(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 353 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 01960
(22) A bejelentés napja: 1993. 01. 26.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
92/00807 1992. 01. 27. FR
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FR 93/00072
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/15204

(51) Int. Cl.[7]

C 12 N 15/14
C 12 N 15/81
C 12 P 21/02
C 07 K 14/765
A 61 K 38/38

(40) A közzététel napja: 1995. 10. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2000. 08. 28.

(72) Feltalálók:
Becquart, Jéróme, Párizs (FR)
Fleer, Reinhard, Bures/ Yvette (FR)
Jung, Gérard, Montlhéry (FR)

(73) Szabadalmas:
RHONE-POULENC RORER S. A., Antony (FR)

(74) Képviselő:
S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Eljárás alacsony kolorimetriás indexű, rekombináns humán szérumalbumin előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű humán szérumalbumin előállítására egy Kluyveromyces nemzetséghez tartozó élesztőben, amely abban áll, hogy

(i) bevezetnek egy, a humán szérumalbumint kódoló exogén DNS-t az említett gazdasejtbe;

(ii) az így kapott gazdasejtet egy meghatározott összetételű tápközegben tenyésztik, amely B0 alaptápközegből áll, és legalább egy szénforrást tartalmaz az alábbiak közül: etanol, glicerin, szorbit, szacharóz, acetátok, laktátok, 1–4 típusú glikozidkötést tartalmazó diszacharidok és mikrofiltrált glükóz;

(iii) a termelődött humán szérumalbumint a tápközegből kinyerik; és kívánt esetben

(iv) a humán szérumalbuminhoz nem kovalensen kötött színező szennyezéseket ismert módon eltávolítják.

HU 218 353 B

A jelen találmány 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű humán szérumalbumin (HSA) előállítási eljárására, ezzel az eljárással kapott gyógyszerészeti felhasználásra alkalmas HSA-ra és ezt tartalmazó gyógyszerkészítményekre vonatkozik.

A humán szérumalbumin (HSA) egy 585 aminosavas, nem glikolizált, monomer protein, molekulatömege 66 kD. Globuláris szerkezetét 17 diszulfidhíd tartja fenn, amelyek 9 dupla hurokból álló szekvenciasorozatot hoznak létre [Weitkamp, L. R. et al., Ann Hum. Genet. *37,* 219–226 (1973)]. A HSA-génben 14 intronszekvencia 15 exont választ el, és a gén 16961 nukleotidot tartalmaz a feltételezett „capping" helytől az első poli(A) addíciós helyig. Az albumin a máj hepatocitáiban szintetizálódik, majd a véráramba szekretálódik. Ez a szintézis először egy prekurzort eredményez, a prepro-HSA-t, ami egy 18 aminosavas szignálszekvenciát tartalmaz, ami a felszabaduló polipeptidet a szekréciós úton vezeti.

A HSA a vér legnagyobb mennyiségű fehérjéje, koncentrációja körülbelül 40 g/l szérum. Így körülbelül 160 g keringő albumin van az emberi testben minden pillanatban. A HSA legfontosabb szerepe, hogy a véráram normális ozmolaritását fenntartsa. Ezenkívül különböző anyagokhoz specifikus kötődési kapacitással bír, és szerepet játszik a hidrofób molekulák (mint a szteroidok és az epesók) endogén transzportjában ugyanúgy, mint a különböző terapeutikus anyagokéban, amelyek így a nekik megfelelő akciós helyre szállítódhatnak. Ráadásul nemrégen úgy találták, hogy a HSA-nak szerepe van a prosztaglandinok katabolizmusában is.

A HSA a plazmafehérjék világpiacán 40%-ot képvisel. Kereskedelmi fontossága azon a tényen alapul, hogy ezt a terméket széles körben használják, például a sebészi beavatkozásokkor, balesetekben vagy hemorrágiában keletkezett vérveszteség pótlására, és olyan dózisban, ami több tíz grammot is elérhet naponként és egyénenként. Jelenleg a HSA éves fogyasztását több mint 300 tonnára becsülhetjük.

Egészen mostanáig a kereskedelemben hozzáférhető HSA-t humán eredetű biológiai anyagokból kiinduló tisztítással állították elő. Jellegzetesen a véradásból származó plazma klasszikus technikákkal történő frakcionálásával kapták meg [Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. *68,* 459 (1946)], vagy a humán placentából kiinduló extrakcióval, a J. Liautaud és munkatársai által leírt technika szerint [Conges International d'IABS, Budapest; A: „Purification of proteins. Development of biological standard", Karger (ed.), Bale, *27,* 107 (1973)].

A géntechnológia és az új extrakciós technikák fejlődése lehetővé tette, hogy kisebb előállítási költséggel javított, nagyobb tisztaságú, stabilabb, és vírusfertőzéstől (például hepatitisz B és AIDS) mentes termékeket kapjunk. Figyelembe véve a HSA piacának fontosságát, széles körben tanulmányozták e protein rekombináns úton való előállításának lehetőségét. Így számos expressziós rendszert vizsgáltak meg a rekombináns HSA előállítására. Részletezve, ami a bakteriális gazdákat illeti, az első géntechnológiai kísérletek az E. coli baktériumot használták gazdaszervezetként. Így az EP 236 210, EP 200 590, EP 198 745 és az EP 1 929 európai szabadalmak a HSA E. coliban történő előállítására vonatkozó eljárást írnak le különböző expressziós vektorok, különböző transzkripciós promoterek és különböző szekréciós szignálok alkalmazásával. Később olyan munkákat is végeztek, amelyek a HSA Bacillus subtilisben történő szekréciójára vonatkoztak, bár ebben a rendszerben a kapott albumin mennyisége még nem tűnik kielégítőnek [Saunders et al., J. Bacteriol. *169,* 2917 (1987)].

Ami az eukarióta gazdákat illeti, kidolgoztak olyan eljárásokat a HSA előállítására, amelyek gazdaszervezetként élesztőket használtak. Így a HSA szekrécióját meg tudták valósítani S. cerevisiae-ben úgy, hogy azt a saját szignálpeptidje irányította a kelatin promoter kontrollja alatt [Etcheverry et al., Bio/Technology *4,* 726 (1986)]. A HSA termelődését szintén megemlítették sörélesztőben, a sörgyártás során, posztfermentációs eljárást alkalmazva (EP 201 239). Nemrégen az EP 361 991 európai közrebocsátási iratban (amely megfelelője az FR 2 635 115 iratnak) ismertettek egy különösen jó termelékenységű rendszert, amely a Kluyveromyces élesztőt használja gazdaszervezetként, amelyet a pKD1 vektor származékaival transzformáltak. Ezzel a rendszerrel különösen nagy mennyiségű tápközegbe kiválasztott HSA-t lehet kapni. Végül a rekombináns HSA termelését leírták Pichia pastorisban is (EP 344 459). Azonkívül a HSA tisztítása is számos tanulmány tárgya volt (EP 319 067).

Mégis, annak ellenére, hogy jelentős erőt fordítottak arra, hogy a HSA-t rekombináns úton kapják meg, ez a termék még nincs jelen a piacon. Ez azzal kapcsolatos, hogy nehéz egy olyan, a géntechnológián alapuló, eléggé termelékeny eljárást kidolgozni, amely lehetővé teszi, hogy ipari méretekben és gazdaságilag kifizetődő feltételekkel egy farmakológiailag használható HSA-t kapjunk. Jellemzően, ha a produktivitás kérdése nagyjából megoldottnak látszik (szekretált, megfelelően érett, és a natív humán szérumalbuminnak megfelelő tercier szerkezetű albumin magas szintű termelődése), az ezt megelőzően a szakmában leírt eljárások nem teszik lehetővé, hogy farmakológiailag felhasználható HSA-t kapjunk. Valóban elengedhetetlen, hogy a termelt HSA megfeleljen bizonyos minőségi feltételeknek. Jellemzően, figyelembe véve farmakológiai használatát, a rekombináns HSA-nak a natív albumin fizikai-kémiai tulajdonságaival kell rendelkeznie, és eleget kell tennie bizonyos homogenitási, tisztasági és stabilitási kritériumoknak. Így a gyógyszerkönyv előír a plazmatikus albuminoldat számára bizonyos paramétereket, nevezetesen egy pH-értéket, egy proteintartalmat, egy polimer- és aggregátumtartalmat, egy alkalikus foszfatáz-, nátrium- és káliumtartalmat, és egy bizonyos fehérje-összetételt. Előír még egy adott abszorbanciát, egy sterilitási tesztnek és egy pirogén és toxicitási próbának való megfelelést (lásd „albumini humani solutio", Európai Gyógyszerkönyv 255 (1984)].

Az egyik fő problémája a géntechnológiát alkalmazó korábbi eljárásoknak, hogy színes rekombináns HSA-t eredményeztek. Ez a jelenség azokban az esetek-

ben jelentős különösen, ahol a rendszer lehetővé teszi a rekombináns HSA expresszióját és szekrécióját a tápközegbe. Ebből a szempontból a jelen bejelentés B1 és B2 példái bemutatják az elszíneződés problémáját egy olyan expressziós rendszer esetén, amely, a tudomány korábbi állása szerint, egy élesztőt használ gazdaszervezetként. A B1 példa nem korlátozó, de egy olyan elszíneződési jelenséget mutat be, amit minden tesztelt törzsnél megvizsgáltunk, bármilyen is az adaptált fermentáció módja (fed-batch, batch, folyamatos). Másrészt, annak ellenére, hogy számos kísérletet végeztek e célból, az elszíneződést soha nem tudták megszüntetni tisztítással (lásd a B2 példát). Ezen körülmények figyelembevételével soha nem írtak le a tudomány korábbi állása szerint olyan, rekombináns úton előállított HSA-t, ami mentes ettől az elszíneződéstől. Pedig az elszíneződés jelenléte akadályt képez a rekombináns HSA gyógyszerészeti felhasználásában. Valóban, az így kapott termékek heterogének, mivel tartalmazzák az elszíneződésért felelős komponenseket. Ráadásul összetételük nem meghatározott, mivel az elszíneződés változhat egyik készítményről a másikra, és mivel a korábbi technika állása nem tette lehetővé az elszíneződés kontrollálását. Ilyen feltételek között nagyon nehéz egy reprodukálható eljárást meghatározni, ami lehetővé teszi, hogy minden esetben azonos rekombináns HSA-készítményt kapjunk. Végül, az elszíneződésért felelős komponensek jelenléte miatt a korábbi, technika állása szerinti rekombináns HSA potenciálisan immunogén.

A találmány célkitűzése, hogy egy gyógyszerészetileg alkalmazható rekombináns HSA-készítményt kapjunk ipari méretekben és gazdaságilag kifizetődő mennyiségben.

A találmány igazolta, hogy lehetséges elszíneződéstől mentes HSA-oldatot nyerni ipari méretekben, rekombináns úton. A jelen találmány annak a felismerésén alapul, hogy a termelt HSA minősége nem kizárólag a kiválasztott gazdaszervezettől vagy vektortól, vagy a HSA tápközegből való tisztítási eljárásától függ, hanem nagymértékben a tápközeg összetételétől. Így megváltoztatva nevezetesen a szénforrásokat és a tápközeg előállításának körülményeit, 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű rekombináns HSA-t kaphatunk.

Az EP–A 464 590 számú iratban ismertettek egy eljárást rekombináns HSA elszíneződésének megakadályozására, melynek során egy adszorbens segítségével a színező szennyezéseket eltávolítják a Saccharomyces cerevisiae-ben kifejeződött HSA-ból, mielőtt azok a HSA-hoz kötődnének. Tehát ez az eljárás alapvetően eltér az általunk kidolgozott eljárástól.

A találmány egyik szempontja szerint eljárást nyújt megfelelő minőségű, az extrakcióval nyert HSA tulajdonságaival rendelkező és a gyógyszerészet területén alkalmazható rekombináns HSA-készítmény előállítására.

Jellemzően, a találmány egy Kluyveromyces nemzetségbeli élesztőben expresszált rekombináns HSA-készítmény előállítására vonatkozik, amelynek kolorimetriás indexe az ismert technikákkal (koncentráció, kicsapás, kromatográfiák stb.) való tisztítás után kisebb, mint 0,2. A jelen találmány értelmében kolorimetriás indexen a 300 nm-nél és a 280 nm-nél mért abszorbancia arányát értjük ($i = OD_{300}/OD_{280}$). Ez az arány különösen jól jellemzi a HSA kolorimetriáját, mivel egy adott oldat esetében az abszorbanciát a koncentrációtól függetlenül tükrözi vissza.

A találmány egyik tárgya tehát egy humán szérumalbumin, melyre jellemző, hogy kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,2, és hogy egy exogén DNS-szekvencia egy eukarióta vagy prokarióta gazdában való expresszziójának eredménye.

A jelen találmány tehát olyan rekombináns HSA-t bocsát rendelkezésre, amelynek kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,2. Így egy gyógyszerészeti területen használható rekombináns HSA-t nyújt, az immunogén reakciók igen csekély kockázatával. Ráadásul a plazmatikus HSA-hoz viszonyítva a találmány szerinti HSA azt az előnyt nyújtja, hogy homogén, és hogy összetétele teljesen meghatározott. Valóban, polimorfizmusából következőleg számos HSA-változat létezik. Így azok között, amelyeket azonosítottak, egyes változatok megőriztek egy helyettesített propeptidet [Brennen et Carrell, Nature *274,* 908 (1978); Galliano et al., Rev. Fr. Tranfus. Immuno-Hematol. *27,* 597 (1984)], mások pontmutációkat tartalmaznak [Winter et al., Biochemistry *11,* 889 (1972); Franklin et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA *77,* 2505 (1980); Brennan, Biochim. Biophys. Acta *830,* 320 (1985); Galliano et al., Proteides Biol. Fluids Proc. Colloq. *34,* 815 (1986); Takahasi et al., J. Chromatogr. *359,* 181 (1986)], vagy delécióakat a C-terminálison [Galliano et al., J. Biol. Chem. *261,* 4283 (1986)]. Ezenkívül számos olyan variáns létezik, amelynek strukturális változatait nem azonosították. Ezért a nagyszámú humán donorból származó biológiai anyagokból extrakcióval kapott plazmatikus HSA potenciálisan a HSA minden variánsát tartalmazza, annak polimorfizmusából eredően. A jelen találmány homogén és meghatározott HSA-t szolgáltat, mivel genetikai úton állítjuk elő egy vagy több meghatározott DNS-szekvencia expressziójával.

Előnyösen a jelen találmány szerinti HSA kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,15.

Még előnyösebben a jelen találmány szerinti HSA kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,1.

A jelen találmány szerinti HSA más fizikai-kémiai jellemzőit a B5 példa ismerteti, nevezetesen a fluoreszcenciás spektrumát. E paraméterek együtt tanúsítják a találmány szerinti HSA minőségét.

A jelen találmány értelmében exogén DNS-szekvencián értünk minden, a használt gazdaszervezetbe mesterségesen bevezetett DNS-szekvenciát, amely HSA-t kódol. Jellemzően szó lehet a gazdaszervezet szerint genomiális szekvenciáról, cDNS-ről, hibrid szekvenciákról stb. A találmány jobb megvalósítása érdekében azonban előnyben részesítjük a cDNS használatát. Ilyen szekvenciákat már leírtak a technika állásában [vö. EP 361 991 és Dugaiczyk et al., J. Supramol. Struct. & Cell Biochem., Suppl. 5 (1981)]. Másrészt ez az exogén DNS általában tartalmaz egy transzkripciós és egy transzlációs kezdőrégiót, a kódoló szekvencia 5'-végéhez kapcsolva, hogy az említett szekvencia transzkripcióját és

transzlációját irányítsa. E promoter régiók kiválasztása az alkalmazott gazdaszervezettől függően változhat.

A jelen találmány keretein belül az exogén DNS előnyösen egy vektor része, ami autonóm replikálódó vagy integratív lehet. Részletezve, az autonóm replikálódó vektorokat a választott gazdasejt autonóm replikálódó szekvenciáit felhasználva állíthatjuk elő. Példaként az élesztőnél szó lehet a pKD1 [EP 241 435], a 2μ [Beggs, Nature *275* 104–109 (1978)] stb. plazmidokból származó replikációs origóról vagy kromoszomális szekvenciákról (ARS). Integratív vektorokról beszélve ezeket például a gazdaszervezet genomjának egyes régióival homológ szekvenciákat felhasználva állíthatjuk elő, amelyek lehetővé teszik homológ rekombináció útján a vektor integrációját. Ebből a nézőpontból a rDNS használata az exogén DNS többszörös integrációját és így sejtenként nagyobb kópiaszámban való jelenlétét teszi lehetővé.

Előnyös módon a találmány szerinti HSA egy exogén DNS-szekvencia eukarióta vagy prokarióta gazdasejtben való expressziójának, és az említett szekvencia expressziós termékének tápközegbe való szekréciójának eredménye. Valójában nagyon előnyös, ha egy farmakológiai minőségű HSA-t rekombináns úton, közvetlenül a tápközegben kapunk meg. Ebben az esetben az exogén DNS-szekvencia a HSA-t kódoló szekvencia előtt, vagy adott esetben a transzkripciós és transzlációs kezdő régió és a kódoló szekvencia között egy leader (vezető) szekvenciát tartalmaz, amely a keletkező proteint az alkalmazott gazdasejt szekréciós útvonalán végigvezeti. Ez a leader szekvencia a HSA saját leader szekvenciája lehet, de szó lehet heterológ (egy másik proteint kódoló génből származó) vagy mesterséges szekvenciáról is. E szekvenciák közül az alkalmazott gazdasejt függvényében választhatunk. Példaként, ha az alkalmazott gazda egy élesztő, heterológ leader szekvenciaként az α-faktor, az invertáz vagy a savas foszfatáz leader szekvenciáját használhatjuk.

A jelen találmány keretein belül felhasználható eukarióta gazdasejtek között megemlíthetjük az állati sejteket, az élesztőket vagy a gombákat. Jellemzően, ha élesztőkről van szó, megemlíthetjük a Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia pastoris, Schwanniomyces, vagy Hansenula nemzetségeket. Állati sejtek között megemlíthetjük a COS, CHO, C127 stb. sejteket. A jelen találmányban való felhasználásra alkalmas gombák között megemlíthetjük az Aspergillus vagy a Trichoderma fajokat.

Prokarióta gazdaként előnyösen E. coli, Bacillus vagy Streptomyces baktériumokat használhatunk.

A találmány egy másik tárgya egy eljárás 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű HSA előállítására, szérumalbumin előállítására egy Kluyveromyces nemzetséghez tartozó élesztőben, melynek során az alábbi lépéseket valósítjuk meg:

(i) bevezetünk egy, a humán szérumalbumint kódoló exogén DNS-t az említett gazdasejtbe;

(ii) az így kapott gazdasejtet egy meghatározott összetételű tápközegben tenyésztjük, amely B0 alaptápközegből áll, és legalább egy szénforrást tartalmaz az alábbiak közül: etanol, glicerin, szorbit, szacharóz, acetátok, laktátok, 1–4 típusú glikozidkötést tartalmazó diszacharidok és mikrofiltrált glükóz;

(iii) a termelődött humán szérumalbumint a tápközegből kinyerjük;

és kívánt esetben

(iv) a humán szérumalbuminhoz nem kovalensen kötött színező szennyezéseket ismert módon eltávolítjuk.

Részletesebben a találmány szerinti eljárás első lépése során az exogén DNS-t különböző technikákkal vezethetjük be a gazdasejtbe. Így például végezhetjük transzformációval, konjugációval vagy elektroporációval.

Transzformáció esetén különböző technikákat írtak le az irodalomban. Előnyösen úgy valósíthatjuk meg, hogy az egész sejteket lítium-acetát és polietilénglikol jelenlétében kezeljük Ito és munkatársai által leírt technika szerint [J. Bacteriol. *153,* 163–168 (1983)], vagy etilénglikol és dimetil-szulfoxid jelenlétében Durrens és munkatársai módszere szerint [Curr. Genet. *18,* 7 (1990)]. Egy alternatív eljárást írtak le az EP 361 991 közrebocsátási iratban. Jellemzően, prokarióta sejtek esetén, a transzformációt a Dagert és munkatársai által leírt technika szerint végezhetjük [Gene 6, 23–28 (1979)] egy $CaCl_2$-oldatos kezeléssel, majd hősokkal. Állati sejtek esetén végezhetjük a kalcium-foszfátos technikát Haynes szerint alkalmazva [Nucleic Acids Res. *11,* 687–706 (1983)].

Elektroporáció esetén előnyösen a Karube és munkatársai által leírt technikát alkalmazhatjuk [FEBS Letters *182,* 90 (1985)].

A kiválasztott gazdaszervezet és az alkalmazott exogén DNS függvénye, hogy ezek közül melyik módszert választjuk.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható eukarióta gazdaszervezetek közül azokat az állati sejteket, élesztőket vagy gombákat sorolhatjuk fel, amelyeket fentebb említettünk. A prokarióta gazdaszervezetek közül minden fentebb meghatározott baktériumot használhatunk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában. az eljárást úgy valósítjuk meg, hogy gazdasejtként eukarióta sejtet használunk.

Még előnyösebben az eljárást gazdasejtként élesztőt használva, legelőnyösebben egy Kluyveromyces fajban valósítjuk meg.

Az eljárásban alkalmazható HSA-t kódoló exogén DNS-t a korábbiakban meghatároztuk. Előnyösen egy cDNS-ről, egy genomiális DNS-ről vagy egy hibrid DNS-ről van szó. A találmány egy előnyösebb megvalósításához mégis előnyben részesítjük a cDNS használatát. Másrészt ez az exogén DNS általában tartalmaz egy transzkripciós és egy transzlációs kezdőrégiót, a kódoló szekvencia 5'-végéhez kapcsolva úgy, hogy azok az említett szekvencia transzkripcióját és transzlációját irányítsák. E régiók kiválasztása is a használt gazdasejt függvénye.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módjában az exogén DNS az érett HSA-t kódoló szekvencia előtt egy leader szekvenciát tartalmaz, amely a keletkező proteint végigvezeti az alkalmazott gazdasejt

szekréciós útvonalán. Ilyen szekvenciákat fentebb megadtunk. Másrészt a jelen találmány keretein belül az exogén DNS előnyösen egy vektor része, amely autonóm módon replikálódó vagy egy integratív lehet, amint azt fentebb jeleztük.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában az előállítási eljárást az jellemzi, hogy a HSA a tápközegbe szekretálódik. Valóban különösen előnyös, ha egy farmakológiai minőségű HSA-t rekombináns úton, közvetlenül a tápközegben kaphatunk meg.

A találmány szerinti eljárás második lépése abból áll, hogy a rekombináns sejteket a HSA-t kódoló exogén DNS-expresszióját lehetővé tevő körülmények között tenyésztjük. Ez a lépés különösen fontos, mivel közvetlenül befolyásolja a termelt HSA mennyiségét és minőségét. A jelen találmány ír le először olyan tenyésztési körülményeket, amelyek lehetővé teszik farmakológiai minőségű szérumalbumin előállítását.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott tápközeg legalább egy szénforrást tartalmaz az alábbiak közül: egyszerű, legalább 2 szénatomot tartalmazó alkoholokat (etanol stb.), többértékű alkoholokat (glicerin, szorbit stb.), nem redukáló cukrot, például szacharózt, és szerves savakként ecetsavat vagy tejsavat vagy ezek sóit, az acetátokat és laktátokat, továbbá glükózt és egy glükózszármazékot. A jelen találmányban alkalmazható glükózszármazékok pontosabban a 20. ábrán látható képlettel írhatók le, ahol R nem hidrogén. Példaként megemlíthetjük a diszacharidokat, és előnyösen az 1–4 glikozidkötést tartalmazó diszacharidokat, mint a maltóz, a cellobióz vagy a laktóz. A glükózt előnyösen mikrofiltrált glükóz formájában alkalmazzuk.

Magától értetődő, hogy a fenti komponensek közötti választás az alkalmazott gazdasejt függvénye. Mégis az is lehetséges, hogy egy gazdasejtet úgy módosítunk, hogy képes legyen asszimilálni egy előnyös szénforrást.

Ezeket a különböző szénforrásokat külön-külön vagy együtt alkalmazhatjuk. Például egy glükózszármazék és egy alkohol együttes alkalmazása nagyon jó eredményt ad. Éppúgy egy egyszerű alkohol és egy többértékű alkohol együtt alkalmazása szintén egy nagyon magas minőségű albumint ad. Másrészt egy váratlan eredmény, hogy ez az együttes alkalmazás lehetővé teszi bizonyos esetekben a HSA-termelés szintjének növekedését, így az előállítási eljárás hatásfokának javulását.

A találmány szerinti eljárást egy meghatározott. összetételű tápközegben, lényegében Bo alaptápközegben egy vagy több, az előbbiekben felsorolt szénforrás jelenlétében hajtjuk végre. Különböző módszereket alkalmazhatunk az aldehid típusú szennyeződések képződésének megakadályozására, ahol a választásnál figyelembe kell venni a tápközeget (a szénforrás természetét) és a gazdasejtet. Példaként előnyös lehet a szénforrás hideg sterilizálása (például szűréssel, amint azt a B4 példában bemutatjuk). A találmány szerinti eljárásban alkalmazott K. lactis törzsek tenyésztése esetén a Bo alaptápközeg előnyösen egy szénforrást, így laktózt vagy mikrofiltrált glükózt, vagy két szénforrást, így laktózt és etanolt, laktózt és glükózt vagy glicerint és etanolt tartalmaz.

A találmány harmadik lépése lehetővé teszi a termelt HSA kivonását a tápközegből. Abban az esetben, ahol a rekombináns sejtek a tápközegbe szekretálják a HSA-t, ezt a kivonást egyenesen a tenyészet centrifugálásával kapott felülúszóból kiindulva végezhetjük. Abban az esetben, ahol a HSA nem szekretálódik, az extrakció előtt a tenyészetben lévő sejteket fel kell tárni, hogy felszabadítsuk a HSA-t. Ezt az előzetes lépést különböző fizikai vagy fizikai-kémiai módszerekkel végezhetjük (szonikálás, őrlés, ozmotikus sokk, hősokk stb.).

Az extrakciót különböző, a szakember számára ismert és az irodalomban leírt módon végezhetjük. Általában ezek a technikák koncentrálási, kicsapási és kromatográfiás lépéseket tartalmaznak. E technikák közül néhányat a példák bemutatnak.

Kívánt esetben az eljárás negyedik lépését is kivitelezzük, melyben a nem kovalensen kötött színező szennyezéseket ismert módon, például ioncserélő kromatográfiával, aktív szénnel stb. eltávolítjuk.

A találmány továbbá minden olyan gyógyszerkészítményre vonatkozik, amely a találmány szerinti eljárással előállított, 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű HSA-t tartalmazza.

A jelen találmányt a következő példák segítségével írjuk le teljesebben, amelyeket példaként kell figyelembe venni, és amelyek nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

Az ábrák leírása

1. ábra: A hibrid PGK/GAL promoter előállítása. P=promoter, UAS=„Upstream Activating Sequence".
2. ábra: A pYG401 vektor előállításának stratégiája és bemutatása. P=promoter, T=transzkripciós terminátor, *bla*=ampicillinrezisztenciáért felelős gén, *aph*=geneticin- (G418) rezisztenciáért felelős gén.
3. ábra: A pP4–33 plazmid előállítása és bemutatása.
4. ábra: A pYG65 plazmid előállítása és bemutatása.
5. ábra: A pYG70 plazmid előállítása és bemutatása.
6. ábra: A pYG72 plazmid előállítása és bemutatása.
7. ábra: A pYG404DHindIII plazmid előállítása és bemutatása.
8. ábra: A pYG128 plazmid előállítása és bemutatása.
9. ábra: A pYG131 és a pYG132 plazmid előállítása és bemutatása.
10. ábra: A pYG600 plazmid restrikciós térképe. *bla*=ampicillinrezisztenciáért felelős b-laktamáz gén.
11. ábra: A pYG70–2 plazmid előállításának stratégiája. *aph*=a geneticin (G418) rezisztenciáért felelős 3'-aminoglikozid foszfotranszferáz gén, prom=promoter, IR=inverz ismétlődő szekvencia, ORI=replikációs origó, LacZ'=a b-galaktozidáz struktúrgénje. A (*)-gal jelölt helyek olyan végekkel rendel-

keznek, amelyek megfelelnek az adott enzim által felismert hasítási helyeknek, anélkül azonban, hogy ligáció után helyreállítanák azt.

12. ábra: Az A–F oligodezoxinukleotidok szekvenciája, amelyek az 1–3 adapterek előállítására szolgálnak.

13. ábra: A pYG70–3 plazmid előállításának stratégiája. A leírást lásd a 11. ábránál. term=terminátor

14. ábra: A pYG1003 plazmid előállításának stratégiája. A leírást lásd a 11. ábránál.

15. ábra: A pYG1023 plazmid előállításának stratégiája. A leírást lásd a 11. ábránál.

16. és 17. ábra: Különböző albuminpreparátumok UV-spektruma: 16. ábra: (1) a B1 és B2 példa BCQ759 albuminja, (2) a B5 példa BCQ804LE albuminja, (3) kontrollalbumin (IM). 17. ábra: a BS példa BCQ835GE albuminja.

18. és 19. ábra: Különböző albuminpreparátumok fluoreszcenciás spektruma 430 nm-nél (18. ábra) és 360 nm-nél (19. ábra).

20. ábra: A jelen találmányban alkalmazható glükózszármazékok. R jelentése hidrogéntől eltérő.

Általános klónozási technikák

A molekuláris biológia klasszikus módszerei, mint a plazmid DNS cézium-kloridos–etídium-bromidos gradiens centrifugálása, a restrikciós enzimes emésztések, a gélelektroforézis, a DNS-fragmentumok agarózgélből való elektroelúciója, E. coli transzformálása stb., az irodalomból ismertek [Maniatis et al., „Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; Ausubel et al., (eds.), „Current Protocols in Molekular Biology", John Wiley & Sons, New York 1987].

Az oligodezoxinukleotidokkal irányított in vitro mutagenezist a Taylor és munkatársai által kidolgozott módszer szerint végeztük [Nucl. Acids Res. *13,* 8749–8764 (1985)] az Amersham által forgalmazott kitet alkalmazva. A nukleotidok szekvenálását a Sanger és munkatársai által leírt didezoxi-módszer szerint végeztük [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *74,* 5463–5467 (1977)]. A specifikus DNS-fragmentumok enzimatikus amplifikálását PCR („Polymerasecatalyzed Chain Reaction") reakcióval végeztük, a Mullis és Faloona [Meth. Enzym., *155,* 335–350 (1987)] és Saiki és munkatársai [Science *230,* 1350–1354 (1985)] által leírt körülmények között, „DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) alkalmazásával, a gyártó előírásait követve.

Példák

A – A humán szérumalbumin expressziós vektorának megalkotása

1. Egy HSA expressziós vektor megalkotása egy hibrid PGK/GAL promoter kontrollja alatt: a pYG401 plazmid.

A humán szérumalbumin egy expressziós vektorát állítottuk elő a pYG19 plazmidból (EP 361 991) kiindulva. Ez utóbbi a következő elemeket tartalmazza:

– a pKD1 plazmid szekvenciája, amely a pYG19 plazmidot egy többkópiás, stabil, és a Kluyveromyces nemzetség élesztőiben replikálódni képes plazmiddá teszi (EP 361 991),

– a humán szérumalbumin egy expressziós kazettáját, amely a prepro formát kódoló struktúrgént tartalmazza a S. cerevisiae PGK génjének promotere kontrollja alatt,

– egy replikon és egy bakteriális szelekciós marker (az ampicillinrezisztenciáért felelős *bla* gén), és

– az élesztőben a G418 rezisztenciáért felelős *aph* gén.

A pYG401 plazmidot a pYG19-ből kiindulva, a humán szérumalbumin expressziós kazettájának módosításával állítottuk elő. A pYG401-ben az albumingén nem a S. cerevisiae PGK génje promoterének kontrollja alatt áll, hanem a S. cerevisiae PGK és GAL1/GAL10 génjei egy hibrid promoterének kontrollja alatt. Ezt a hibrid promotert úgy szerkesztettük meg, hogy a PGK promoter UAS („Upstream Activating Sequence") régióját [Stanway et al., Nucl. Acids. Res. *15,* 6855 (1987)] a GAL1/GAL10 promoter UAS régiójával [Johnston et Davies, Mol. Cell. Biol. *4,* 1440 (1984), West et al., Mol. Cell. Biol. *4,* 2467 (1984)] helyettesítettük. Ezt a hibrid promotert a következő módon állítottuk elő (lásd 1. ábra):

A pYG29 plazmid előállítása az EP 361 991 bejelentésben részletesen le van írva. Ez a plazmid a S. cerevisiae PGK génjének promoterét tartalmazza, amelyet a pYG19 plazmidból izoláltunk egy SalI–HindIII fragmentum formájában, és az M13mp18 bakteriofágba klónoztunk. Azután irányított mutagenezissel módosítottuk, hogy a következő restrikciós helyeket vezessük be:

– egy további HindIII helyet az ATG-hez viszonyított –25 helyzetben. E hely bevezetése lehetővé teszi, hogy különböző klónozási lépések után helyreállítsunk egy, az ATG-hez közeli nukleotidrégiót, amely azonos a natív PGK promoter régiójával. Valóban, az ATG kodon környezete úgy ismert, mint ami érzékeny módon befolyásolja az eukarióta gének transzlációjának iniciációját [Kozak M., Microbiol. Rev. *47,* 1–45 (1983), Hamilton R., Nucl. Acid. Res. *15,* 3581–3593 (1987)]; és

– két NotI helyet az UAS-régió egyik és másik végén. A GAL1/GAL10 promoter UAS-szekvenciáját a Miyajima és munkatársai által leírt pG1 plazmidból kiindulva izoláltuk [Nucl. Acid. Res *12,* 6397–6414 (1984), Cloning Vectors, Pouwels et al., Elsevier VI–B–ii–2 (1985)]. Ez a plazmid az ATCC-nél 37 305 számon van letétbe helyezve. A pG1 plazmid egy 0,8 kb, a S. cerevisiae GAL1/GAL10 promoterét tartalmazó fragmentumot hordoz a pUC8 plazmid HindII helyére beépítve, ahonnan egy BamHI–PstI fragmentum formájában kivágható (1. ábra).

Ezt a fragmentumot kivágtuk a pG1-ből, tisztítottuk, majd RsaI és AluI enzimekkel emésztettük, amelyek hasítási helyei az UAS-régió egyik és másik végén találhatók. Így elektroelúcióval izoláltunk egy 143 bp fragmentumot, majd egy 5'-GCGGCCGC-3' linker hozzákapcsolásával egy NotI fragmentummá alakí-

tottuk át. Ezt a fragmentumot azután az előzőleg NotI-gyel emésztett pYG29 plazmidba klónoztuk.

Az így létrejött plazmidot pYG32-nek neveztük el (1. ábra).

Hogy megkapjuk az ezt a hibrid promotert hordozó expressziós vektort, a pYG32-ből izoláltuk a hibrid promotert hordozó SalI–HindIII fragmentumot, és egy szintetikus HindIII–BstEII adapterrel ligáltuk, amely a következő két komplementer szálból állt: 5'-AGC TTT ACA ACA AAT ATA AAA ACA **ATG** AAG TGG-3' és 5'-GT TAC CCA CTT CAT TGT TTT TAT ATT TGT TGT AA-3' (a transzlációs iniciációs kodont vastag betűk jelölik). Ez az adapter helyreállítja a közvetlenül a S. cerevisiae PGK struktúrgénje előtt elhelyezkedő 22 bázispárt, és tartalmazza a preprót kódoló gén első kodonjait, egészen egy, a natív génben jelen levő BstEII helyig (1. ábra).

Ezután helyreállítottuk a humán szérumalbumin expressziós kazettáját úgy, hogy az így kapott, a hibrid promotert és az albumin struktúrgénjének 5'-végét tartalmazó SalI–BstEII fragmentumot ligáltuk a pYG19-ből izolált BstEII–SacI fragmentummal, amely az albumin génjének hiányzó részét és a S. cerevisiae PGK génjének terminátorát tartalmazza (2. ábra).

Az így kapott kazettát használtuk a pYG19 plazmid által hordozott SalI–SacI expressziós kazetta helyettesítésére. Az így kapott vektort pYG401-nek neveztük (2. ábra).

2. Egy HSA expressziós vektor megalkotása a K1ADH4 promoter kontrollja alatt: a pYG132 plazmid

2.1. A K. lactis K1ADH4 promoterének izolálása

A K1ADH4 promotert a Kluyveromyces lactis CBS 2359/152 egy genomiális DNS-bankjának szűrésével kaptuk, egy, a S. cerevisiae ADH2 génjéből származó heterológ szondával. Pontosabban a bankot úgy kaptuk, hogy a K. lactis CBS 2359/152 DNS részleges Sau3A enzimes emésztésének termékét a Lambda–L47 helyettesítési vektor BamHI helyére klónoztuk. A hibridizációhoz használt szonda egy 980 bp-os, a S. cerevisiae ADH2 struktúrgénjét kódoló régiót az első 70 bázispár kivételével tartalmazó EcoRV–BamHI fragmentum (A szonda). Ezt a fragmentumot egy pBR322.ADR2.BSa-nak nevezett plazmid [Williamson et al., Cell 23, 605–614 (1981), Russel et al., J. Biol. Chem. *258,* 2674–2682 (1983)] enzimatikus emésztésével kaptuk.

Így egy körülbelül 8 kb fragmentumot izoláltunk, és a pBR322 plazmid BamHI helyére szubklónoztuk, hogy a p6–4–98 plazmidot kapjuk (3. ábra). Az e plazmid által hordozott BamHI inszertumot azután restrikciós enzimes módszerrel térképeztük, és a K1ADH4 gén promoter régióját ezen a fragmentumon differenciális hibridizációval lokalizáltuk az A szondát, és egy, a pBR322. ADR2.BSa plazmid körülbelül 1100 bp BamHI–EcorV fragmentumának megfelelő második szondát (B szonda) alkalmazva.

Egy második lépésben a p6–4–98 plazmidot HindIII enzimmel emésztettük, és egy 2,2 kb fragmentumot izoláltunk. Ezt a fragmentumot azután standard technikákkal tisztítottuk, és a pTZ19 plazmid HindIII helyére szubklónoztuk, hogy a p6–2200–2 plazmidot kapjuk (3. ábra). A szubklónozott fragmentum analízise megmutatta, hogy a fragmentum a K1ADH4 gén első 14 kodonját és az e fölötti régiót tartalmazza, beleértve az expressziós szabályozóelemeket.

A BglII hely és a transzlációs iniciációs ATG kodon közötti részt (körülbelül 1,2 kb fragmentum) a láncterminációs módszerrel szekvenáltuk [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. *74,* 5463 (1977)].

2.2. Egy hordozható K1ADH4 promoter kialakítása (Bg1II–BamHI)

A p6–2200–2 plazmidon jelen levő 2,2 kb HindIII fragmentumba a K1ADH4 gén ATG kodonjához viszonyított –16 helyre egy BamHI restrikciós helyet építettünk be, így egy hordozható promotert hoztunk létre.

E hely bevezetése lehetővé teszi, hogy egy 1,2 kb Bg1II–BamHI fragmentumot kapjunk, amely kizárólag a K1ADH4 promoter régiót tartalmazza. Lehetővé teszi azt is, hogy az így kapott promotertől lefelé bármely kifejezni kívánt gént beépítsünk.

A BamHI helyet a K1ADH4 gén transzlációs iniciációs kodonjához (ATG) viszonyított –16 helyzetbe vezettük be irányított mutagenezissel, a kettős primer technikát alkalmazva [Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab Press, 1989]. A mutagenezisben használt szintetikus oligodezoxinukleotidok szekvenciáját az alábbiakban adjuk meg. A kialakított BamHI hely alá van húzva, az ATG-t dőlt betűk jelölik, és a kiindulási szekvenciához képest módosított bázisokat csillaggal jelöltük. SI=kiindulási szekvencia, SM=módosított szekvencia.

5' - CTCCCCCACCAACAACACAACATACAACACACGCAATGTTCAGATT - 3' (SI)
** *
5' - CTCCCCCACCAACAACACAGGATCCAACACACGCAATGTTCAGATT - 3' (SM)
5' - GAGGGGGTGGTTGTTGTGTCCTAGGTTGTGTGCGTTACAAGTCTAA - 3' (SM)

Az így kapott plazmidot pP4–33-nak neveztük (3. ábra).

2.3. A humán szérumalbumin (HSA) egy expressziós vektorának megalkotása

A humán szérumalbumin egy expressziós vektorának előállításához elkészítettük a pYG404 plazmid (EP 361 991) egy származékát, amely tartalmaz:

– egy élesztőreplikont (a természetes pKDl plazmid majdnem teljes szekvenciája),

– a humán prepro-albumint (HSA) kódoló gént a K. lactis LAC4 gén promoterének kontrollja alatt, amelyet a S. cerevisiae PGK génjének terminátora követ; a HSA-t kódoló struktúrgént egy 25 nukleotidos, közvetlenül a S. cerevisiae PGK génje fölötti régiónak megfelelő szekvencia előzi meg,

– az élesztőnél a geneticin (G418) rezisztenciáért felelős *aph* gén, és

– egy E. coli replikon és egy szelekciós marker (az ampicillinrezisztenciáért felelős *bla* gén).

Ez a pYG404ΔH-nak nevezett plazmid a pYG404-től csak az *aph* génben található HindIII hely irányított mutagenezissel történt elroncsolásában különbözik. Ez a módosítás teszi majd lehetővé, hogy a pYG404ΔH plazmidban egy SalI–HindIII fragmentum formájában jelen levő LAC4 promotert az ugyancsak egy SalI–HindIII fragmentum formájában előállított K1ADH4 promoterrel helyettesítsük.

(a) A pYG404ΔH plazmid előállítása (4–7. ábrák)

A pYG404 klónozóvektorban található HindIII hely deléciójához több szubklónozólépést végeztünk, amely egy intermedier megalkotásához vezetett: a pYG72-höz (6. ábra). Ez a vektor a pKan707 plazmidnak (EP 361 991) felel meg, amelyben az URA3 gént tartalmazó SacI fragmentumot, és az egyetlen, az *aph* génben jelen levő HindIII helyet kiiktattuk. Az e helyre irányuló mutagenezis megvalósításához a pKan707 plazmidból származó, az *aph* gént hordozó 1,3 kb PstI fragmentumot az M13mp7 bakteriofágba szubklónoztuk, és így a pYG64 vektort kaptuk (4. ábra). A HindIII helyet irányított mutagenezissel elroncsoltuk (lásd az általános klónozási technikáknál) a következő oligodezoxinukleotidot alkalmazva: 5'-GAA ATG CAT AAG CTC TTG CCA TTC TCA CCG-3', amely lehetővé teszi, hogy a 185 leucint kódoló CTT tripletet CTC triplettel helyettesítsük. Ez a változás nem módosítja a keletkező protein szekvenciáját. Az így kapott plazmidot pYG65-nek neveztük el (4. ábra). A pYG72 plazmid megalkotásához a pKan707 bakteriális replikont tartalmazó részét EcoRI enzimmel végzett emésztéssel, és T4 DNS-ligázzal való recirkularizálással izoláltuk, így a pYG69 intermedier plazmidot kaptuk. Az ebben jelen levő, az *aph* gént kódoló PstI fragmentumot azután annak a pYG65-ből származó mutált megfelelőjével helyettesítettük. Ezt a konstrukciót pYG70-nek neveztük (5. ábra). Azután a pKD1 az EcoRI és a SacI helyek közötti 4,7 kb fragmentumát bevezettük ebbe a vektorba, és így a pYG72-t kaptuk (6. ábra).

A pYG404ΔH vektort a pYG404 plazmidból (EP 361 991) származó expressziós kazettának egy SalI–SacI fragmentum formájában a pYG72 megfelelő helyeire való beépítésével kaptuk (7. ábra).

(b) Egy hordozható KlADH4 promoter előállítása (SalI–HindIII) (8. ábra)

A pP4–33 plazmidból származó BglII–BamHI fragmentumon levő K1ADH4 promotert (lásd 2.1.) a következő módon módosítottuk, hogy a pYG4040H plazmidból származó expressziós vektorokban való alkalmazáshoz adaptáljuk.

A pP4–33 plazmidot BglII és BamHI enzimekkel emésztettük, majd „Mung Bean" nukleázzal kezeltük, hogy szabad végeket kapjunk. Azután a K1ADH4 promotert tartalmazó 1,2 kb fragmentumot agaróz gélből izoláltuk, és az előzőleg ClaI enzimmel linearizált és „Mung Bean" nukleázzal, valamint borjú alkalikus foszfatázzal (CIP) kezelt pBC SK+vektorba (Stratagene, La Jolla, CA, USA) szubklónoztuk. Az ezen a módon kapott plazmid (pYG128, 8. ábra) lehetővé teszi, hogy a K1ADH4 promotert egy 1,2 kb SalI–HindIII fragmentum formájában izoláljuk.

(c) A pYG132 vektor megalkotása (9. ábra)

A pYG404ΔH expressziós vektor (lásd 2.3.(a)] SalI és HindIII enzimekkel végzett emésztése lehetővé teszi, hogy a LAC4 promotert a fent leírt K1ADH4 promoterrel helyettesítsük.

E klónozás megvalósításához a pKD1 részt és a szelekciós markereket tartalmazó 8,7 kb SalI–HindIII fragmentumot, valamint a prepro-HSA-t kódoló gént hordozó 1,9 kb HindIII–HindIII fragmentumot a pYG404ΔH vektorból izoláltuk, és a pYG128 plazmidból származó, a K1ADH4 promotert hordozó 1,2 kb SalI–HindIII fragmentum jelenlétében újraligáltuk. Ezen a módon két plazmidot kaptunk:

– a pYG131-et (9. ábra), amely egy olyan klónozóvektornak felel meg, amely lehetővé teszi, hogy az egyetlen HindIII helyre bármely gént beépítsünk, amit a K1ADH4 promoter kontrollja alatt szeretnénk kifejezni, és

– a pYG132-t (9. ábra), amely azonos a pYG131-gyel, kivéve, hogy a HndIII helyre bevezetve tartalmazza a prepro-HSA génjét.

3. Egy HSA expressziós vektor megalkotása a K. lactis LAC4 génje promoterének kontrollja alatt: a pYG1023 plazmid

3.1. A K. lactis PGK génjének izolálása

A PGK gént a K. lactis CBS 2359 egy részleges genomiális génbankjának szűrésével izoláltuk egy, a S. cerevisiae PGK génjének [Dobson et al., Nucl. Acid. Res. *10,* 2625–2637 (1982)] N-terminális részét tartalmazó szondával. Pontosabban az alkalmazott szonda az 1,3 kb PvuI–EcoRI fragmentumnak felelt meg.

Southern blot-analízissel [Southern et al., J. Biol. Chem. 98, 503 (1975)] az alkalmazott szonda egy olyan DNS-szekvenciával hibridizál, amelyet egy 4 kb HindIII–HindIII fragmentum tartalmaz. Ezt a szekvenciát az előző szonda segítségével telephibridizációval izoláltuk. Ehhez a CBS 2359 törzs egy korlátozott genomiális DNS-bankját hoztuk létre, és szűrtük, amely bank 3 és 5 kb közötti méretű HindIII fragmentumokból állt, amelyeket a pUC18 plazmid HindIII helyére vezettünk be.

Így izoláltunk egy klónt, amely a pYG600 plazmidot (10. ábra) hordozta. Az e plazmid által hordozott PGK gén szekvenciáját Fournier és munkatársai írták le [Nucl. Acid. Res. *18,* 369 (1990)].

3.2. Egy humán szérumalbumin expressziós vektor előállítása, amely a K. lactis PGK génjét hordozza

Az 5. ábrán leírt pYG70 plazmidot a következőképpen módosítottuk.

(a) A pYG70 plazmid restrikciós helyeinek módosítása (11. ábra)

A későbbi klónozás megkönnyítésére a pYG70 plazmidban egyes restrikciós helyeket eltöröltünk (i), és 2 adaptert adtunk hozzá (ii és iii).

(i) A SphI hely eliminálása

A pYG70 plazmidot SphI-gyel emésztettük, majd a kohezív végeket a T4 fág DNS-polimerázának jelenlétében emésztéssel eliminálták. Ligáz jelenlétében végzett

ligálás után a pYG70ΔSphI plazmidot kaptuk (lásd 11. ábra).

(ii) Az 1. adapter (1. és 2. számú szekvencia) beépítése

Az 1. adaptert a 12. ábrán bemutatott szintetikus A és B oligodezoxinukleotidok hibridizációjával kaptuk. Ehhez mindkét oligodezoxinukleotidból 2 μg-ot inkubáltunk egy hibridizációs pufferban (30 mM Trisz-HCl puffer pH 7,5; 30 mM NaCl; 7,5 mM $MgCl_2$; 0,25 mM ATP; 2 mM DTT; 0,2 mM EDTA), 20 μl össztérfogatban, majd a hőmérsékletet 10 percen át 80 °C-ra emeltük, és lassan csökkentettük szobahőmérsékletre.

Az így kapott adapter a következő enzimekhez tartalmaz hasítóhelyeket: SacI, SalI, MluI, BssHII és SfiI, és lehetővé teszi, hogy bevezetésekor a pYG70ΔSphI plazmidban jelen levő SalI helyet kiiktassuk. Ezt az adaptert az előzőleg SalI és SacI enzimekkel emésztett pYG70ΔSphI phazmidba vezettük be.

A kapott plazmidot pYG70–1-nek neveztük.

(iii) A 2. adapter (3. és 4. számú szekvencia) bevezetése

A 2. adaptert az 1. adapternél leírt eljárást követve hoztuk létre, a 12. ábrán leírt C és D oligodezoxinukleotidokat használva. Ez az adapter a következő enzimekhez tartalmaz hasítóhelyeket: SfiI, AatII, SphI, NarI és SacI, és lehetővé teszi, hogy bevezetésekor a pYG70–1 plazmidban jelen levő EcoRI helyet kiiktassuk. Az adaptert az előzőleg EcoRI és SacI enzimekkel emésztett pYG70–1 plazmidba ligálással vezettük be, és így a pYG70–2 plazmidot kaptuk (11. ábra).

(b) A humán szérumalbumin egy expressziós kazettájának bevezetése

A használt humán szérumalbumin expressziós kazetta tartalmazza:

– a K. lactis LAC4 génjének indukálható promoterét,

– a humán szérumalbumint kódoló struktúrgént (prepro forma), és

– a S. cerevisiae PGK génjének terminátorát.

Ezt a kazettát a pYG404 plazmidból (EP 361 991) izoláltuk egy SalI–SacI fragmentum formájában, majd az előzőleg a megfelelő enzimekkel emésztett pYG70–2 plazmidba ligáltuk.

A kapott plazmidot pYG70–3-nak neveztük (13. ábra).

(c) A K. lactis PGK génjének bevezetése

A K. lactis PGK génjét a pYG600 plazmidból izoláltuk (10. ábra), és a pYG1002 plazmidba szubklónoztuk, hogy a pYG1003 plazmid jöjjön létre, majd ez utóbbiból egy MluI–BssHII fragmentum formájában izoláltuk.

A pYG1002-ben való szubklónozás lehetővé tette, hogy a K. lactis PGK gént egy MluI–BssHII fragmentum formájában, promotere nélkül kapjuk meg.

A pYG1003 plazmidot a következő módon kaptuk meg (14. ábra).

A pIC20H plazmidot [Marsh et al., Gene *32*, 481 (1984)] Bg1II-vel és EcoRI-gyel emésztettük, hogy ezen a módon bevezessük a 3. adaptert. Ezt az adaptert, amely a EcoRI, BssI, ClaI, NheI, MluI és Bg1II helyeket tartalmaz, a korábban leírt módon [2. (a) (ii)] az E és F oligodezoxinukleotidok (12. ábra, 5. és 6. számú szekvencia) hibridizációjával kaptuk meg. Az így kapott plazmidot pYG1002-nek neveztük. A K. lactis PGK génjét ebbe az új plazmidba egy, a pYG600 plazmidból származó ClaI–NheI fragmentum formájában vezettük be. A kapott plazmidot pYG1003-nak neveztük (14. ábra).

A K. lactis PGK génjét hordozó, a pYG1003 plazmidból származó MluI–BssHII fragmentumot azután a pYG70–3 plazmid megfelelő helyeire vezettük be, hogy a pYG70–4 plazmidhoz jussunk (15. ábra).

Ezen a plazmidon a K. lactis PGK génje már a Killer toxin kétirányú k1 promotere kontrollja alatt áll.

(d) Az élesztőreplikon beépítése

A pYG70–4 (15. ábra) és a pKD1 (EP 361 991) plazmidokat SphI-gyel emésztettük, és ligáz jelenlétében együtt ligáltuk. E ligáció eredményeképpen 4 vektort kaphattunk, a pKD1 plazmid konformációja (A forma vagy B forma) és a pYG70–4 plazmidnak megfelelő rész a pKD1-hez viszonyított orientációja szerint.

E konstrukciók egyikét kiválasztottuk, és pYG1023-nak neveztük el (15. ábra). Ez a vektor tartalmazza:

– a pKD1 plazmid teljes szekvenciáját, amely a pYG1023-at egy többkópiás, stabil plazmiddá teszi, amely képes az élesztőkben, és előnyösen a Kluyveromyces nemzetség élesztőiben replikálódni,

– a humán szérumalbumin egy expressziós kazettáját, amely a prepro formát kódoló struktúrgént tartalmazza a K. lactis LAC4 génje indukálható promoterének és a S. cerevisiae PGK génterminátorának kontrollja alatt,

– egy E. coli replikont és szelekciós markert (az ampicillinrezisztenciáért felelős *bla* gént),

– két szelekciós markert egy K. lactis PGK törzs számára: a mutált *aph* gént a Killer toxin kétirányú k1 promotere kontrollja alatt, és a K. lactis PGK génjét ugyanannak a promoternek a kontrollja alatt, de az *aph* géntől eltérő átírási irányban.

B – A humán szérumalbumin előállítása rekombináns úton

B1. Ez a példa egy klasszikus eljárást ír le a HSA előállítására, amely a pYG401 vektorral (A1 példa) transzformált K. lactis CBS 683 élesztőt alkalmazza. Ez a példa a technika állását mutatja be.

A tenyésztést 2 literes fermentorban, 28 °C-on fedbatch módban végeztük. Kezdetben a fermentor 0,7 liter alaptápközeget (2 g/l glükóz, 3 g/l élesztőkivonat, sók) tartalmaz. A fermentor beoltására egy 50 ml-es, exponenciális növekedési fázisban levő (egy fagyasztott szuszpenzióból kiindulva inokulált) kultúrát használtunk. Egy batch típusú bevezető növekedési fázis után kiegészítő tápanyagokat (glükóz, kukoricalekvár, ammóniumsók: 40%/13%/7% [tömeg/térfogat]) adagoltunk exponenciálisan. 64 óra tenyésztés után a fermentlevet centrifugáltuk, és a felülúszót 2μ membránon mikrofiltráltuk. A tisztítási eljárás egy Bleu Trisacrylon (IBF, Franciaország) végzett affinitás kromatográfiás lépésből állt, ahonnan az albumint egy erős sóoldattal

(3,5 M NaCl) eluáltuk, majd koncentráció és diafiltráció után, egy Q-szefaróz „fast flow" típusú ioncserélőn engedtük át. Az így tisztított HSA SDS–PAGE elektroforézissel egyetlen homogén sávot mutat, és nem különböztethető meg a kontrollként használt természetes albumintól számos biokémiai karakterizációs tesztben. Mégis, a kapott HSA oldata egy sárga elszíneződést mutat, és kolorimetriás indexe i=0,26, amit lehetetlen eltávolítani alaposabb tisztítással és/vagy kezelésekkel, mint például az aktív szén alkalmazása, és 360 nm-nél végzett gerjesztés utáni fluoreszcenciája sem normális (lásd a 16., 18. és 19. ábrákat).

B2. A BCQ 759 rekombináns albumin egy mintája, melyet a B1 példában leírt körülmények között kaptunk, i=0,26 kolorimetriás indexet mutat tisztítás után (16. ábra). Számos kiegészítő kromatográfiás próbálkozás és fizikai-kémiai kezelés sem teszi lehetővé ennek az elszíneződésnek az eliminálását.

Egy denaturáció-renaturáció ciklust végeztünk a következők szerint, hogy megállapítsuk az elszíneződésnek az albuminhoz való kapcsolódásának módját:

50 mg BCQ 759-et denaturáltunk 2 ml 7 M guanidin-HCl-ben és 0,3 M β-merkaptoetanolban való inkubálással. Ezt az oldatot 1 órán át 100 °C-ra melegítettük. Lehűtés után 500 µl denaturált rHSA-t injektáltunk egy 8 M karbamiddal és 0,3 M β-merkaptoanollal kiegyensúlyozott TSK 3000SW oszlopra, hogy eliminálják azokat a kis molekulákat, amelyek erősen (de nem kovalensen) kötődhettek a HSA-hoz. A 280 nm-nél elnyelő frakciókat egy 50 mM Trisz-HCl, 8 M karbamid pH 8,0 oldattal szemben dializáltuk egy éjszakán át nitrogén alatt, majd 1 1 50 mM Trisz-HCl, pH 9,5 renaturációs pufferrel szemben, amely 50 mM NaCl-t, 1 mM redukált glutationt és 0,1 mM oxidált glutationt tartalmaz, nitrogén alatt, 48 órán át. Egy végső, vízzel szemben végzett dialízis után UV-spektrumot készítettünk, és i_2=0,22 kolorimetriás indexet számoltunk. Ugyanilyen körülmények között egy placentaeredetű kontrollalbumin (Institut Mérieux, i=0,07) renaturáció után i_2=0,14 indexet ad. Ez a példa világosan megmutatja, hogy a pigment kötése az albuminhoz alapvetően kovalens jellegű. Hiábavaló tehát azzal próbálkozni, hogy egy rekombináns albumint jelentősen elszínteleníts tisztítási eljárásokkal.

B3. Ebben a példában egy egyszerű kísérletet írunk le, ami lehetővé teszi, hogy rámutassunk, hogy a szénforrás az elszíneződés egyik alapvető okozója.

A kontrollalbumint (i=0,07) különböző tápközegmintákban inkubáltuk élesztővel való beoltás nélkül. A tesztelt tápközegek egy alap Bo tápközegből állnak, amelyet a következőképpen definiáltunk:

Sók	ammónium-acetát	7 g/l
	Na_2HPO_4	4,4 g/l
	KH_2PO_4	4 g/l
	$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g/l
	$CaCl_2.2H_2O$	0, 1 g/l
	$MnSO_4.H_2O$	10 mg/l
	$ZnSO_4.7H_2O$	100 mg/l
	$FeSO_4.7H_2O$	15 mg/l
	$AlCl_3.6H_2O$	1 mg/l
	$CoCl_2.6H_2O$	2 mg/l
	$CuSO_4.5H_2O$	0,13 mg/l
	KI	0,33 mg/l
	H_3BO_3	1,47 mg/l
	Na_2MoO_4	0,67 mg/l
Vitaminok	mezoinozitol	2 mg/l
	nikotinsav	2 mg/l
	biotin	2 mg/l
	kalcium-pantotenát	2 mg/l
Aminosavak	L–Glu	0,6 g/l
	L–Phe	0,15 g/l
	DL–Ala	0,7 g/l
	L–Leu	0,35 g/l
	L–Lys.HCl	0,30 g/l
	DL–His.HC1	0,30 g/l
	L–Ile	0,10 g/l
	DL–Met	0,15 g/l
	L–Pro	0, 3 g/l

és egy szénforrás:

Minták:	E1:	glükóz (mikrofiltrált) 20 g/l
	E2:	laktóz 20 g/l
	E3:	kontroll (szénforrás nélkül)

A három mintát 50 mg/l HSA-val inkubáltuk, és 28 °C-on 3 napon át ráztuk.

3 nap után a tápközeget lecentrifugáltuk, és egy 0,2 µ membránon szűrtük. 5 ml Bleu Trisacryl M (IBF Franciaország) affinitáshordozót adtunk hozzá, és enyhén kevertük. 1 óra után a keverékeket üvegfritten szétválasztottuk, és az albumint egy 3,5 M NaCl-oldattal eluáltuk. Az eluátumot azután koncentráltuk és 10 kD ultrafiltrációs membránon vízzel diafiltráltuk.

Egy spektrofotometriás analízis a következő eredményeket adta az albumin kolorimetriás indexére:

Minták:	E1	i=0,16
	E2	i=0,12
	E3	i=0,09
	kontroll HSA	i=0,07

Ez a példa tehát világosan megmutatja, hogy a szénforrás élesztő nélküli kultúrában az albumin elszíneződésének növekedését indukálja.

B4. Az előző példában kapott eredmények kiegészítésére a referencia albumint ugyanolyan körülmények között, a következők jelenlétében inkubáltuk:

Minták:	E4	Bo tápközeg+autoklávozott glükóz 20 g/l
	E5	Bo tápközeg+mikrofiltrált glükóz 20 g/l
	E6	Bo tápközeg+mikrofiltrált szacharóz 20 g/l

Miután a tápközeget koncentráltuk és diafiltráltuk, hogy a kis molekulákat eltávolítsuk, UV fénynél meghatároztuk a kolorimetriás indexet:

E4	i=0,22
E5	i=0,15
E6	i=0,14

B5. A találmány szerinti eljárás. Az előző példákból levont következtetések ellenőrzésére egy valós te-

nyésztés folyamán analizáltuk a K. lactis élesztő által termelt rekombináns albumin elszíneződését.

a) Az A3 példa szerint előállított pYG1023 vektorral transzformált K. lactis pgk–CBS 295.91 törzset tenyésztettük az alábbi tápközegekben:

E7 =Bo+10 g/l laktóz+10 g/l etanol
E8 =Bo+20 g/l laktóz
E9 =Bo+20 g/l mikrofiltrált glükóz
E10=Bo+10 g/l laktóz+10 g/l glükóz

A 72 órás, batch módban, 250 ml-es Erlenmeyerekben, 28 °C-on végzett tenyésztés alatt termelődött albumint MonoQ HR5/5 (Pharmacia) anioncserélő oszlopon tisztítottuk, és aktív szénnel kezeltük, hogy a HSA-hoz nem kovalensen kötött elszíneződést eltávolítsuk. Az UV-analízis után a következő koloritmeriás indexeket kaptuk:

E7 i=0,11 BCQ 804 LE (lásd a 16., 18. és 19. ábrát)
E8 i=0,14 BCQ 804 L
E9 i=0,17 BCQ 804 G
E10 i=0,15 BCQ 804 LG

b) Az A2 példában leírt pYG132 vektorral transzformált K. lactis CBS 293.91 törzset tenyésztettük az alábbi tápközegben:

E11=Bo+10 g/l glicerin+10 g/l etanol

Az előzőekkel megegyező körülmények között egyszerű MonoQ-n végzett tisztítás után a termelt rekombináns albumin kolorimetriás indexe i=0,09 (BCQ 835 GE): lásd a 17. ábrát.

Szekvencialista:

1. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 37 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
vii) Származás:
b) klón: 1. adapter – A oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
CGTCGACACG CGTGCGCGCC CGCGGCCAAT GGGGCCC 37

2. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 45 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
vii) Származás:
b) klón: 1. adapter – B oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
TCGAGGGCCCCATTGGCCGC GGGCGCGCAC GCGTGTCGAC GAGCT 45

3. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 41 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
vii) Származás:
b) klón: 2. adapter – C oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
AATTAGGCCA ATGGGGCCGA CGTCGCATGC GGCGCCGAGC T 41

4. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 33 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
Vii) Származás:
b) klón: 2. adapter – D oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
CGGCGCCGCA TGCGACGTCG GCCCCATTGG CCT 33

5. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 41 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
vii) Származás
b) klón: 3. adapter – E oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
AATTCCCCGC GCGCCCATCG ATCCGCTAGC CCACGCGTCC A 41

6. számú szekvencia

i) A szekvencia jellemzői:
a) hossz: 41 bázispár
b) típus: nukleinsavszekvencia
c) szálasság: egyszálú
d) konfiguráció: lineáris
ii) Molekulatípus: cDNS
vii) Származás
b) klón: 3. adapter – F oligonukleotid
xi) A szekvencia leírása:
GATCTGGACG CGTGGGCTAG CGGATCGATG GGCGCGCGGG G 41

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás 0,2-nél kisebb kolorimetriás indexű humán szérumalbumin előállítására egy Kluyveromyces nemzetséghez tartozó élesztőben, *azzal jellemezve,* hogy

(i) bevezetünk egy, a humán szérumalbumint kódoló exogén DNS-t az említett gazdasejtbe;

(ii) az így kapott gazdasejtet egy meghatározott összetételű tápközegben tenyésztjük, amely B0 alaptápközegből áll és legalább egy szénforrást tartalmaz az alábbiak közül: etanol, glicerin, szorbit, szacharóz, acetátok, laktátok, 1–4 típusú glikozidkötést tartalmazó diszacharidok és mikrofiltrált glükóz;

(iii) a termelődött humán szérumalbumint a tápközegből kinyerjük;

és kívánt esetben,

(iv) a humán szérumalbuminhoz nem kovalensen kötött színező szennyezéseket ismert módon eltávolítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg legalább egy szénforrást tartalmaz az alábbi diszacharidok közül: maltóz, cellobióz és laktóz.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg szénforrásként laktózt tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg szénforrásként mikrofiltrált glükózt tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg legalább két szénforrást tartalmaz az alábbiak közül: etanol, glicerin, szorbit, szacharóz, acetátok, laktátok, 1–4 típusú glikozidkötést tartalmazó diszacharidok és mikrofiltrált glükóz.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg szénforrásként laktózt és etanolt tartalmaz.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg szénforrásként glicerint és etanolt tartalmaz.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeg szénforrásként laktózt és glükózt tartalmaz.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a tápközeget előzőleg hidegen sterilizáljuk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a humán szérumalbumint kódoló exogén DNS cDNS-szekvenciák, genomiális szekvenciák vagy hibrid szekvenciák egyike.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a DNS egy cDNS.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az exogén DNS egy transzkripciós és egy transzlációs kezdő régiót tartalmaz a HSA-t kódoló szekvencia 5'-végéhez kapcsolva.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az exogén DNS egy autonóm módon replikálódó vagy egy integratív vektor része.

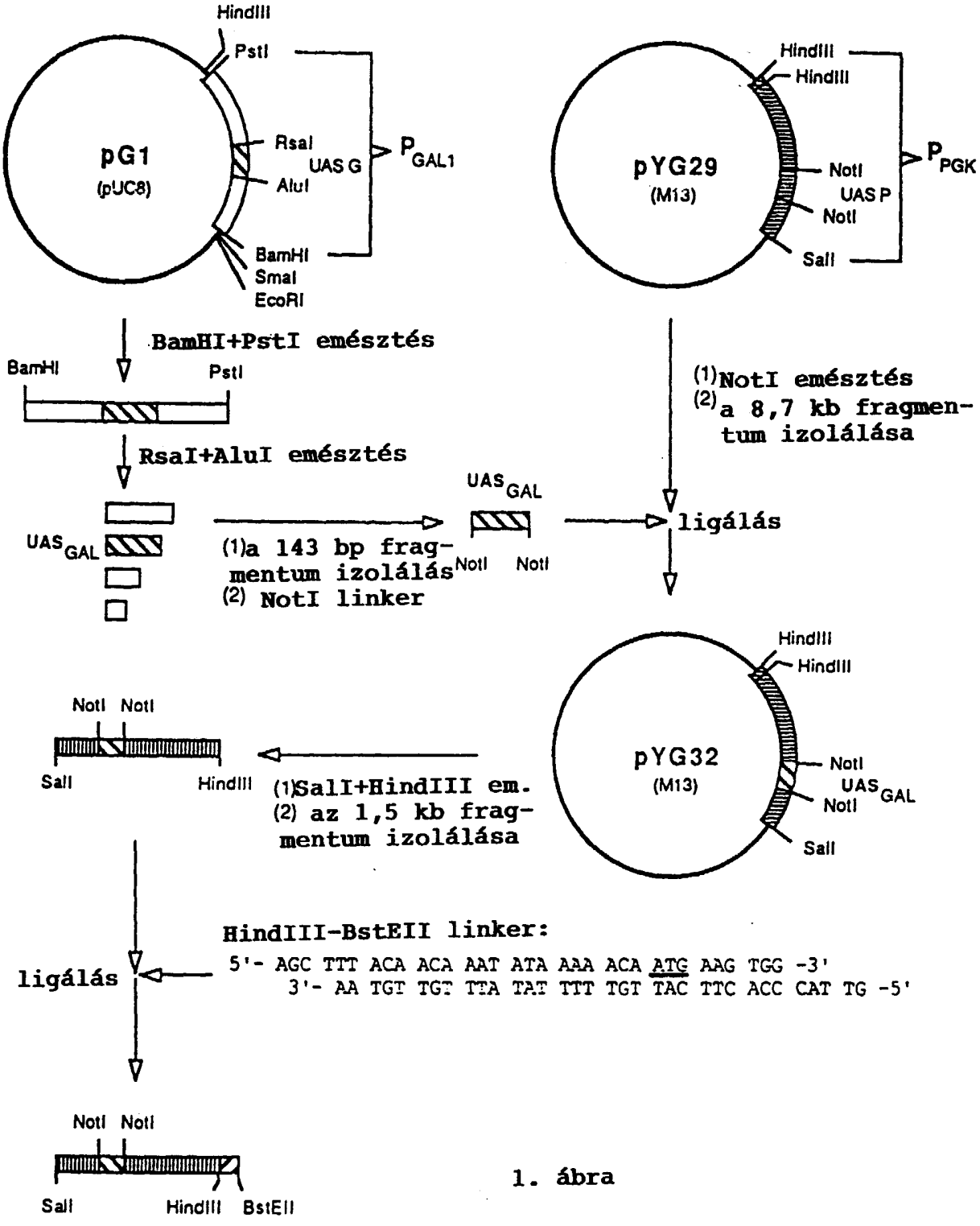
14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a humán szérumalbumin a tápközegbe szekretálódik.

15. Rekombináns humán szérumalbumin, *azzal jellemezve,* hogy kolorimetriás indexe ($i=OD_{300}/OD_{280}$) kisebb, mint 0,2, és az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított.

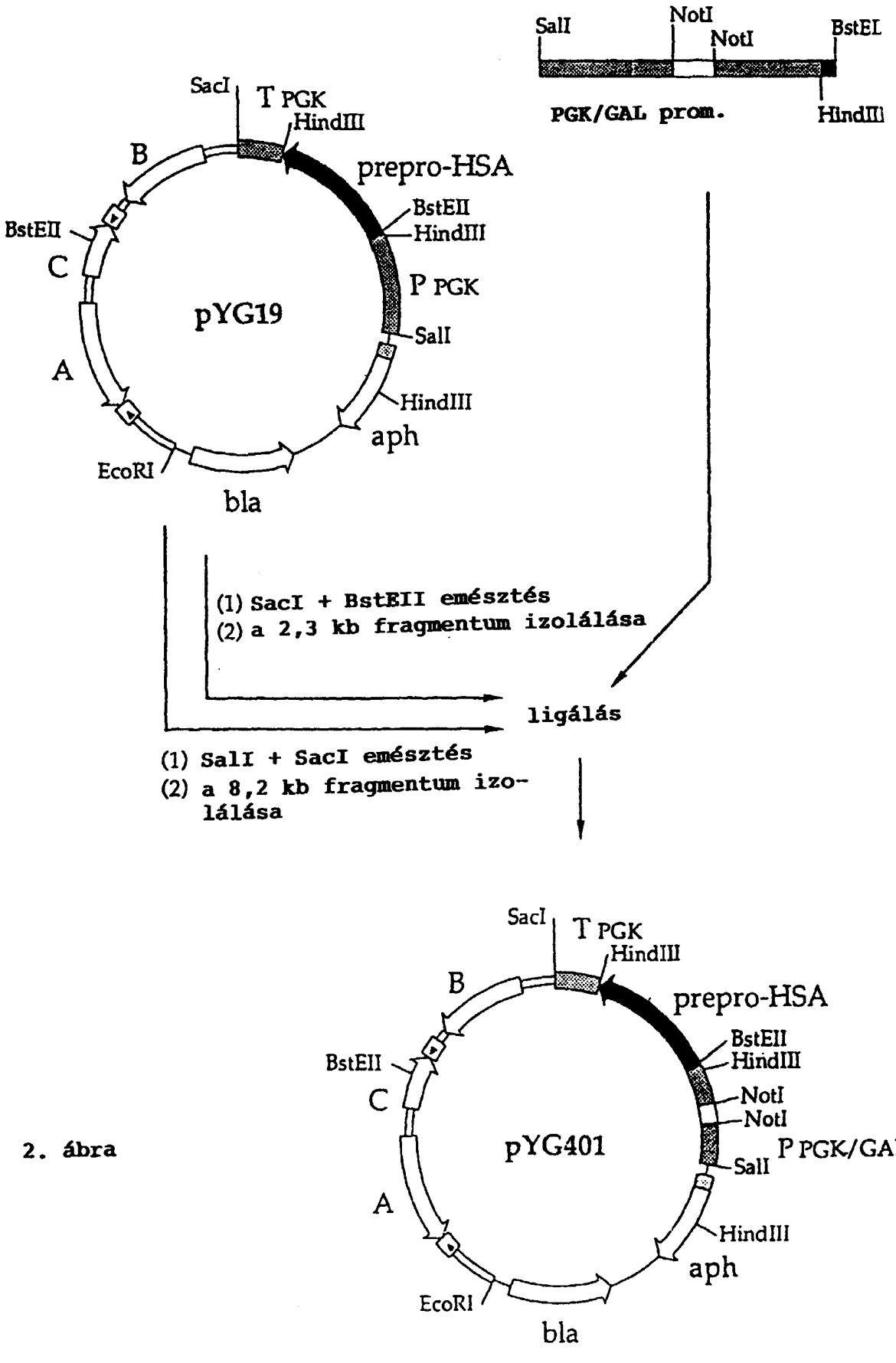
16. A 15. igénypont szerinti humán szérumalbumin, *azzal jellemezve,* hogy kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,15.

17. A 16. igénypont szerinti humán szérumalbumin, *azzal jellemezve,* hogy kolorimetriás indexe kisebb, mint 0,1.

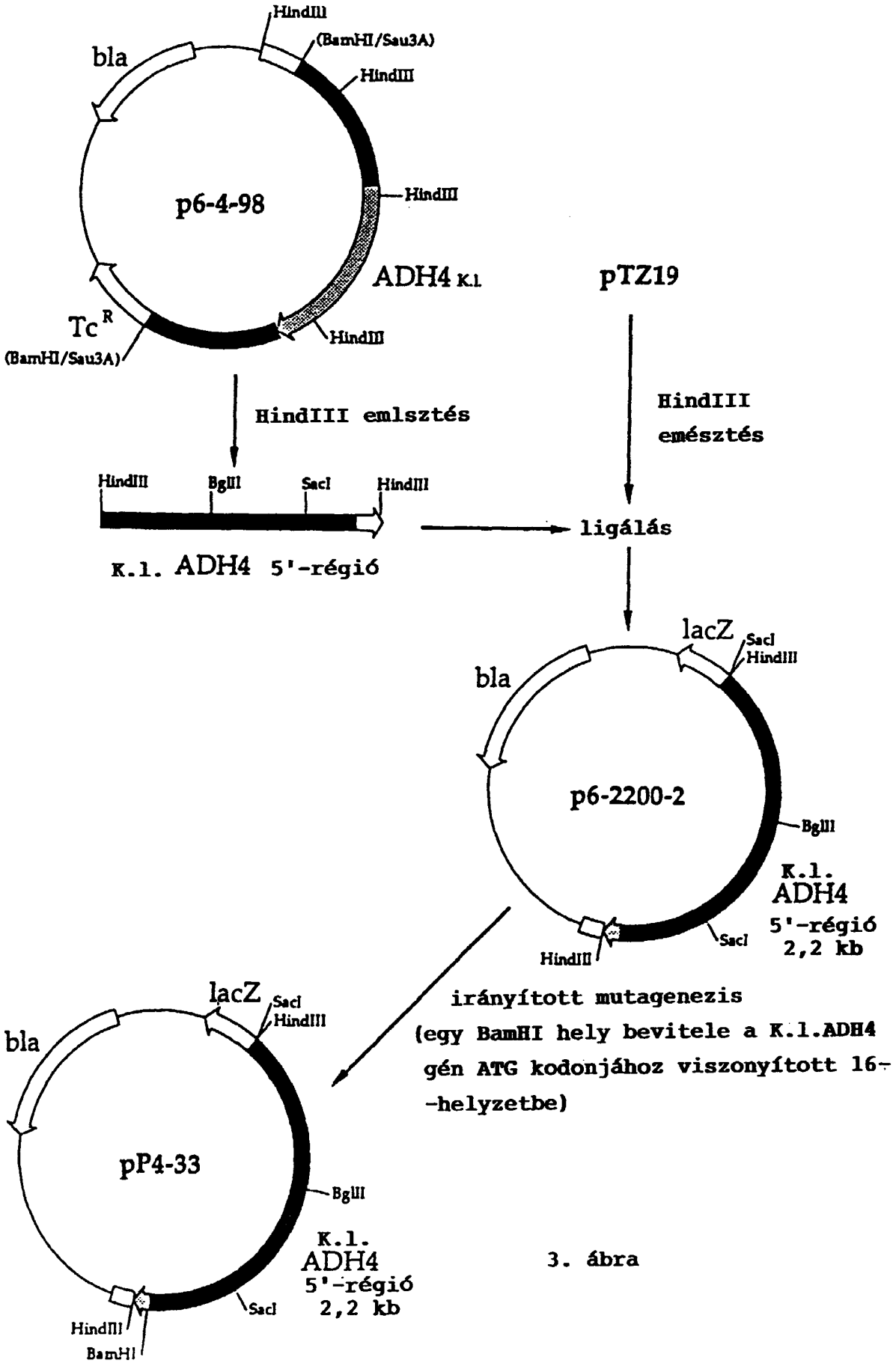
18. Gyógyszerkészítmény, *azzal jellemezve,* hogy hatóanyagként a 15–17. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns humán szérumalbumint tartalmazza.


HindIII
PstI
pG1
(pUC8)
RsaI
UAS G
AluI
P GAL1
BamHI
SmaI
EcoRI
BamHI+PstI emésztés
BamHI
PstI
RsaI+AluI emésztés
UAS GAL
(1)a 143 bp frag-
mentum izolálás
(2) NotI linker
NotI
NotI
UAS GAL
pYG29
(M13)
HindIII
HindIII
NotI
UAS P
NotI
SalI
P PGK
(1)NotI emésztés
(2)a 8,7 kb fragmen-
tum izolálása
ligálás
pYG32
(M13)
HindIII
HindIII
NotI
UAS GAL
NotI
SalI
NotI NotI
SalI
HindIII
(1)SalI+HindIII em.
(2) az 1,5 kb frag-
mentum izolálása
HindIII-BstEII linker:
5'- AGC TTT ACA ACA AAT ATA AAA ACA ATG AAG TGG -3'
3'- AA TGT TGT TTA TAT TTT TGT TAC TTC ACC CAT TG -5'
ligálás
NotI NotI
SalI
HindIII
BstEII

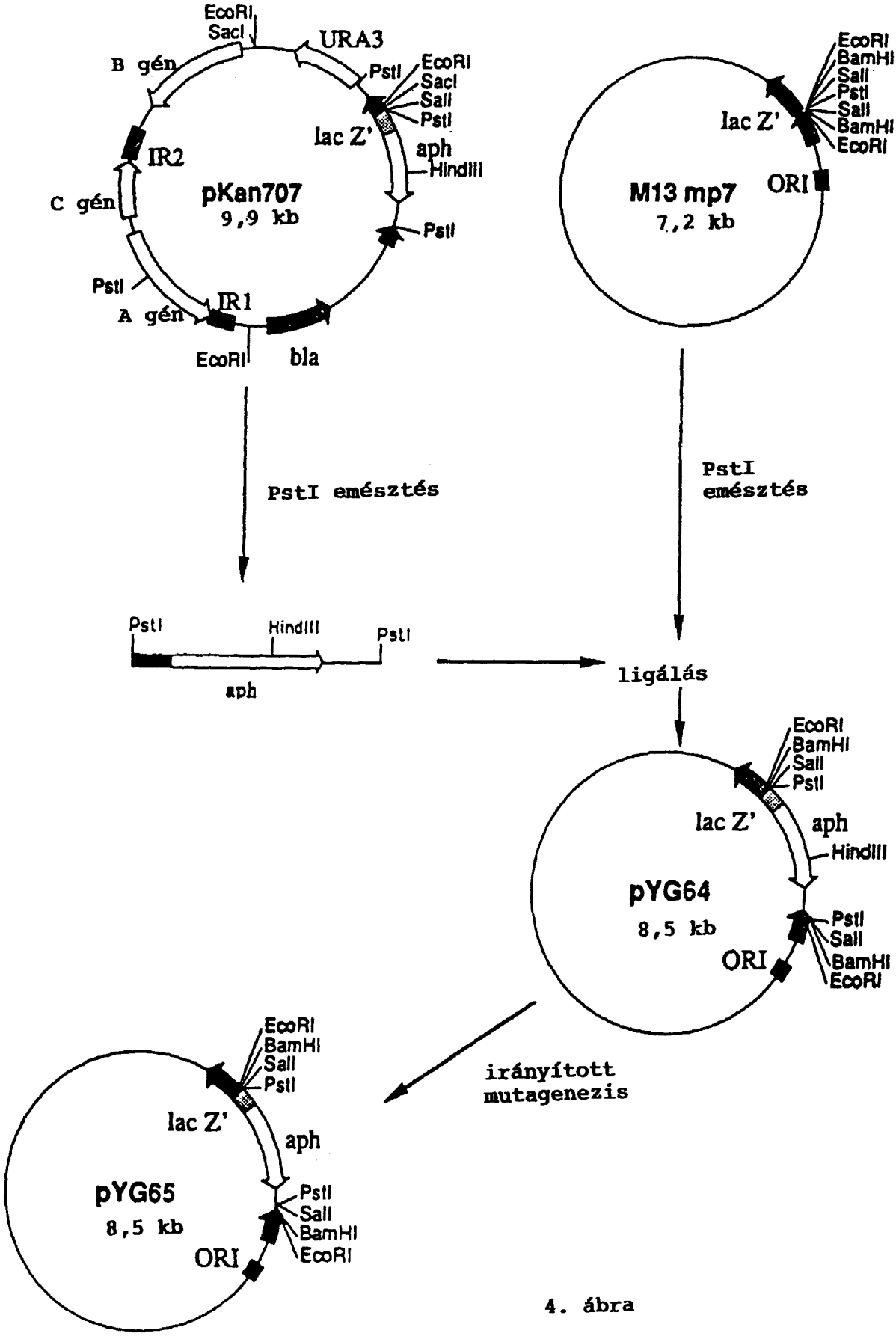
1. ábra


SalI
NotI
NotI
BstEI
PGK/GAL prom.
HindIII
SacI
T PGK
HindIII
B
prepro-HSA
BstEII
HindIII
BstEII
C
P PGK
pYG19
SalI
A
HindIII
aph
EcoRI
bla
(1) SacI + BstEII emésztés
(2) a 2,3 kb fragmentum izolálása
ligálás
(1) SalI + SacI emésztés
(2) a 8,2 kb fragmentum izolálása
SacI
T PGK
HindIII
B
prepro-HSA
BstEII
HindIII
BstEII
C
NotI
NotI
pYG401
P PGK/GAL
SalI
A
HindIII
aph
EcoRI
bla

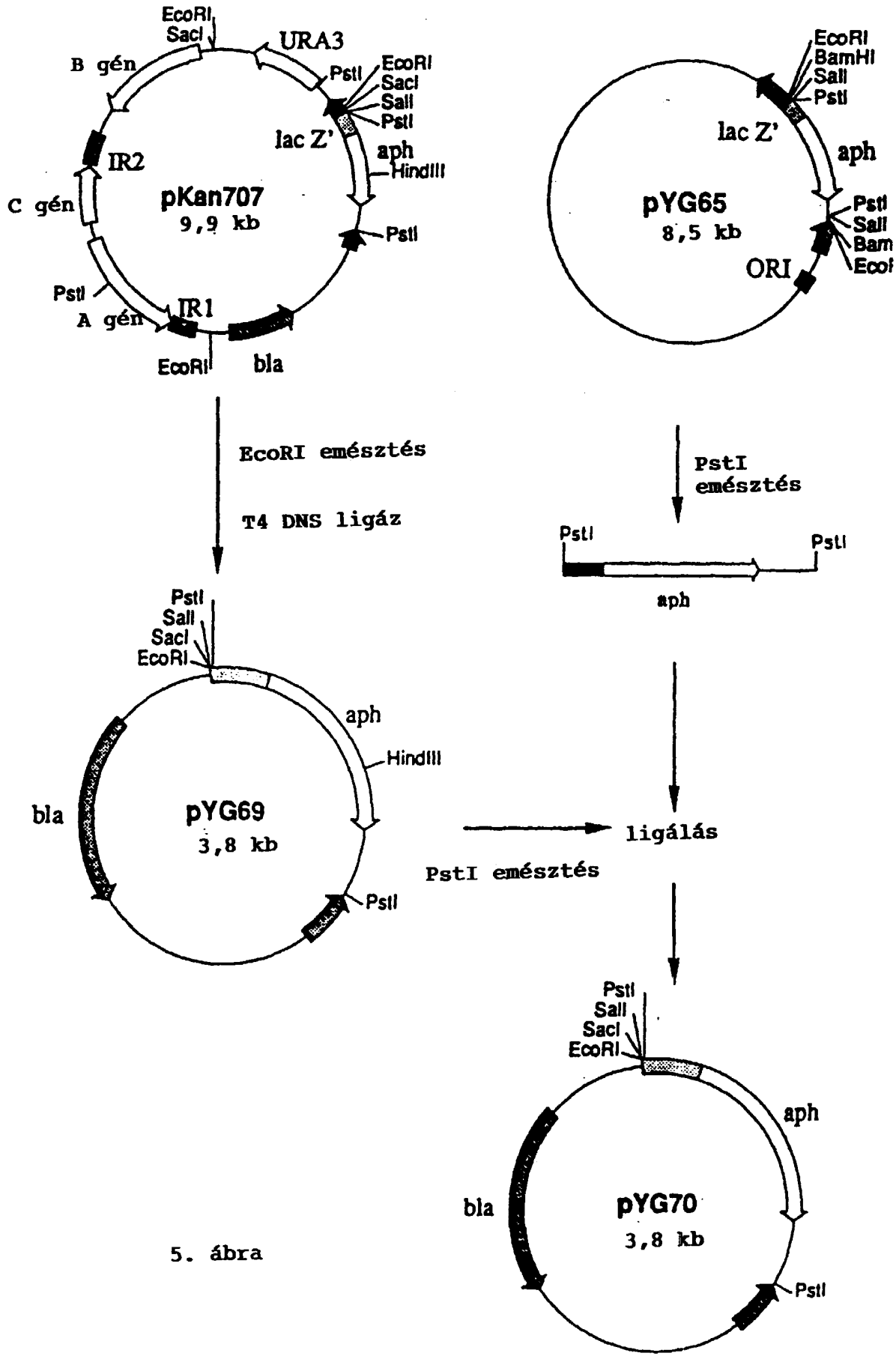
2. ábra


HindIII
(BamHI/Sau3A)
bla
HindIII
p6-4-98
HindIII
ADH4 K.l.
Tc R
(BamHI/Sau3A)
HindIII
pTZ19
HindIII emlsztés
HindIII
emésztés
HindIII
BglII
SacI
HindIII
ligálás
K.l. ADH4 5'-régió
lacZ
SacI
HindIII
bla
p6-2200-2
BglII
K.l.
ADH4
5'-régió
2,2 kb
SacI
HindIII
irányított mutagenezis
(egy BamHI hely bevitele a K.l.ADH4
gén ATG kodonjához viszonyított 16-
-helyzetbe)
lacZ
SacI
HindIII
bla
pP4-33
BglII
K.l.
ADH4
5'-régió
2,2 kb
SacI
HindIII
BamHI

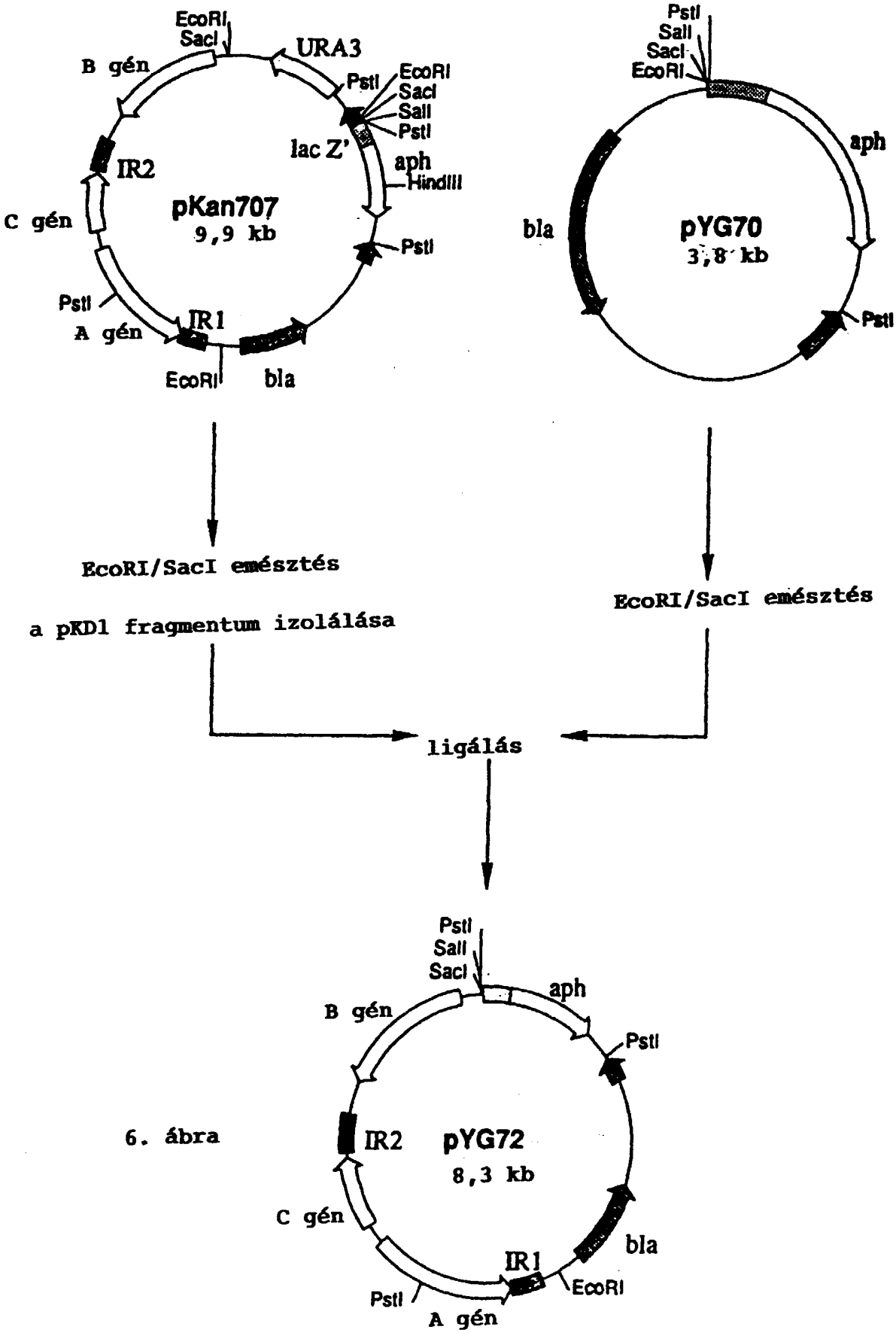
3. ábra


EcoRI
SacI
URA3
B gén
PstI
EcoRI
SacI
SalI
PstI
lac Z'
aph
HindIII
IR2
C gén
pKan707
9,9 kb
PstI
PstI
IR1
A gén
EcoRI
bla
EcoRI
BamHI
SalI
PstI
SalI
BamHI
EcoRI
lac Z'
M13 mp7
7,2 kb
ORI
PstI emésztés
PstI emésztés
PstI
HindIII
PstI
aph
ligálás
EcoRI
BamHI
SalI
PstI
lac Z'
aph
HindIII
pYG64
8,5 kb
PstI
SalI
ORI
BamHI
EcoRI
irányított mutagenezis
EcoRI
BamHI
SalI
PstI
lac Z'
aph
pYG65
8,5 kb
PstI
SalI
BamHI
ORI
EcoRI

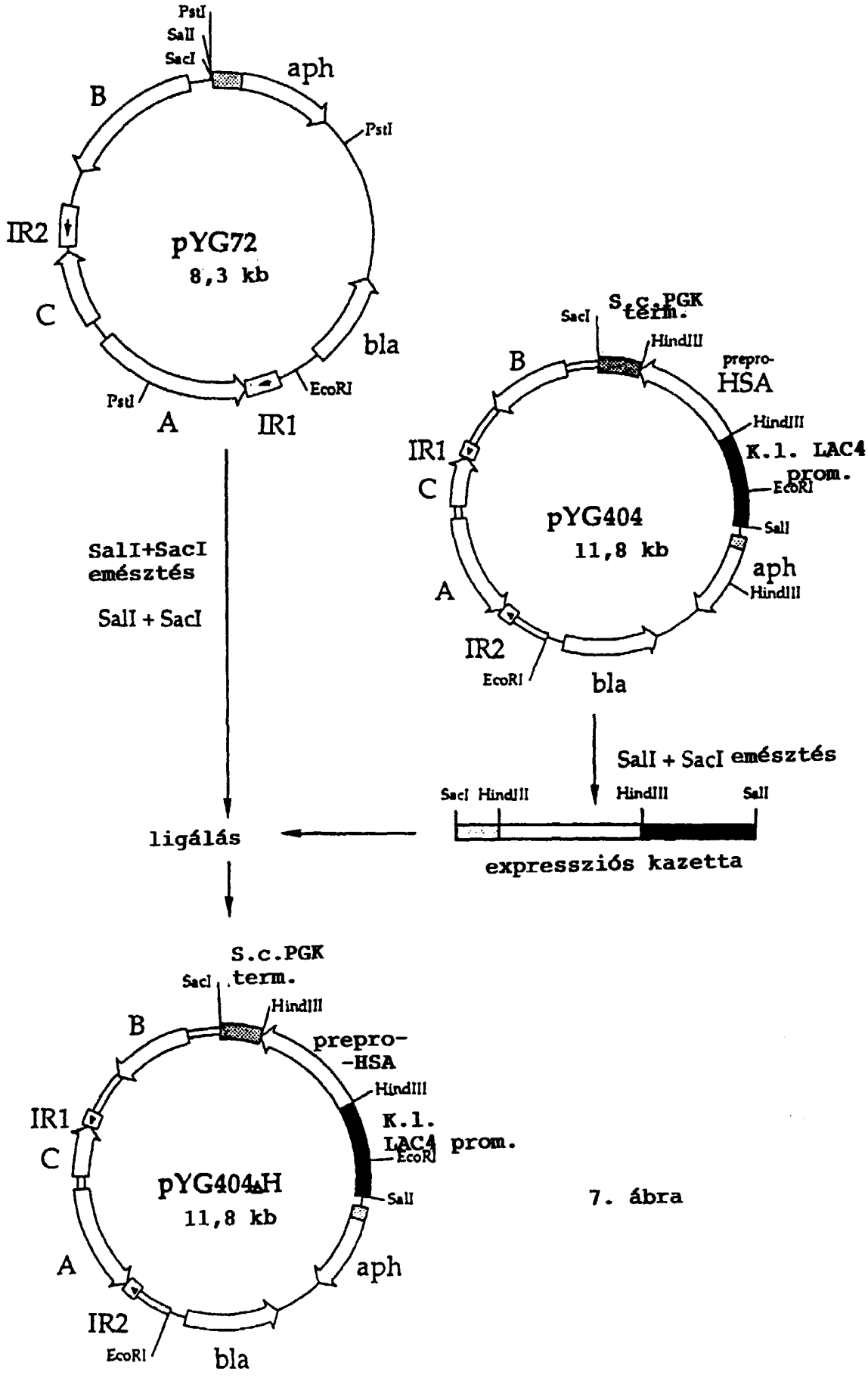
4. ábra


EcoRI
SacI
URA3
B gén
PstI
EcoRI
SacI
SalI
PstI
lac Z'
aph
HindIII
IR2
C gén
pKan707
9,9 kb
PstI
PstI
A gén
IR1
EcoRI
bla
EcoRI
BamHI
SalI
PstI
lac Z'
aph
pYG65
8,5 kb
PstI
SalI
Bam
Ecol
ORI
EcoRI emésztés
T4 DNS ligáz
PstI
emésztés
PstI
PstI
aph
PstI
SalI
SacI
EcoRI
aph
HindIII
bla
pYG69
3,8 kb
PstI
ligálás
PstI emésztés
PstI
SalI
SacI
EcoRI
aph
bla
pYG70
3,8 kb
PstI

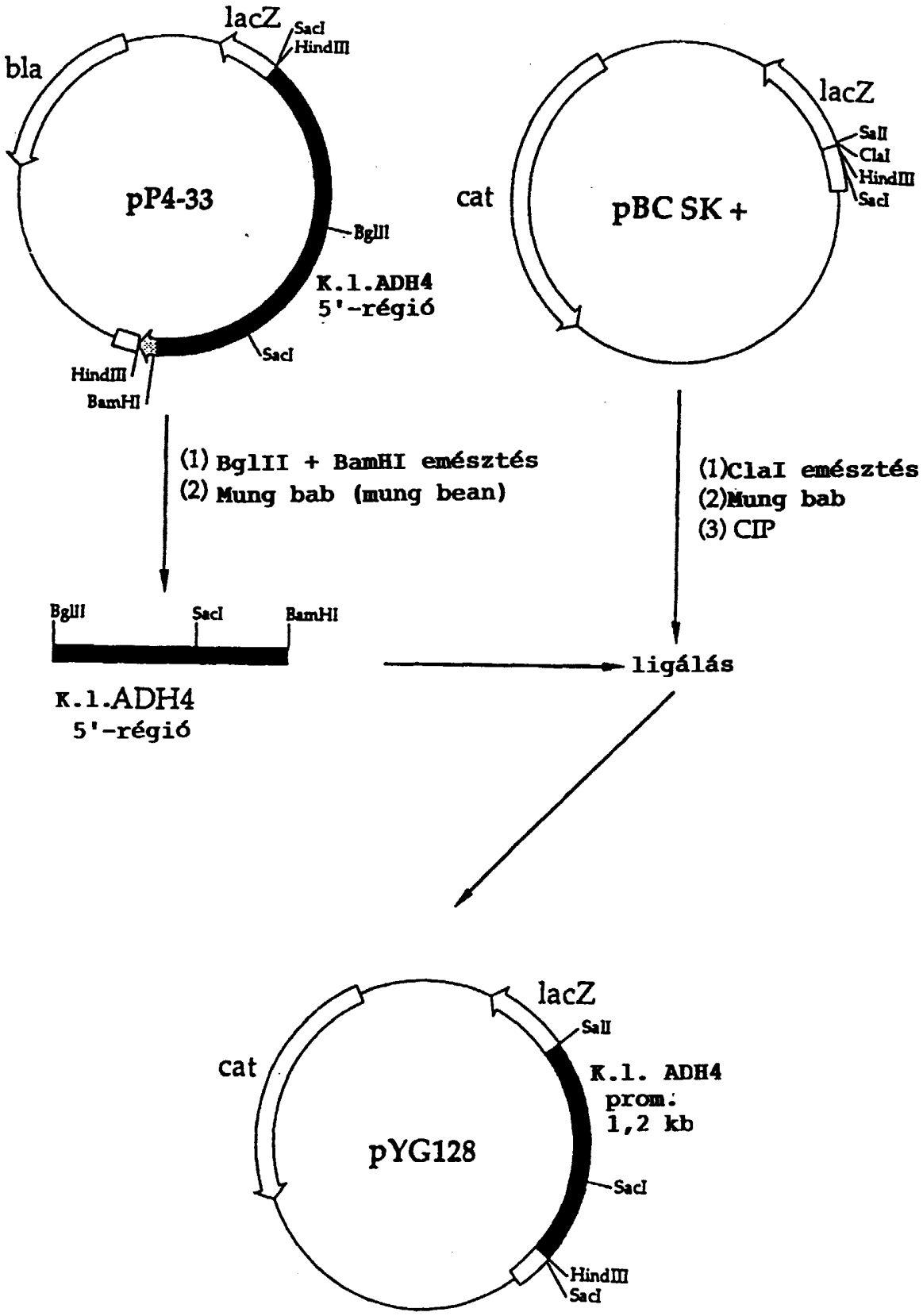
5. ábra


EcoRI
SacI
URA3
B gén
PstI
EcoRI
SacI
SalI
PstI
lac Z'
aph
HindIII
IR2
pKan707
9,9 kb
C gén
PstI
PstI
A gén
IR1
EcoRI
bla
PstI
SalI
SacI
EcoRI
aph
bla
pYG70
3,8 kb
PstI
EcoRI/SacI emésztés
a pKD1 fragmentum izolálása
EcoRI/SacI emésztés
ligálás
PstI
SalI
SacI
aph
B gén
PstI
IR2
pYG72
8,3 kb
C gén
bla
IR1
EcoRI
PstI
A gén

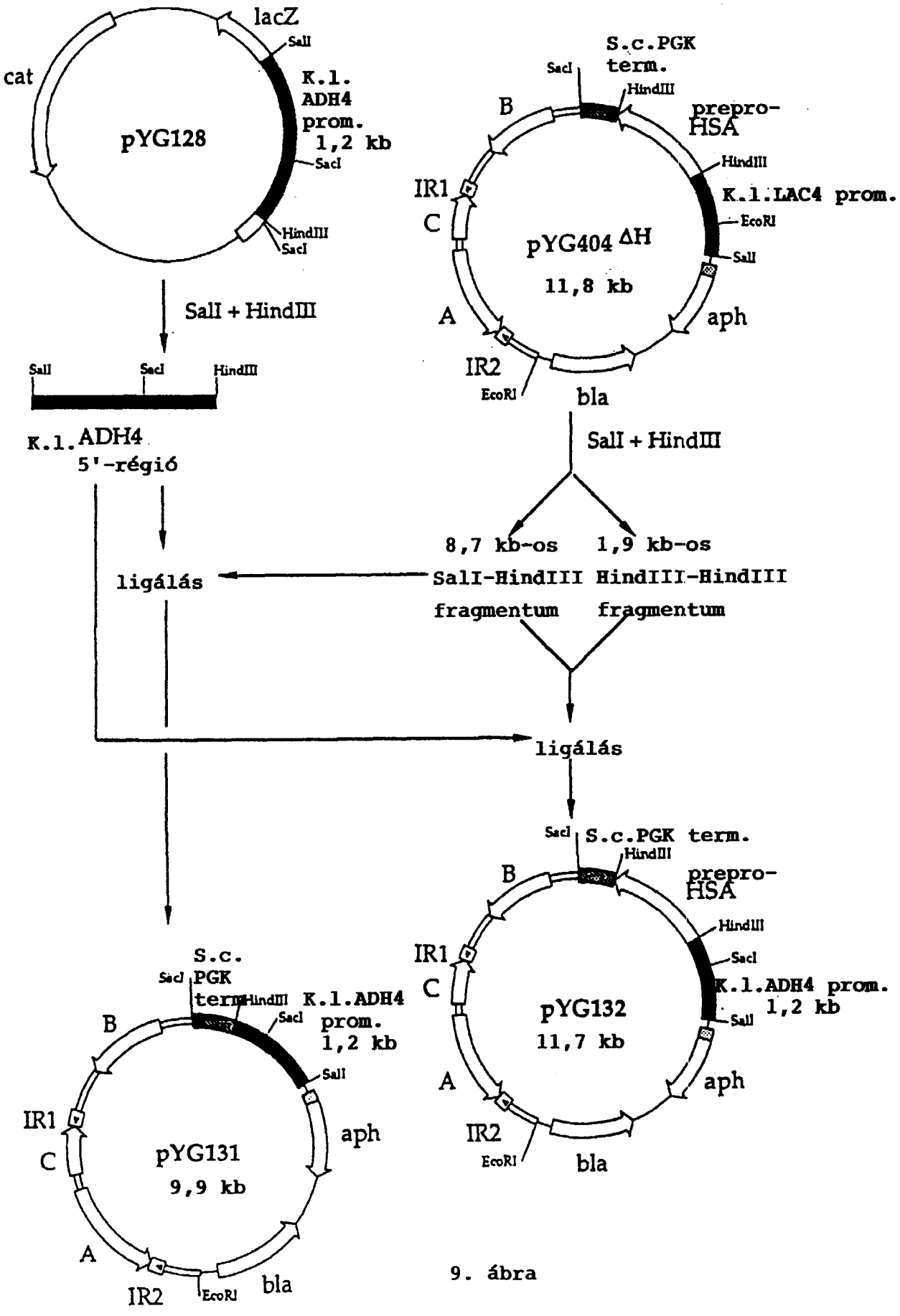
6. ábra


PstI
SalI
SacI
aph
B
PstI
IR2
pYG72
8,3 kb
C
bla
PstI
EcoRI
A
IR1
SalI+SacI
emésztés
SalI + SacI
S.c.PGK
term.
SacI
HindIII
B
prepro-
HSA
HindIII
IR1
K.1. LAC4
prom.
C
EcoRI
pYG404
11,8 kb
SalI
aph
HindIII
A
IR2
EcoRI
bla
SalI + SacI emésztés
SacI HindIII
HindIII
SalI
ligálás
expressziós kazetta
S.c.PGK
term.
SacI
HindIII
B
prepro-
-HSA
HindIII
IR1
K.1.
LAC4 prom.
C
EcoRI
pYG404ΔH
11,8 kb
SalI
A
aph
IR2
EcoRI
bla

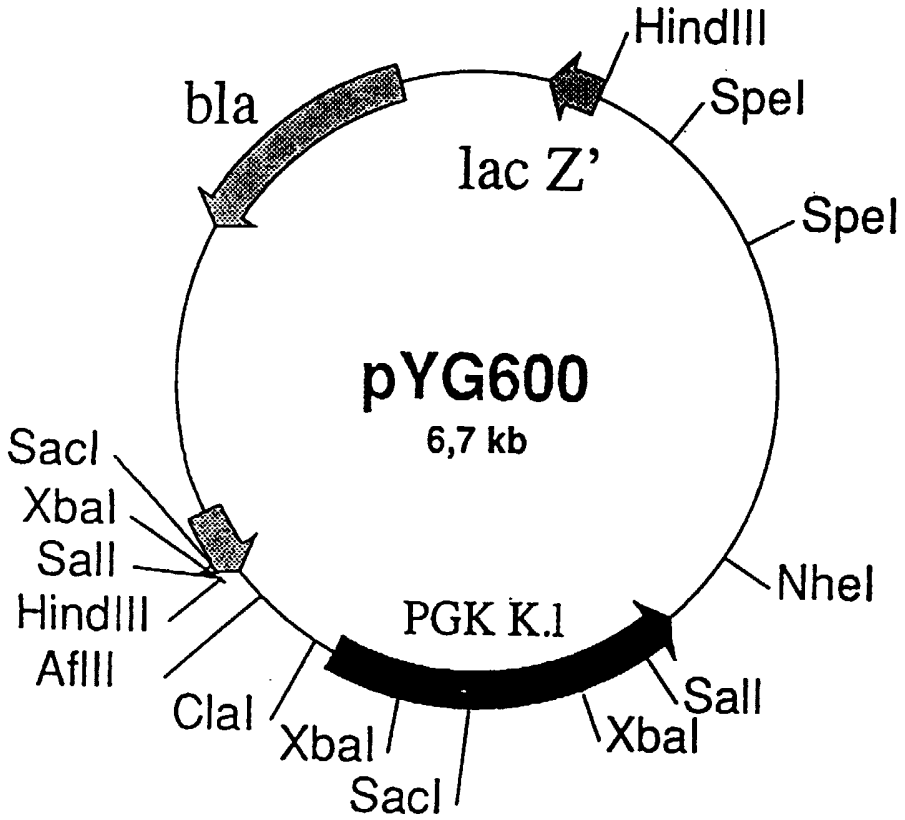
7. ábra


lacZ
SacI
HindIII
bla
pP4-33
BglII
K.1.ADH4
5'-régió
SacI
HindIII
BamHI
(1) BglII + BamHI emésztés
(2) Mung bab (mung bean)
BglII
SacI
BamHI
K.1.ADH4
5'-régió
lacZ
SalI
ClaI
HindIII
SacI
cat
pBC SK+
(1)ClaI emésztés
(2)Mung bab
(3) CIP
ligálás
lacZ
SalI
cat
K.1. ADH4
prom.
1,2 kb
pYG128
SacI
HindIII
SacI

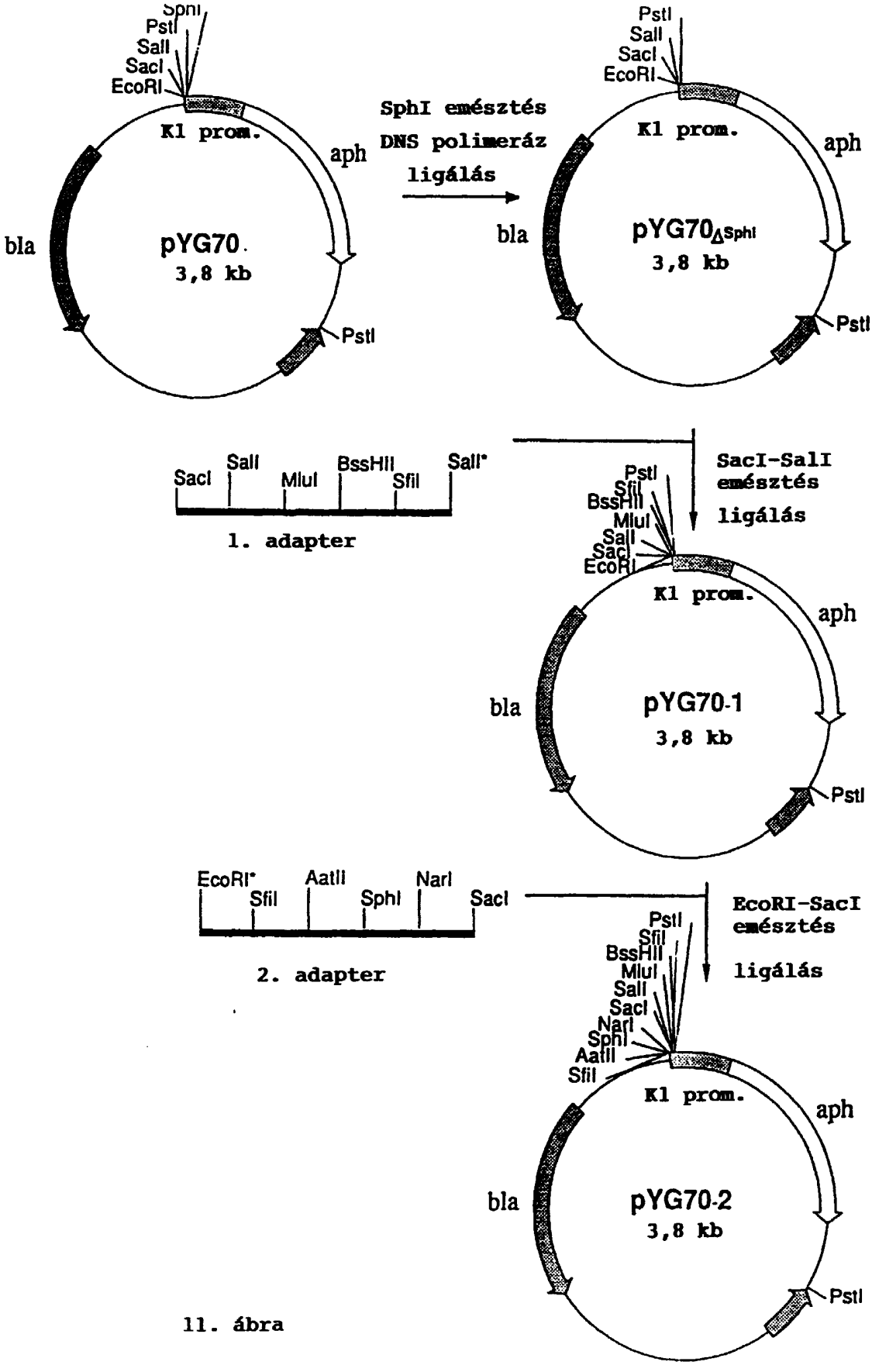
8. ábra


lacZ
SalI
cat
K.l.
ADH4
prom.
1,2 kb
pYG128
SacI
HindIII
SacI
SalI + HindIII
SalI
SacI
HindIII
K.l.ADH4
5'-régió
S.c.PGK
term.
SacI
HindIII
B
prepro-
HSA
HindIII
IR1
C
K.l.LAC4 prom.
EcoRI
pYG404 ΔH
11,8 kb
SalI
A
aph
IR2
EcoRI
bla
SalI + HindIII
8,7 kb-os
SalI-HindIII
fragmentum
1,9 kb-os
HindIII-HindIII
fragmentum
ligálás
ligálás
SacI
S.c.PGK term.
HindIII
B
prepro-
HSA
HindIII
IR1
C
SacI
K.l.ADH4 prom.
1,2 kb
pYG132
11,7 kb
SalI
A
aph
IR2
EcoRI
bla
S.c.
PGK
SacI
term
HindIII
K.l.ADH4
SacI
prom.
1,2 kb
B
SalI
IR1
aph
C
pYG131
9,9 kb
A
IR2
EcoRI
bla

9. ábra


HindIII
SpeI
SpeI
NheI
SalI
XbaI
SacI
bla
lac Z'
pYG600
6,7 kb
SacI
XbaI
SalI
HindIII
AflII
ClaI
XbaI
SacI
PGK K.1

10. ábra


SphI
PstI
SalI
SacI
EcoRI
K1 prom.
aph
bla
pYG70
3,8 kb
PstI
SphI emésztés
DNS polimeráz
ligálás
pYG70ΔSphI
SacI
SalI
MluI
BssHII
SalI*
1. adapter
SacI-SalI
emésztés
ligálás
pYG70-1
EcoRI*
SfiI
AatII
SphI
NarI
SacI
2. adapter
EcoRI-SacI
emésztés
ligálás
pYG70-2

11. ábra

OLIGODEZOXINUKLEOTIDOK

1. adapter

A 5' CGTCGACACGCGTGCGCGCCCGCGGCCAATGGGGCCC 3'

B 5' TCGAGGGCCCCATTGGCCGCGGGCGCGCACGCGTGTCGACGAGCT 3'

2. adapter

C 5' AATTAGGCCAATGGGGCCGACGTCGCATGCGGCGCCGAGCT 3'

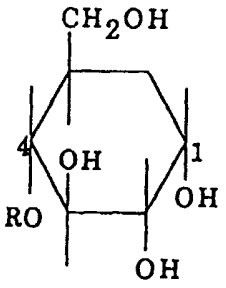
D 5' CGGCGCCGCATGCGACGTCGGCCCCATTGGCCT 3'

3. adapter

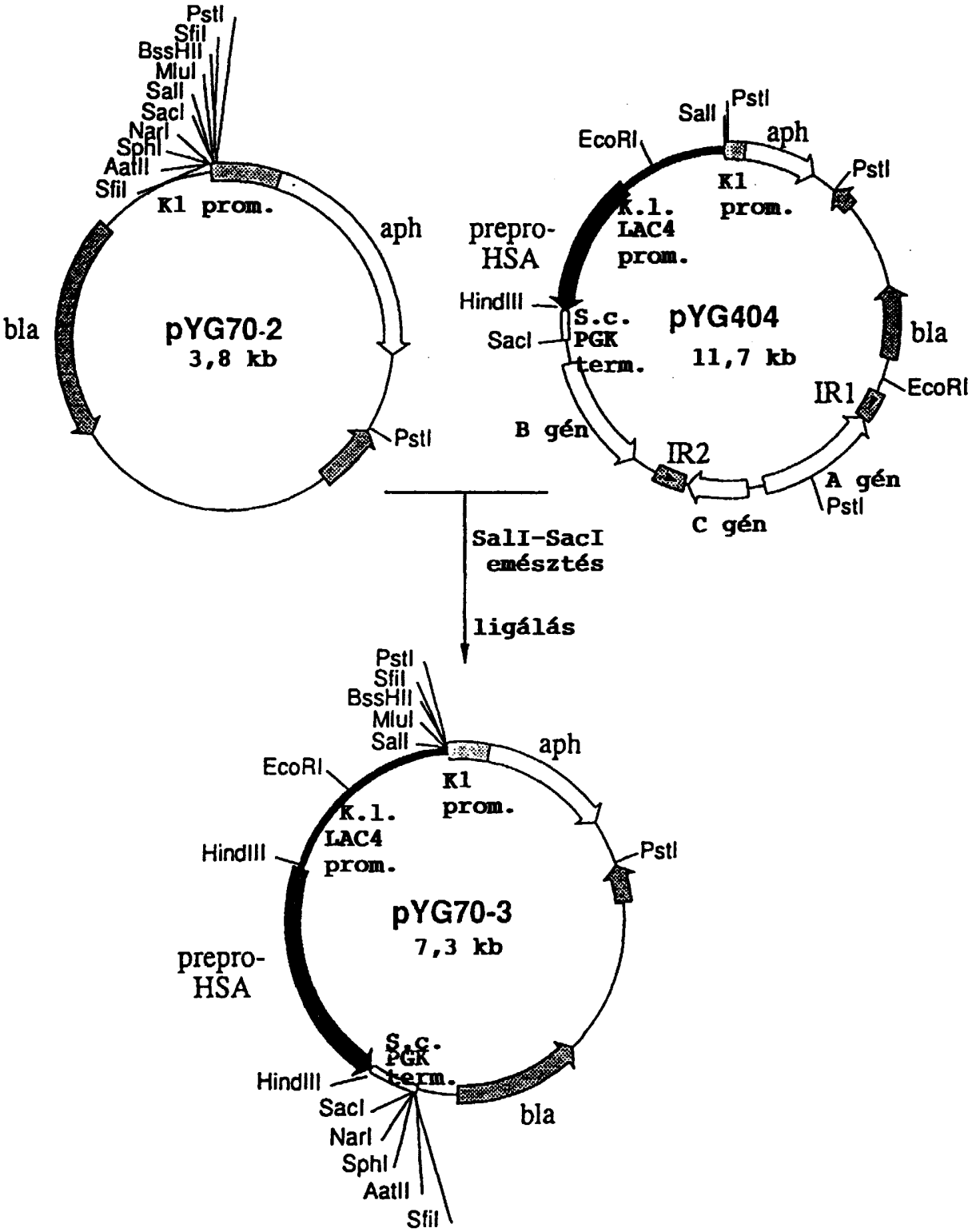
E 5' AATTCCCCGCGCGCCCATCGATCCGCTAGCCCACGCGTCCA 3'

F 5' GATCTGGACGCGTGGGCTAGCGGATCGATGGGCGCGCGGGG 3'

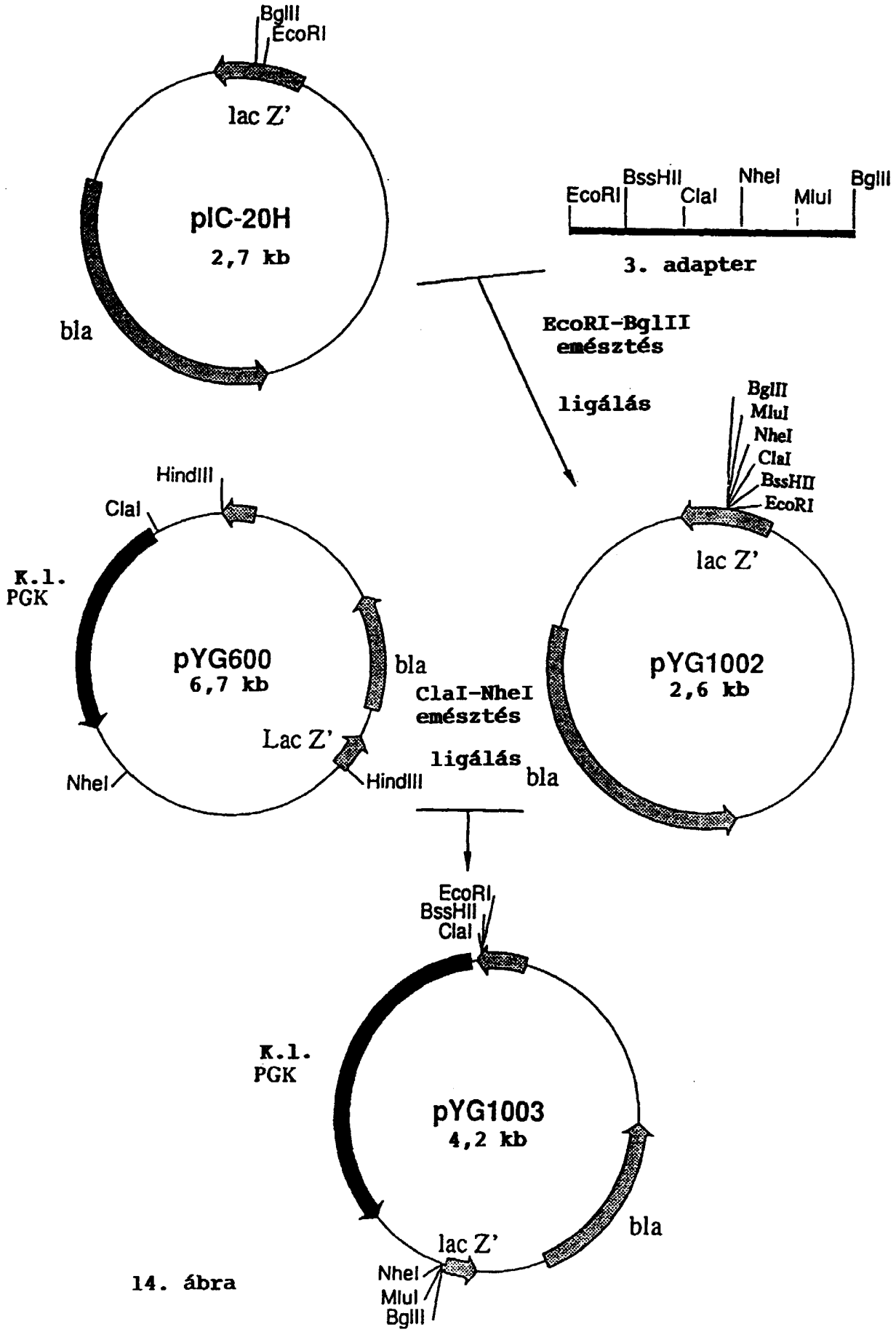
12. ábra



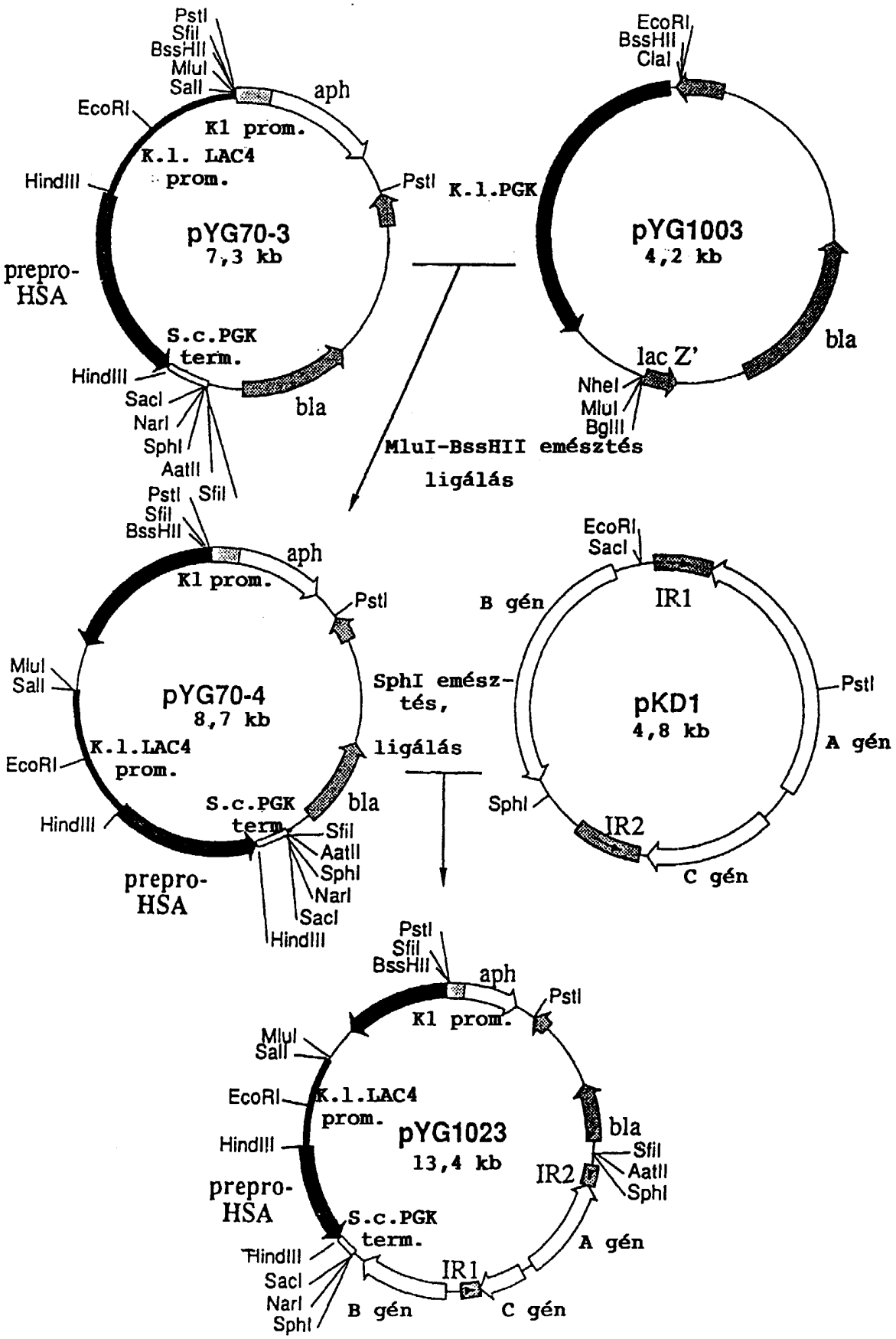
20. ábra


PstI
SfiI
BssHII
MluI
SalI
SacI
NarI
SphI
AatII
SfiI
K1 prom.
aph
bla
pYG70-2
3,8 kb
PstI
SalI
PstI
EcoRI
aph
K1
prom.
PstI
prepro-
HSA
K.l.
LAC4
prom.
HindIII
S.c.
PGK
term.
SacI
pYG404
11,7 kb
bla
IR1
EcoRI
B gén
IR2
A gén
PstI
C gén
SalI-SacI
emésztés
ligálás
PstI
SfiI
BssHII
MluI
SalI
aph
EcoRI
K1
prom.
K.l.
LAC4
prom.
HindIII
PstI
pYG70-3
7,3 kb
prepro-
HSA
S.c.
PGK
term.
HindIII
bla
SacI
NarI
SphI
AatII
SfiI

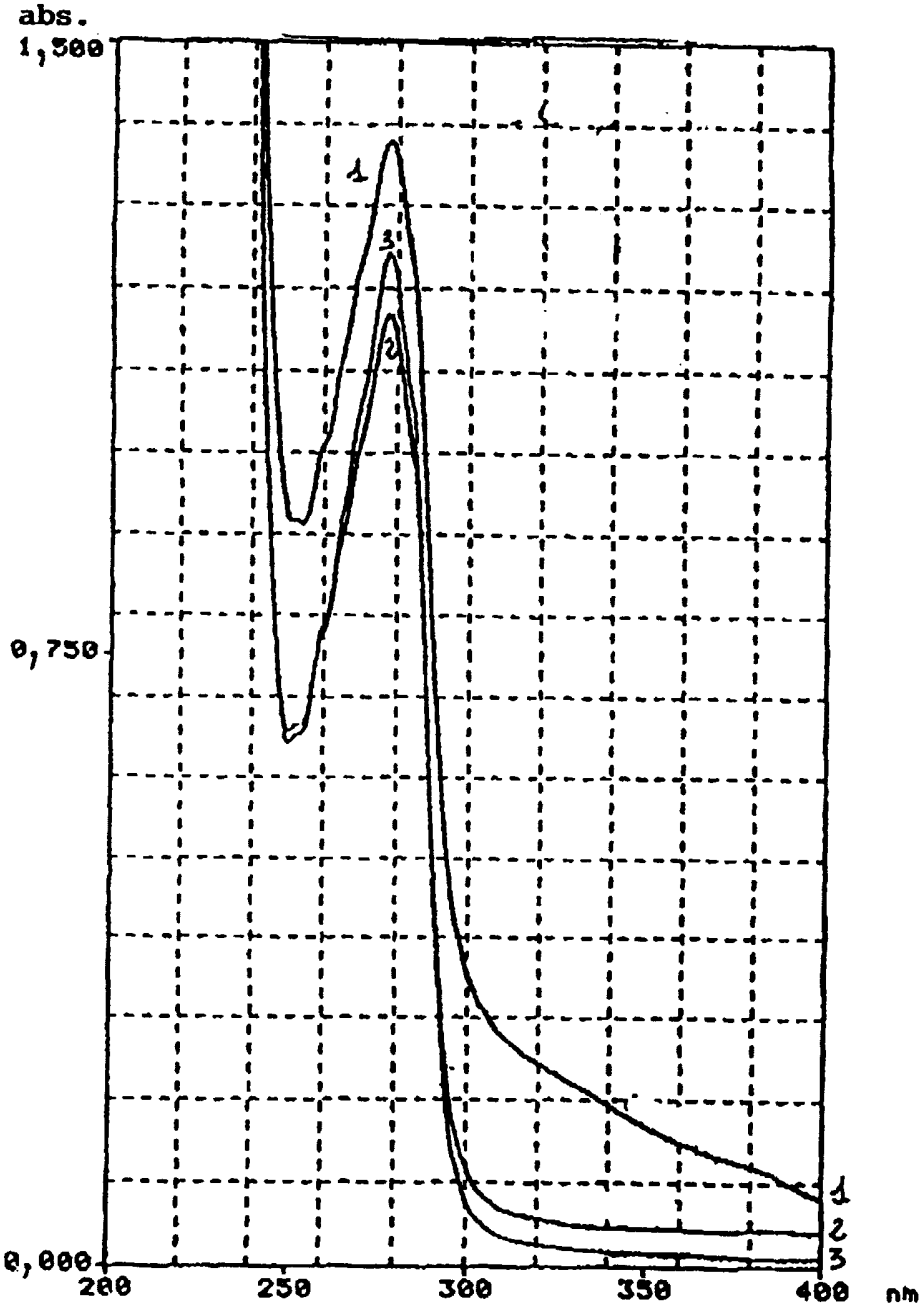
13. ábra


BglII
EcoRI
lac Z'
pIC-20H
2,7 kb
bla
EcoRI
BssHII
ClaI
NheI
MluI
BglII
3. adapter
EcoRI-BglII
emésztés
ligálás
BglII
MluI
NheI
ClaI
BssHII
EcoRI
lac Z'
pYG1002
2,6 kb
bla
HindIII
ClaI
K.l.
PGK
pYG600
6,7 kb
bla
Lac Z'
NheI
HindIII
ClaI-NheI
emésztés
ligálás
EcoRI
BssHII
ClaI
K.l.
PGK
pYG1003
4,2 kb
bla
lac Z'
NheI
MluI
BglII

14. ábra


PstI
SfiI
BssHII
MluI
SalI
aph
EcoRI
K1 prom.
K.l. LAC4
prom.
HindIII
PstI
pYG70-3
7,3 kb
prepro-
HSA
S.c.PGK
term.
HindIII
SacI
NarI
SphI
AatII
bla
EcoRI
BssHII
ClaI
K.l.PGK
pYG1003
4,2 kb
lac Z'
bla
NheI
MluI
BglII
MluI-BssHII emésztés
ligálás
PstI
SfiI
BssHII
aph
K1 prom.
PstI
MluI
SalI
pYG70-4
8,7 kb
K.l.LAC4
prom.
EcoRI
HindIII
S.c.PGK
term.
bla
SfiI
AatII
SphI
NarI
SacI
HindIII
prepro-
HSA
SphI emész-
tés,
ligálás
EcoRI
SacI
B gén
IR1
PstI
pKD1
4,8 kb
A gén
SphI
IR2
C gén
PstI
SfiI
BssHII
aph
K1 prom.
PstI
MluI
SalI
EcoRI
K.l.LAC4
prom.
pYG1023
13,4 kb
bla
SfiI
AatII
SphI
IR2
HindIII
prepro-
HSA
S.c.PGK
term.
A gén
HindIII
IR1
SacI
NarI
SphI
B gén
C gén

15. ábra

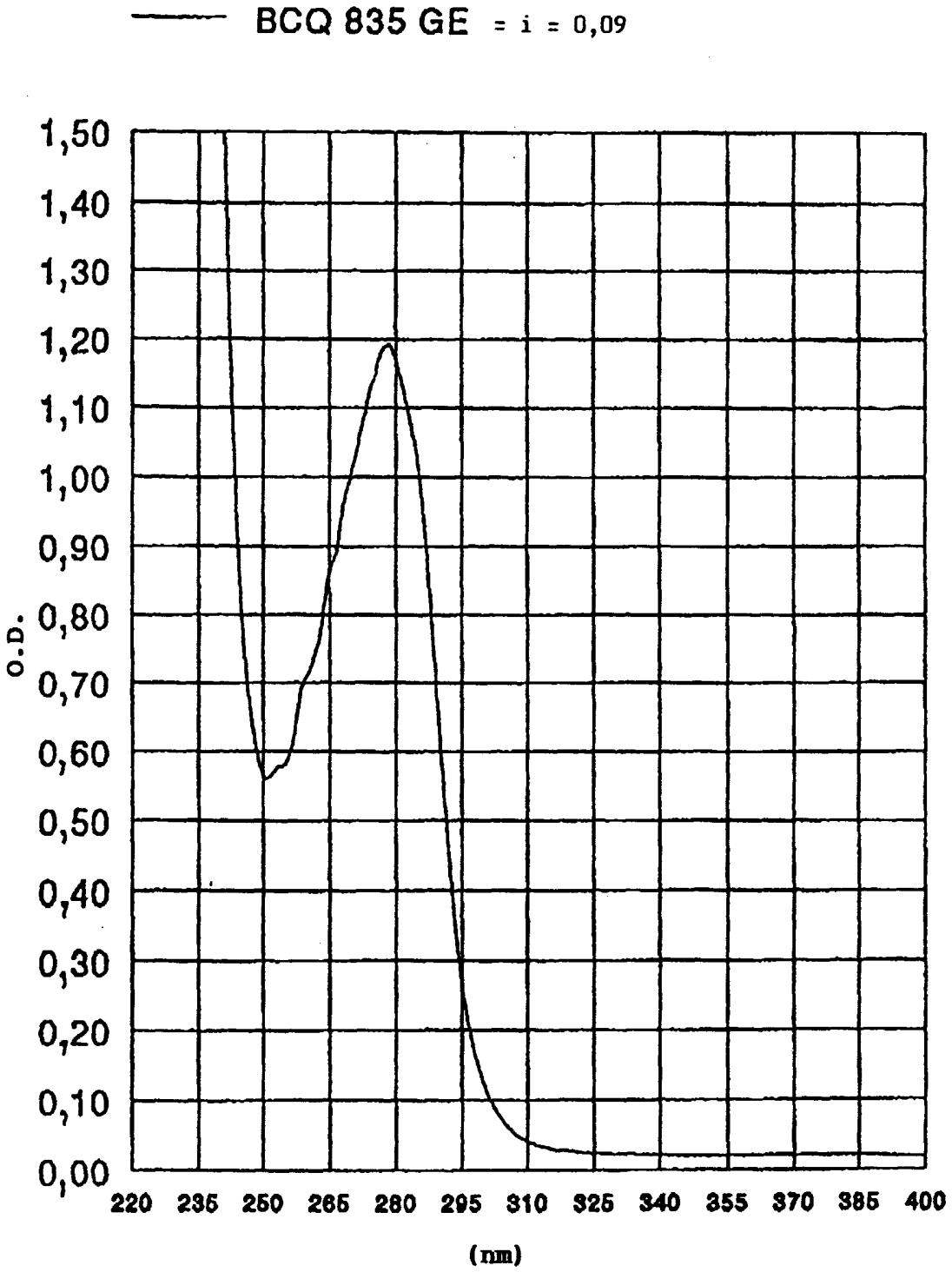


Az albuminok UV-
-spektruma

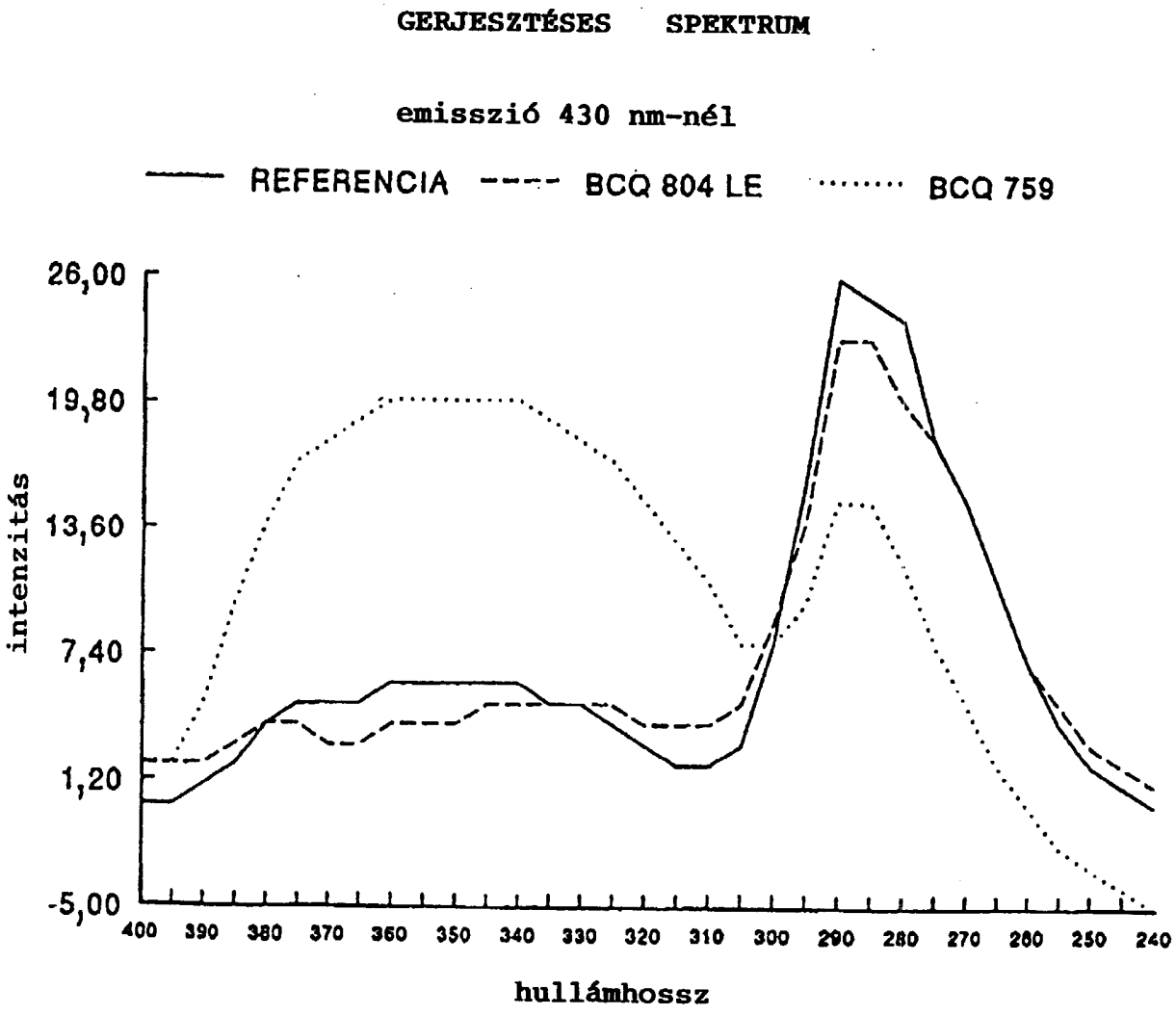
BCQ759(1) = i = 0,26
BCQ804LE(2) = i = 0,11
Kontroll (13) = i = 0,07

16. ábra

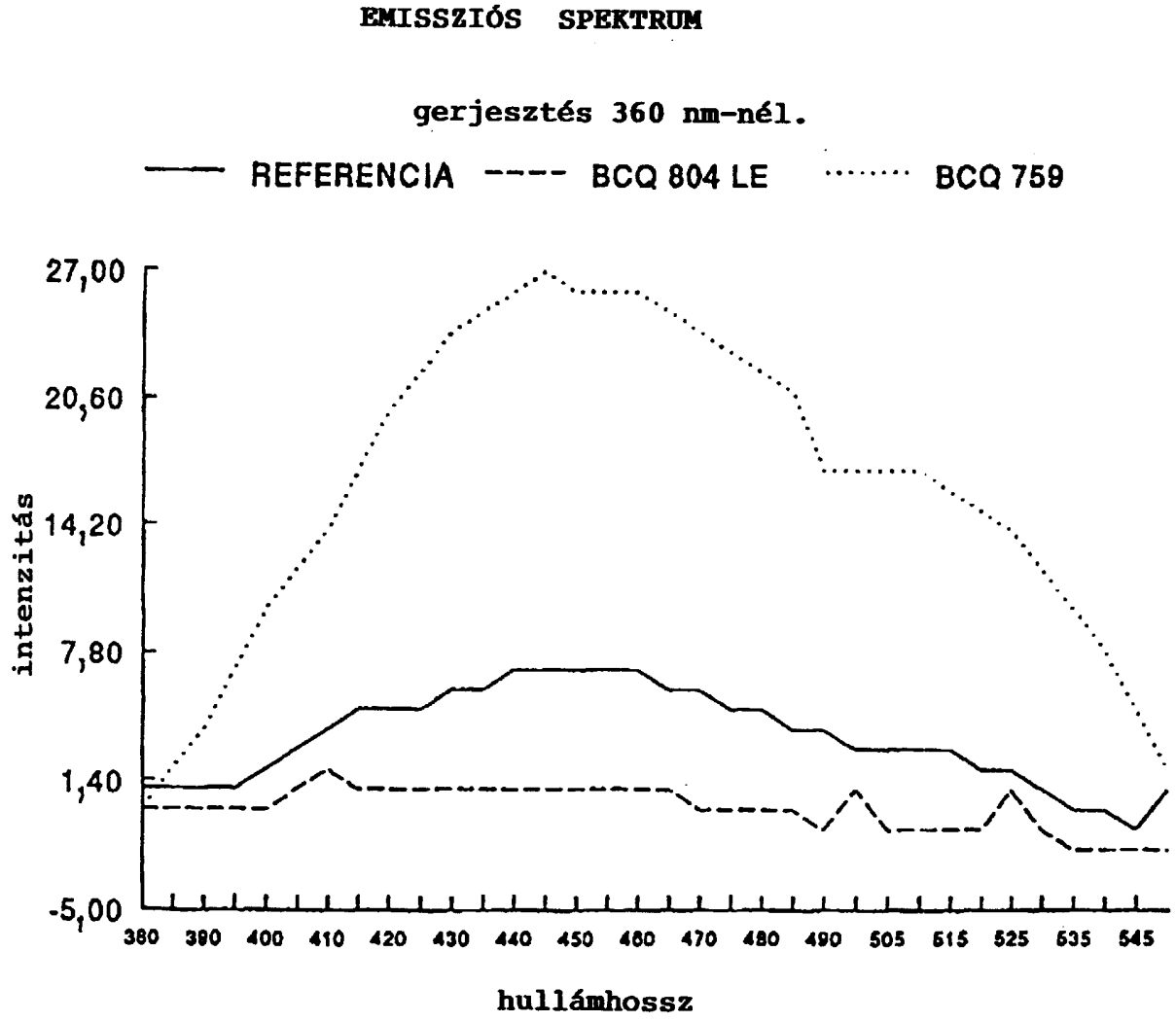
UV - SPEKTRUM



17. ábra


GERJESZTÉSES SPEKTRUM
emisszió 430 nm-nél
REFERENCIA
BCQ 804 LE
BCQ 759
26,00
19,80
13,60
7,40
1,20
-5,00
intenzitás
400 390 380 370 360 350 340 330 320 310 300 290 280 270 260 250 240
hullámhossz

18. ábra


EMISSZIÓS SPEKTRUM
gerjesztés 360 nm-nél.
REFERENCIA
BCQ 804 LE
BCQ 759
27,00
20,60
14,20
7,80
1,40
-5,00
intenzitás
380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 505 515 525 535 545
hullámhossz

19. ábra