



(19) **HU**

**MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**  
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **224 491**

(13) **B1**

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 00185**

(22) A bejelentés napja: **2000. 01. 20.**

(40) A közzététel napja: **2002. 09. 30.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: **2005. 09. 28.**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C 12 N 15/70**

C 07 K 14/54

C 12 N 15/72

C 12 N 15/24

(30) Elsőbbségi adatok:

**99100967.1 1999. 01. 20. EP**

(73) Jogosult:

**Bayer AG, Leverkusen (DE)**

(72) Feltalálók:

**dr. Apeler, Heiner, Wuppertal (DE);  
dr. Wehlmann, Hermann, Wuppertal (DE)**

(74) Képviselő:

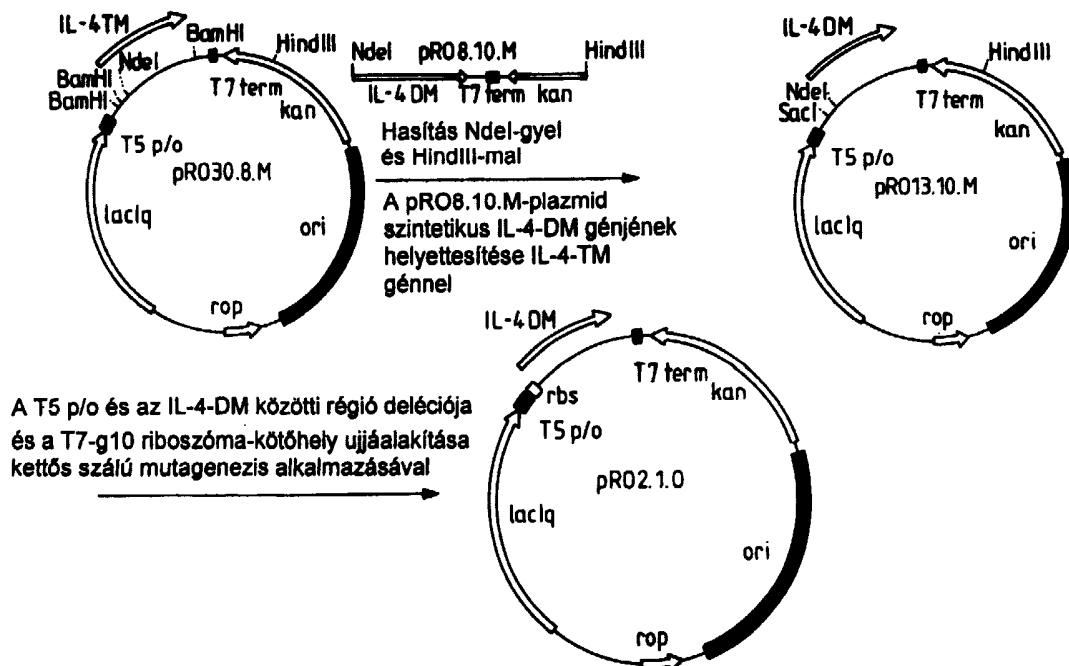
**dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és  
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54) **Plazmidok, előállítási eljárásaik, valamint alkalmazásuk interleukin-4 és interleukin-4-muteinek előállítására**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát interleukin-4 (IL-4) és IL-4-muteinek előállítására alkalmas expressziós plazmidok képezik. Szintén a találmány tárgyához tartozik az ilyen plazmidok alkalmazása rekombináns interleukin-4 és interleukin-4-muteinek előállítására.

A találmány szerinti plazmidok alkalmasak rekombináns interleukin-4 és interleukin-4-muteinek előállítására.



A T5 p/o és az IL-4-DM közötti régió deléciója és a T7-g10 riboszóma-kötőhely újalakítása kettős szálú mutagenézis alkalmazásával

4. ábra

HU 224 491 B1

A találmány tárgyát interleukin-4 (IL-4) és IL-4-muteinek előállítására alkalmas expressziós plazmidok képezik. Szintén a találmány tárgyához tartozik az ilyen plazmidok alkalmazása rekombináns interleukin-4 és interleukin-4-muteinek előállítására.

A találmány szerinti plazmidok sokkal nagyobb mértékű expressziót, illetve plazmidstabilitást és expressziós stabilitást biztosítanak, mint az eddig ismert egyéb plazmidok, ezáltal sokkal alkalmasabbak a rekombináns interleukin-4 és az interleukin-4-muteinek előállítására.

Az érett humán interleukin-4 (IL-4) 129 aminosavból áll, és 50%-ban homológ az egéregedetű interleukin-4-gyel. Az IL-4 az egyetlen olyan ismert citokin, amely a T-segítő- („helper”-) sejtek T<sub>H2</sub>-fenotípusú sejtekké történő differenciálódását szabályozza [Mosmann és Sad: Immunol. Today 17, 138 (1996)]. Az IL-4 a limfocitákra és egyéb sejtípusokra két citokinreceptor, az IL-4R $\alpha$  és a közös  $\gamma$ -lánc ( $\gamma$ c) heterodimer komplexén keresztül fejti ki hatását. Kruse és munkatársai [EMBO J. 11, 3237 (1992)] antagonisták aktivitású IL-4-mutánsokat írtak le. A  $\gamma$ c-lánchoz történő kötődés szempontjából három – C-terminálshoz közeli – aminosavnak (R121, Y124 és S125) van nagy jelentősége. Ha ezekre a helyekre aszparaginsavat (Asp, D) helyettesítünk, a receptordimerizáció és a transzmembrán-jelátvitel gátlás alá kerül.

Az interleukin-4 dupla mutein (IL-4 DM) olyan IL-4-változat, amely a 121. és 124. pozícióban aminosavszubsztitúciót hordoz (R121D és Y124D). Az IL-4 DM az IL-4 és az IL-13 aktivitását egyaránt képes gátolni. E mutein esetében – szemben az egy mutációt hordozó mutánsokkal – soha nem mutattak ki maradék agonista aktivitást. Úgy véljük, hogy az IL-4 antagonisták tulajdonságai hasznosak a T<sub>H2</sub>-fenotípus kialakulásával és/vagy az IgE-termelődéssel kapcsolatos betegségek kezelésére [Ryan: J. Allergy Clin. Immunol. 99, 1 (1997)].

Mint ahogy az számos forrásból ismeretes, a rekombináns IL-4 és IL-4-muteinek termelésére prokarióta mikroorganizmusok alkalmazhatók. A korábban leírt expressziós rendszereknek sajnos számos hátránya van (alacsony expressziós szint, az expressziós vektor nem megfelelő stabilitása), ami az IL-4 és az IL-4-muteinek nagy mennyiségben történő előállítását lehetetlenné vagy gazdaságtalanná teszi. Ilyen expressziós rendszerek és a bennük használt regulációs elemek leírását megtalálhatjuk többek között: Ptitsyn és munkatársai, Bull. Exp. Biol. Med., 119: 77–79. oldalán és US 4689406 számú szabadalmi leírásban; ám az említett publikációkban ismertetett adatok nem adnak – még együttes figyelembevétel esetén sem – szakember számára kellő útmutatást a találmány szerinti expressziós rendszerek lehetséges kifejlesztésére vonatkozóan, és a leírásban ismertetett találmány szerinti expressziós rendszerek lényegesen előnyösebbek a fenti publikációkban ismertetettekénél.

A hatékony és biztonságos expressziós rendszer fő kritériumai a következők:

- nagy hozam;
- szabályozható, stabil expresszió;
- az expressziós vektor stabilitása.

A fenti kritériumok szempontjából az alkalmazott expressziós plazmid több komponense is fontos [Hannig és munkatársai: TIBTECH 16, 54 (1998)], melyek a következők:

- 5 – promoter;
- riboszómakötő helyek;
- a megfelelő gén kodonfelhasználása;
- transzkripció terminátorszignál;
- rezisztenciagén;
- 10 – expressziós szabályozóelemek;
- replikációs kezdőhely (ori).

A találmány szerinti megoldás értelmében olyan – IL-4 és IL-4-muteinek expresszálatására alkalmas – expressziós plazmidokat állítottunk elő, amelyek valamennyi lényeges eleme – a hatékony és biztonságos expresszió érdekében – módosítva van. A megfelelő expressziós rendszer minőségét és alkalmasságát a következő kritériumok alapján ítéltük meg:

- az IL-4 és az IL-4-muteinek hozama;
- 20 – plazmidstabilitás;
- indukciós képesség fennmaradása.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során a rekombináns interleukin-4 (IL-4) és az interleukin-4-muteinek nagy mennyiségben történő előállítására alkalmas expressziós plazmidok előállítási és alkalmazási eljárásának kidolgozását tűztük ki célul. Az újonnan kifejlesztett gazda/vektor rendszernek más proteinek (citokinek, növekedési faktorok, oldékony receptorok, antitestek stb.) expresszálatására is alkalmaznak kell lennie.

Felismertük, hogy a találmány szerinti plazmidokkal transzformált baktériumok, meglepő módon, sokkal nagyobb mértékű expressziót, illetve plazmidstabilitást és expressziós stabilitást biztosítanak, mint az ismert plazmidokkal transzformált, ugyanezen gazdasejtek. Ennek megfelelően a találmány szerinti plazmidok sokkal alkalmasabbak a rekombináns interleukin-4 és az interleukin-4-muteinek előállítására, mint bármely, korábban ismert plazmid.

A találmány szerinti, újonnan kifejlesztett vektorrendszer a következő elemeket tartalmazza:

#### T5-promoter

A T5 *E. coli* fág promotere – két lac-operátorszekvenciával együtt – a pDS plazmidcsaládba [Bujard és munkatársai: Methods Enzymol. 155, 416 (1987); Stüber és munkatársai: „Immunological Methods” szerk.: Lefkovits és Pernis, Academic Press, Inc. IV. kötet, 121. old. (1990)] tartozó pQE30 plazmidból (Qiagen) származik.

#### T7-g10 riboszómakötő hely

Ez a riboszómakötő hely (rbs) a T7-fág 10. génjétől 5'-irányban elhelyezkedő régióból (T7-g10 vezetőszekvencia) származik. A T7-fág 10. génje a fág burokproteinjét kódolja, amely a T7-fertőzés után expresszálandó fő protein. A T7-g10 riboszómakötő helyet a pET-9a-vektorból [Studier és munkatársai: Methods Enzymol. 185, 60 (1990)] nyertük. A T7-g10 vezetőszekvencia kb. 100 bp-os régiót ivel át [Olins és mun-

katársai: Gene 227, 235 (1988)]. A végső expressziós konstrukcióban az XbaI-helytől 5'-irányban lévő régiót delécióval eltávolítottuk, így a T7-g10 vezetőszekvencia 42 bp hosszúságú, és a találmány szerinti előnyös plazmid 3638. pozíciójában egy G→A szubsztitúciót hordoz.

#### A természetes IL-4-szekvencia kodonfelhasználása

A szinonim kodonfelhasználásra vonatkozó hajlam hatékony mérőszámaként kodonadaptációs index (CAI) határozható meg, amely alkalmas lehet egy adott gén expressziója mértékének megjósolására [Sharp és munkatársai: Nucleic Acids Res. 15, 1281 (1987); Apeleler és munkatársai: Eur. J. Biochem. 247, 890 (1997)]. A CAI-érték úgy számítható ki, hogy az adott génben alkalmazott egyes kodonoknak megfelelő relatív szinonim kodonfelhasználási (RSCU) értékek geometriai átlagát elosztjuk az ugyanolyan aminosav-összetételű aminosavszekvenciát kódoló gén maximális lehetséges CAI-értékével. Az egyes kodonokra vonatkozó RSCU-értékeket egy adott organizmusban (például *E. coli*-ban) nagyon nagy mennyiségben expresszálandó génekből számítjuk ki; az RSCU-érték jelentése: a kodon megfigyelt gyakorisága, osztva az egy aminosavat kódoló szinonim kodonok egyenlő felhasználását feltételezve várt gyakorisággal. A nagy mennyiségben expresszálandó (például riboszomális proteinek kódoló) gének CAI-értéke általában magas ( $\geq 0,46$ ), míg a kis mennyiségben expresszálandó gének (mint például a lacI- és trpR-gén) *E. coli*-ban kis CAI-értékűek ( $\leq 0,3$ ).

A természetes IL-4-szekvenciára kiszámított *E. coli* CAI-érték 0,733. Ez azt jelenti, hogy a természetes gén *E. coli*-ban alkalmas a nagy mennyiségben történő expresszióra. Mindazonáltal *E. coli*-ban optimális kodonfelhasználás szintetikus génnel (amelynek CAI-értéke 1) tovább növelhető az expresszió nagysága. Ennek megfelelően szintetikus IL-4- és IL-4-mutein-géneket terveztünk és klónoztunk.

#### Transzkripció terminátorszignál

A T $\phi$  transzkripció terminátorszignált tartalmazó T7-DNS-fragmens a pET-9a-vektorból [Studier és munkatársai: Methods Enzymol. 185, 60 (1990)] származik. A transzkripció terminátorszignálok határozzák meg az mRNS/RNS-polimeráz/DNS komplex disszociációjának – s ezáltal a transzkripció befejezésének – helyét. Egy nagy mennyiségben expresszálandó gén végén a transzkripció terminátorszignál jelenlétének több előnye is van: minimálisra csökkenti az RNS-polimeráz – szükségtelen transzkripcióban való – lefoglaltságát; minimálisra korlátozza az mRNS hosszúságát, korlátozva ezáltal az energiavesztést, mivel a nagymértékű transzkripció zavarhatja a replikációs kezdőhelyet, egy transzkripció terminátor – a kópiaszám fenntartása révén – növeli a plazmidstabilitást [Balbas és Bolivar: Methods Enzymol. 185, 14 (1990)].

#### Rezisztenciagén

A kan-rezisztenciagén a pET-9a-vektorból [Studier és munkatársai: Methods Enzymol. 185, 60 (1990)]

származik. Eredetileg ez a gén a pUC4KISS-vektorból [Barany, Gene 37, 111 (1985)] származó Tn903 kan-génje. A találmány szerinti előnyös plazmidban a kan-gén és az IL-4-, illetve IL-4-muteingén ellentétes orientációban helyezkedik el, miáltal a kan-gén-termék mennyisége a T5-promoterről kiinduló, túlszaladó („read-through”) transzkripciónak köszönhető indukció után nem növekedhet. A kanamicint azért választottuk szelekciós markerként, mert GMP-célokra ez az előnyös antibiotikum. Ezenfelül a kan-géneken alapuló vektorok stabilabbak, mint az ampicillinrezisztencia-géneket hordozó (bla) plazmidok. Az ampicillines szelekció a tenyésztésben kiválasztott  $\beta$ -laktamáz-enzim antibiotikumot lebontó hatásának következtében lehetetlenné válik. A baktériumok kanamicinnel szembeni rezisztenciája amino-glikozid-foszfotranszferázon alapul, amely inaktíválja az antibiotikumot.

#### Expressziós szabályozóelemek

Stabil plazmidrendszer létrehozása céljából feltétlenül szükség van szabályozott génexpresszióra, különösen olyan esetben, ha az expresszálatni kívánt protein káros a gazdasejtre. A találmány szerinti előnyös plazmidban lac-alapú, indukálható rendszert alkalmazunk, amely lac-represszorgénből (lacI) és két szintetikus lac-operátorszekvenciából áll, melyek az *E. coli* T5-fágjának promoterének 3'-végéhez vannak kapcsolva. A lacI<sup>q</sup>-promotert és a lacI-struktúrgént a pTrc99A-vektorból [Armann és munkatársai: Gene 69, 301 (1988)] izoláltuk. Az I<sup>q</sup> egy promotermutáció, amely a lacI-represszor túltermelődését eredményezi. A vad típusú lac-represszor egy tetramer molekula, amely négy azonos, egyenként 360 aminosavas alegységből áll. A lac-represszor tetramer két funkcionális dimerből álló dimer. A négy alegységet a 340–360. aminosavakból álló, négy hélixes köteg tartja össze. Mivel a lacI-gént a pTrc99A-vektorból NarI-endonukleázzal végzett hasítással izoláltuk, a 331. aminosav utáni aminosavakat kódoló nukleotidok hiányoznak, és 10 további – a lacI-gén által normális esetben nem kódolt – aminosavat kódoló nukleotid van hozzákapcsolva. Ismeretes, hogy a lacI C-terminális részén – a 329. aminosav után – található mutációk vagy deléciók olyan működőképes dimereket eredményeznek, amelyek fenotípus szintjén hasonlóak a vad típusú represszorhoz [Pace és munkatársai: TIBS 22, 334 (1997)].

#### Replikációs kezdőhely (ori)

A találmány szerinti előnyös plazmid replikációs kezdőhelye (ori) a pET-9a-vektorból származik (melynek replikációs kezdőhelye viszont a pBR322 plazmidból való). Ennek megfelelően a találmány szerinti előnyös plazmid a pMB1-(ColE1)-replikont hordozza. Az e replikont tartalmazó plazmidok sokkópiás plazmidok, amelyek „relaxált” módon replikálódnak. Normális tenyésztési feltételek mellett minden egyes baktériumsejtben minimum 15–20 plazmidkópia marad fenn. A találmány szerinti előnyös plazmid tényleges példányszáma e tartományon belül esik. A ColE1 típusú ori replikációját egy 555 nukleotidos RNS-transzkrip-

tum, az RNS-II indítja be, amely – az ori közelében lévő – templát-DNS-ével állandó hibridet alkot. Az RNS-II/DNS hibridet ezután – az ori pozíciójában – RNáz-H hasítja, miáltal szabad 3'OH-csoport képződik, amely a DNS-polimeráz-I láncindítójaként szolgál. A DNS-szintézis ilyenfajta beindítása az RNS-I (amely az RNS-II 5'-végével komplementer, 108 nukleotidos RNS-molekula) negatív szabályozása alatt áll. Az antiszensz RNS-I és az RNS-II közötti kölcsönhatás az RNS-II konformációs változását eredményezi, ami gátolja az RNS-II templát-DNS-hez történő kötődését, s ezáltal gátolja a plazmid-DNS szintézisének beindítását. Az RNS-I RNS-II-höz történő kötődését egy 63 aminosavas protein (Rop-protein; „Repressor of primer”) serkenti; ezt a proteint a replikációs kezdőhelytől 3'-irányban, 400 nukleotidnyi távolságra lévő gén kódolja [Sambrook és munkatársai: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor (1989)]. A Rop-proteint kódoló rop-gén deléciója a kópiaszám fokozódásához és – a gén dózishatásának következtében – a plazmid által hordozott heterológ gén megnövekedett expressziós szintjéhez vezet. Az IL-4 tesztelt expressziós vektorai esetében ugyanezt tapasztaltuk, azonban kiderült, hogy a rop-plazmidok instabilak, és nem szelektív feltételek mellett végzett fermentáció során nagyon gyorsan elfogynak. A találmány szerinti előnyös plazmidból hiányzik a mobilizációhoz szükséges mob-gén, ezáltal nem képes saját – egyik baktériumsejtről a másikra történő – konjugációs átjutásának vezérlésére.

A találmány szerinti előnyös plazmidból valamennyi olyan elemet eltávolítottunk, amely a plazmid replikációjához, a rezisztenciához és a szabályozható expresszióhoz nem szükséges.

A találmány szerinti előnyös plazmid előállításánál nincs szükség valamennyi, fentebb felsorolt elemet a plazmidba foglalnunk. Például interleukin-4 vagy az interleukin-4-mutein szintetikus – optimalizált *E. coli* kodonfelhasználású – génje helyett természetes gént is alkalmazhatunk. A plazmidban előnyösen T $\phi$  transzkripció terminátort alkalmazunk, de egyéb terminációs szignálok (például rnb-T2 vagy aspA) is alkalmasak. Hasonlóan, a találmány szerinti előnyös plazmid előállításához a fentebb említett, kereskedelmi forgalomban beszerezhető vektoroktól eltérő vektorokból származó elemek is alkalmazhatók.

A következőkben az expressziós rendszer létrehozása során alkalmazott eljárásokat ismertetjük.

#### Anyagok és módszerek

##### Enzimek

A restriktív endonukleázokat, a borjúbél-eredetű alkalikus foszfatázt, a T4-polinukleotid-kinázt és a T4-DNS-ligázt a Boehringer-Mannheimtől és a GIBCO-BRL-től vásároltuk, és ezeket a forgalmazók által megadott használati útmutatás szerint alkalmaztuk.

##### Rekombináns DNS-technikák

A szokványos klónozási eljárások leírását lásd Sambrook és munkatársai: „Molecular Cloning, A La-

boratory Manual”, Cold Spring Harbor (1989). A transzformálásokat M. Scott módszerével végeztük [Seed és Aruffo: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365 (1987)]. A transzformálások gazdasejtjeiként elsősorban az *E. coli* DH5 $\alpha$ -törzset (GIBCO BRL) és az *E. coli* W3110-törzset (ATCC 27 325) alkalmaztuk. A W1330-sejtek genotípusa K12, F<sup>-</sup>, [N(rrnD-rnE)] $\lambda$ <sup>-</sup>.

A plazmid-DNS nagy mennyiségben történő izolálására Qiagen-pipettahegyeket (Qiagen) alkalmaztunk. A DNS-fragmenseket „Jetsorb” (Genomed) alkalmazásával – a forgalmazó útmutatásai szerint – vontuk ki az agarózgélekről.

A helyspecifikus mutagenézis, a polimeráz-láncreakciók és a nukleotidszekvenálások végrehajtására alkalmas oligonukleotidokat az MWG Biotech-től, a Pharmacia Biotech-től és a GIBCO BRL-től szereztük be.

A mutagenizálási kísérleteket Deng és Nickoloff eljárásával hajtottuk végre [Deng és Nickoloff: Anal. Biochem. 200, 81 (1992)], melynek során a Pharmacia Biotech-től származó „Unique Site Elimination Mutagenesis” rendszert alkalmaztuk. A T7-g10 riboszómakötő hely újjalakítására alkalmazott láncindító nukleotidszekvenciája a következő:

5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACATCTA-GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAA3' (1. azonosító számú szekvencia).

Valamennyi konstrukció és DNS-szekvencia nukleotidszekvenciáját ABI 373A típusú szekvenálókészülékkel („Applied Biosystems”), „Dye Terminator Cycle Sequencing” reagenskészlet, „AmpliAq” DNS-polimeráz, FS alkalmazásával határoztuk meg.

A találmány szerinti megoldást a következőkben a kísérleti példák, az ábrák és a szekvenciainformációk segítségével ismertetjük részletesen.

Az 1–4. ábrákon a találmány szerinti előnyös expressziós plazmid előállításának vázlatát mutatjuk be (IL-4 TM=IL-4 tripla mutein; IL-4 DM=IL-4 dupla mutein).

Az 5. ábrán az IL-4-mutein expresszáló pRO21.1.O és pRO2.1.O expressziós vektorok plazmidstabilitásának tanulmányozására végzett kísérlet eredményeit mutatjuk be. A pRO2.1.O-vektor – antibiotikumos szelekció nélkül – 78 generáción keresztül stabil marad, míg a kereskedelmi forgalomban beszerezhető pET-30a plazmidon (Novagen) alapuló pRO21.1.O-vektor nagyon gyorsan elfogy (ezt a vektort kanamicines szelekció nélkül, 78 generáció után csak a telepek 16%-a tartalmazta).

A 6. ábrán a találmány szerinti előnyös IL-4 és IL-4-mutein expressziós vektor indukció utáni expressziós képességének fennmaradását mutatjuk be. A különböző számú generációkon keresztül, antibiotikumos szelekció nélkül tenyésztett *E. coli*/pRO2.1.O-sejtek teljes kivonatainak 15%-os poliakril-

amid-gélen végzett SDS-PAGE-analízise 0,5 mM végkoncentrációjú IPTG-vel öt óra hosszat végzett indukció után. A gél üregeibe az újraszuszpendált sejttöledék 10-10 µl-ét töltöttük. A gélt redukáló feltételek mellett futtatuk, majd „Coomassie brillant blue” színezéssel festettük.

1. sáv: Molekulatömeg-marker („Low Range”, Life Technologies);
2. sáv: IL-4-muteinek (5 µg);
3. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (8 generáció) indukció előtt;
4. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (8 generáció) indukció után;
5. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (18 generáció) indukció után;
6. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (28 generáció) indukció után;
7. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (38 generáció) indukció után;
8. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (48 generáció) indukció után;
9. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (58 generáció) indukció után;
10. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (68 generáció) indukció után;
11. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (78 generáció) indukció előtt;
12. sáv: *E. coli*/pRO2.1.O (78 generáció) indukció után;
13. sáv: Molekulatömeg-marker („Low Range”, Life Technologies);
14. sáv: Molekulatömeg-marker („High Range”, Life Technologies).

#### 1. példa

##### Plazmidstabilitási teszt

A plazmidstabilitási teszteket minden esetben folyékony nitrogénben lefagyasztott tenyésztel kezdjük. Először meghatározzuk a felolvasztott tenyésztel  $OD_{600}$ -értékét, majd a tenyésztetet PBS-pufferben  $10^{-4}$ -szeres koncentrációra hígítottuk, és antibiotikumok nélkül LB-agarlemezekre kentük.

A felolvasztott tenyésztet 1 ml-ét 100 ml peptontápközegbe (30 g/liter szójapepton; 20 g/liter élesztőkivonat; 5 g/liter  $KH_2PO_4$ ; 20 g/liter glicerin; 1 g/liter

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; pH=7,0) oltottuk, és percnkénti 280-as fordulatszámú keverve, 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk.

- 5 A tenyésztet optikai denzitását 600 nm-nél mértük, majd a tenyésztetet PBS-pufferben  $10^{-6}$ -szoros koncentrációra hígítottuk, és antibiotikum nélküli LB-agarlemezekre szélesztettük, hogy jól elkülönült telepeket kapjunk.

- 10 A tenyésztet 100 µl-ét 100 ml peptontápközegbe oltottuk, és percnkénti 280-as fordulatszámú keverve, 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk.

- 15 Az LB-lemezekről származó 100, jól elkülönült telepet kanamicint (25 µg/ml) tartalmazó LB-lemezekben, illetve kanamicin nélküli LB-lemezekben kialakított rácsozatba helyeztük, 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd naponta meghatározzuk a rezisztens telepek százalékos arányát.

A naponkénti generációs számot a következő képletel számítottuk ki:  $\log[\text{kiindulási } OD_{600} / \text{vég } OD_{600}] / \log 2$ .

- 20 Az expressziós vizsgálatokhoz a tenyésztet 1 ml-ét LB-tápközegben 100-szoros térfogatra hígítottuk, és a 2. példában leírtak szerint kezeltük.

#### 2. példa

- 25 *Expressziós vizsgálat*

Az interleukin-4 és az interleukin-4-muteinek kis mennyiségben történő expresszálatása céljából a sejteket LB-tápközegben (10 g/liter Bactotripton; 5 g/liter élesztőkivonat; 10 g/liter NaCl; pH=7,5) addig tenyésztettük, míg a 600 nm-nél mért optikai denzitás ( $OD_{600}$ ) 0,8–1,0 értéket nem ért el. Az expressziót 0,5 mM végkoncentrációjú IPTG hozzáadásával indukáltuk, és az inkubálást 5 óra hosszat folytattuk. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze.

- 35 Az SDS-PAGE-analízis elvégzéséhez a sejttöledéket SDS-PAGE felvivőpufferben – 1  $OD_{600}$ -egység/100 µl koncentrációra – hígítottuk.

### SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 60

<212> DNS

<213> ismeretlen

<220>

<223> ismeretlen élőlény leírása: primer

<400> 1

tcaattgtga gcgataaca atttcacaca tctagaaata atttgttta  
actttaagaa

60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNS

<213> ismeretlen

<220>

<223> ismeretlen élőlény leírása: ember

<400> 2

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat  
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca  
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc  
tattaatttc cctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aatcaccat gagtgacgac

60

120

180

240

tgaatccggt	gagaatggca	aaagcttatg	catttctttc	cagacttggt	caacaggcca	300
gccattacgc	tcgtcatcaa	aatcactcgc	atcaacccaa	ccgttattca	ttcgtgattg	360
cgctgagcg	agacgaaata	cgcgatcgct	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	420
atgcaaccgg	cgcaggaaca	ctgccagcgc	atcaacaata	ttttcacctg	aatcaggata	480
ttcttcta	acctggaatg	ctgttttccc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcate	540
atcaggagta	cggataaaat	gcttgatggt	cggaaagaggc	ataaattccg	tcagccagtt	600
tagtctgacc	atctcatctg	taacatcatt	ggcaacgcta	cctttgccat	gtttcagaaa	660
caactctggc	gcategggct	tcccatacaa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgcac	720
attatcgcga	gcccatttat	acccatataa	atcagcatcc	atgttggat	ttaatcgcg	780
cctcgagcaa	gacgtttccc	gttgaatatg	gctcataaca	ccccttgat	tactgtttat	840
gtaagcagac	agttttattg	ttcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	900
gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaa	gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	960
taatctgctg	cttgcaaaaa	aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgcccagtc	1020
aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaata	1080
ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	1140
catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgct	1200
ttaccggggt	ggactcaaga	cgatagttac	cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaaccg	1260
ggggttcggt	cacacagccc	agcttggagc	gaacgacct	caccgaactg	agatacctac	1320
agcgtgagct	atgagaaagc	gccacgcttc	ccgaaggag	aaaggcggac	aggatatccg	1380
taagcggcag	ggtcggaaaca	ggagagcgc	cgagggagct	tccaggggga	aacgcctggt	1440
atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	1500
cgtcaggggg	gcgagccta	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	1560
ccttttgctg	gccttttgct	cacatgttct	ttcctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	1620
accgtattac	cgcttttgag	tgagctgata	ccgctcgcgc	cagccgaacg	accgagcgc	1680
gagagtcagt	gagcagaggaa	gcggaagagc	gcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcate	1740
tgtgcggtat	ttcacaccgc	aatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	1800
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	ctgactggg	tcattggctgc	gccccgacac	1860
ccgccaacac	ccgctgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcate	cgcttacaga	1920
caagctgtga	ccgtctcccg	gagctgcatg	tgctcagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	1980
cgcgcgaggc	agctgcggta	aaagctcatca	gcgtggctgt	gaagcgattc	acagatgtct	2040
gcctgttcat	ccgcgtccag	ctcgttgagt	ttctccagaa	gcgttaatgt	ctggcttctg	2100
ataaagcggg	ccatgttaag	ggcggttttt	tcctgtttgg	tcactgatgc	ctccgtgtaa	2160
gggggatttc	tgttcatggg	ggtaaatgata	ccgatgaaac	gagagaggat	gctcacgata	2220
cgggttactg	atgatgaaca	tgcccggtta	ctggaacggt	gtgagggtaa	acaactggcg	2280
gtatggatgc	ggcgggacca	gagaaaaatc	actcagggtc	aatgccagcg	ctcatgagcc	2340
cgaagtggcg	agcccgatct	tccccatcgg	tgatgtcggc	gatataggcg	ccagcaaccg	2400
cacctgtggc	gcccgtgatg	ccggccacga	tgcgtccggc	gtagaggate	gagatccatt	2460
tacgttgaca	ccatcgaatg	gtgcaaaaac	tttcgcggta	tggcatgata	gcgcccggaa	2520
gagagtcaat	tcagggtggt	gaatgtgaaa	ccagtaacgt	tatacagatg	cgcagagtat	2580
gcccgtgtct	cttatcagac	cgtttcccgc	gtggtgaacc	aggccagcca	cgtttctgcg	2640
aaaaagcggg	aaaaagtgga	agcggcagtg	gcggagctga	attacattcc	caaccgcgtg	2700
gcacaacaac	tgccgggcaa	acagtcgctg	ctgattggcg	ttgccacctc	cagtctggcc	2760
ctgcacgcgc	cgtcgcaaat	tgctcggcg	attaatctc	gcgcccgatca	actgggtgcc	2820
agcgtggtgg	tgctcagatg	agaacgaagc	ggcgtcgaag	cctgtaaagc	ggcgggtgcac	2880
aatcttctcg	cgcaacgcgt	cagtgggctg	atcattaact	atccgctgga	tgaccaggat	2940
gccattgctg	tggaagctgc	ctgcaactat	gttccggcgt	tatttcttga	tgtctctgac	3000
cagacaccca	tcaacagtat	tattttctcc	catgaagacg	gtacgcgact	gggctgggag	3060
catctggtcg	cattgggtca	ccagcaaatc	gcgctgttag	cgggcccatt	aagttctgtc	3120
tcggcgcgct	tgctctggc	tggctggcat	aaatatctca	ctcgcfaatca	aattcagccg	3180
atagcggaac	gggaaggcga	ctggagtgcc	atgtccgggt	ttcaacaaac	catgcaaatg	3240
ctgaatgagg	gcategttcc	cactgcgatg	ctggttgcc	acgatcagat	ggcgtgggc	3300
gcaatgcgcg	ccattaccga	gtccgggctg	cgcgttggtg	cggatatctc	ggtagtggga	3360
tacgacgata	ccgaagacag	ctcatgttat	atcccgcctg	taaccaccat	caaacaggat	3420
tttcgcctgc	tggggcaaac	cagcgtggac	cgcttgctgc	aactctctca	gggcccaggcg	3480
gtgaagggca	atcagctgtt	gcccgtctca	ctggtgaaaa	gaaaaaccac	cctggctcga	3540
gaaatcataa	aaaatttatt	tgctttgtga	gcggataaca	attataatag	attcaattgt	3600
gagcggataa	caatttcaca	catctagaaa	taattttatt	taactttaag	aaggagatat	3660
acatatgcac	aaatgcgata	tcaccctgca	ggaaatcctc	aaaaccctga	attctctgac	3720
cgaacagaaa	accctgtgca	ccgaactgac	cgttaccgac	atcttgcctg	cttcgaaaaa	3780
caccaccgaa	aaagaaacct	tctgcctgct	tgctaccggt	ctgcgtcagt	tctactctca	3840

ccacgaaaaa	gacacccggt	gcctgggtgc	taccgctcag	cagttccacc	gtcacaaaca	3900
gctgatccgt	ttcctgaaac	gtctggaccg	taacctgtgg	ggctctggctg	gtctgaacag	3960
ctgcccgggt	aaagaagcta	accagtctac	cctggaaaac	ttcctggaac	gtctgaaaac	4020
catcatggac	gaaaaagact	ctaaatgctc	ttcttaataa	ggatccggt	gctaacaaag	4080
cccgaagga	agctgagttg	gctgctgcca	ccgetgagca	ataactagca	taacccttg	4140
ggcctctaa	acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaagg	aggaactata	tccggataat	4200
tc						4202

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Plazmid IL-4 és IL-4-muteinek *Escherichia coli* 15 törzsben történő előállítására, amely 5'→3' irányban tartalmazza a következő – egymáshoz működőképesen kapcsolt – elemeket: *E. coli* T5-fág promoterből és két lac-operátorszekvenciából álló, vezérelhető promoter; *E. coli* T7-fágból származó T7-g10 riboszómakötő 20 hely; translációs kezdőkodon; az IL-4 vagy IL-4-mu-

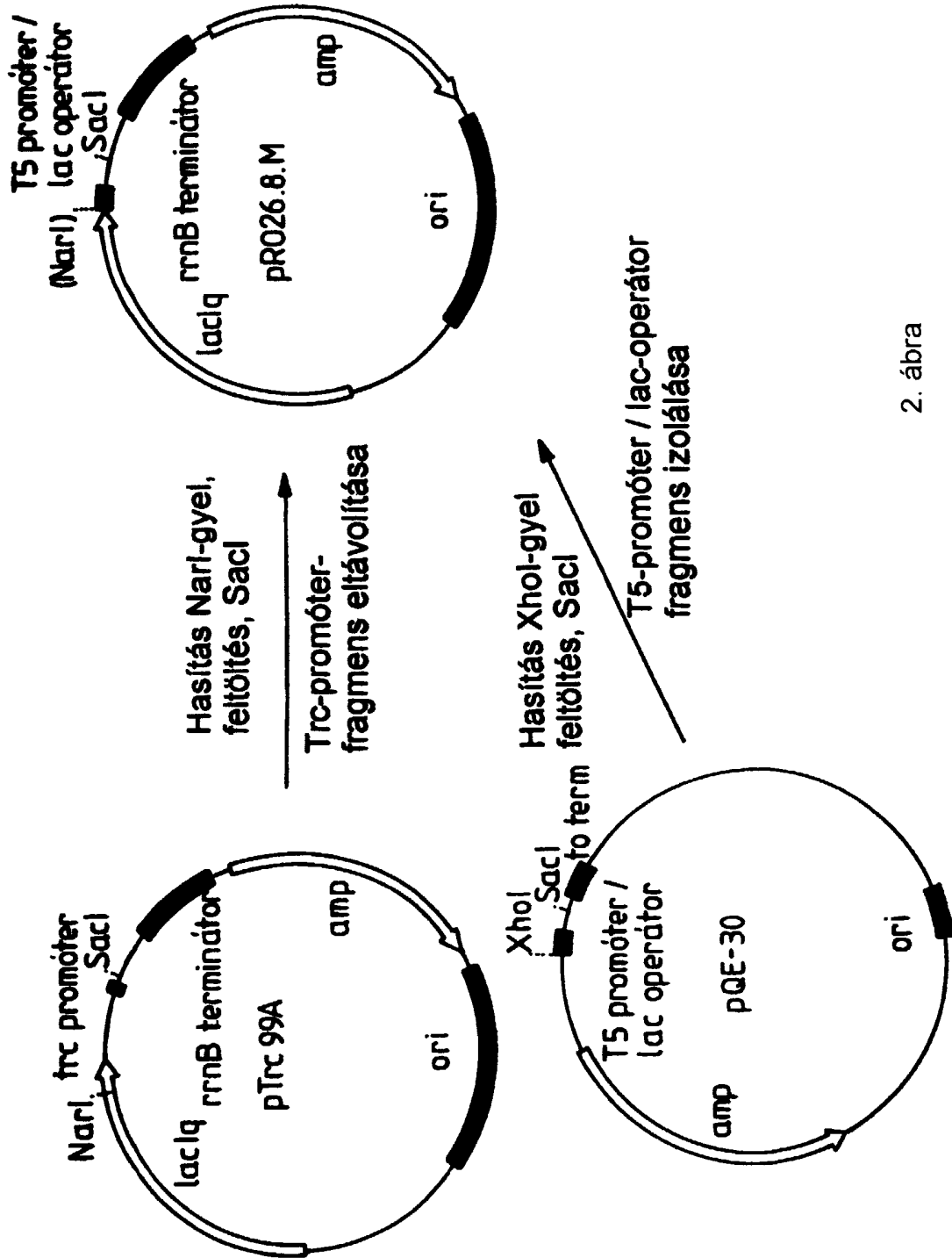
tein strukturális génje; valamint a strukturális géntől 3'-irányban egy transzkripció terminációs szignál.

2. A 4. ábrán bemutatott szerkezetű pRO2.1.0 plazmidot tartalmazó *E. coli*-sejt.

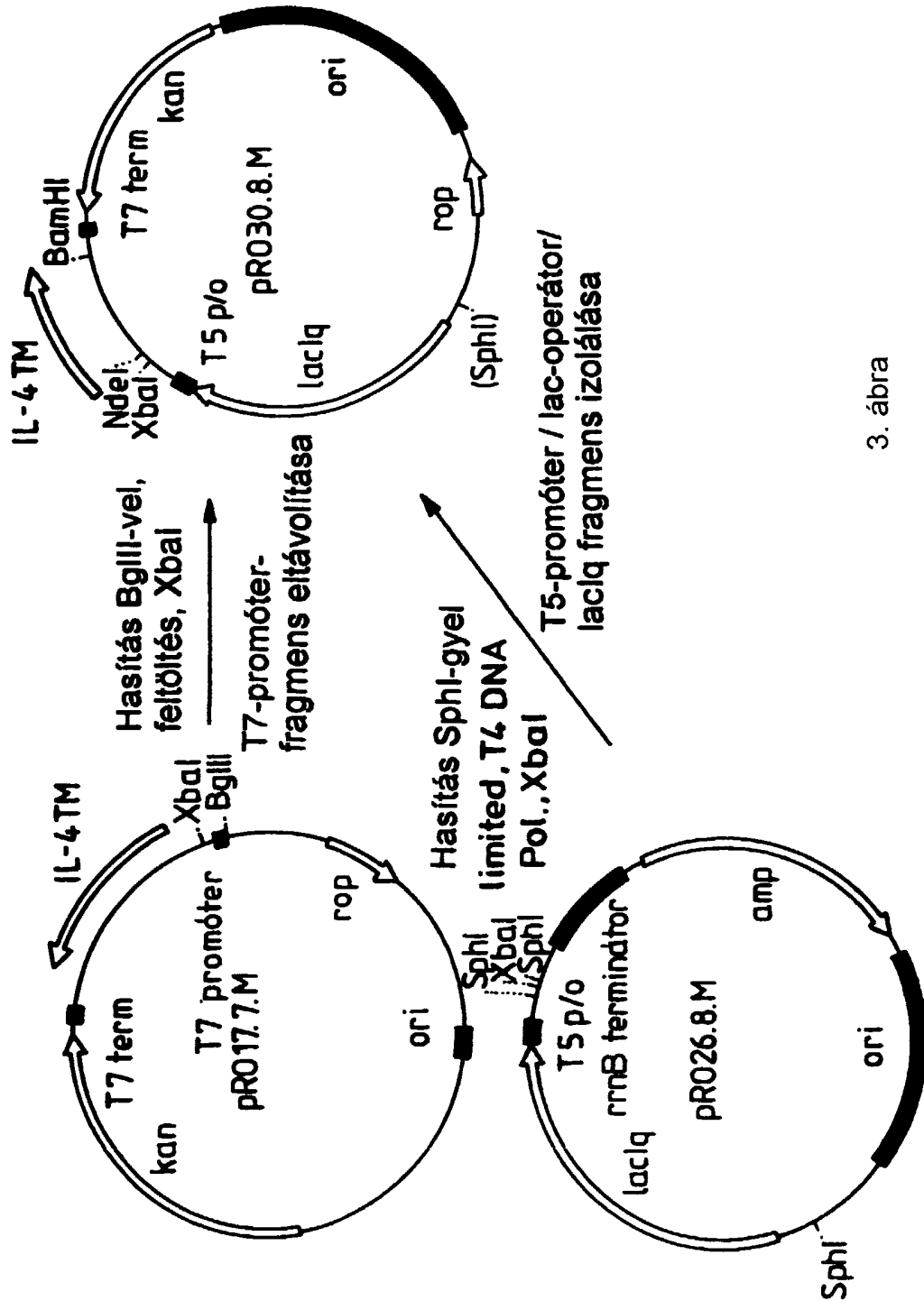
3. *Escherichia coli*, amely 1. igénypont szerinti vagy a 2. igénypontban említett plazmiddal van transzformálva.

4. Az 1. igénypont szerinti vagy a 2. igénypontban említett plazmid alkalmazása IL-4 vagy IL-4-muteinek előállítási eljárásában.

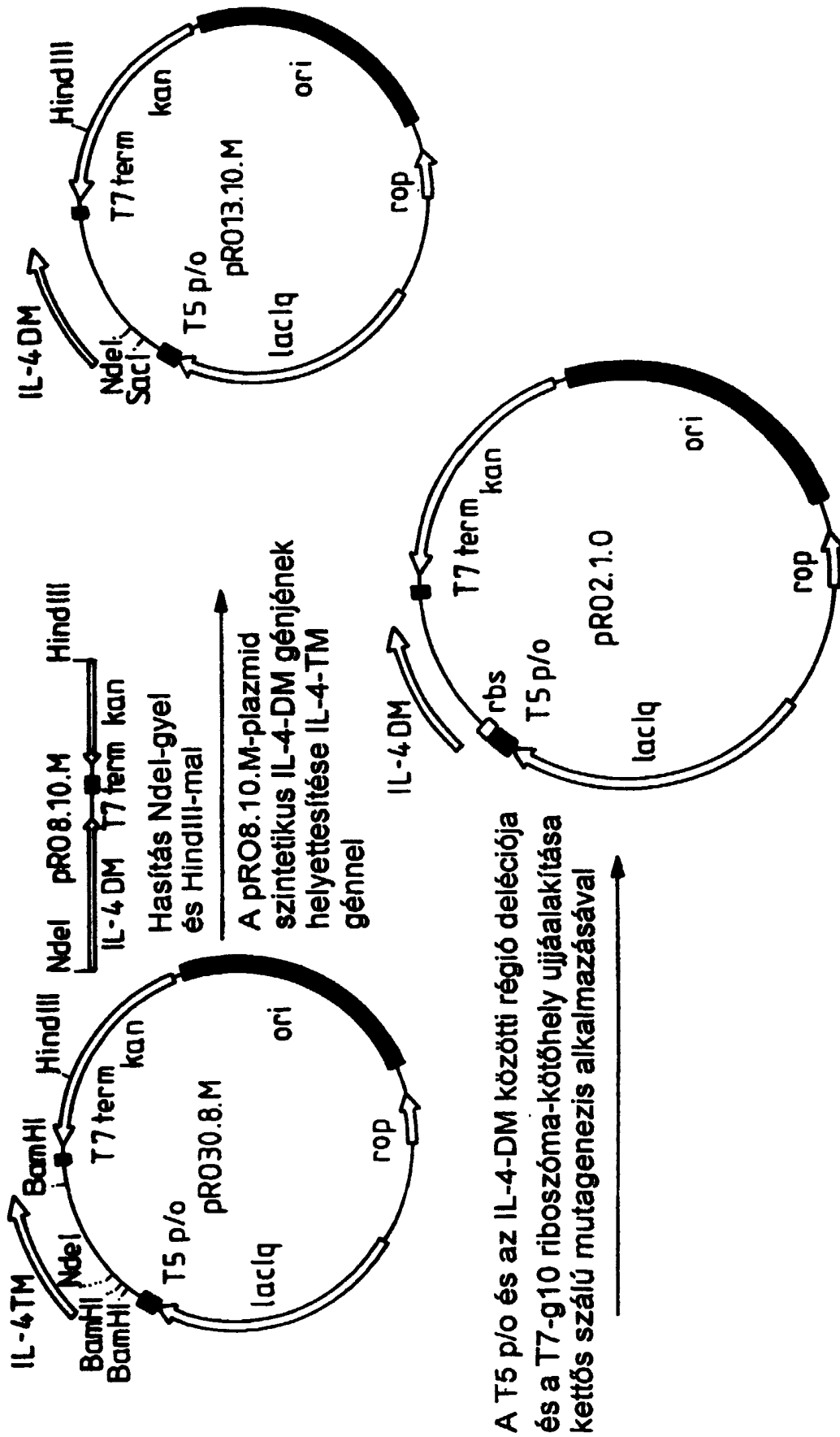




2. ábra

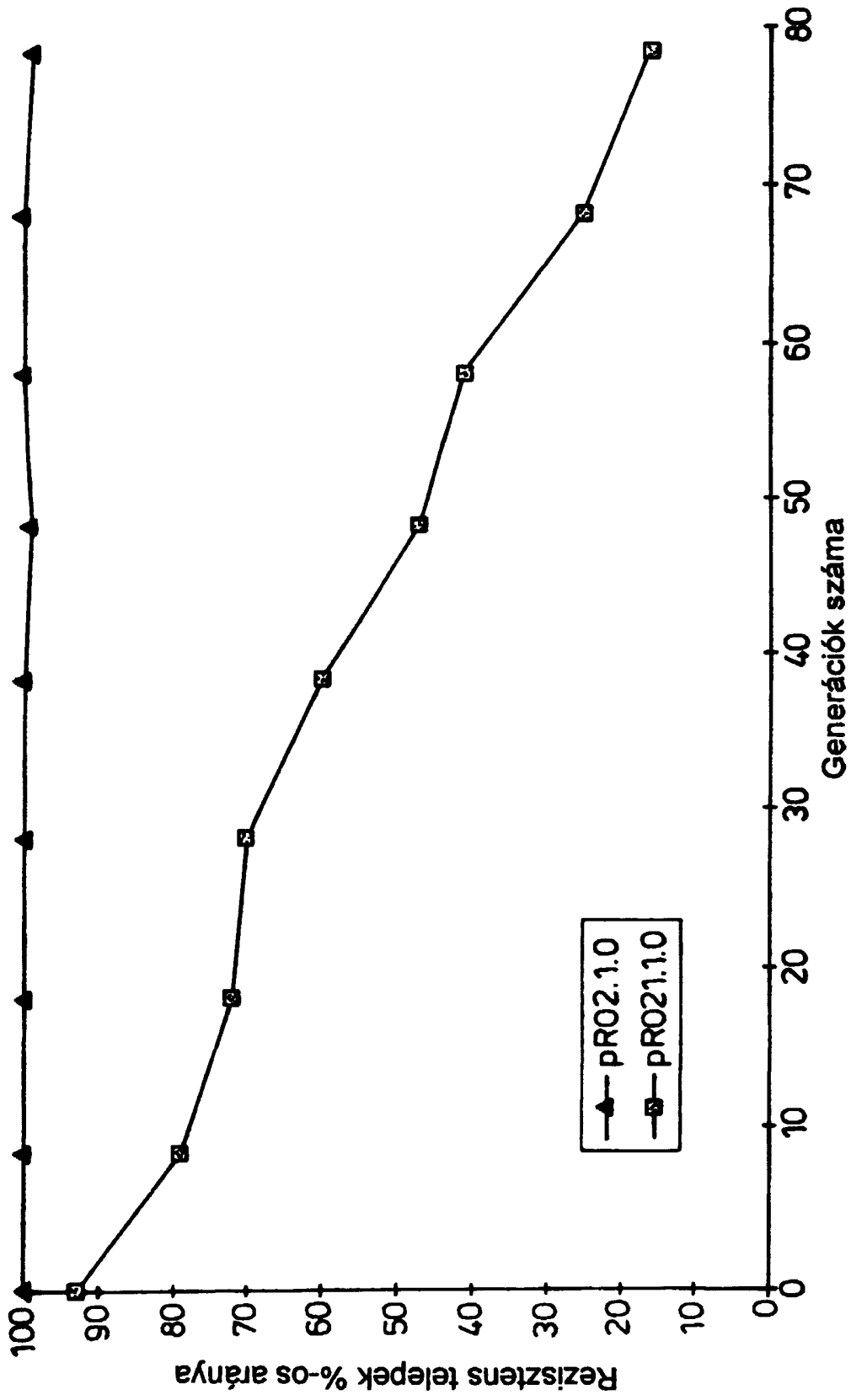


3. ábra

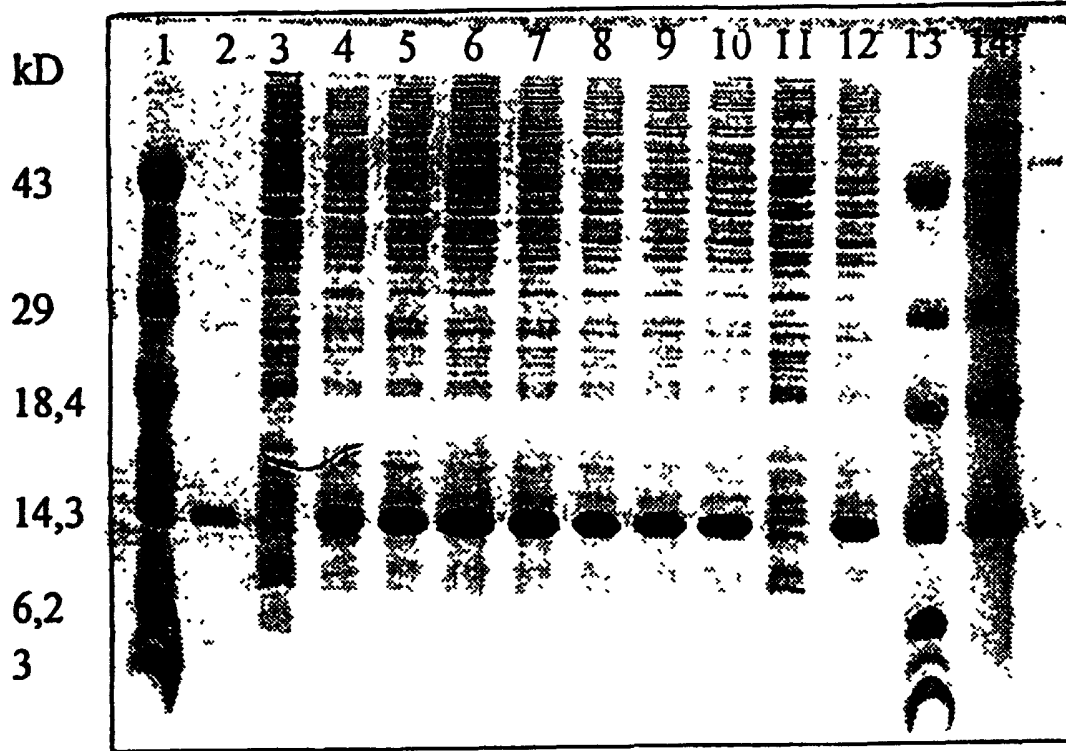


A T5 p/o és az IL-4-DM közötti régió delécioja és a T7-g10 riboszóma-kötőhely ujjaalakítása kettős szárlú mutagenézis alkalmazásával

4. ábra



5. ábra



6. ábra