P01 04974

"A2"

72.923/PA

Eljárás fehérjék gazdaszervezetekben történő, betakarítás utáni, szabályozott termelésére

KIVONAT

A találmány egy kívánt fehérje előállítási eljárására vonatkozik egy transzgénikus gazdaszervezetből, ahol a fehérjét kódoló gén mindaddig nem expresszálódik, amíg a gazdaszervezetet be nem takarítják. Az eljárás azzal jellemezhető, hogy: (a) a gazdaszervezet a kívánt fehérjét kódoló gént úgy tartalmazza, hogy az csak egy kémiai induktor jelenlétében expresszálódik és (b) a kémiai induktorral a gazdaszervezetet a betakarítás után hozzák érintkezésbe. A találmány egy olyan gazdaszervezetre is vonatkozik, amelyik alkalmas az eljárás kivitelezésére.

"A2"

72.923/PA

Eljárás fehérjék gazdaszervezetekben történő, betakarítás utáni, szabályozott termelésére

A találmány egy kívánt fehérje előállítási eljárására vonatkozik egy transzgénikus gazdaszervezetből, ahol a fehérjét kódoló gén addig nem fejeződik ki, amíg a gazdaszervezetet be nem gyűjtik, és az eljárás azzal jellemezhető, hogy az adott gén csak egy kémiai induktor jelenlétében expresszálódik, amelyet a gazdaszervezet betakarítása után adagolunk a gazdaszervezetnek, a környező fázis, különösen gáz- vagy folyadék-fázison keresztül.

A természetben előforduló fehérjék gyakran csak egészen kis mennyiségben hozzáférhetőek, pedig aktív anyagokként történő felhasználásuk különösen jelentős. Habár rekombináns gazdarendszerekben, például baktériumokban, mint például *Escherichia coli*ban vagy *Bacillus subtilis*ben, stb. gyakran előállíthatóak, gazdaságossági szempontból és mennyiségük tekintetében előállításuk nem hatékony, ezért ilyen esetekben az általános felhasználásuk nem megoldható. Azon célból, hogy lehetővé tegyük egyre több és több olyan komplex fehérje termelését, amelyeket nehéz, illetve egyáltalán nem lehet előállítani alacsonyabbrendű élőlényekben, a fehérjék teljes bioszintéziséért felelős saját rendszerét tartalmazó magasabb rendű élőlények sejtjeit egyre növek-

vő számban szükséges gazdaként felhasználni. Ezekben az esetekben néhány éve rekombináns gazdákként transzgénikus állatok, növények, gombák, mohák, algák, stb. kínálkoznak. Bár a jól jellemzett, elérhető fehérjék száma a molekuláris kutatásoknak köszönhetően folyamatosan növekszik, az alább ismertetett technológia a felhasználás tekintetében jelentős előrelépést nyújt.

Mindezek mellett az idegen fehérjék termeltetése negatív hatással is lehet a gazdaszervezet fiziológiás működésére, például gátolja a növekedését, akár teljesen meg is akadályozva azt. Ráadásul elképzelhető, hogy például az orvosi szempontból érdekes aktív fehérjét termelő transzgénikus növények termesztésekor a növények növekedésük során a természetben előforduló más élőlények számára potenciális veszélyt jelentenek. Ezért az idegen fehérjék betakarítást követő termeltetése transzgénikus gazdaszervezetekben, különösen a növénytermelésben illetve kertészetben termelt gazdaszervezetekben, mint a fehérjék gazdaságos és környezetkímélő kivonása felé irányuló technológiai építő kő, nagy jelentőséggel bír. Más (bio)kémiai anyagok szintén előállíthatóak transzgénikus gazdaszervezetekben az adott anyag bioszintetikus útvonalában résztvevő enzimfehérjék expressziójával. Ez azonban szintén hordozhat negatív hatásokat a gazdaszervezetre vonatkozólag, például növekedésének gátlása vagy a biológiai biztonságosság tekintetében. Mivel a (bio)kémiai anyagok gazdaszervezetekben történő termeltetése szintén fehérjék, különösen enzimek expresszióján alapul, erre is ugyanazok a technológiai előírások vonatkoznak.

Eddig csupán olyan betakarítás után termelő rendszereket írták le, amelyek a növényi anyag sebzésén alapulnak, mint például

a dohány esetében a levelek szétdörzsölésén. Ennek eredményeként a kívánt fehérje addig nem termelődik, amíg a dohánynövény a termőföldön van, csak a leszedés után, a regenerálódási lépés előtt. Mindemellett ezt nehéz kivitelezni, minthogy egy sebzés-indukálható promóter a transzgénikus növényekben a mezőgazdasági vagy kertészeti termesztés során is indukálódhat, például a dohány esetében a táplálkozás, szél vagy jégeső, ütközés, gépek használata stb. okozta sérülés következtében. Az előző módszer további hátránya, hogy az indukciós stimulus egyenletes eloszlását a növény egészére vonatkozólag nehéz elérni.

Így a találmány azon a technikai problémán alapul, hogy egy kívánt fehérje olyan betakarítás utáni termelőrendszerét hozzuk létre, amely nem rendelkezik a technika állásában leírt módszer hátrányaival, így mindenek előtt biztosítja, hogy a génexpresszió megbízhatóan csak a betakarítás után valósuljon meg, nem szükséges a növényi szövetek sebzése, és az induktor eredményesen és egységesen lépjen kapcsolatba a megfelelő transzgénikus gazdaszervezet sejtjeivel. Ezt a technikai problémát oldjuk meg azzal az eljárással, amelyet találmány szabadalmi igénypontjaiban határozunk meg.

A találmány szerinti eljárásban az idegen gén expresszióját a gazdaszervezetben egy kémiai anyag indukálja, amelyet a gazdát körülvevő fázisba juttatunk be. Ez a fázis gáz- vagy folyadékfázis lehet, amelyben a kémiai indukció bekövetkezhet a gázfázis összetételének megváltoztatásával, előnyösen egy anaerob indukcióval, szilárd vagy folyékony indukáló (bio)kémiai anyagok oldatainak (szuszpenzióinak) porlasztásával vagy egy illékony anyag használatával. Ezen anyagoknál biztosítani kell a reakció-

HU 219

kamrában való egyenletes eloszlást. Továbbá a folyadékfázisban a kémiai indukció bekövetkezhet szilárd vagy folyadék indukáló biokémiai anyagok oldatain keresztül is. A találmány szerinti eljárással jó minőségű fehérjék vagy más (bio)kémiai anyagok állíthatóak elő nagy mennyiségben, így a találmány új (bio)gyógyászati és technológiai alkalmazást jelent.

A találmány egy olyan eljárást foglal magában, amellyel egy transzgénikus gazdaszervezetből egy kívánt fehérje előállítható, ahol a fehérjét kódoló gén csak a gazdaszervezet betakarítása után expresszálódik és az eljárást az jellemzi, hogy:

(a) a transzgénikus gazdaszervezet a kívánt fehérjét kódoló gént úgy tartalmazza, hogy az csak egy kémiai induktor jelenlétében fejeződik ki; és

(b) a kémiai indukáló anyaggal a gazdaszervezet a betakarítást követően lép kapcsolatba, a gazdaszervezetet körülvevő fázison keresztül, ami általában gáz- vagy folyadékfázis.

Egy szakterületen jártas személy jól ismeri a találmány végrehajtásához szükséges nukleinsav konstrukciók előállításának módszereit, és ezek a módszerek általános standard munkákból is hozzáférhetőek [például Sambrook és munkatársai műve, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989)]. A nukleinsav konstrukciók elsősorban vektorba klónozott formában férhetőek hozzá, a vektor leginkább egy plazmid, egy kozmid, egy vírus, egy bakteriofág vagy más, a géntechnológiában közönséges vektor. Ezen vektoroknak további funkcionális egységeik lehetnek, amelyek stabilizálják a vektotokat a gazdaszervezetben, mint például egy bakteriális replikációs origó vagy a 2-mikronos-DNS a

4714

*Saccharomyces cerevisiae*ben. A vektorok az agrobaktériumokban található T-DNS "jobb border" és "bal border" szekvenciáit szintén tartalmazhatják, ezzel biztosítva a stabil integrációt a növény genotípusába. Terminációs szekvenciák szintén jelen lehetnek, amelyek a transzkripció helyes befejezését segítik és poli-A szekvenciát adnak a transzkriptumhoz. Ezeket az elemeket a szakirodalomban már leírták [Gielen és munkatársai, EMBO J. 8, 23-29 (1989)], és kívánt esetekben megváltoztathatók.

Magasabbrendű növényekben az idegen gén inszerciójához nagy számú klónozó vektor áll rendelkezésre, amelyek tartalmaznak egy *E. coli* replikációs szignált és egy, a transzformált baktérium-sejtek szelekciójához szükséges marker gént. Ilyen vektorok például a pBR322, pUC sorozatok, M13mp sorozatok, pACY184, stb. Az idegen DNS a vektorba a megfelelő restrikciós helyen inszertálható be. Az így kapott plazmidot használjuk az *E. coli* sejtek transzformálására. A transzformált *E. coli* sejteket a megfelelő tápközegben tenyésztjük, ezután a sejteket elkülönítjük, lizáljuk, hogy a plazmidhoz hozzáférjünk. Elemző módszerekként általában restrikciós analízist, gélelektroforézist és további biokémiai és molekuláris biológiai módszereket használunk a kapott plazmid DNS jellemzésére. Mindegyik manipulációt követően a plazmid DNS hasítható és a DNS fragmentumok más DNS szekvenciákhoz kapcsolhatók. Minden plazmid DNS szekvencia ugyanabba vagy más plazmidokba klónozható.

Számtalan módszer létezik a DNS beillesztésére, például növényi gazdasejtekbe. Ezek a technikák a növényi sejtek transzformálásából állnak *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes* baktériumok (mint transzformáló ágensek) T-DNS-ének

4.714.13

felhasználásával, protoplaszt fúzióval, injektálással, DNS-elektroporációval, DNS-inszertálásával biolisztikus módszerek segítségével valamint további lehetőségekkel.

A DNS beinjektálásához és az elektroporációjához a növényi sejtekben nincs speciális követelmény a használandó plazmiddal kapcsolatban. Lehetőség van egyszerű plazmidok, mint például pUC származékok felhasználására. Mindamellett, ha az ilyen transzformált sejtekből teljes növényt regeneráltatnak, szelektálható markernek jelen kell lennie. A kívánt gén növényi sejtbe történő inszertálásának módjától függően további DNS szekvenciák lehetnek szükségesek. Például, ha a transzformáláshoz Ti vagy Ri plazmidot használunk, legalább a Ti és Ri plazmidok T-DNS-ének jobboldali borderszekvenciáját, de gyakran a bal- és jobboldali borderszekvenciákat is szegélyező régióként az inszertálandó génnek mellé kell kötni.

Amennyiben agrobaktériumot használunk a transzformációhoz, előnyös, ha az inszertálandó DNS-t speciális plazmidba klónozzuk, különösen intermredier vagy bináris vektorba. Az intermredier vektorok a T-DNS-sel homológ szekvenciáiknak köszönhetően homológ rekombinációval az agrobaktériumok Ti vagy Ri plazmidjába tudnak integrálódni. Ez a plazmid továbbá tartalmaz egy vir régiót, amely a T-DNS transzferéhez szükséges. Az intermedier vektorok nem képesek replikálódni az agrobaktériumokban. Az intermedier vektorokat segítő plazmid felhasználásával lehet *Agrobacterium tumefaciens*be juttatni. A bináris vektorok mind az *E. coli*ban, mind az agrobaktériumokban képesek replikálódni. Ezek szelekciós markergént és egy linker vagy polilinker régiót tartalmaznak, amelyet a T-DNS jobb és bal határszekvenciája vesz

4.714.13

körül.

Ezek közvetlenül agrobaktériumokba juttathatók. A gazdaként szolgáló agrobaktériumnak tartalmaznia kell egy vir régiót hordozó plazmidot. A vir régió szükséges a T-DNS növényi sejtbe jutásához. További T-DNS is jelen lehet. Az ilyen módon transzformált agrobaktériumot növényi sejtek transzformálására használjuk.

A DNS növényi sejtbe juttatásához a növényi explantátumokat *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes* baktériummal eredményesen tenyészthetjük együtt. Ezután a fertőzött növényi anyagból, mint például levéldarabkákból, szárszegmensekből, gyökerekből, protoplasztokból vagy szuszpenzióban tenyésztett növényi sejtekből, amelyeket a megfelelő médiumban tartottunk (amely médium antibiotikumot tartalmazhat a transzformált sejtek szelekciójához), ismét teljes növény regeneráltatható. Az így kapott növény ezután tesztelhető a bejuttatott DNS jelenlétére. További lehetőségek is ismertek idegen DNS bejuttatására biolisztikus módszer felhasználásával vagy protoplaszt-fúzióval.

Egyszikű növények transzformálásának alternatív lehetőségei a biolisztikus módszer, a protoplasztok elektromosan vagy kémiai úton indukált DNS felvétele, a részlegesen permeábilissá tett sejtek elektroporációja, a DNS makroinjektálása a virágzatba, a DNS mikroinjektálása mikrospórákba és előembriókba, a csírázó pollen általi DNS-felvétel és az embriók DNS felvétele duzzasztással [összefoglalása: Potrykus, Physiol. Plant, 269-273. (1990)]. Bár a kétszikű növényekre fejlesztették ki az *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidján keresztül történő transzformációt, több tanulmány rámutat, hogy egyszikű növények

transzformációja is lehetséges agrobaktériumokon alapuló vektorok segítségével.

A találmány szerinti eljárásban felhasználható transzgénikus gazdaszervezetek elvben bármely fajhoz tartozó növények lehetnek, azaz mind egyszikűek, mind kétszikűek. A haszonnövényeket részesítjük előnyben, különösen ilyen növény például a búza, az árpa, a rizs, a kukorica, a cukorrépa, a burgonya, a káposztafélék, a pillangós virágúak vagy a dohány. A kívánt fehérje expresszáltatásához vagy a kémiai indukáló anyaggal történő kezeléshez kívánatos növényi részek elvileg bármely növényi részre vonatkozhatnak, így feltétlenül ezeknek a növényeknek a szaporító anyagára és a begyűjtött terményre, például termésre, magvakra, szárcsomókra, gumókra vagy hagymákra, gyöktörzsekre, magoncokra, dugványokra, stb.

Továbbá bármely fehérje, különösen egy diagnosztikai fehérje, egy terápiás fehérje és/vagy egy anyagfehérje termeltethető a találmány szerinti eljárással. A fehérje bármely élőlényből származhat, különösen emberből vagy állatból. A fehérje vad típusú vagy módosított formában egyaránt jelen lehet. Lehet fúziós protein vagy egy fehérjefragmens.

Egy előnyös megvalósítási módban, a kémiai indukáló anyaggal való érintkeztetést a találmány szerinti eljárás (b) lépésében hajtjuk végre a gazdaszervezetet körülvevő gázfázison keresztül. Ezt előnyösen a gazdaszervezetet körülvevő gázfázis módosításával érjük el, például a gázfázis hordozóként szolgál az indukciós stimulushoz azáltal, hogy az indukáló oldatot ide porlasztjuk be vagy azt illékony indukáló anyaggal árasztja el. A gázfázis módosítása a gazdaszervezetben előnyösen egy speciális indukciót

eredményez, például az érintett promóterét. Csupán fizikai okokból, a diffúziós effektust kihasználva, az indukciós stimulus homogén eloszlása érhető el egy bizonyos idő eltelte után. E homogén eloszlás elérési ideje jelentősen lerövidíthető, ha a gázfázist a reakciókamrában aktívan keverjük. Így különösen az egymással szorosan határos sejtanyagok esetében, mint például a növényi leveleknél, alga- és mohaszöveteknél, egyenletes és gyors penetráció érhető el. Különösen az igen kompakt szövetek, mint például a burgonyagumó esetében, a találmány szerinti gyors szöveti penetráció nagy előnyt jelent.

A szakterületen járatos személy számára ismertek a megfelelő gáznemű indukáló anyagok csakúgy, mint a gázfázis lehető legelőnyösebb módon történő megváltoztatásának körülményei. Az Anaerocoult rendszer (Merck, Darmstadt, Germany) anaerob környezetet állít elő az oxigén megkötésével és széndioxid kibocsátással. Ebben a rendszerben a kukoricából származó GapC4 promótert a széndioxid atmoszféra anaerob módon indukálja [Bülow, L. és munkatársai, Molecular Plant-Microbe Interactions, 182-188 (1999)]. Ugyanezt a hatást lehet elérni ipari nitrogén bejuttatásával. Egy további példát képvisela "patogenezissel kapcsolatos fehérje" promóterek, mint például az L-fenilalanin ammónium liáz promóterek, a kalkon szintáz vagy "hidroxiprolinban gazdag glikoprotein" promóterek etilénnel történő indukciója [Ecker, J. R. és Davis, R. W., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 5202-5206 (1987)].

Aki a szakterületen járatos, ismeri a porlasztásra alkalmas oldékony induktrokat és a porlasztáshoz szükséges legmegfelelőbb körülményeket. Irodalmi hivatkozásokból ismert egy kiméra

transzkripciós-indukciós rendszer, amelyet a szolubilis dexametazon indukál [Plant J. 11, 605-612 (1997); Kunkel és munkatársai Nature Biotechnol. 17, 916-918 (1999)]. A kukorica Incw1 promóterét a D-glükóz aktiválja [Chen, W. H. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10512-10517 (1999)]. Sok "patogenezissel kapcsolatos fehérje" promóterét szalicilsav aktiválja [Gaffney és munkatársai, Nature 261, 754-756 (1993)]. Egy illékony induktor a metil-szalicilát, amely növényi felvételekor szalicilláttá alakul, mely, ahogy fentebb leírtuk, szintén indukáló hatással bír [Shulaev, V. és munkatársai, Nature 385, 718-721 (1997)]. Az oldatok, például promóter indukáló (bio)kémiai anyagok porlasztásának megvan az az előnye, hogy technikailag egyszerűen kivitelezhető, az indukáló anyag egyenletesen oszlik el a szövetek körül valamint egyenletesen diffundál azokba. Egy gyorsan létrejövő, egyenletes eloszlás elsősorban a gázfázis erőteljes kevertetésével érhető el. Továbbá a kapott koncentrációkülönbségek egy egyszerű és hatékony egyensúlya érhető el, így szabályozott eljárási körülményeket lehet biztosítani. Egy különösen előnyös megvalósítási mód szerint az RH5992 mezőgazdasági vegyszert (tebufenozid, Rohm és Haas, Croyden, U.K.) használjuk porlasztásra. Az RH5992 egy kiméra transzkripciós aktivátor fehérjén keresztül hat az indukálandó promóter induktoraként [Gatz és Lenk, Trends in Plant Science, 3, 352-358 (1998)]. A promótert specifikusan az RH5992 kapcsolja be, e nélkül a komponens nélkül az inaktív. Ebben az esetben az induktor az indukálandó szöveteket például egy folyamatos légáramlat segítségével egységesen beborítja. A promóter aktív indukcióját a szövetek felszínéről a sejtekbe való diffúzió eredményezi. A

szakterületen jártasak ismerik az elárasztáshoz szükséges illékony induktorokat és az általuk indukálható promótereket. Leginkább a metil-szalicilátot kell megemlíteni, amely a növénybe történő felvételekor szalicilátté alakul, amely, ahogy már fentebb említettük, indukáló hatással bír (Shulaev, V. és munkatársai, fentebbb). Az illékony indukáló anyagok másik példája az etanol, amely az *Aspergillus nidulans*ból származó alcA promótert aktiválja transzgénikus dohánynövényben [Caddick, M. X. és munkatársai, Nature Biotechnology, 16, 177-180 (1998)]. Az aktív elárasztáshoz folyékony vagy szilárd (illékony) induktor szükséges egy megfelelő légnemű hordozó médiummal a illékony gázfázis kialakításához. Ezenkívül célszerű a gázfázist folyamatosan kevertetni, hogy az indukáló anyag egyenletes eloszlást mutasson.

Egy különösen előnyös megvalósítási mód szerint a kémiai indukáló anyaggal való kontaktust a találmány szerinti eljárás (b) lépésben valósítjuk meg a gazdaszervezetet körülvevő folyadékfázison keresztül. Ezt elsősorban a szilárd vagy folyékony indukáló (bio)kémiai anyagok oldatain keresztül lehet elérni. Ezzel kapcsolatban a szolubilis induktorok porlasztásra tett fenti megállapításokra hivatkozunk. Kedvező lehet, ha a kémiai induktor anyagot vírus szuszpenziókon keresztül juttatjuk a gazdaszervezetbe, mint például a dohány esetében a dohány mozaik vírussal (TMV), azaz azzal együtt fertőzzük.

A találmány szerinti eljárás egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint a kívánt fehérjét kódoló gént egy indukálható promóterhez kötjük. A szakterületen jártasak ismerik az erre a célra alkalmas megfelelő promótereket és induktorokat (légnemű, folyékony vagy szilárd, illékony anyagok). Ezek közé az

alábbi, már leírt rendszerek tartoznak: a fentebb említett GapC4 promóter / CO_2 rendszer (Bülow és munkatársai, fentebb), a kukoricából származó Adh1 promóter / anaerobiózis rendszer [Ellis és munkatársai, EMBO J. 6, 11-16 (1987)], a fenilalanin ammónium liáz promóterek, kalkon szintáz promóterek vagy "hidroxiprolinban gazdag glikoprotein" promóterek / etilén rendszer (Ecker, J. R. és Davis, fentebb), a kiméra transzkripciós indukciós rendszer / dexametazon (Plant J., fentebb), a kukoricából származó Incw1 promóter / szacharóz vagy D-glükóz (Chen és munkatársai, fentebb), sok "patogenezissel kapcsolatos fehérje" promóter / szalicilsav vagy metil-szalicilát (Gafney és munkatársai, fentebb; Shulaev és munkatársai, fentebb), az *Aspergillus nidulans*ból származó alcA promóter a transzgénikus dohányban / etanol (Caddick és munkatársai, fentebb).

A promóter előnyösen egy olyan promóter, amely inaktív aerob körülmények között, mint például az Adh1 promóter GapC4 promótere, és az indukció a gázfázis olyan módosításával jön létre, mint a dezoxidáció. Ebben az esetben az anaerob módon indukálható GapC4 promóter (DE 195 47 272 számú német közzétételi irat) különösen előnyös, például betakarított transzgénikus növényi szöveteknél, mint például a burgonyagumóknál. A legtöbb növényi promóter anaerob körülmények között nem működik, míg a GapC4 promóter aerob körülmények között kapcsol ki, és egyszerű dezoxidációval bekapcsolható (Bülow és munkatársai, fentebb). Ez például úgy érhető el, hogy nitrogént vagy széndioxidot jutattunk a reakciókamrába. Így néhány óra alatt egy teljesen anaerob környezet állítható elő a promóter indukciójához illetve az idegen fehérje termeléséhez még akkor is, ha teljesen ép burgonya-

gumókról van is szó.

A találmány szerinti eljárás egy másik, előnyös megvalósítási módja szerint a kívánt fehérjét kódoló gént a transzkripció és/vagy transzláció funkcionális gátlásának kompenzációjával indukáljuk. Az árpából származó HRT fehérje (represszor) jó példa a transzkripció gátlására. A represszor az árpa α-amilázának "gibberellin fitohormon válasz elem" nevű promóteréhez köt [Raventos, D. és munkatársai, J. Biol. Chem. 273, 23313-23320 (1998)]. Ha ez a represszor a transzgénikus növényben aerob körülmények között a CaMV 35S promóter kontrollja alatt kifejeződik, a kívánt fehérje és annak promótere közé inszertálódott célszekvenciához köt. Ha anaerob körülményeket teremtünk, 35S promóter nem működik, a represszor neoszintézise leáll, ennél fogva a fentebb említett gén a meglévő represszorok degradációjával aktiválódik.

A transzlációs gátlás egyik példája a ferritin transzkriptum transzlációjának gátlása a búzacsíra kivonatban egy patkánymájból származó 90 kDa-os represszor expressziójával, mely represszor a ferritin mRNS 5' nem transzlálódó régiójához kötődik. A ferritin mRNS-t a kívánt fehérjét kódoló cDNS szekvencia elé inszertáljuk, és a represszort a transzgénikus növényben kifejezzük.

A represszor aktivitását egy induktor vagy egy inhibitor közvetlenül is szabályozhatja. Például a borsóban található PS-IAA4/5 és PS-IAA6 promóterek szabályozott transzkripciós aktivációját indolecetsav vagy cikloheximid hozzáadásával lehet elérni úgy, hogy amíg ezek az aktivátorok jelen vannak, transzkriptum nem képződik [Koshiba, T. és munkatársai, J. Mol. Biol. 253, 396-

413 (1995)]. A tet operátor transzlációs represszióját a transzgénikus Arabidopsis növényekben például tetraciklinnel közvetlenül kompenzálni lehet [Ulmasov, B. és munkatársai, Plant Mol. Biol. 35, 417-424 (1997)].

Egy különösen előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti eljárás azzal jellemezhető, hogy a kívánt fehérjét kódoló gént funkcionálisan egy promóterhez kötjük oly módon, hogy egy, az alábbiakban jellemezhető nukleinsav inszertálódjék a promóter és a gén közé: (a) megakadályozza a gén transzkripcióját és/vagy transzlációját; és (b) indukció segítségével eltávolítható, ami génexpressziót erdményez. Így a kívánt gén transzkripciója vagy transzlációja nem indukált állapotban gátolt, és ezáltal a gén által kódolt idegen fehérje sem képződik. A találmány szerinti eljárás egy még előnyösebb megvalósítási módja szerint az inszertált nukleinsavat egy represszált és indukálható rekombináz vághatja ki. A rekombinázt kódoló gén ebben az esetben vagy külön inszertumként található meg a gazdanövényben vagy magán az inszertált nukleinsavon helyezkedhet el. Így a helyspecifikus rekombináció, ezzel együtt a nukleinsav kivágódása csak a rekombináz (bio)kémiai anyaggal vagy genetikai induktorral történő aktiválása után történik meg. Ennek eredményeképpen a kívánt gén közvetlenül a promóter mögé kerül, ami a transzkripciót és transzlációt iniciálja, így megkezdődik az idegen fehérje bioszintézise. A rekombinázt aktiváló induktorral kapcsolatban a promóter indukáló rendszerekkel kapcsolatban tett megállapításokra hivatkozunk. Főként azt említhetjük meg, hogy a rekombináz gént vírus is hordozhatja, például a TMV, és addig nem aktiválódik, amíg gazdaszervezet nem fertőződik meg.

A találmány szerinti eljáráshoz leginkább az LBD rekombináz (WO 95/00555 számú nemzetközi közzétételi irat) rendszert részesítjük előnyben. Ez a promóter és az expresszálni kívánt gén közé az alábbi módon inszertálódik:

5'-promóter--R-- LBD rekombináz --R--az expresszálni kívánt gén--terminátor-3'

(R = LBD rekombináz rekombinációs helye)

A rekombinázt az LBD doménnel történő fúzió inaktiválja. A növényi anyagot betakarítása után induktorral, például ösztradiollal inkubálják, ez az idegen fehérje termelését aktiválja az LBD doménhez kötődve. Ennek eredményeképpen a rekombináz aktiválódik és a rekombinázt kódoló cDNS fragmens ennél fogva kivágódik mindkét rekombinációs helyénél, így az expresszálni kívánt gén közvetlenül a promóter mögé kerül. Ezáltal az expresszálni kívánt gén transzkripciója és transzlációja lehetővé válik, és az idegen fehérje szabályozott körülmények között termelődik.

A találmány szerinti eljárás egy másik előnyös megvalósítási módja azzal jellemezhető, hogy a kívánt fehérjét kódoló gén expresszióját úgy érjük el, hogy kompenzáljuk a transzkripciós, poszt-transzkripciós, transzlációs vagy poszt-transzlációs represszor hatását, a represszort a kötött nukleinsavtól vagy az indukálandó fehérjeszekvenciától egy külső stimulussal különítük el. A transzkripció és/vagy transzláció funkcionális gátlásának kompenzációjára tett fenti megállapításokra hivatkozhatunk.

Végül, a találmány egy olyan eljárásra vonatkozik, amelyben a különböző fent említett indukciós mechanizmusokat kombináljuk, például egy kétkomponenses rendszerként. Következésképpen az

idegen gén expressziójának egy még szigorúbb szabályozása valósul meg, például a transzgénikus növényekben, és így még nagyobb mértékű biológiai biztonság érhető el, ugyanakkor a növény élettana szempontjából negatív hatásokat potenciálisan ki lehet küszöbölni. Például egy gáznemű anyaggal indukálható promóter, mint például a kukoricából származó, anaerob körülmények hatására bekapcsoló GapC4 promóter, vagy egy represszoron alapuló rendszer, egy másik rendszerrel, mint például egy rekombináción alapuló rendszerrel kombinálható azért, hogy a megfelelő idegen gén transzkripciója, amely működése az indukálható promótertől függ, csak akkor legyen lehetséges, ha a promóter és a gén szabályozott rekombinációval rekombinálódott. Például, a fentebb említett LBD rekombináz rendszert (WO 95/00555 számú nemzetközi közzétételi irat) használhatjuk fel rekombinációs rendszerként, amely az LBD rekombináz fehérjét kódoló cDNS 5' rekombinációs helyből és a rekombináz 3' rekombinációs helyből áll. Ebben a kétkomponensű rendszerben aerob körülmények között a promóter inaktív. A rekombináz az LBD doménnel való fúzió következtében szintén inaktív. Így kettős represszió jön létre. Az idegen gén nem expresszálódik mezőgazdasági illetve kertészeti körülmények között, még akkor sem, ha valamelyik represszor rendszer nem teljesen gátolt valamely környezeti stimulus miatt. Ezt a negatív hatást a második represszios rendszer közömbösíti. A növényi anyag betakarítása után LBD domén-kötő induktort adunk hozzá az idegen fehérje termelése céljából, továbbá a reakciókamrában anaerob körülményeket állítunk elő. Ez egyrészről aktiválni fogja a rekombinázt, ennél fogva a rekombinázt kódoló cDNS fragmens kivágódik mindkét rekombinációs helynél, és így az

expresszálandó gén közvetlenül az anaerob promóter mellé kerül. Ezután anaerob körülmények létrehozásával lehetővé válik az expresszálandó gén transzkripciója és transzlációja, és az idegen fehérje szabályozott körülmények között termelődik.

A találmány további tárgyát képezik azok a gazdaszervezetek, amelyek a kíván fehérjét kódoló gént úgy tartalmazzák, hogy az csak kémiai induktor jelenlétében expresszálódjék. A gazdaszervezetek főként azok, amelyek mutatják a fentebb említett transzgénikus tulajdonságokat. Ezzel kapcsolatban a korábbi megállapításainkra hivatkozhatunk.

A következő példák a találmány megmagyarázására szolgálnak.

1. példa. Az scFv anaerob, betakarítás utáni termelése burgonyában

PCR reakció segítségével az anaerob módon indukálható GapC4 promótert (DE 195 47 272 számú német közzétételi irat) úgy módosítottuk, hogy 5' végén egy HincII és egy NcoI hasító helyet tartalmazzon. A PCR reakcióhoz a következő primerpárt alkalmaztuk:

HincII-pGapC4 primer: CATGTCAACACATAAGGAAGAAGAGGTAGAAAG

pGapC4-NcoI primer: CATGCCATGGATCGATGACGGGGTTGGCGAGTGTG

Artsaenko és munkatársai [Molecular Breeding 4, 313-319. (1998)] által leírt cDNS-t, amely az endoplazmatikus retikulumban található scFv antitestet kódolja, linker-ligálás segítségével [5' végen CATGCCATGGCATG-vel, (5'-foszforilált oligonukleotid)]; 3' végen GCTCTAGAGC-vel (5'-foszforilált oligonukleotid) módosítottuk úgy, hogy az 5' végen egy NcoI, a 3' végen pedig egy XbaI restrikciós hely legyen. A pRT100 plazmidból [Töpfer és munkatársai, Nucleic Acids Research 15, 5890 (1987)] HincII és XbaI rest-

rikciós hasítást alkalmazva kivágtuk a CaMV 35S promótert. Helyére a két fentebb leírt, a GapC4 promótert illetve a scFv antitestet kódoló nukleinsav fragmenst inszertáltuk. HindIII enzimmel történő részleges emésztést követően az expressziós kazettát izoláltuk, és a pSR 8-30 bináris vektorba [Düring és munkatársai, Plant Journal 3, 587-598 (1993); Porsch és munkatársai, Plant Molecular Biology, 37, 581-585 (1998)] inszertáltuk. Így kaptuk meg a pSR 8-30/Gap-scFv(ox) vektort.

Ezt a vektort használtuk *E. coli* SM10 (Koncz és Schell, Molecular and General Genetics 204, 383-396 (1986)] transzformálására. A transzformánsokat Agrobacterium GV 3010 törzzsel (Koncz és Schell, fentebb) egy éjen át 28°C-on inkubáltuk [Koncz és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 131-135 (1987). A szelekciót karbenicillin jelenlétében végeztük, ehhez a fenti expressziós vektorokban a bla génnek jelen kellett lennie. *Agrobacterium tumefaciens* szelekciós klónjait tettük egy Dessirée fajtájú burgonyanövény olyan levágott leveleihez, amelyet a középső levélerezetnél többször megkarcoltunk, majd a leveleket két napig sötétben 28°C-on inkubáltuk. Ezután az agrobaktériumokat lemostuk, növényi növekedési faktorokat adagoltunk a burgonya levelekhez, hogy így új hajtások regenerálódjanak. Kanamicin (100 mg/ml) táptalajhoz való hozzáadásával a nem transzformált sejteket elpusztítottuk. A növekedő sarjakat levágtuk, és ezek növekedési faktorok nélkül, kanamicin jelenlétében gyökeret eresztettek a médiumba. A burgonya növényeket ezután a szokásos módon tenyésztettük.

A scFv antitest expresszióját úgy detektáltuk, hogy levágott levélanyagot vagy intakt vagy levágott gumóanyagot Anaerocoult

rendszer (Merck, Darmstadt, Germany) segítségével indukáltunk, ahogy azt Bülow és munkatársai(1999, fentebb) leírták. 40 óra elteltével a leveleket összegyűjtöttük, és eldörzsöltük. Az expresszált scFv antitestet a monoklonális 9E10-IgG (Cambridge Research Chemicals, Northwich, Chesire, U.K.) ellenanyag segítségével a keletkező c-myc Tag alapján detektáltuk, vagy L fehérje (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) vizsgálatával Western blotton vagy ELISA-n. E célból a burgonya teljes fehérjéjét izoláltuk és a megfelelő detektáló módszereket alkalmaztuk.

Az expresszióra pozitív transzgénikus burgonya növényeket üvegházban (cserépben vagy melegágyba) vagy szabadföldön mezőgazdasági vagy kertészeti körülmények között neveltük. A burgonyagumókat szokásos módon betakarítottuk és tároltuk. A scFv antitest betakarítás utáni termeltetése céljából a gumókat acél (vagy műanyag) reakciótartályokba helyeztük, amelyek alján egy gázbebocsátó, tetejükön egy gázelvezető szelep volt. Az edényben a levegőt gyorsan ipari nitrogénnel (vagy széndioxiddal) helyettesítettük. A reakciókamrában a gázfázis állandó összetételét lassú gázárammal (óránként 1 m^3 gáz/m^2 terület) biztosítottuk. 40 óra múltán a burgonyagumókat kiemeltük a reakciókamrákból, homogenizáltuk őket, a szilárd fázist centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszó vizes fázist használtuk az scFv antitest kromatográfiás tisztításához. A dezoxidáció előtti és utáni állapot összehasonlításakor kimutatható volt, hogy mielőtt az oxigént lecseréltük, nem volt scFv antitest termelés, ennek szignifikáns termelése csak a gázfázis cseréje után következett be.

2. példa. Rekombináció közvetített betakarítás utáni termelés transzgénikus burgonyában

Az Artsaenko és munkatársai (1998) által leírt cDNS-t, amely az endoplazmatikus retikulumban található scFv antitestet kódolja, az 1. példában leírt linker-ligálás segítségével módosítottuk úgy, hogy egy NcoI hasítási helye legyen az 5' végén és egy Xba hasítási helye a 3' végén. Ezt a nukleinsav szekvenciát pRT100 plazmidba inszertáltuk a polilinker régiónál. Így a pRT100/scFv(ox) plazmidot kaptuk. A pRT100/scFv(ox) plazmid NcoI hasítási helyére egy szintetikus nukleinsavat inszertáltunk, amely két FRT rekombinációs helyet [Buchholz és munkatársai, Nucleic Acid Res. 24, 3118-3119 (1996)] tartalmaz. Így kaptuk meg a pRT 100/FRT-scFv(ox) plazmidot. Az FLP-rekombináz LBD fehérjét (WO 95/00555) kódoló cDNS-t PCR adaptált NcoI-XbaI fragmensként inszertáltuk a pRT100 NcoI hasítási helyre, szensz orientációban a CaMV 35S (Odell és munkatársai, Nature 313, 810-812. (1985)] promóter mögé (pRT 100/FLP plazmid). Erre a célra az alábbi primert használtuk:

NcoI-PLP-LBD-primer: CATGCCATGCCACAATTTGATATATTATGTTAAAAC

FLP-LBD-XbaI primer: GCTCTAGATCAGACTGTGGCAGGGAAACCCTC

A pRT 100/FLP plazmidból származó expressziós kazettát részlegesen emésztett PstI fragmensként inszertáltuk a két FRT rekombinációs hely közé. eredményként a pRT 100/rec-scFv(ox) plazmidot kaptuk.

HindIII enzimmel való hasítást követően a pRT 100/rec-scFv(ox) plazmidból származó expressziós kazettát izoláltuk, és pSR 8-30 bináris vektorba [Düring és munkatársai, Plant Journal 3, 587-598 (1993); Porsch és munkatársai, Plant Molecular Biology, 37, 581-585 (1998)] inszertáltuk. Így kaptuk meg a pSR 8-30/rec-scFv(ox) vektort. A transzgénikus burgonyanövényeket az

1. példában leírt módon nyertük.

Az scFv antitest expressziójának kimutatása céljából *in vitro* termesztett burgonyanövényeket 10^{-6} M koncentrációjú ösztradiollal (Sigma Chemicals, St Louis, MO, U.S.A.) reagáltattuk tápközegen,és két napig tenyésztettük. Ezután a növényanyagot begyűjtöttük és eldörzsöltük. Az expresszált scFv antitesteket ismét c-myc Tagon (ld. előbb) vagy L-fehérjén keresztül Western blottal vagy ELISA-val mutattuk ki. E célból a burgonyából a teljes fehérje anyagot izoláltuk és használtuk fel a megfelelő módszerekben.

Az expresszióra pozitív vonalak burgonyanövényeit kivettük a klonális *in vitro* kultúrákból, és üvegházba ültettük át. Ezeket az egyedi növényeket ekkor még nem kezeltük ösztradiollal azért, hogy rekombináció ne történjen. A szabadföldi termesztés szintén normál mezőgazdasági körülményeknek megfelelően történt. A burgonyagumókat betakarítottuk és a szokásos módon tároltuk. Az scFv antitest betakarítás utáni termeléséhez a gumókat 10^{-6} M koncentrációjú ösztradiol porlasztott oldatával kezeltük a reakciókamrákban. Ennek technikai megoldását az 1. példa tartalmazza. 40 óra múlva a gumókat kiemeltük a reakciókamrából, homogenizáltuk, a szilárd fázist centrifugálással eltávolítottuk, és a vizes fázisból az scFv antitestet kromatográfiásan tisztítottuk. Az ösztradiol kezelés előtti és utáni minták összehasonlításakor kimutattuk, hogy scFv antitest termelése a kezelést megelőzően nem volt, szignifikáns mennyiségű anyagot csak a kezelést követően lehetett kimutatni.

4.714.13

Szekvencialista

<110> MPB Cologne GmbH

<120> Eljárás fehérjék gazdaszervezetekben történő, betakarítás utáni, szabályozott termelésére

<130> M 4375

<140> PCT/DE 00/03119
<141> 2000-09-05

<150> DE 199 56 272.5
<151> 1999-11-23

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Primer

<400> 1

catgtcaaca cataaggaag aagaggtaga aag 33

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Primer

<400> 2

catgccatgg atcgatgacg gggttggcga gtgtg 35

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Primer

<400> 3

catgccatgc cacaatttga tatattatgt aaaac 35

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Primer

<400> 4

gctctagatc agactgtggc agggaaaccc tc

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás egy kívánt fehérje előállítására egy transzgénikus gazdaszervezetből, amelyben az e fehérjét kódoló gén a gazdaszervezet betakarításáig nem expresszálódik, azzal jellemezve, hogy

(a) a transzgénikus gazdaszervezet a kívánt fehérjét kódoló gént úgy tartalmazza, hogy az csak egy kémiai induktor jelenlétében expresszálódjon; és

(b) az induktor anyaggal való érintkeztetést a gazdaszervezetet körülvevő fázison keresztül azután valósítjuk meg, hogy a gazdaszervezetet betakarítottuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fázis egy gázfázis.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fázis egy folyadékfázis.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépésben a gazdaszervezetet körülvevő gázfázist egy induktor oldatának (szuszpenziójának) beporlasztásával vagy egy illékony induktorral történő elárasztással módosítjuk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépésben egy vírus szuszpenzióval fertőzünk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérjét kódoló gént funkcionálisan egy indukálható promóterhez kapcsoljuk.

7. A 2., 4. és 6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gázfázist dezoxidációval módosítjuk, és

egy aerob körülmények között inaktív promótert alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a promóter a GapC4 promóter.

9. A 2., 4. és 6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (b) lépésben a kémiai induktor anyaggal való érintkezést az RH5992 induktor porlasztásán keresztül valósítjuk meg.

10. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérjét kódoló gén expresszióját a transzkripció és/vagy a transzláció funkcionális gátlásának kompenzációjával indukáljuk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérjét kódoló gén funkcionálisan egy indukálható promóterhez kapcsolódik úgy, hogy a promóter és a gén közé egy nukleinsavat van inszertálva, amely az alábbi tulajdonságokkal jellemezhető:

(a) megakadályozza a gén transzkripcióját és/vagy transzlációját; és

(b) indukció után kivágható, és ez a gén expresszióját eredményezi.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a nukleinsav egy olyan nuklainsav, amely indukálható rekombinázzal vágható ki.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a kivágandó nukleinsav és a rekombináz a LBD rekombináz rendszer tagjai.

14. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kívánt fehérjét kódoló gént a transzkripciós,

poszt-transzkripciós, transzlációs vagy poszt-transzlációs represszor hatásának kompenzálásával expresszáljuk.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy, az a 6., 10., 11. és 12. igénypontokban meghatározott eljárások közül legalább kettő kombinációja.

16. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a transzgénikus szervezet egy haszonnövény.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a haszonnövény búza, árpa, kukorica, cukorrépa, cukornád, burgonya, egy káposztaféle, egy pillangós virágú növény vagy dohány.

18. Az 1. igénypont szerinti gazdaszervezet, amely a kívánt fehérjét kódoló gént úgy tartalmazza, hogy az csak egy kémiai induktor jelenlétében expresszálódik.

A meghatalmazott:

Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099