal a termelés ezen új módszereinek az ipari alkalmazása még korlátozott maradt, főként azért, mivel a rekombináns mikroorganizmusokban a gének expressziójának hatékonyságával kapcsolatban problémák merülnek fel. E termelési rendszerek teljesítményének növelése érdekében kísérleteket is végeztek olyan erős promoterek izolálása céljából, melyek lehetővé teszik a heterológ proteinek magas szintű kifejeződését. *E.coli*-nál főként a triptofán és laktóz operonok promotereit lehet megemlíteni.

Az élesztővel */S.cerevisiae/* kapcsolatos legújabb kutatások a glikolízisben szerepet játszó génekből származó promoterekkel foglalkoznak. Nevezetesen, a 3-foszfoglicerát kináz */PGK/* gén promoterével [Dobson et al., Nucl.Acids, 10, 2625 (1982)], ezenkívül a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz */GAPDH/* gén promoterével [Holland et al., J.Biol.Chem., 254, 9839 (1979); Musti et al., Gene, 25, 133 (1983)], az alkohol dehidrogenáz *1(ADH1)* gén promoterével [Bennentzen et al. J.Biol.Chem., 257, 3018 (1982); Denis et al., J.Biol.Chem., 258, 1165 (1983)] vagy az enoláz *1(ENO1)* gén promoterével [Uemura et al., Gene, 45, 65 (1986)] foglalkozó munkákra lehet hivatkozni.

A közelmúltban genetikai technikákat fejlesztettek ki abból a célból, hogy a *Kluyveromyces* élesztőt gazdaként lehessen használni rekombináns proteinek termelésére. Egy *K. drosophilarum*-ból származó 2-mikron típusú plazmid (pKD1 plazmid –EP 241 435 számú európai szabadalmi leírás) felfedezése révén lehetővé vált egy nagyon hatékony gazda/vektor rendszer létrehozása rekombináns proteinek termelésére. Ugyanakkor az e rendszerben használt promotereket soha nem optimalizálták. Főként lényegében a heterológ promoterekről van szó, azaz a más mikroorganizmusokból, nevezetesen például a *S. cerevisiae*-ből származó promoterekről. Ez a helyzet különböző nehézségekkel járhat, például korlátozhatja a promoter aktivitását a transzkripció mechanizmus bizonyos elemeinek, például a transz-aktivátoroknak a hiánya miatt, bizonyos fokig toxikus hatással lehet a gazdasejtre a szabályozás valamilyen hiánya miatt, vagy befolyásolhatja a vektor stabilitását.

A *Kluyveromyces*-nél az erős homológ promoterek hiánya ilyen körülmények között korlátozó faktort jelentett ezen expressziós rendszer ipari felhasználása szempontjából.

A találmány szerint azonosítottuk, klónoztuk és szekvenáltuk a *Kluyveromyces lactis* genomjának egy olyan szakaszát, amely transzkripció promoter aktivitást fejt ki /1. ábra/. Pontosabban, ez a szakasz a *K. lactis* PGK génje promoterének felel meg. Ez a szakasz vagy származékai vagy fragmentumai igen eredményesen használhatók rekombináns proteinek termelésére *Kluyveromyces* fajhoz tartozó élesztőknél. Természetesen ezt a szekvenciát más gazdaszervezetekben szintén fel lehet használni.

Másrészt, a *Kluyveromyces* genomból izolált szakasz analízise alapján kitűnt, hogy két ellenkező irányban két leolvasási keret létezik /2. ábra/. Ez a megfigyelés arra mutat, hogy az 1. ábrán bemutatott szakasz komplementer szála a másik irányban szintén promoter aktivitást fejt ki.

A találmány tárgyát egy olyan DNS szakasz képezi, amely vagy az 1. ábrán bemutatott teljes szekvenciát vagy ennek komplementer szálát vagy ezek egy származékát tartalmazza, és e szekvenciák promoter aktivitást fejtenek ki.

A találmány szerint származéknak tekintünk minden olyan szekvenciát, amelyeket az 1. ábra szerinti szekvencia szerkezetének olyanképpen való módosításával (mutációk, deléciók, szubsztitúciók, addíciók, fragmentációk, stb. révén) kapunk, hogy megmaradjon promoter aktivitásuk. Részletesebben kifejtve, a mutációk egy vagy több nukleotidra terjedhetnek ki, és az addíciók és/vagy szubsztitúciók a szabályozó elemeket vagy az aktivátor szakaszokat – ilyenek az "UAS" szakaszok – érintetik.

Mihelyt megkaptunk egy származékot, transzkripciós promoterének aktivitását különböző módon állapíthatjuk meg, de főként úgy, hogy a tanulmányozott szekvencia szabályozása alá helyezünk egy rezisztencia gént vagy egy kiegészítő markert. A szakterületen járatosak természetesen más ismert technikákat szintén használhatnak ugyanilyen eredmény elérése céljából.

A találmány egy speciálisabb tárgyát képezi az a DNS szekvencia, mely a 6. ábrán bemutatott két nyílt leolvasási keret – ORF PGK és ORF X – közötti szakasznak felel meg.

Vonatkozik még a találmány egy olyan rekombináns DNS-re, amely az alábbiakban meghatározott DNS szekvenciát tartalmazza.

Ez a rekombináns DNS tartalmazhatja például az 1. ábra szerinti promoter szekvenciát vagy ennek származékát, amelybe egy olyan restrikciós hely van beépítve, amely megkönnyíti ennek a szekvenciának, mint "hordozható" promoternek a használatát.

Ez a rekombináns DNS ezenfelül előnyösen egy vagy több strukturális gént tartalmaz.

Még előnyösebb, ha ez a rekombináns DNS olyan szignálokat is tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a strukturális gén vagy gének expressziós termékének a szekrécióját.

A találmány egy jellemző kiviteli alakjában a rekombináns DNS egy olyan expressziós plazmid részét képezi, mely autonóm módon vagy beépülve replikálódik.

Részletesebben: akkor kaphatunk autonóm módon replikálódó vektorokat, ha a kiválasztott gazdánál az autonóm replikálódó szekvenciákat (ARS=autonomously replicating sequence) használjuk. Azaz élesztő esetén ezek ismert plazmidokból (pKD1, 2 μ , stb.) származó replikációs origók lehetnek.

Integrált vektorokhoz például úgy jutunk, hogy a gazdasajt genomjának bizonyos szakaszaival homológ szekvenciákat használunk, és így homológ rekombináció révén lehetővé válik a vektor integrálódása /beépülése/.

Az 1. ábrán bemutatott szekvenciát úgy kapjuk, hogy egy teljes *Kluyveromyces lactis* genomiális DNS bankot szűrünk egy

a *S.cerevisiae* PGK génjéből származó heterológ szondával.

A találmány szerint ténylegesen kimutatjuk, hogy *S.cerevisiae* génnek megfelelő heterológ szondákkal való hibridizálással a Kluyveromycesnél promoter szakaszt tudtunk klónozni. Ebből a szakaszból lehetett izolálni ezután a génen belüli szakaszt, mégpedig restrikciós helyek beépítésével, mikoris PCR amplifikációs technikát használtunk a példákban ismertetett módon.

A találmány vonatkozik olyan sejtekre is, melyek még egy, fentiekben meghatározott DNS szekvenciát tartalmaznak. Előnyös ha a sejteket élesztő sejtek közül választjuk ki, és még előnyösebb, ha a kiválasztás *Kluyveromyces* fajhoz tartozó élesztők közül történik. Mindazonáltal magától értetődik, hogy a találmány minden olyan rekombináns sejtre vonatkozik, amelyekben a találmány szerinti promoter szakaszok működnek.

Ezeket a sejteket minden olyan módszerrel elő lehet állítani, amelyek lehetővé teszik, hogy idegen DNS-t vezessünk be egy sejtbe. Ilyen eljárás lehet például a transzformálás, az elektroporáció vagy az e szakterületen ismert minden más technika.

További tárgyát képezi a találmánynak az előzőekben meghatározott szekvencia felhasználása rekombináns gének expressziójára.

Amint ezt a példák szemléltetik, a találmány szerinti DNS szekvenciák ténylegesen lehetővé teszik a rekombináns proteinek magas szintű termelését.

Egyébként a találmány szerinti szekvenciák kétirányú promoter aktivitása következtében, felhasználásuk különösen előnyös. Ugyanis ezeket a szekvenciákat két lehetséges irányban

használhatjuk, több strukturális gén egyidejű kifejezésére.

A találmány ezenfelül az előbbieken meghatározott valamely szekvenciának, rekombináns gének két ellenkező irányban történő egyidejű kifejezésére szolgáló, előnyös felhasználására is vonatkozik.

A találmány szerinti szekvenciákat előnyösen használhatjuk a gyógyszergyártásban, a mezőgazdaságban vagy az élelmiszeriparban fontos proteinek kódoló gének kifejezésére. Példaként megemlíthetjük az enzimeket (ilyenek például a szuperoxid diszmutáz, a kataláz, az amilázok, lipázok, amidázok, a kimozin, stb.), a vérszármazékokat (ilyenek a szérum albumin, az alfa- vagy a béta-globin, a VIII faktor, a IX faktor, a van Willebrand faktor, a fibronektin, az alfa-1-antitripszin, stb.), az inzulint és változatait, a limfokineket [ilyenek az interleukinek, interferonok, a telep stimuláló faktorok (G-CSF, GM-CSF, M-CSF,...) a TNF, a TRF, stb.], a növekedési faktorokat (ilyenek a növekedési hormonok, az eritroprotein, az FGF, RGF, a PDGF, a TGF, stb.), az apolipoproteineket, a vakcina készítéshez (hepatitis, cytomegalovirus, Epstein-Barr vírus, herpes vírus) szolgáló, antigénhatású polipeptideket vagy még az olyan fuzionált polipeptideket, melyekben egy aktív rész egy stabilizáló részhez van fuzionálva [például: az albumin vagy albumin fragmentumok fúziója egy vírus receptorral (CD4, stb.) vagy receptor résszel].

A találmányt részletesebben ismertetjük a példák segítségével, azonban ezek csak a szemléltetés célját szolgálják, és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

Az alábbiakban az ábrák magyarázata következik.

1. ábra: A *K.lactis* PGK génjének transzlációs iniciációs kodonjától 5'-irányban lévő kromoszómális fragmentum 2,2 kb méretű szakaszának nukleotid szekvenciája, amely promoter aktivitással rendelkezik.

2. ábra: A nyílt leolvasási keretek analízise. A függőleges fél-vonalak képviselik a transzlációs iniciációs kodonokat. A teljes függőleges vonalak a stop kodonokat jelzik. A világos területek a leolvasási kereteket jelentik (ORF X és ORF PGK).

3. ábra: A pYG610 plazmid restrikciós térképe. A fekete szakasz a *K.lactis* genomból izolált szakasznak felel meg.

4. ábra: A 2,5 kb méretű XbaI fragmentum szekvenálási stratégiája.

5. ábra: Az 1. ábra szerinti szekvencia ATG kodonjához viszonyított – 6 pozícióba egy HindIII hely bevezetésére végzett PCR reakcióban használt oligodezoxinukleotidok szekvenciája és helyzete. Az oligodezoxinukleotidokat dőlt betűkkel ábrázoltuk. Az ATG a PGK gén transzlációs iniciációs kodonjának felel meg.

6. ábra: A 2,2 kb hosszú fragmentum intergenikus szakaszának nukleotid szekvenciája. 6(a): a PCR reakcióban használt oligodezoxinukleotidok. 6(b): Sall-HindIII fragmentum, mely az 1. ábra szerinti szekvencián az 1343-tól 2246-ig terjedő nukleotidoknak felel meg.

7. ábra: A pYG45 plazmid szerkesztésének stratégiája.

8. ábra: A humán szérum-albumin expressziós kazetta szerkesztésének stratégiája.

9. ábra: A pYG65 plazmid szerkesztésének stratégiája.

10. ábra: A pYG70 plazmid szerkesztésének stratégiája.

11. ábra: A pYG72 plazmid szerkesztésének stratégiája.

12. ábra: A pYG621 plazmid szerkesztésének stratégiája.

13. ábra: A K.lactis PGK promoter szabályozása alatt álló humán albumin gén expressziójának vizsgálata Northern blot analízissel. A minták 10 μ g össz RNS-nek felelnek meg. A 18S és 28S jelölés a 18S és 28S riboszómális RNS helyzetét jelzik. ALB = az albumin génnek megfelelő szonda által felismert fragmentumok; URA = a K.lactis URA A génjének megfelelő szonda által felismert fragmentumok, melyek a felvitel kontrolljául szolgálnak.

14. ábra: Albumin termelés meghatározása a K.lactis PGK promotert tartalmazó pYG621 expressziós vektorral transzformált törzsekben. A minták 30 μ l tenyészet felülúszónak felelnek meg. A 66 kD-nak megfelelő marker szintje az albuminnak felel meg. M = molekulatömeg markerek; bovin szénsav anhidráz (31 kD), ovalbumin (45 kD), BSA (bovin szérum albumin, 66 kD), nyúl foszforiláz b (92 kD).

1.példa:

A K.lactis PGK gén promoter szakaszának izolálása

Az 1. ábra szerinti szekvenciához úgy jutottunk, hogy a Kluyveromyces lactis CBS 2359 törzs egy teljes genomiális DNS bankját átszűrtük egy S. cerevisiae PGK gén eredetű heterológ szondával [Dobson et al., Nucl.Acids, 10, 2625 (1982)].

Pontosabban, a használt szonda a *S. cerevisiae* PGK gén 1,3 kb hosszú PvuI-EcoRI N-terminális fragmentumának felelt meg.

A Southern blot vizsgálatban [Southern et al., J.Biol. Chem., 98, 503 (1975)] használt szonda két különböző fragmentummal hibridizált, ha a genomiális DNS-t XbaI-gyel emésztettük. Az egyiket, mely körülbelül 2,5 kb méretű volt, úgy izoláltuk, hogy az XbaI-gyel hasított DNS fragmentumokból — amelyeket a pUC18 plazmid XbaI helyére vezettünk be, és amelyek egy részének a hossza 2 és 3 kb között volt — álló *K. lactis* CBS2359-ből származó hasított genomiális bankot szűrtük. Ilyen módon egy 500 klónból álló bankot létesítettünk, melyet ezután a fent leírt módon heterológ szondával szűrtünk.

A telepek hibridizálása révén egy klónt tudtunk azonosítani, melyből plazmid DNS-t izoláltunk. Ez a plazmid (pYG610) egy 2,5 kb méretű genomiális DNS fragmentumot tartalmazott, amelynek restrikciós térképét a 3. ábra mutatja be. A pYG611 plazmid ugyanezt az inszertumot tartalmazza ellenkező irányban (lásd a 8. ábrát).

Egy második lépésben az így izolált 2,5 kb méretű fragmentumot Sanger módszerével [Sanger et al., Proc.Natl.Acad. Sci., 74, 5463 (1977)] szekvenáltuk. Ennek érdekében a pYG611 plazmidból származó fragmentumot előzőleg az M13tg130 és M13tg131 bakteriofágba szubklónoztuk. A fragmentum szekvenálásának stratégiáját a 4. ábrán mutatjuk be vázlatosan.

A szekvencia-analízis kimutatta, hogy az izolált fragmentum egy olyan részt tartalmaz, mely a *Kluyveromyces lactis* P_{gk} proteinjének N-terminális szakaszát kódolja (0,3 kb) és egy 2,2 kb méretű részt, mely a promoter szakasznak felel meg s ez a transzláció kezdőpontjától 5' irányban helyezkedik el.

Az analízis azt is kimutatta, hogy a PGK génhez képest az ellenkező irányban egy második leolvasási keret található, amely körülbelül 0,9 kb távolságra helyezkedik el a PGK gén ATG kodonjától 5' irányban (2. ábra).

Ennek a szekvenciának és a *S.cerevisiae* eredetű PGK gén promoter szekvenciájának az összehasonlításából kitűnik a jellemző homológia hiánya, főként a szabályozó elemek terén. Ez a szekvencia tehát egy teljesen eredeti promoter szakasznak felel meg, mely strukturális szempontból és ennek következtében a szabályozás szempontjából, teljesen különbözik a már leírtaktól.

2. példa:

Expressziós vektorok szerkesztése heterológ proteinek termeléséhez.

Ebben a példában az 1. ábrán bemutatott szekvencia 2,2 kb méretű szekvenciájának és a származék szekvenciáknak a promoter teljesítményét szemléltetjük.

a) Restrikciós hely bevezetése az ATG-hoz viszonyított -6 pozícióba.

Ennek a helynek a beépítése után lehetővé válik, hogy a kapott promotertől 3' irányban minden olyan gént bevezessünk, amelyet ki óhajtunk fejezni. A meglévő expressziós vektorokkal való kompatibilitás érdekében (EP 361 991 számú európai szabadalmi leírás) "hordozható" promotereket szerkesztettünk SalI-HindIII fragmentumok formájában.

Egy HindIII helyet vezettünk be a PGK gén transzlációs iniciációs helyéhez (ATG) viszonyított -6 pozícióba PCR amplifikációs technika segítségével [Mullis et al., Met.Enzymol., 155, 335 (1987)]. Ebből a célból két oligonukleotidot használtunk, melyek az 5. ábrán láthatók.

Az A oligonukleotid az ATG kodontól 3' irányban a 467. bp-nál, egy HindIII helynél lévő szekvenciának felel meg. Az itt lévő HindIII hely az amplifikáció következtében SalI helyre cserélődik ki. A B oligonukleotid az iniciációs helytől 3' irányban elhelyezkedő szekvenciának felel meg, és a -6 pozícióba egy HindIII hely bevezetését teszi lehetővé.

A PCR-rel kapott fragmentumot az M13tg130 bakteriofágban a SalI és HindIII hely közé építjük be abból a célból, hogy szekvenálással meggyőződjhessünk, miszerint az amplifikációkor nem következett be mutáció.

b) Humán szérum-albumin expressziós kazetták szerkesztése (8. ábra)

A fentiek szerint kapott 474 bp hosszú rekombináns DNS-t a SalI és HindIII helyeknél beépítettük az pYG45 plazmidba (7. ábra), és így kaptuk a pYG614 vektort (8. ábra). A pYG45 plazmid egy olyan expressziós kazettát tartalmaz, amely a *S.cerevisiae* PGK génjének a promoteréből és terminátorából áll, és ezek közé — egy HindIII helynél — be van építve a humán preproszerumalbumint kódoló gén. A pYG45 a pYG18 plazmid származéka (lásd az EP 361 991 számú európai szabadalmi leírást), melyet úgy szerkesztünk, hogy a HSA expressziós

kazettát tartalmazó SalI-BamHI fragmentumot a pIC-2ORDH megfelelő helyeire klónozzuk be (7.ábra). A pIC 2ORDH plazmidhoz úgy jutunk, hogy HindIII enzimmel emésztjük a pIC-2OR plazmidot [March et al., Gene, 32, 481 (1984)], a végeket betöltjük az E.coli polimeráz KlenowI fragmentje segítségével, és T4 DNS ligázzal recirkularizáljuk.

A pYG614 plazmidból emésztéssel izoláljuk a SalI-SacI fragmentumot, mely az 1. ábrán bemutatott szekvenciából származó promoter szakaszt, az albumin gént és a *S.cerevisiae* gén terminátorát tartalmazza. A fragmentum egy expressziós kazettát képez, melyet be lehet építeni egy plazmidba, expressziós vektor előállítására céljából.

A pYG614 plazmidból kiindulva egy másik expressziós kazettát kaphatunk úgy, hogy az AflII-SacI fragmentumot, amely a találmány szerinti PGK promoter egy részét, az albumin gént (prepro-HSA) és a *S.cerevisiae* PGK terminátorát tartalmazza, beklónozzuk az előbbiekben leírt pYG611 plazmidba. Így kapjuk a pYG615 plazmidot. A SalI-SacI fragmentum, amely a teljes 1. ábra szerinti promoter szakaszt, a preprosérumalbumint kódoló gént és a *S.cerevisiae* PGK gén terminátorát tartalmazza, emésztéssel izolálható. Ez a fragmentum egy másik olyan albumin expressziós kazettát alkot, amely a találmány szerinti promoter szekvenciát használja.

c) Albumin expressziós vektorok szerkesztése.

Az albumin expressziós vektorokat úgy szerkesztjük meg, hogy a fentiek szerint kapott expressziós kazettákat beépítjük *K.lactis*-*E.coli* ingázó plazmidokba, mint amilyen a pYG72 plazmid

(10. ábra). Részletesebben, expressziós vektort úgy szerkesztünk (pYG621), hogy a pYG615 SalI-SacI fragmentumát, mely az albumin expressziós kazettát tartalmazza, beépítjük a pYG72 vektorba (lásd a 10. ábrát). Ez a vektor a pKan707 plazmidnak felel meg (lásd az EP 361 991 számú európai szabadalmi leírást), melyből az URA3 gént tartalmazó SacI fragmentumot, valamint az aph génben lévő egyetlen HindIII helyet altávolítottuk, hogy megkönnyítsük a későbbi szerkesztéseket. Az aph gén az aminoglikozid-3'-foszfotransferáz (I)-et kódolja [Oka et al., J.Mol.Biol., 147, 217 (1981)], és élesztőnél a G418 elleni rezisztencia markereként használják. A pKan707 plazmid PstI fragmentumát, mely az aph gént tartalmazza, beklónozzuk az M13mp7 bakteriofágba, hogy előállítsuk a pYG64 vektort (9. ábra). A génben jelenlévő HindIII helyet elbontjuk a Taylor által leírt [Taylor et al., Nucleic.Acid.Res., 13, 8749 (1985)] módszer szerint végzett mutagenizálással. A kapott plazmid pYG65 elnevezést kapott (9. ábra). A mutagenézishoz használt oligodezoxinukleotid szekvenciája a következő: 5'-GAA ATG CAT AAG CTC TTG CCA TTC TCA CCG- 3', mely a 185. aminosavat (Leu) kódoló CTT tripletet CTC-re transzformálja. Ez a változás nem módosítja a kapott protein szekvenciát. A pYG72 plazmid szerkesztése céljából a pKan707 vektor bakteriális replikonját tartalmazó részt EcoRI enzimmel való emésztéssel izoláljuk, majd T4 DNS ligázzal végezzük a recirkularizációt, hogy a pYG69-hez jussunk. Ez utóbbi vektor PstI fragmentumát, mely az aph gént tartalmazza, a pYG65-ből származó, mutált, azonos értékű fragmentummal helyettesítjük. A pKD1 EcoRI és SacI helye között lévő 4,7 kb

méretű szekvenciát bevezetjük ez utóbb említett vektorba, és így kapjuk a pYG72 vektort. A pYG621 vektort (11. ábra) úgy állítjuk elő, hogy a pYG615-ből származó albumin expressziós kazettát tartalmazó SalI-SacI fragmentumot beépítjük a pYG72 vektorba.

3. példa

A promoter szakasz két irányba történő használatára szolgáló kazetta szerkesztése.

Ezt a szerkezetet úgy állítjuk elő, hogy egy a 2. ábrán ORF PGK és ORF X jelöléssel ellátott két leolvasási keretben lévő szakaszba — vagyis az 1. ábra szerinti 1343. és 2246. nukleotidnál — kölcsönösen egy SalI és egy HindIII helyet vezetünk be.

Ezt a szerkezetet PCR technikával állítottuk elő, egyrészt az A oligonukleotid segítségével, mely egy SalI helyet vezet be a PGK gén transzlációs iniciációs helyéhez viszonyított -1 pozícióba, másrészt a B oligonukleotid segítségével, amely egy HindIII helyet vezet be az X gén transzlációs iniciációs helyéhez viszonyított -1 pozícióba [lásd a 6(a) ábrát]. Ezután, hogy a promoter szakaszban jelenlő egy HindIII helyet eltávolítsunk 3 PCR reakciót végeztünk, mindegyik lépésben a pYG610 plazmidnak, mint mátrixnak a használatával:

- a két első lépésben vagy az egyik vagy a másik HindIII hely szakaszainak a sokszorozására az A és B digonukleotidok, illetve ezeket a C és D oligonukleotidokhoz kapcsolva használtuk (6. ábra). E két utóbbi komplementer, és lehetővé teszi pontmutáció bevezetését a belső HindIII helynél;

- az utolsó lépésben, az előző sokszorozásnál kapott két terméket primereként használva állítottuk elő a módosított promoter szakaszt tartalmazó végső fragmentumot.

Ezt a fragmentumot ezután a 2. példában leírt vektorokba vezethetjük be, és mint kétirányú promotereket használhatjuk.

4. példa

Albumin kifejezése

A pYG621 vektort transzformálás révén vezetjük be — etilén-glikol/dimetil-szulfoxid technikával [Durrens et al., Curr.Genet. 18, 7 (1990)] — a *K. lactis* MW98-8C törzsbe (CBS 579.88). Ez a törzs a CBS 2359 vad törzs származéka, és a következő genotípushoz tartozik: MAT- uraA, lysA, argA, K+, cir. A transzformált élesztő sejteket a pYG621 plazmidból származó "G418-rezisztens" fenotípusra szelektáljuk, 0,2 g/l geneticint tartalmazó YPD táptalajban (10 g/l élesztő kivonat, 20 g/l pepton, 20 g/l glükóz). Az expressziós kazettát nem tartalmazó pYG72 plazmiddal transzformált törzseket azért szelektáltuk, hogy kontrollként szolgáljanak a termelés ellenőrző vizsgálataiban. Egyébként, hogy összehasonlítsuk a találmány szerinti *K. lactis* PGK promoter hatékonyságát a *S. cerevisiae* PGK promoterével, a PyG19 vektorral transzformált törzseket szintén szelektáltuk. A pYG19 vektor analóg a pYG621 vektorral, kivéve hogy az albumin gén a *S. cerevisiae* PGK promotere szabályozása alatt áll (EP 361 991 számú európai

szabadalmi leírás).

a) Az mRNS-ek analízise.

A sejteket 0,2 g/l geneticint tartalmazó YPD szelektív táptalajban (10 g/l élesztő kivonat, 20 g/l pepton, 20 g/l glükóz) 28 °C-on tenyésztjük. A sejtekből kivonjuk az összes RNS-t [Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, (1986) 143. oldal], és agarózgél elektroforézissel elválasztjuk. Az RNS-eket egy a pYG18 vektorból származó (7. ábra) albumin strukturális génnek (1,9 kb méretű HindIII-HindIII fragmentum) megfelelő szondával hibridizáljuk, Northern blot módszert alkalmazva [Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)]. Az autoradiográfia világosan kimutat egy albuminra specifikus 2,3 kb méretnek megfelelő sávot (13. ábra). Ezenkívül tisztán látható, hogy az albumin gén transzkripciójának a mértéke a táplálmány szerinti promoter szakaszt (pYG621) tartalmazó törzsekben jóval magasabb, mint az érintetlen *S. cerevisiae* PGK promotert (pYG619) tartalmazó sejtekben.

b) A proteinek analízise

A sejteket 0,2 g/l geneticint tartalmazó szelektív YPD táptalajban (10 g/l élesztő kivonat, 20 g/l pepton, 20 g/l glükóz), rázott Erlenmeyer lombikokban, 28 °C-on tenyésztjük. A tenyésztést 96 órán át folytatjuk, majd a felülúszóból 30 µl-t kiveszünk, és azonos mennyiségű 2x Laemmli pufferhez [Laemmli, Nature, 227, 680 (1970)] keverjük. A mintát ezután 10 percig 96 °C-on melegítjük, majd a mintában lévő proteineket 8,5 %-os SDS poliakrilamid gélben választjuk el. Az albumin termelést

ezután úgy bizonyítjuk, hogy a gélt Coomassie kékkel festjük meg. Ezután értékeljük ki a felhasznált különböző vektorokat. A 14. ábra mutatja, hogy a pYG621 vektorral transzformált MW98-8C törzs négy külön szelektált klónja sokkal több albumin szekretál, mint azok, amelyeket a pYG19 vektorral transzformáltunk.

Nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti promoterrel olyan kiváló albumin termelést lehet elérni élesztőben, mely felülmúlja a *S. cerevisiae* PGK promoterével elérhető termelést. Ez a szakasz vagy ennek rövidebb formái vagy származékai fontos ipari eszközökként jönnek számításba a mikrobiológiai és főként különösen az eukarióta termelési rendszerekben.

Szabadalmi igénypontok

1. DNS szekvencia, azzal jellemezve, hogy a teljes 1. ábra szerinti szekvenciát vagy ennek részét vagy komplementer szálát vagy származékát tartalmazza, és transzkripció promoter aktivitással rendelkezik.

2. Az 1. igénypont szerinti szekvencia, azzal jellemezve, hogy a 6(b) ábrán bemutatott szekvencia egészét vagy részét tartalmazza.

3. Rekombináns DNS, azzal jellemezve, hogy az 1. vagy 2. igénypont szerinti DNS szekvenciát tartalmazza.

4. A 3. igénypont szerinti rekombináns DNS, azzal jellemezve, hogy ezenkívül egy vagy több strukturális gént tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti rekombináns DNS, azzal jellemezve, hogy olyan szignálokat is tartalmaz, melyek lehetővé teszik az illető strukturális gén vagy gének expressziós termékeinek szekrécióját.

6. A 3-5. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns DNS, azzal jellemezve, hogy egy olyan expressziós plazmid részét képezi, melynek replikációja autonóm módon megy végbe, vagy mint integrált elem.

7. Rekombináns sejt, azzal jellemezve, hogy egy, az előző igénypontok bármelyike szerinti DNS vagy rekombináns DNS szekvenciát tartalmaz,

8. A 7. igénypont szerinti rekombináns sejt, azzal jellemezve, hogy ez egy élesztő sejt.

9. A 8. igénypont szerinti rekombináns sejt, azzal jellemezve, hogy a Kluyveromyces fajhoz tartozó élesztőről van szó.

10. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti DNS szekvencia felhasználása rekombináns gének kifejezésére.

11. A 10. igénypont szerinti felhasználás a rekombináns gének két ellenkező irányban történő egyidejű kifejezésére.

12. A 10. vagy a 11. igénypont szerinti felhasználás gyógyszeripari vagy mezőgazdasági-élelmiszeripari fontosságú proteinek kódoló gének kifejezésére.

13. Rekombináns protein előállítására szolgáló eljárás az említett protein génjének gazdasejtben való expressziója révén, azzal jellemezve, hogy az illető gén expressziója egy az 1. igénypont szerinti szekvencia szabályozása alatt történik.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a protein a szérumalbumin.

10 oldal
+ 14 oldal
24 oldal
jellemezve a szérumalbumin
szel

A meghatalmazott
Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Társaság tagja
H-1061 Budapest, Dózsa György út 10.
Telefon: 153-7763, Fax: 153-3664

10 20 30 40 50 60 14/1
TCTAGATTTA GCGGGTCATC GAAATTTAGT AGCGAGTCTA TTAGGGACCA GAGTTGCAAC
70 80 90 100 110 120
CTGAGGTTTA ATGCGTCATC CTGTCGTTGC TTCAAGTTCC CCACTTGAAT CACTTGACA
130 140 150 160 170 180
AACC GTTTCA TTGGTTTGAG GAAGGTGACG GATCTGGGTA GAAACTGGAC TACTGCATCT
190 200 210 220 230 240
GTTGGTAGTC TTGATGCCAT GGTGATGAGC CATTGCCATT GGAAAAGAGT GAATTCAGAT
250 260 270 280 290 300
TCCAAGATTT GGTCAATGAT TGATTTTGTG AGATTGAGAT CGTAATCCTG ATACTCTTTG
310 320 330 340 350 360
AGCCATGTTT CCAACAGTTC TTCGGAATCT GCCGGTGTGG AAACGAGTAT TTCGGAGTAC
370 380 390 400 410 420
AATCTCGGTG GTTGC GTTAT CTGAGAGGAT GGTGTAGTGG TTTGATGTTG CTGTGTGAAA
430 440 450 460 470 480
GATGATGCAG AGCTGATCAA CGATTGCAAC TGGGAGATCA CTTCTGTTAC TTCTTCCTGG
490 500 510 520 530 540
TTCCCGTTAC CTGTTTGC GTTTCCTCATAC ATTGGTACGC TATCCTCATC TTCAGATAAC
550 560 570 580 590 600
GAAATATCAA ACTCATCGGA ATCGGACGCG TCGTTCAAAT CGCCCTCATC CTTGGTAATG
610 620 630 640 650 660
TTCTTGAACC GGTCGAGAAG GTTGAGAATC TCTGTGCGAA CACCACCCTG CGGCGTATAC
670 680 690 700 710 720
CAGAACCAGA ATAAATTGTA GCACATCTTA ACTTTCTCTA AGGAAACATC TGAACCTCTGA
730 740 750 760 770 780
TCAACGCATT CCGTAAGTAT ACTGTTTGCC TTGTCTCTGG TGAATTTATG AGGGTAAGAC
790 800 810 820 830 840
TCTGAGATCA TAAGTAACTG TTGAGCATCG AAGTTGTTGT AGTTTGAAAT TAGGGATCTG
850 860 870 880 890 900
GAAAGATGCG GTACCACTGC TTTGATGACA TTATCTGGCG GGTCAACGG TACCAATTCC
910 920 930 940 950 960
TGCAAGAATA GCGAATCCAA CGGTTTTAAC TCAGAGTAAT GGTTGATCAA CTCGATGAAA
970 980 990 1000 1010 1020
ACGTCCCAAT GGATGGATTG CATCAAGTGT TGATGTTCCA CCAAATTAAG ACAATATTTT
1030 1040 1050 1060 1070 1080
GTAACGTTTT CGAGTGAAAC TGACACGGGC CTGCCCTCAG CACTCGTAGA CACGAGTAAC
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GTCTTGAGAC CTCTCGTACA GGGAAGCGAC ATATCGTTCA ATAGACTATG GAACAAAGTG
1150 1160 1170 1180 1190 1200
TACACCGCAG CGATATCCTT GCATTTGCAA AACGATTGAA TAAGTGACGT CGATGCTAAA
1210 1220 1230 1240 1250 1260
TCCTGGATAA GTACGCTGGT ATCGTGTAAG CCCATGAGAA CGACACGTTT CTCATCACTA

1. ábra

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dózsa György út 10.
Telefon: 153 3213, fax: 153 3214

1270 1280 1290 1300 1310 1320 14/2
GAAGCCGAAC TGTGTCTTC AGTGGGGATT GGTTCGACAT TTTGCCAATT GCTGTGCGATG

1330 1340 1350 1360 1370 1380
TACCCTTTCA AAGCCATGTA CCTTAAATCT TCATCCTTGG CAAGTAGATT CATCGGGTGT

1390 1400 1410 1420 1430 1440
GTTTGAAGTA AGAATATTTG CTTGTTTTTA TGGTATCAAA GGTATATGTT GTAGAAGACA

1450 1460 1470 1480 1490 1500
ATTTCCGGTA ATCCAATTGT CTGTCTGCTC AGTTTAGCAC ATGTATAGTA CGTTGCACAT

1510 1520 1530 1540 1550 1560
AGTCTACAAT ATTCAGCATT CAGCATTGAG TATACAGCAT ATGGCTAAAT GATCACAAAT

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GTGATTGATG ATTTGACACG ACTAGAAAAG AGAACGAAAA AGGGAAATTC ATGTCACGTG

1630 1640 1650 1660 1670 1680
CGTTGGCAGC TGACATGGAA TATCGAAGAA AGAAAAAATA AAACGATCTC GTCCTAGTGG

1690 1700 1710 1720 1730 1740
AAGCCCAGAG TCTGGTCCCC CCGGAGTCTT CCCAAAACAA GAAGCTGACA CATGTTGACA

1750 1760 1770 1780 1790 1800
CAGAACACCC CACAGCAAAT GCACCACGCT ACGTAGATCA GGAAGCTTAA CTCTAGCGAC

1810 1820 1830 1840 1850 1860
CTGTGCGCTCG CCCACAGAA CCTCACCCGA GAACCACACA TTACACGCCG CCAGCTCCCA

1870 1880 1890 1900 1910 1920
CTATACTCAT CTTGCTTCCC TTAAGCGTTC TCACGATTG TTCGCTGCCC TTCTTCAAGA

1930 1940 1950 1960 1970 1980
GTCTTCTGAT TCTAATTCTC ATTGGAATC CTCTACAGTT AATGAATTGC TTGACATGAC

1990 2000 2010 2020 2030 2040
ATTCATTGTC TCATGGTTTT GGCTTTTTGG CTTTTGTCTT TTAAAGCTAT ATCAACTTTA

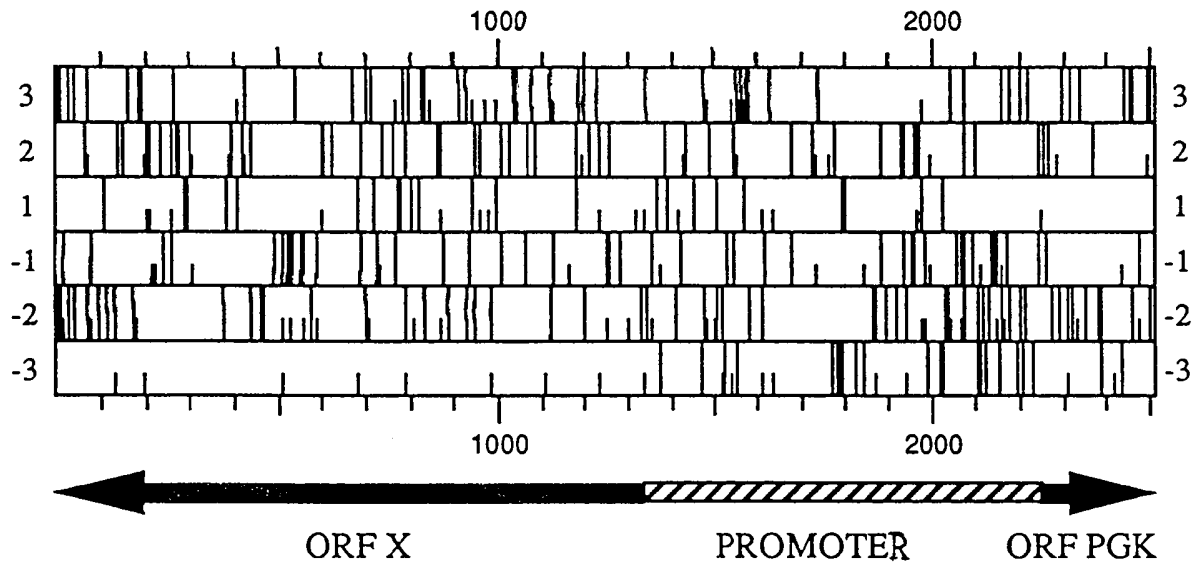
2050 2060 2070 2080 2090 2100
CATATAAATA TACGTCAAAA GGGGATTCAT TAATTAGAAA ATTCTCTTTT TCAATAGTTG

2110 2120 2130 2140 2150 2160
CTATTCATTA TCAATCTATT CAACTCAATT GGTATTATT TTCATCTTTT TGTCATCCTA

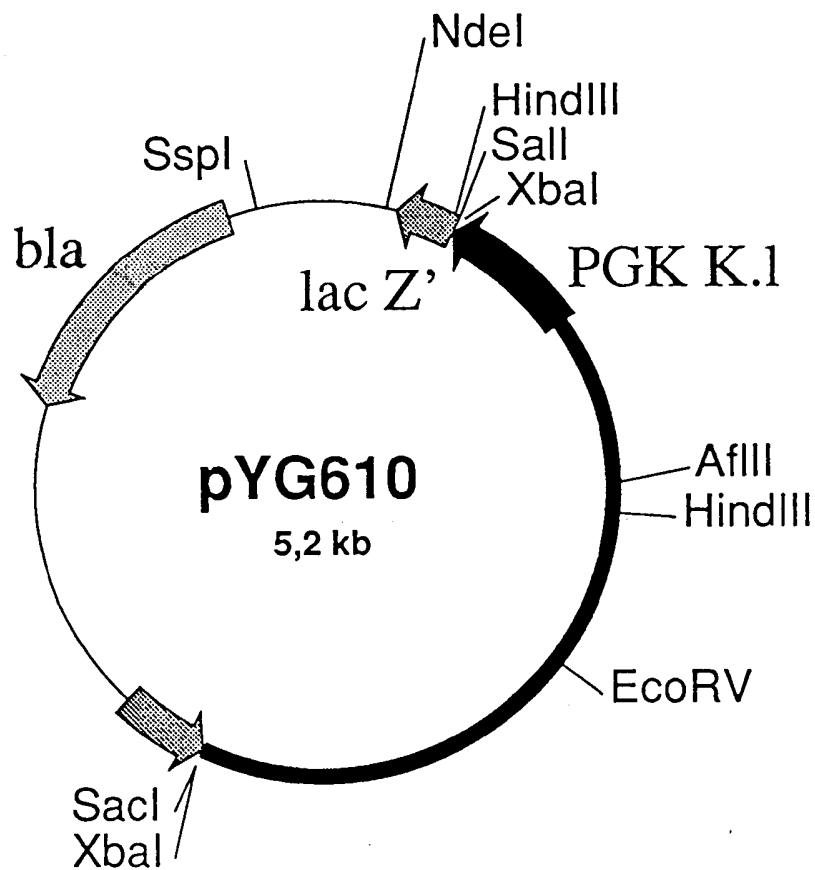
2170 2180 2190 2200 2210 2220
AACCATCAAC AATATTTAAA TATATCTGTT GCTACATTAA GAGTTACTTC AGAAATAACA

2230 2240 2250
AAAAAATCGA TCAAGAATTA ATAAAAATG
Met

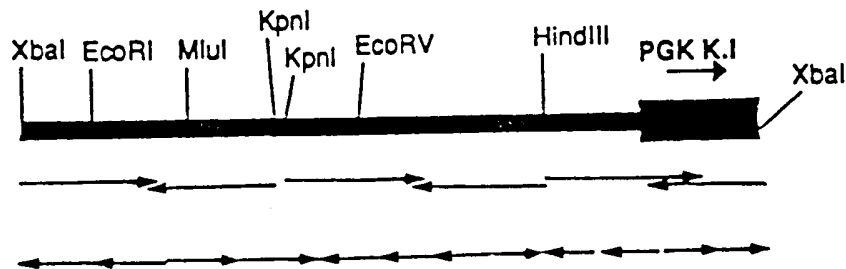
1. ábra (folytatás)



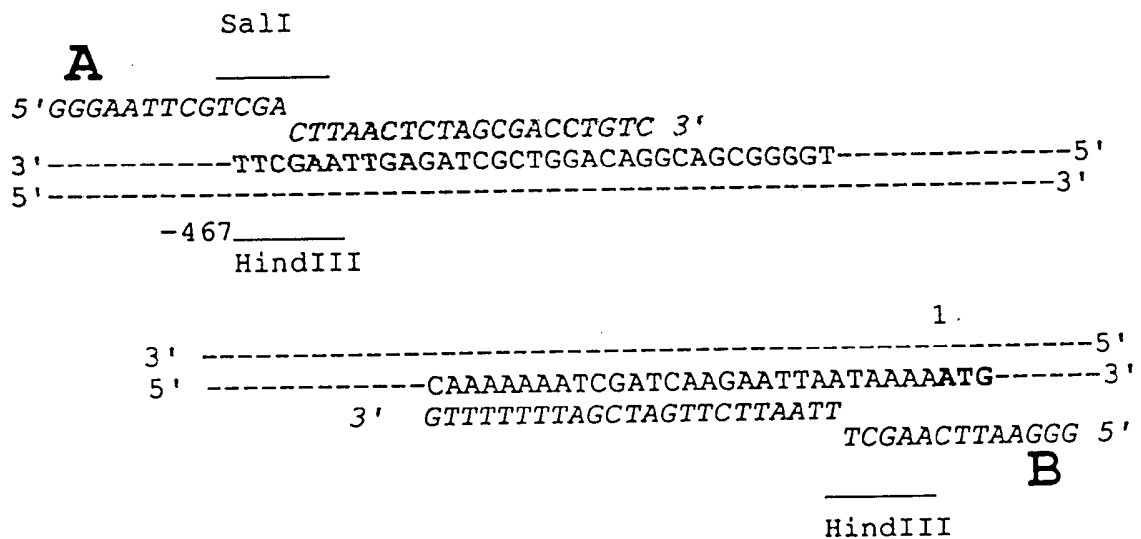
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra



A oligodezoxinukleotid

5'CATGTCGACTTTTTATTAATTCTTGATCGAT3'

SalI

B oligodezoxinukleotid

5'ATGAAGCTTAAATCTTCATCCTTGGC3'

HindIII

C oligodezoxinukleotid

5'GGGTGAGGTTCTGTGGGGCGAGCGACAGGTCGCTAGAGTTAAGCATCCTGATC3'

(439 - 492.helyzet)

D oligodezoxinukleotid

5'GATCAGGATGCTTAACTCTAGCGACCTGTCGCTCGCCCCACAGAACCTCACCC3'

(439 - 492.helyzet)

HindIII	10	20	30	40	50	60
aagctt	TTAA	ATCTTCATCC	TTGGCAAGTA	GATTCATCGG	GTGTGTTTGA	AGTAAGAATA 60
ttcgaa	AATT	TAGAAGTAGG	AACCGTTCAT	CTAAGTAGCC	CACACAAACT	TCATTCTTAT
TTTGCT	TGTT	TTTATGGTAT	CAAAGGTATA	TGTTGTAGAA	GACAATTTCC	GGTAATCCAA 120
AAACGA	ACAA	AAATACCATA	GTTTCCATAT	ACAACATCTT	CTGTTAAAGG	CCATTAGGTT
TTGTCT	GTCT	GCTCAGTTTA	GCACATGTAT	AGTACGTTGC	ACATAGTCTA	CAATATTCAG 180
AACAGAC	AGAG	CGAGTCAAAT	CGTGACATA	TCATGCAACG	TGTATCAGAT	GTTATAAGTC
CATTCA	GCAT	TCAGTATACA	GCATATGGCT	AAATGATCAC	AAATGTGATT	GATGATTTGA 240
GTAAGTC	GTAG	AGTCATATGT	CGTATACCGA	TTTACTAGTG	TTTACACTAA	CTACTAAACA
CACGACT	AGAA	AAAGAGAACG	AAAAAGGGAA	ATTCATGTCA	CGTGCGTTGG	CACGTGACAT 300
GTGCTGA	TCTC	TTTCTCTTGC	TTTTTCCCTT	TAAGTACAGT	GCACGCAACC	GTGCACTGTA
GGAATAT	CGAA	AGAAAGAAAA	AAAAAAACGA	TCTCGTCCTA	GTGGAAGCCC	AGAGTCTGGT 360
CCTTATA	GCTT	TCTTTCTTTT	TTTTTTTGCT	AGAGCAGGAT	CACCTTCGGG	TCTCAGACCA
CCCCCCG	GAGT	TCTTCCCAAA	ACAAGAAGCT	GACACATGTT	GACACAGAAC	ACCCACACAGC 420
GGGGGGC	CTC	AGAAGGGTTT	TGTTCTTCGA	CTGTGTACAA	CTGTGTCTTG	TGGGGTGTCTG
AAATGCAC	CA	CGCTACGTAG	ATCAGGATGC	TTAACTCTAG	CGACCTGTCTG	CTCGCCCCAC 480
TTTACGTG	GGT	GCGATGCATC	TAGTCCTACG	AATTGAGATC	GCTGGACAGC	GAGCGGGGTG
AGAACCTC	CAC	CCGAGAACCA	CACATTACAC	GCCGCCAGCT	CCCCTATAC	TCATCTTGCT 540
TCTTGGA	GTG	GGCTCTTGGT	GTGTAATGTG	CGGCGGTCGA	GGGTGATATG	AGTAGAACGA
TCCCTTA	AGC	GTTCTCACGA	TTCGTTTCGCT	GCCCTTCTTC	AAGAGTCTTC	TGATTCTAAT 600
AGGGAAT	TCG	CAAGAGTGCT	AAGCAAGCGA	CGGGAAGAAG	TTCTCAGAAG	ACTAAGATTA
TCTCATT	CGA	AATCCTCTAC	AGTTAATGAA	TTGCTTGACA	TGACATTCAT	TGTCTCATGG 660
AGAGTA	AGCT	TTAGGAGATG	TCAATTACTT	AACGAAGTGT	ACTGTAAGTA	ACAGAGTACC
TTTTGGC	TTT	TTGGCTTTTG	TCTTTTAAAG	CTATATCAAC	TTTACATATA	AATATACGTC 720
AAAACCG	AAA	AACCGAAAAC	AGAAAATTTT	GATATAGTTG	AAATGTATAT	TTATATGCAG
AAAAGGG	GAT	TCATTAATTA	GAAAATTCTC	TTTTTCAATA	GTTGCTATTTC	ATTATCAATC 780
TTTTCCC	CTA	AGTAATTAAT	CTTTTAAGAG	AAAAAGTTAT	CAACGATAAG	TAATAGTTAG
TATTCAAC	TC	AATTGGTTAT	TATTTTCATC	TTTTTGTCAT	CCTAAACCAT	CAACAATATT 840
ATAAGTT	GAG	TTAACCAATA	ATAAAAGTAG	AAAAACAGTA	GGATTGGTA	GTTGTTATAA
TAAATAT	ATC	TGTTGCTACA	TTAAGAGTTA	CTTCAGAAAT	AACAAAAAAA	TCGATCAAGA 900
ATTTATAT	AG	ACAACGATGT	AATTCTCAAT	GAAGTCTTTA	TTGTTTTTTT	AGCTAGTTCT
ATTAATA	AAAA	Agtcgac				917
TAATTAT	TTTT	Tcagctg				

10 SalI

20

30

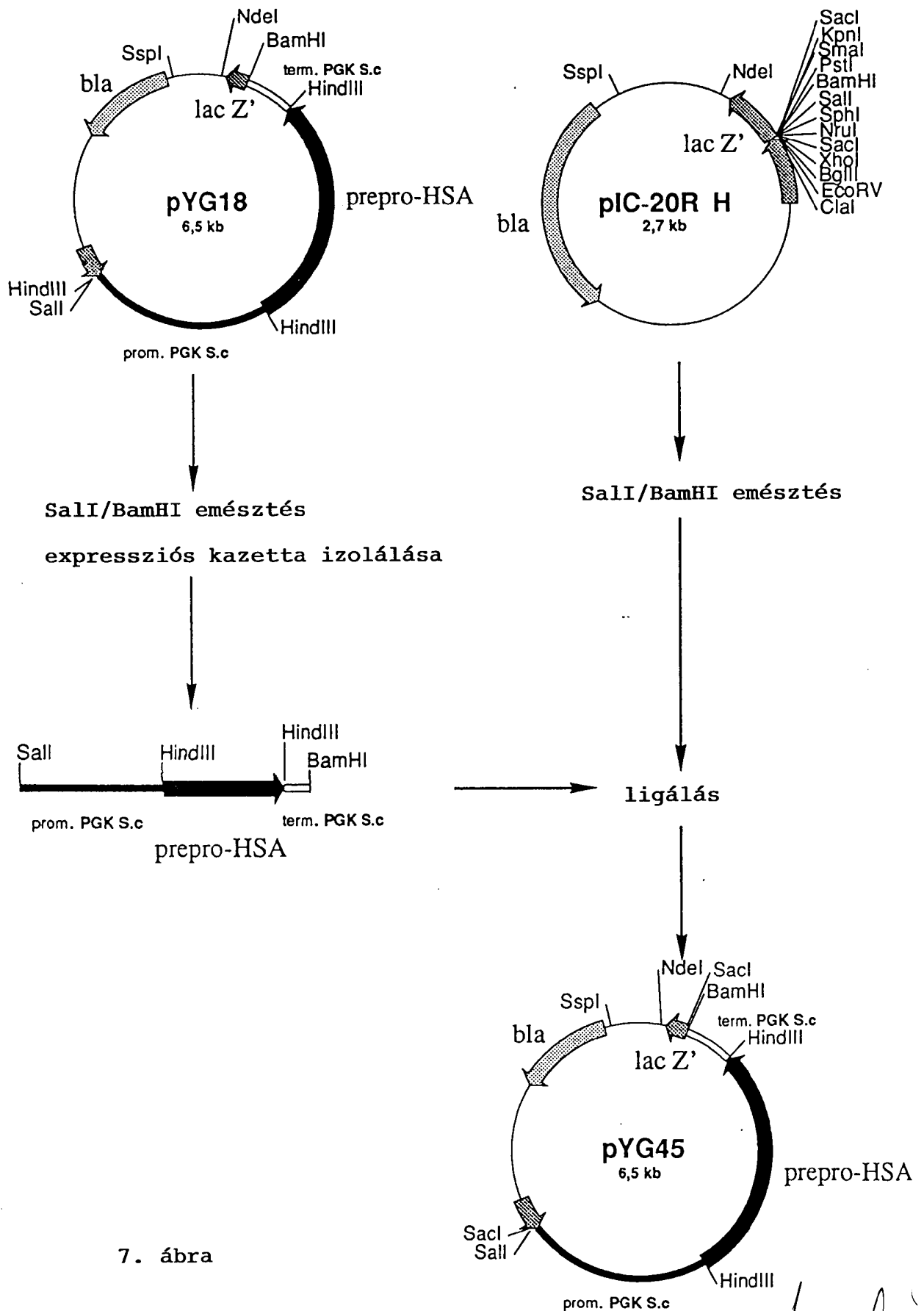
40

50

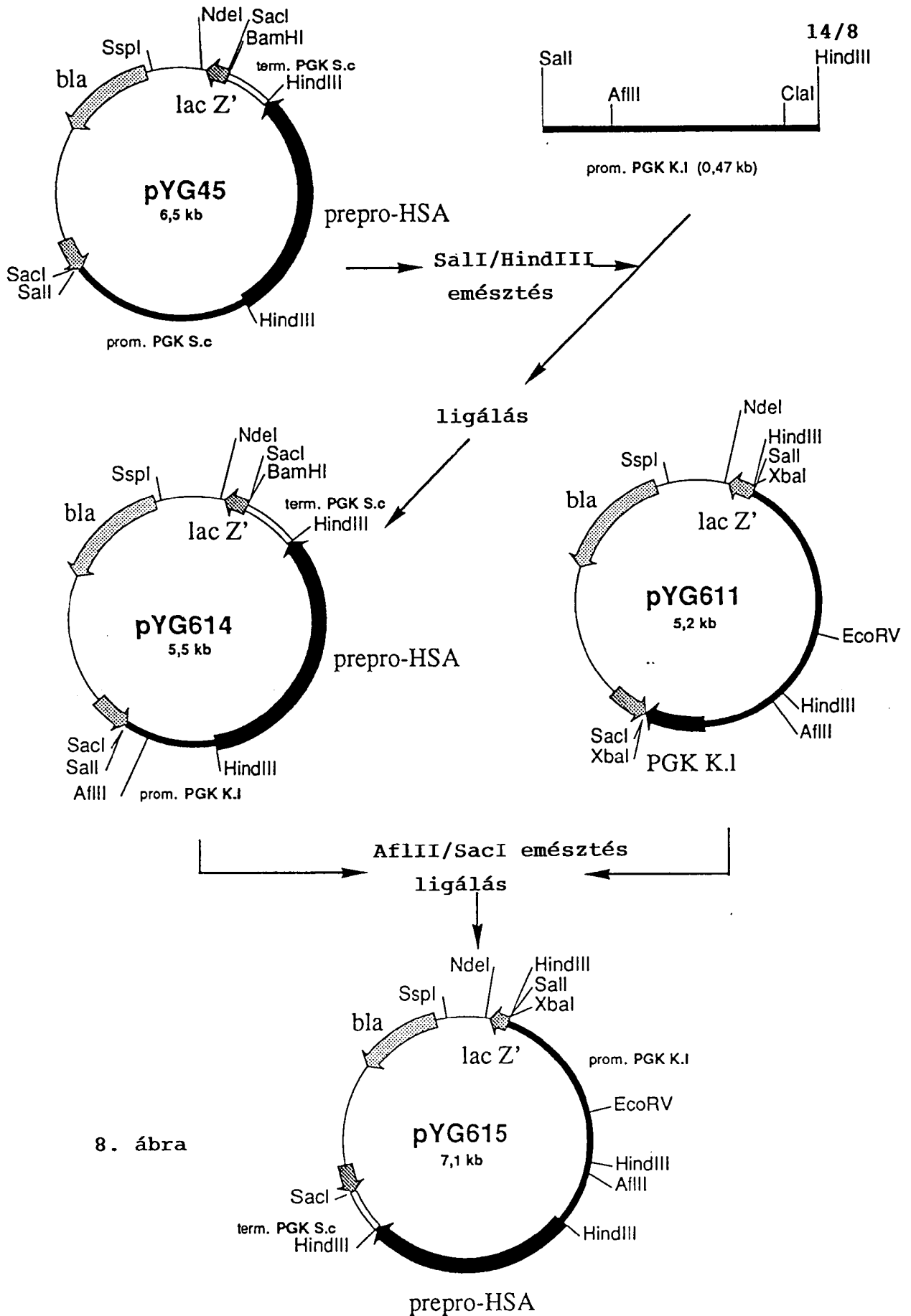
60

6. ábra

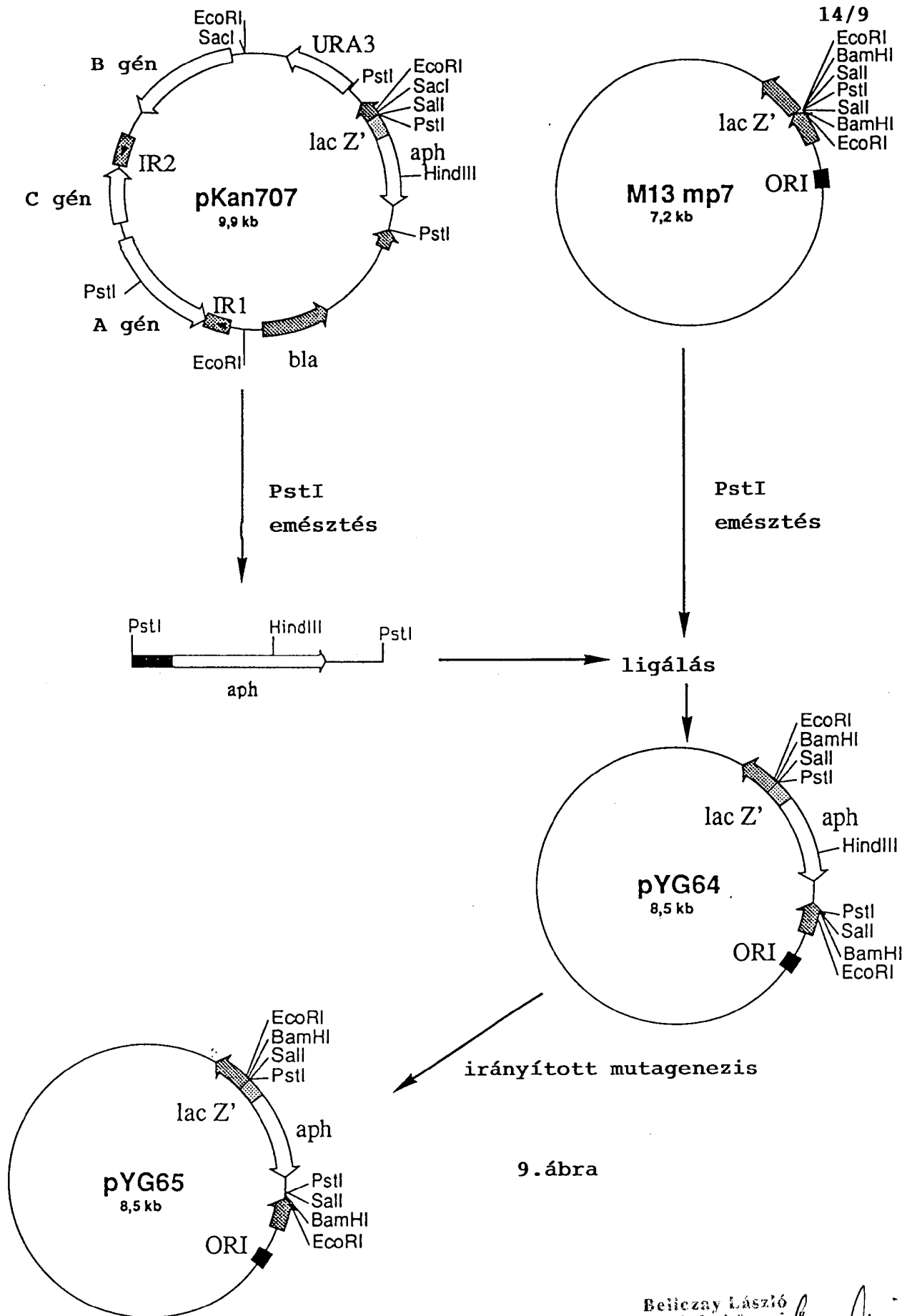
Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Irodáján
H-1061 Budapest, Dózsa György út 10.
Telefon: 153-3733, 153-3464



7. ábra

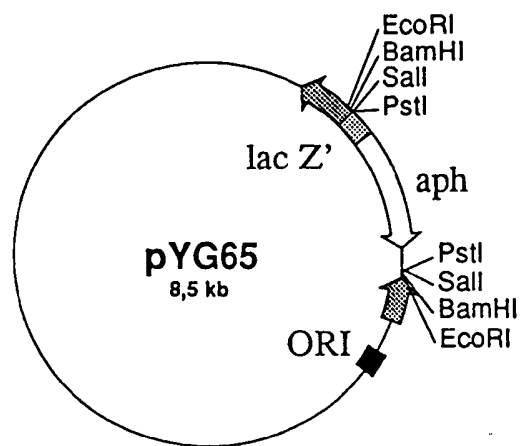
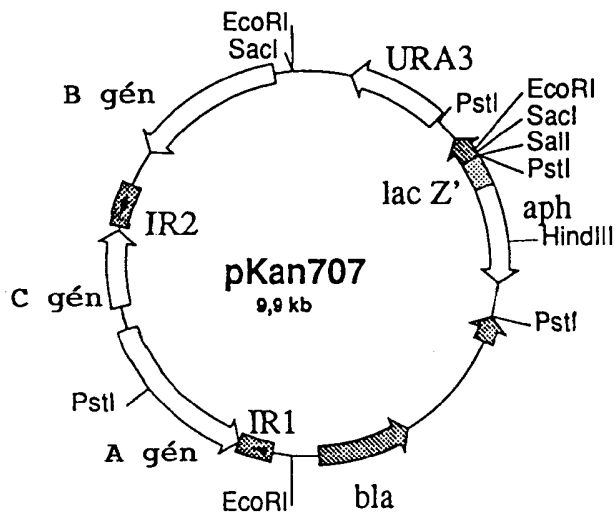


8. ábra



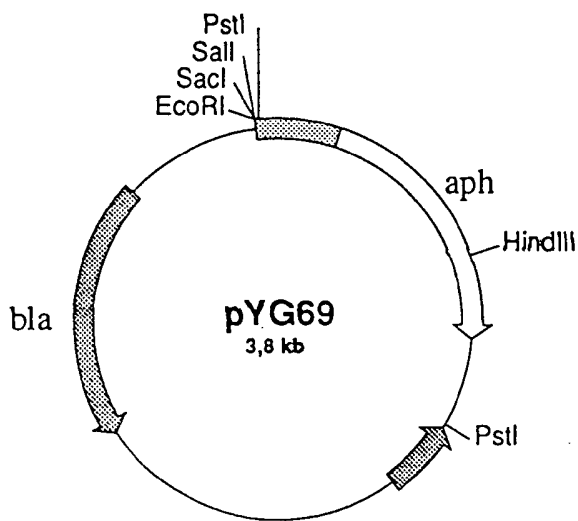
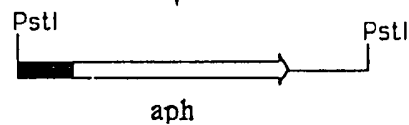
9. ábra

Bellezay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 19.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3066

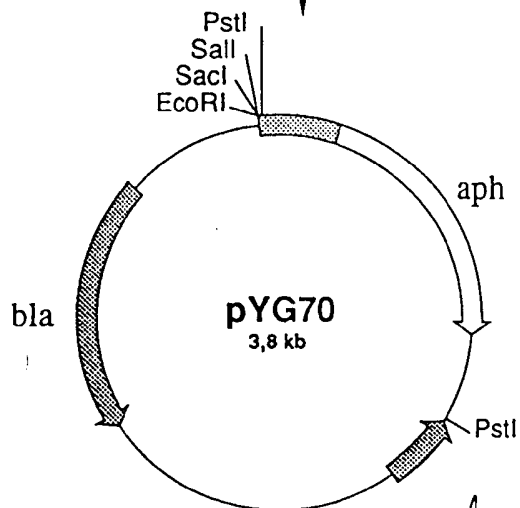


EcoRI emésztés
T4 DNS ligáz

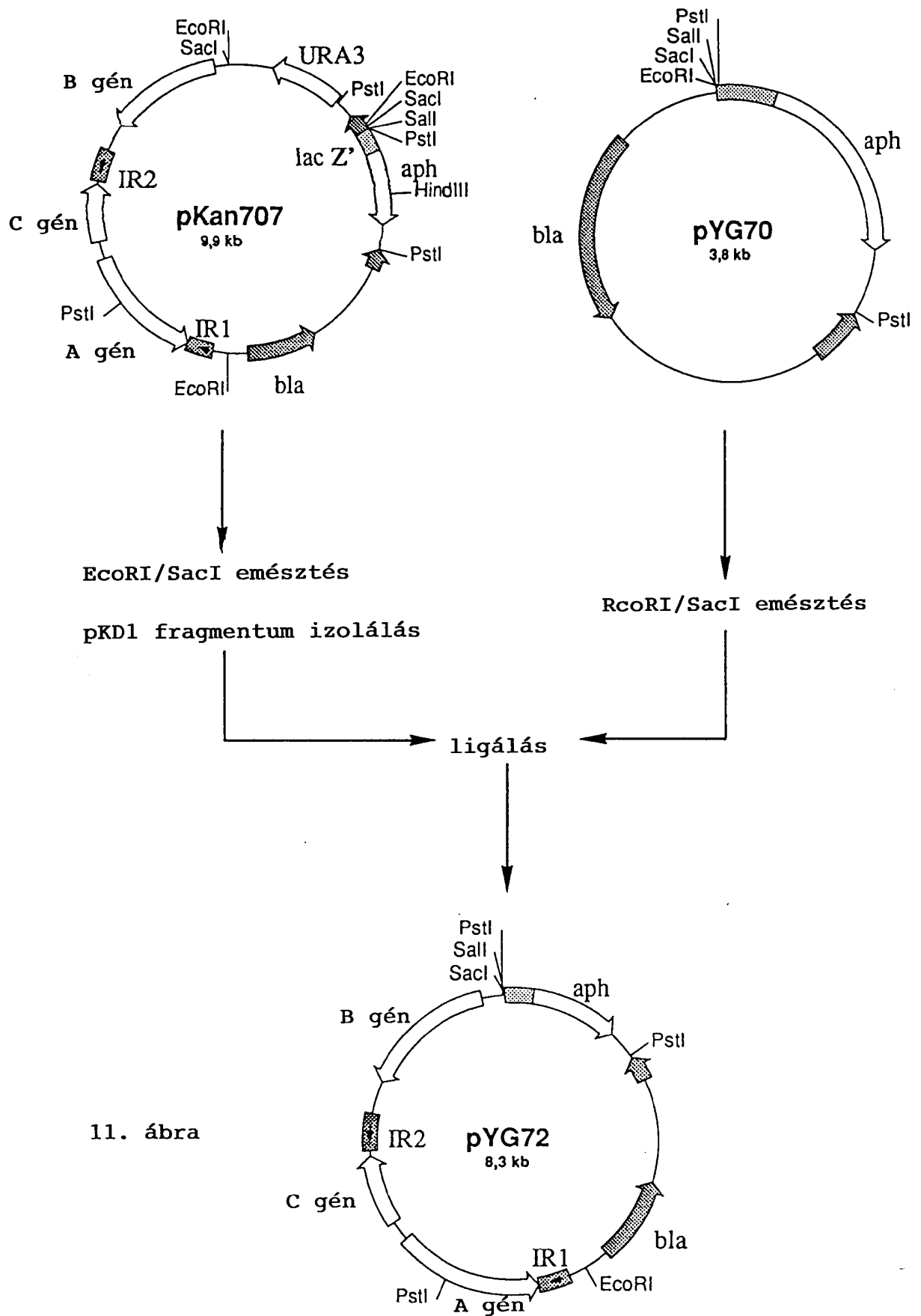
PstI emésztés



ligálás
PstI emésztés

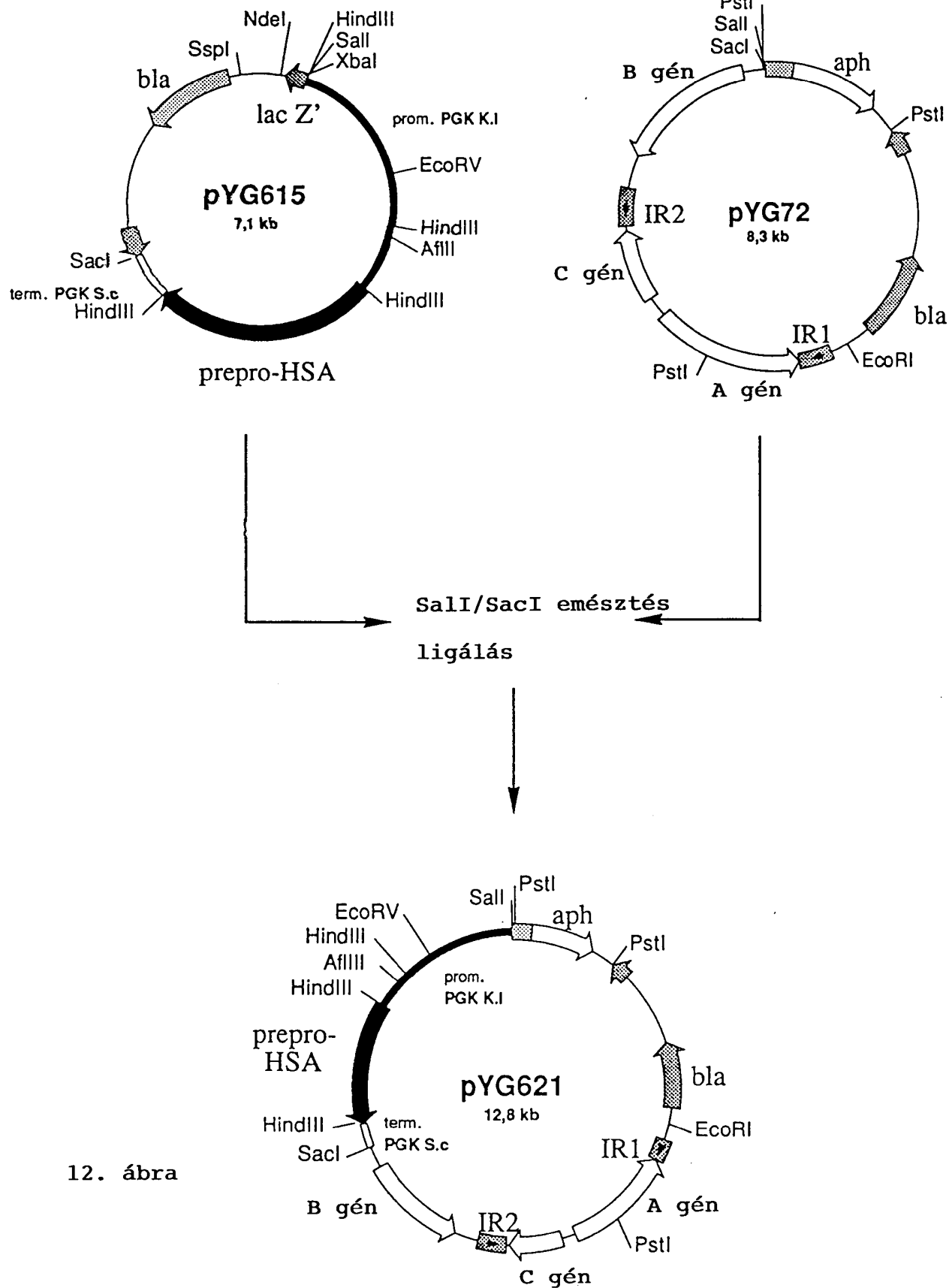


10. ábra

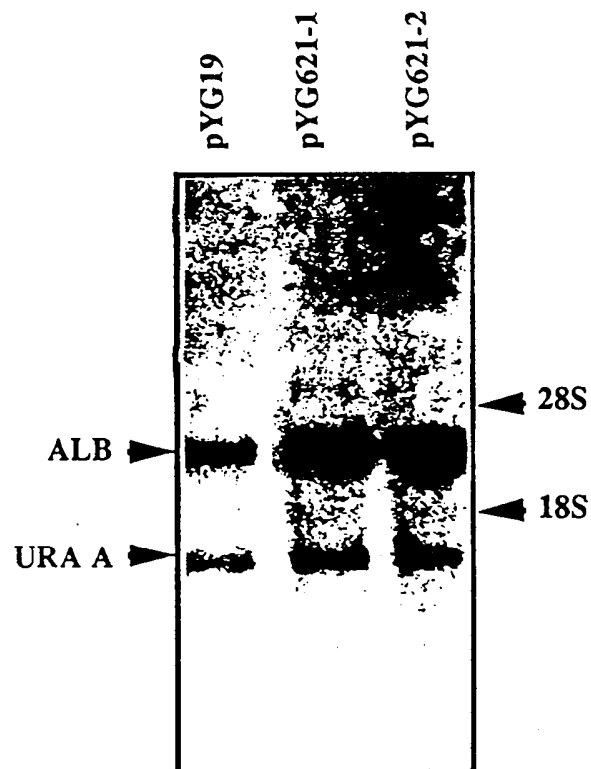


11. ábra

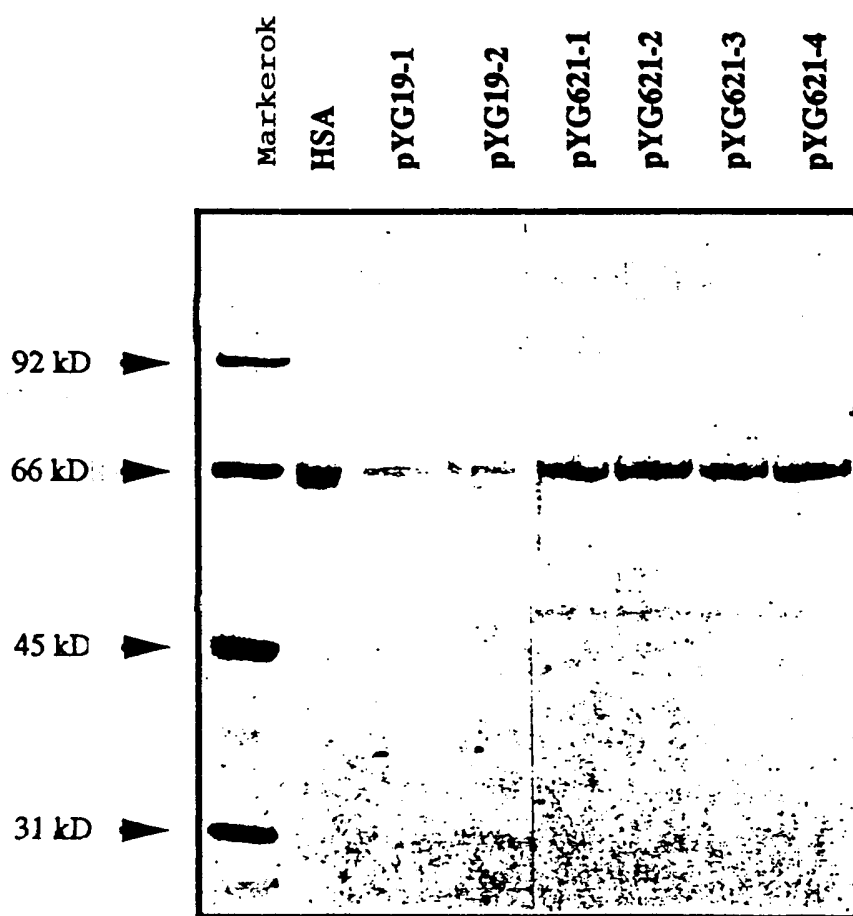
Figure 11



12. ábra



13. ábra



14. ábra