



Τίτλος →

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΛΑΚΤΟΦΕΡΡΙΝΗΣ

Τεχνικό Πεδίο
στο οποίο
αναφέρεται η
Εφεύρεση →

Στάθμη
Προηγούμενης
Τεχνικής και
Αξιολόγησης
αυτής →

ΥΠΟΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

5 Πεδίο της εφεύρεσης
Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται γενικά στο πεδίο των γλυκοπρωτεϊνών σύνδεσης σιδήρου. Ειδικότερα, η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται στην ανασυνδυαστική παραγωγή ανθρώπινης λακτοφερρίνης.

10 Περιγραφή της σχετικής τεχνολογίας του κλάδου
Η ανθρώπινη λακτοφερρίνη (LF) είναι ένα μέλος της οικογένειας τρανσφερρινών των μονομερών γλυκοπρωτεϊνών σύνδεσης σιδήρου. Ανακαλύφθηκε αρχικά στο γάλα όπου μπορεί να φθάσει στα επίπεδα των 7 γραμμαρίων/λίτρο στο πρωτόγαλα. LF έχει από τότε ανιχνευθεί σε άλλα εξωτερικά υγρά όπως δάκρυα, σάλιο, και βλεννογόνες εκκρίσεις και επίσης
15 στα δευτερογενή κοκκία των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων.

Η LF είναι μία 78 KDa γλυκοπρωτεΐνη που έχει μία διλοβική δομή με ένα υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ C και N τερματικών ημίσεων που είναι φανερή σε τόσο το επίπεδο των αμινοξέων όσο και αυτό της τρισδιάστατης δομής. Καθένας από τους λοβούς αυτούς μπορεί να δεσμεύσει
20 αντιστρεπτά ένα τρισθενή σίδηρο με υψηλή συγγένεια και με την συνακόλουθη σύνδεση διπτανθρακικού. Στις βιολογικές λειτουργίες που προτείνονται για την λακτοφερρίνη περιλαμβάνονται η προστασία έναντι μικροβιακής μόλυνσης, η ενισχυμένη εντερική απορρόφηση σιδήρου στα νήπια, η προαγωγή της κυτταρικής ανάπτυξης, η ρύθμιση της
25 μιελοποίησης και η διαμόρφωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Νηματοειδείς μύκητες έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί ως ξενιστές στην βιομηχανική παραγωγή εξωκυτταρικών γλυκοπρωτεϊνών. Ορισμένα βιομηχανικά στελέχη είναι σε θέση να εκκρίνουν ποσότητες γραμμαρίων αυτών των πρωτεϊνών. Επιπλέον, νηματοειδείς μύκητες είναι σε θέση να
30 πραγματοποιούν σωστά μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ευκαρυωτικών πρωτεϊνών και πολλά στελέχη έχουν εγκριθεί από την U.S. επιτροπή τροφίμων και φαρμάκων. Περαιτέρω, είναι διαθέσιμη τεχνολογία ζυμώσεων μεγάλης κλίμακας και εμπειρία στην επεξεργασία του εξερχόμενου προϊόντος.

35 Την στιγμή αυτή, δεν υπάρχει κανένας αποδοτικός και οικονομικός τρόπος παραγωγής ανθρώπινης LF. Κατά συνέπεια, μία από παλαιά αισθητή ανάγκη και περιγραφή σε αυτή την τεχνολογία του κλάδου θα καλυπτόταν με την ανάπτυξη μίας αποτελεσματικής μεθόδου για την παραγωγή ανθρώπινης λακτοφερρίνης για θρεπτικές και θεραπευτικές
40 εφαρμογές και για περαιτέρω έρευνα του μηχανισμού της δράσης της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

45 Σε μία ενσωμάτωση, η παρούσα εφεύρεση παρέχει ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο που περιλαμβάνει το cDNA ανθρώπινης λακτοφερρίνης. Το πλασμίδιο της παρούσας εφεύρεσης είναι προσαρμοσμένο για έκφραση σε ένα μυκητικό κύτταρο *Aspergillus* και περιέχει τα ρυθμιστικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για την έκφραση του cDNA ανθρώπινης λακτοφερρίνης στο κύτταρο αυτό.

Πλεονεκτήματα
της Εφεύρεσης →



Σε μία άλλη ενσωμάτωση, η παρούσα εφεύρεση παρέχει ένα μεταμορφωμένο μυκητικό κύτταρο *Aspergillus* που περιλαμβάνει ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο.

5 Το πλασμίδιο περιέχει ένα πλασμιδικό ενδιάμεσο ξενιστή μέσα στον οποίο έχει εισαχθεί ένα πολυδεοξυριβονουκλεοτιδικό κομμάτι που κωδικοποιεί για ανθρώπινη πρωτεΐνη λακτοφερρίνη.

Σε μία άλλη ακόμη ενσωμάτωση της παρούσας εφεύρεσης, παρέχεται μία διαδικασία για την παραγωγή ανασυνδυαστικής ανθρώπινης λακτοφερρίνης η οποία περιλαμβάνει καλλιέργεια ενός μεταμορφωμένου 10 μυκητικού κυττάρου *Aspergillus*, που περιλαμβάνει ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο. Το πλασμίδιο περιέχει ένα πλασμιδικό ενδιάμεσο ξενιστή που έχει πολυδεοξυριβονουκλεοτίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ανθρώπινη λακτοφερρίνη. Μετά την καλλιέργεια σε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρι του σχηματισμού της ανθρώπινης πρωτεΐνης 15 λακτοφερρίνης, απομονώνεται η ανθρώπινη πρωτεΐνη λακτοφερρίνη.

Σε μία ακόμη περαιτέρω ενσωμάτωση της παρούσας εφεύρεσης, παρέχεται ένας ανασυνδυαστικός ενδιάμεσος ξενιστής έκφρασης. Αυτός ο ενδιάμεσος ξενιστής περιλαμβάνει μία μεταγραφική μονάδα που 20 περιλαμβάνει μία συναρμολόγηση από (1) ένα γενετικό στοιχείο ή στοιχεία που έχει ένα ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση· (2) cDNA που κωδικοποιεί για ανθρώπινη λακτοφερρίνη· (3) κατάλληλες αλληλουχίες έναρξης και τερματισμού μεταγραφής και μετάφρασης· και (4) ένα γενετικό στοιχείο για επιλογή σπορίων *Aspergillus* που έχουν μεταμορφωθεί με τον ενδιάμεσο ξενιστή.

Σε μία άλλη ακόμη ενσωμάτωση της παρούσας εφεύρεσης, παρέχεται μία μέθοδος για την παραγωγή βιολογικά ενεργού ανασυνδυαστικής λακτοφερρίνης που περιλαμβάνει καλλιέργεια 25 μεταμορφωμένων μυκητικών κυττάρων *Aspergillus oryzae* που περιέχουν ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο, όπου το αναφερόμενο πλασμίδιο περιλαμβάνει ένα πλασμιδικό ενδιάμεσο ξενιστή που περιέχει cDNA της 30 ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 1, ένα γονίδιο επιλέξιμου δείκτη, ένα προαγωγό, αλληλουχίες τερματισμού μεταγραφής, και αλληλουχίες συνδέτη, όπου τα αναφερόμενα μεταμορφωμένα μυκητικά κύτταρα *Aspergillus oryzae* καλλιεργούνται σε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρις ότου να σχηματισθεί η πρωτεΐνη λακτοφερρίνη, και όπου η λακτοφερρίνη εκκρίνεται 35 μέσα στο θρεπτικό μέσο και απομονώνεται από αυτό.

Τέλος, η εφεύρεση αναφέρεται σε πρωτεΐνη λακτοφερρίνη που παράγεται με την μέθοδο της εφεύρεσης.

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΣΧΕΔΙΩΝ

40 Περισσότερο συγκεκριμένες περιγραφές της εφεύρεσης που με συντομία συνοψίζονται παραπάνω, μπορούν να παρέχονται με αναφορά σε ορισμένες ενσωματώσεις της που επεξηγούνται στα επισυναπτόμενα σχέδια, κατά τρόπο που τα παραπάνω αναφερόμενα χαρακτηριστικά, πλεονεκτήματα, και αντικείμενα της εφεύρεσης, όπως επίσης και άλλα που 45 θα καταστούν φανερά, να λαμβάνονται και να μπορούν να κατανοηθούν με λεπτομέρειες. Τα σχέδια αυτά αποτελούν μέρος αυτής της ειδικής περιγραφής. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι τα επισυναπτόμενα σχέδια επεξηγούν προτιμώμενες ενσωματώσεις της εφεύρεσης και δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως εκ τούτου περιοριστικά του πεδίου της. Η εφεύρεση



μπορεί να εισαχθεί σε άλλες εξίσου αποτελεσματικές ισοδύναμες ενσωματώσεις.

Η ΕΙΚ.1 απεικονίζει μία σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου έκφρασης *Aspergillus oryzae*, pAhLFG.

5 Η ΕΙΚ.2 δείχνει μία ανάλυση κηλίδας Southern των μεταμορφωμένων στελεχών *Aspergillus oryzae*.

Η ΕΙΚ.3 απεικονίζει μία RNA ανάλυση του προϊόντος μεταμόρφωσης έναντι ελέγχου A07.

10 Η ΕΙΚ.4 δείχνει την ανάλυση χρωματισμένης με άργυρο πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου έκκρισης και καθαρισμού ανασυνδυαστικής LF.

Η ΕΙΚ.5 απεικονίζει τον χαρακτηρισμό της ανασυνδυαστικής ανθρώπινης LF.

Η ΕΙΚ.6 απεικονίζει το cDNA και την συναγόμενη αλληλουχία αμινοξέων για ανθρώπινη λακτοφερρίνη.

15 ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΑΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

ΟΡΙΣΜΟΙ

Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «οικογένεια τρानσφερρίνης» σημαίνει μία οικογένεια πρωτεϊνών μεταφοράς σιδήρου που περιλαμβάνει τρानсφερρίνη ορού, ωοτρानсφερρίνη και λακτοφερρίνη.

20 Οι πρωτεΐνες αυτές είναι όλες δομικά σχετικές μεταξύ τους.

Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «ενδιάμεσος ξενιστής (έξς)» σημαίνει πλασμιδικό φορέα που επιτρέπει εισαγωγή, εξάπλωση και έκφραση του cDNA της λακτοφερρίνης.

25 Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «ξενιστής (έξς)» σημαίνει οποιοδήποτε ευκαρυωτικό κύτταρο που θα επιτρέψει την ενσωμάτωση του πλασμιδίου έκφρασης λακτοφερρίνης μέσα στο γένωμα του.

30 Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «προαγωγός (οί)» σημαίνει ρυθμιστικές DNA αλληλουχίες που ελέγχουν την μεταγραφή του cDNA της λακτοφερρίνης.

Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «κασέτα πολλαπλής κλωνοποίησης» σημαίνει ένα DNA κομμάτι που περιέχει θέσεις διάσπασης ενζύμων περιορισμού για μία ποικιλία από ένζυμα που επιτρέπουν την εισαγωγή μίας ποικιλίας από cDNAs.

35 Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «μεταμόρφωση» σημαίνει πρόσληψη του πλασμιδίου από ένα κατάλληλο ευκαρυωτικό κύτταρο.

40 Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «ικανότητα σύνδεσης σιδήρου» σημαίνει ικανότητα σύνδεσης με ⁵⁹Fe. Πλήρως λειτουργική λακτοφερρίνη μπορεί να δεσμεύσει δύο άτομα σιδήρου ανά μόριο LF.

45 Γιά τους σκοπούς της παρούσας εφαρμογής, ο όρος «βιολογική ενεργότητα / βιολογικά ενεργή» σημαίνει μία βιολογικά ενεργότητα λακτοφερρίνης όπως μετρείται από την ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο. Η πρωτεΐνη λακτοφερρίνη λειτουργεί ως μία πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου και πρέπει να δεσμεύει σίδηρο για να είναι βιολογικά ενεργή.

Όλες οι αναφορές της βιβλιογραφίας που παρατίθενται στην ειδική αυτή περιγραφή ενσωματώνονται εδώ μέσα σαφώς με παραπομπή.

Αποκάλυψη
της Εφεύρεσης





Τα επόμενα παραδείγματα δίδονται για λόγους επεξήγησης των διαφόρων ενσωματώσεων της παρούσας εφεύρεσης και δεν νοούνται ως περιορισμοί της παρούσας εφεύρεσης κατά κανένα τρόπο.

Παράδειγμα 1

5 Μυκητικά στελέχη και μεταμόρφωση

Το *rygG* μεταλλακτικό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές προερχόταν από *Aspergillus oryzae* (A07 11488). Το *rygG* γονίδιο από *Aspergillus oryzae* μεταλλάχθηκε με 4-νιτροκινολινο-1-οξειδίο. Η μεταμόρφωση *Aspergillus* πραγματοποιήθηκε με μία τροποποίηση της διαδικασίας Osmani et al., *J. Cell. Biol.* 104:1495-1504 (1987). Κονίδια (1X10⁶/ml) ενοφθαλμίστηκαν μέσα σε 50 ml μέσου YG (0.5% εκχύλισμα ζυμομυκήτων 2% γλυκόζη) που περιέχει 5 mM ουρακίλη και 10 mM ουριδίνη. Η ανάπτυξη έγινε σε 32°C για 14-16 ώρες μέχρις ότου να γίνει ορατός ένας βλαστικός σωληνίσκος. Τα βλαστήσαντα κονίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση και αιωρήθηκαν και πάλι σε 40 ml λυτικού μίγματος που περιέχει 0.4M θειικό αμμώνιο, 50 mM κιτρικό κάλιο (pH 6.0), 0.5% εκχύλισμα ζυμομυκήτων, 0.12 g Novozyme, 0.1 g Driselase, 100 μl β-γλυκουρονιδάση, 0.5% σακχαρόζη και 10 mM MgSO₄. Σχηματισμός πρωτοπλαστών έγινε σε 32°C και 150 σαλ για 2-3 ώρες. Μετά τον σχηματισμό πρωτοπλαστών, ήταν απαραίτητη διήθηση με την χρησιμοποίηση αποστειρωμένου κατάλληλου πανιού για απομάκρυνση των όποιων μυκηλίων που δεν είχαν χωνευθεί. Οι πρωτοπλάστες συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση και πλύθηκαν δύο φορές με 10 ml 0.4 M θειικού αμμωνίου, 1% σακχαρόζη και 50 mM κιτρικό κάλιο (pH 6.0) σε 4°C, αιωρήθηκαν και πάλι σε 1 ml 0.6M KCl- 50 mM CaCl₂- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) και τέθηκαν σε πάγο. Η μεταμόρφωση πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την παρασκευή των πρωτοπλαστών. Υποπολλαπλάσια κλάσματα (100 μl) πρωτοπλαστών προστέθηκαν σε 3 μg DNA και 50 μl 40% πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) 6000, 50 mM CaCl₂, 0.6 M KCl και 10 mM Tris-HCl, (pH 7.5). Τα δείγματα επώαστηκαν σε πάγο για δεκαπέντε λεπτά μετά από που προστέθηκε ένα ακόμη ml διαλύματος PEG και συνεχίστηκε η επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τριάντα λεπτά. Υποπολλαπλάσια κλάσματα του μίγματος αυτού απλώθηκαν σε 3 ml 0.7% ελάχιστων μέσων, που συμπληρώθηκαν με 0.4% θειικό αμμώνιο πάνω σε δίσκους που περιέχουν τα αυτά αλλά ακινητοποιημένα με 2% άγαρ. Όλη η μεταγενέστερη ανάπτυξη έγινε σε 32°C.

Παράδειγμα 2

Πλασμιδική δόμηση

Μια σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου έκφρασης δείχνεται στην εικ.1. Το πλήρες cDNA που κωδικοποιεί την ανθρώπινη LF επισκευάστηκε με την χρησιμοποίηση του κομματιού Klenow της DNA πολυμεράσης I και υποκλωνοποιήθηκε σε χωνεμένο με *AccI* και επισκευασμένο pGEM4 προς παραγωγή του pGEMhLFc. Με σκοπό την απομάκρυνση της LF αλληλουχίας σήματος και την παραγωγή ενός 5' άκρου σε πλαίσιο με τις αλληλουχίες α-αμιλάσης, λήφθηκε ένα 252 ζευγών βάσεων κομμάτι λακτοφερρίνης (nt 69-321) που περιέχει *HindIII/AccI* άκρα με ενίσχυση με αντίδραση αλυσιδίας πολυμεράσης (PCR) του pGEMhLFc πλασμιδικού DNA. Οι oligo ενάρκτες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν όπως ακολουθεί: το 5' άκρου ολιγονουκλεοτίδιο



όπως δείχνεται στην ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.3:(CTGGGTGACGTAGGAGAA GGAGTGTTCAGTGGTGC) και το 3' άκρου ολιγονουκλεοτίδιο όπως δείχνεται στην ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.4: (GCCGTAGACTTCCGCCGCTACAGG).

5 Το κομμάτι αυτό χωνεύτηκε με HindII και AclI και υποκλωνοποιήθηκε μέσα στο HindII/AclI χωνεμένο pGEMhLFC δημιουργώντας το pGEMhLF. Ένα 681 ζευγών βάσεων κομμάτι α-αμυλάσης με Asp718/PvuII άκρα που κωδικοποιεί τον προαγωγό, την αλληλουχία σήματος και το υπόλειμμα αλανίνης από την αρχή του ώριμου γονιδίου II α-αμυλάσης, λήφθηκε με PCR ενίσχυση του *Aspergillus oryzae* 10 γονιδιωματικού DNA. Οι oligo ενάρκτες είχαν όπως ακολουθεί το 5' ολιγονουκλεοτίδιο όπως δείχνεται στην ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.5: (GAGGTACCGAATTCATGGTGTTTTGATCATTTTAAATTTTATAT) και το 3' άκρου ολιγονουκλεοτίδιο όπως δείχνεται στην ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.6: (AGCAGCTGCAGCCAAAGCAGGTGCCGCGACCTGAAGGCCGTACAG)

15 Το ενισχυμένο DNA χωνεύτηκε με Asp718 και PvuII και υποκλωνοποιήθηκε μέσα σε Asp718/HindII χωνεμένο pGEMhLF. Το προκύψαν πλασμίδιο (pGEMhLF) χωνεύτηκε με EcoRI και το προκύψαν 2.8 χβ κομμάτι α-αμυλάσης – λακτοφερρίνης υποκλωνοποιήθηκε μέσα σε μία μοναδική EcoRI θέση σε pAL3 δημιουργώντας το pAhLF*. Συνθετικό 20 ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιήθηκε για να παρασχεθούν τα τελευταία πέντε καρβοξυ τερματικά κωδικόνια λακτοφερρίνης (ντ 2138-2153) που λείπουν από pAhLF* και επίσης για να παρέξει τα πρώτα 180 ζβ των αμετάφραστων αλληλουχιών από *A. niger* γονίδιο γλυκοαμυλάσης. Το προκύψαν πλασμίδιο (pAhLFG) χρησιμοποιήθηκε για να μεταμορφώσει το 25 *pyrG* μεταλλακτικό στέλεχος *Aspergillus oryzae*.

Αναφερόμενοι στην ΕΙΚΟΝΑ 1, πλασμίδιο έκφρασης *Aspergillus oryzae*, pAhLFG περιέχει 681 ζβ της 5'-πλευρίζουσας αλληλουχίας του *Aspergillus oryzae* AMY11 γονιδίου που περιλαμβάνει την αλληλουχία 30 σήματος και το πρώτο κωδικόνιο της ώριμης α-αμυλάσης. Το cDNA που κωδικοποιεί για ώριμη ανθρώπινη λακτοφερρίνη υποκλωνοποιήθηκε εντός πλαισίου προς τα κάτω αυτών των αλληλουχιών επιτρέποντας την παραγωγή ανασυνδυαστικής πρωτεΐνης με την προσθήκη αμύλου μέσα στο μέσο ανάπτυξης. Η 3' αμετάφραστη περιοχή γλυκοαμυλάσης *Aspergillus niger* παρέχει τα σήματα για τον τερματιστή μεταγραφής και 35 πολυαδενυλίωσης. Το πλασμίδιο περιέχει επίσης τον *Neurospora crassa pyr4* επιλέξιμο δείκτη και ένα γονίδιο αντίστασης σε αμπικιλίνη.

Η πλασμιδική δόμηση (pAhLFG) που χρησιμοποιείται για την έκφραση ανθρώπινης LF περιέχει ένα 681 ζβ κομμάτι που κωδικοποιεί τον προαγωγό και το πεπτιδίο εκκριτικού σήματος του γονιδίου II α-αμυλάσης 40 *Aspergillus oryzae* (AMY11). Η αλληλουχία σήματος περιέχει επίσης το κωδικόνιο για αλανίνη από την αρχή της ώριμης πρωτεΐνης α-αμυλάσης δημιουργώντας την θέση διάσπασης αλληλουχίας σήματος (Leu Ala Ala) που μπορεί να αναγνωρισθεί από μία ενδογενή πεπτιδάση α-αμυλάσης. Ένα cDNA κομμάτι ανθρώπινης λακτοφερρίνης που κωδικοποιεί την 45 ώριμη πρωτεΐνη υποκλωνοποιήθηκε εντός πλαισίου αμέσως προς τα μετά των AMYII αλληλουχιών, που το τοποθετούν υπό τον έλεγχο αυτού του σε υψηλό βαθμό αποτελεσματικού επαγωγίμου με άμυλο προαγωγού. Με σκοπό την σταθεροποίηση του μεταγραφμένου ανθρώπινου LF mRNA, ένα 180 ζβ κομμάτι που κωδικοποιεί την 3' αμετάφραστη περιοχή του



γονιδίου γλυκοαμυλάσης από *Aspergillus niger* προσδέθηκε στην μοναδική BamHI θέση μέσα στην κασέτα πολλαπλής κλωνοποίησης, αμέσως προς τα κάτω του ανθρώπινου LF cDNA παρέχοντας τα σήματα 5 τερματιστή μεταγραφής και πολυαδενυλίωσης. Το πλασμίδιο περιέχει επίσης τον *Neurospora crassa* *pyr4* επιλέξιμο δείκτη που συμπληρώνει μία *pyrG* αυξοτροφική μετάλλαξη *Aspergillus oryzae* και επιτρέπει για επιλογή σπορίων που έχουν μεταμορφωθεί με το πλασμίδιο με ανάπτυξη σε απουσία ουριδίνης.

Παράδειγμα 3

Χειρισμός γονιδιωματικού DNA

Aspergillus oryzae DNA απομονώθηκε από 200 mg λυοφιλισμένων 10 μυκηλίων όπως περιγράφεται από Rafmussen et al., *J. Biol. Chem.*, 265:13767-13775 (1990). Το DNA αυτό χωνεύτηκε με EcoRI, κλασματοποιήθηκε κατά μέγεθος σε μία 0.8% πηκτή αγαρόζης και 15 μεταφέρθηκε σε νιτροκυτταρίνη. Προύβριδισμός και υβριδισμός του φίλτρου νιτροκυτταρίνης για ανάλυση Southern πραγματοποιήθηκε σε 6XSSC, 0.1% SDS και 0.5% γάλα σε σκόνη σε 65°C για 16 ώρες. Το διάλυμα υβριδισμού περιείχε 1×10^7 cpm ^{32}P -σημασμένου ανιχνευτή cDNA 20 λακτοφερρίνης (2.1 χβ). Το φίλτρο πλύθηκε σε 2X SSC, 0.5% SDS σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά που ακολουθήθηκαν από δύο πλύσεις σε 0.5X SSC, 0.5% SDS σε 68°C για 30 λεπτά. Το φίλτρο ξηράνθηκε, εκτέθηκε σε -70°C για δύο ώρες και εμφανίστηκε με αυτοακτινογραφία.

Αναφερόμενοι στην ΕΙΚΟΝΑ 2, ανάλυση κηλίδας Southern 25 πραγματοποιήθηκε σε μεταμορφωμένα στελέχη *Aspergillus oryzae*. Γονιδιωματικό DNA από ατομικά προϊόντα μεταμόρφωσης και έλεγχος A07 υβριδίστηκαν με ένα ραδιοσημασμένο hLF cDNA ανιχνευτή (2.1 χβ). Το βέλος δείχνει ένα ραδιοσημασμένο κομμάτι (2.8 χβ) που δημιουργήθηκε από την EcoRI πέψη αυτού του πλασμιδίου έκφρασης που 30 υπάρχει σε όλα τα προϊόντα μεταμόρφωσης (#1-9) αλλά απουσιάζει σε χωρίς μεταμόρφωση A07 έλεγχο σύγκρισης. Τα μοριακά βάρη των HindIII κομματιών βακτηριοφάγου λάμβδα υποδεικνύονται στα αριστερά.

Παράδειγμα 4

Ανάλυση Northern

RNA απομονώθηκε από λυοφιλισμένα μυκηλία (200 mg) με την 35 χρησιμοποίηση εμπορικά διαθέσιμης Rnazol B (Biotecx Laboratories, INC, Houston, TX) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Ολικό RNA (20 μg) ηλεκτροφορήθηκε σε μία 0.8% πηκτή αγαρόζης που περιέχει 2.2 M φορμαλδεύδη. Το RNA μεταφέρθηκε σε νιτροκυτταρίνη και υβριδίστηκε 40 με είτε ένα 2.1 χβ cDNA λακτοφερρίνης ή ένα 1.8 χβ γονιδιωματικό κομμάτι α-αμυλάσης που αντιστοιχεί στην κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου II α-αμυλάσης. Οι ανιχνευτές ήταν ^{32}P -σημασμένοι με μετάφραση εντομής (ειδική ενεργότητα 2×10^8 cpm/μg). Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε σε 2X SSC, 0.05% γάλα σε σκόνη σε 65°C για όλη τη νύχτα με 2×10^8 cpm 45 ανιχνευτή/ml.

Οι πλύσεις ήταν ταυτόσημες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στην Southern ανάλυση. Τα φίλτρα στέγνωσαν, εκτέθηκαν σε -70°C για δύο ώρες και εμφανίστηκαν με αυτοακτινογραφία. Στυπώματα κηλίδων RNA πραγματοποιήθηκαν με την χρησιμοποίηση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης



και του συστήματος πολλαπλού στυπώματος κηλίδων. Υβριδισμός και συνθήκες πλύσης είχαν όπως περιγράφηκε παραπάνω για την ανάλυση Southern. Η ραδιενέργεια προσδιορίστηκε ποσοτικά με την χρησιμοποίηση ενός Betagon αναλυτή κηλίδων.

5 Με αναφορά στην ΕΙΚΟΝΑ 3, πραγματοποιήθηκε RNA ανάλυση προϊόντος μεταμόρφωσης έναντι συγκριτικού ελέγχου AO7. Στον πίνακα A, ανάλυση Northern RNA (20 μ g) από συγκριτικό έλεγχο AO7 και προϊόν μεταμόρφωσης #1, υβριδίστηκε με ραδιοσημασμένο ανθρώπινο LF cDNA. Ανθρώπινο LF mRNA (2.3 χ β) ανιχνεύθηκε στο προϊόν
10 μεταμόρφωσης #1 αλλά όχι στον μη μεταμορφωμένο συγκριτικό έλεγχο AO7. Οι θέσεις των 28S και 18S rRNA ζωνών υποδεικνύονται στα αριστερά. Στον πίνακα B, στυπώματα κηλίδων του RNA (5 και 10 μ g) από συγκριτικό έλεγχο έναντι προϊόντος μεταμόρφωσης #1 με την
15 χρησιμοποίηση ενός ραδιοσημασμένου γονιδωματικού DNA ανιχνευτή α-αμυλάσης. Στον πίνακα C, στυπώματα κηλίδων του RNA (5 και 10 μ g) από συγκριτικό έλεγχο AO7 και προϊόν μεταμόρφωσης #1 χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένο ανθρώπινο LF cDNA ανιχνευτή όπως επεξηγείται.

Ανάλυση Northern πραγματοποιήθηκε για να προσδιορισθεί αν
20 mRNA λακτοφερρίνης μεταγράφηκε σωστά και αποτελεσματικά σε *Aspergillus oryzae* υπό τα ρυθμιστικά στοιχεία ελέγχου του πλασμιδίου μας έκφρασης. Σπόρια (1×10^6 /ml) από προϊόν μεταμόρφωσης #1 και μη μεταμορφωμένα σπόρια από συγκριτικό έλεγχο ενοφθαλμίστηκαν μέσα σε μυκητικό μέσο που περιέχει 1.5% γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και
25 αναπτύχθηκαν σε 30°C για 48 ώρες σε καλλιέργειες μικρών φιαλών ανακίνησης. Οι καλλιέργειες πλύθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν και πάλι μέσα σε μυκητικό μέσο που περιέχει 3% άμυλο προς επαγωγή της μεταγραφής του ανθρώπινου LF mRNA. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και απομονώθηκε το RNA. Ολικό RNA (20 μ g) κλασματοποιήθηκε κατά
30 μέγεθος σε μία 1.0% πηκτική αγαρόζης που περιέχει 2.2 M φορμαλδεΐδη και στυπώθηκε σε νιτροκυτταρίνη.

Ανθρώπινο mRNA λακτοφερρίνης ανιχνεύθηκε με την χρησιμοποίηση 32 P σημασμένου ανθρώπινου LF cDNA (2.0 χ β) ανιχνευτή. Υβριδισμός με ανθρώπινο LF ραδιοσημασμένο cDNA ανιχνευτή ανίχνευσε μία ειδική
35 ραδιοσημασμένη ζώνη στο σωστό μέγεθος για mRNA λακτοφερρίνης (2.3 χ β) στο προϊόν της μεταμόρφωσης αλλά όχι στο μη μεταμορφωμένο στέλεχος συγκριτικού ελέγχου (Εικ.3Α). Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA επιπέδων με δοκιμασία κηλίδων έδειξε συγκρίσιμα επίπεδα έκφρασης mRNA ενδογενούς α-αμυλάσης μεταξύ συγκριτικού ελέγχου
40 AO7 και προϊόντος μεταμόρφωσης #1 (Εικ.3B). Επιπλέον, παρόμοια επίπεδα έκφρασης α-αμυλάσης και ανθρώπινου LF mRNA παρατηρήθηκαν στο προϊόν μεταμόρφωσης #1 (Εικ.3B και 3C).

Παράδειγμα 5

Καθαρισμός ανασυνδυαστικής ανθρώπινης LF

45 LF καθαρίστηκε από το μέσο ανάπτυξης με την χρησιμοποίησης CM Sephadex C50 ουσιαστικώς όπως περιγράφεται από Stowell, et al., *Biochem J.*, 276:349-59 (1991). Η στήλη προεξισορροπήθηκε με 500 ml 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5/1M NaCl. Το pH του μέσου καλλιέργειας προσαρμόστηκε σε pH 7.4 πριν από την εφαρμογή στην



προεξισορροπημένη στήλη. Η στήλη πλύθηκε με 500 ml ρυθμιστικού εξισορρόπησης και ακολουθήθηκε από μία γραμμική βαθμίδωση άλατος από 0.1 ως 1.1 M NaCl. Κλάσματα (σύνολο 7 ml) υποβλήθηκαν σε δοκιμασία για περιεχόμενο λακτοφερρίνης και καθαρότητα με την 5 χρησιμοποίηση SDS/PAGE και χρώση αργύρου. Κλάσματα που περιέχουν LF υποβλήθηκαν σε διαπίδωση έναντι 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5/0.1 M NaCl και λυοφιλήστηκαν.

Παράδειγμα 6

Ποσοτικός προσδιορισμός ανθρώπινης LF

10 Ανασυνδυαστική λακτοφερρίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά με την χρησιμοποίηση μίας δοκιμασίας ELISA ουσιαστικά όπως περιγράφεται από Vilja et al., *J. Immunol. Methods*, 76:73-83 (1985). Μία ευαισθησία 5 ng λακτοφερρίνης λήφθηκε με την χρησιμοποίηση της μη-ανταγωνιστικής 15 δοκιμασίας αβιδίνης-βιοτίνης. Ανθρώπινη LF που απομονώθηκε από γάλα από μαστό (Sigma) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Βιοτινυλιωμένη ανθρώπινη λακτοφερρίνη IgG λήφθηκε από Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA.

Παράδειγμα 7

N-τερματική ανάλυση αλληλουχίας

20 Πέντε μg καθαρισμένης ανασυνδυαστικής ανθρώπινης LF διαχωρίστηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδική πηκτή και μεταφέρθηκαν σε Problott, μία μεμβράνη τύπου διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Applied Biosystems). Ανθρώπινη LF 25 ανιχνεύθηκε με χρώση και αποχρωματισμό με λαμπρό κυανό Coomassie. Αυτή η ανθρώπινη LF ζώνη αποκόπηκε, πλύθηκε εντελώς με αποσταγμένο νερό και ξηράνθηκε στον αέρα. Η N-τερματική αλληλουχία αμινοξέων των πρώτων δέκα αμινοξέων της ανθρώπινης LF προσδιορίστηκε με την αυτοματοποιημένη διαδικασία αποδόμησης Edman 30 χρησιμοποιώντας ένα παλμικό υγρής φάσης αναλυτή της Applied Biosystems (μοντέλο 477A).

Με αναφορά στην εικόνα 4, ο πίνακας B απεικονίζει μία ανάλυση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου με χρώση αργύρου της ανασυνδυαστικής ανθρώπινης LF έκκρισης και καθαρισμού. Η λωρίδα 1 περιέχει πρότυπη ανθρώπινη LF γάλατος από μαστό (500 ng). Οι λωρίδες 2 και 3 περιέχουν 35 δείγματα του μέσου ανάπτυξης (40 μg) από επαγόμενο συγκριτικό έλεγχο AO7 και προϊόν μεταμόρφωσης #1, αντίστοιχα. Οι λωρίδες 4-8 περιέχουν υποπολλαπλάσια κλάσματα 100 μl εκλουσμένων κλασμάτων (#25,30,35,40 και 45 αντίστοιχα), που συλλέχθηκαν από CM-Sephadex καθαρισμό της ανασυνδυαστικής LF από το μέσο ανάπτυξης του 40 προϊόντος μεταμόρφωσης #1. Η θέση των δεικτών μοριακών βαρών (BioRad Laboratories Richmond, CA) υποδεικνύεται στα αριστερά. Τα μεγέθη δίνονται σε κιλοδαλτόνια. Ο πίνακας A απεικονίζει μία ανάλυση ανοσοκηλίδας Western διπλών δειγμάτων όπως περιγράφονται στον 45 πίνακα B με την χρησιμοποίηση ενός ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος που στρέφεται κατά ανθρώπινης LF με ανίχνευση με ¹²⁵I-πρωτεΐνη A. Ο πίνακας C απεικονίζει την N-τερματική αλληλουχία αμινοξέων της ανασυνδυαστικής ανθρώπινης LF. Η ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF αναλύθηκε κατά την αλληλουχία από το N-άκρο ως 10 υπολείμματα και είναι ταυτόσημη με την ανθρώπινη LF από γάλα από μαστό με την



εξαίρεση της επιπλέον αλανίνης που δημιουργείται στην δόμησή μας για την παροχή μίας θέσης διάσπασης της αλληλουχίας σήματος α-αμυλάσης.

Παράδειγμα 8

Απογλυκοζύλιωση

5 Απογλυκοζύλιωση πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση N-γλυκοσιδάσης F (Boehringer Mannheim). Μέσο ανάπτυξης *Aspergillus oryzae* που περιέχει 0.5 μg λακτοφερρίνη μετουσιώθηκε για 3 λεπτά σε 100°C σε παρουσία 0.01% SDS. Πρότυπη LF από ανθρώπινο γάλα επεξεργάστηκε με παρόμοιο τρόπο. Τα δείγματα στην συνέχεια
10 τοποθετήθηκαν σε πάγο για πέντε λεπτά. Αντιδράσεις N-γλυκοσιδάσης F πραγματοποιήθηκαν σε 0.4 M φωσφορικό νάτριο (pH 6.8), 0.08% Triton-0.1% β-μερκαπτοαιθανόλη και 1 μονάδα ενζύμου και επωάστηκαν σε 37°C για δεκαέξι ώρες. PAGE και ανάλυση Western πραγματοποιήθηκαν με την χρησιμοποίηση μίας IgG_κ ειδικά κατευθυνόμενης κατά ανθρώπινης
15 λακτοφερρίνης προς ανίχνευση μίας αύξησης στην κινητικότητα των χωνεμένων δειγμάτων.

Με αναφορά στην ΕΙΚΟΝΑ 5, χαρακτηρίζεται ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF. Ο πίνακας A απεικονίζει την απογλυκοζύλιωση της λακτοφερρίνης. Ανάλυση Western γλυκοζυλιωμένης και
20 απογλυκοζυλιωμένης λακτοφερρίνης με την χρησιμοποίηση ενός ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που στρέφεται κατά ανθρώπινης λακτοφερρίνης με ανίχνευση με ¹²⁵I-πρωτεΐνη A. Ο πρώτος πίνακας περιέχει LF από γνήσιο ανθρώπινο γάλα από μαστό (500 ng) χωρίς επεξεργασία (-) και επεξεργασμένο (+) με N γλυκοσιδάση F. Ο δεύτερος
25 πίνακας περιέχει καθαρισμένη ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF (500 ng) χωρίς επεξεργασία (-) και επεξεργασμένη (+) με N- γλυκοσιδάση F. Το μέγεθος της γλυκοζυλιωμένης ανθρώπινης LF υποδεικνύεται με το βέλος. Ο πίνακας B απεικονίζει μία λειτουργική ανάλυση ανασυνδυαστικής λακτοφερρίνης σε σχέση με την ικανότητα σύνδεσης σιδήρου. Ο πίνακας A και ο B δείχνουν την δοκιμασία σύνδεσης φίλτρου ⁵⁹Fe διπλών δειγμάτων από ανθρώπινη LF από γνήσιο γάλα από μαστό και από καθαρισμένη ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF, αντίστοιχα, στις συγκεντρώσεις που υποδεικνύονται. Η πρώτη λωρίδα και στους δύο πίνακες περιέχει BSA (5
30 μg) ως αρνητικό συγκριτικό έλεγχο.

35 Η λακτοφερρίνη περιέχει δύο γλυκάνες τύπου N-ακετυλλακταμίνης προσαρτημένες μέσω των N-γλυκοσιδικών δεσμών. Γιά να προσδιορισθεί αν η ανασυνδυαστική λακτοφερρίνη γλυκοζυλιώθηκε σωστά, η πρωτεΐνη επεξεργάστηκε με N γλυκοσιδάση F, διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκε σε νιτροκυτταρίνη και ανιχνεύθηκε με την χρησιμοποίηση μίας ειδικής IgG που στρέφεται κατά ανθρώπινης
40 λακτοφερρίνης (Εικ.5Α). Η N-γλυκοσιδάση F υδρολύει τον γλυκοζυλαμινικό δεσμό παράγοντας ένα απαλλαγμένο από υδατάνθρακα πεπτιδίο μικρότερου μοριακού βάρους. Σύγκριση ανασυνδυαστικής LF με καθαρισμένη LF από ανθρώπινο γάλα, δείχνει ότι και οι δύο πρωτεΐνες συμμετακινούνται κατά την πέψη με N-γλυκοσιδάση F πράγμα που
45 σημαίνει ότι η ανασυνδυαστική πρωτεΐνη έχει ένα τύπο γλυκοζύλιωσης παρόμοιο με την φυσική LF.

Η λακτοφερρίνη έχει μία διλοβική δομή με κάθε λοβό να έχει την ικανότητα να συνδέεται στενά, αλλά αντιστρεπτά, με ένα ιόν Fe³⁺. Οι



ιδιότητες σύνδεσης σιδήρου της λακτοφερρίνης είναι καθοριστικές για τους λειτουργικούς της ρόλους. Για να εξετασθεί αν η ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF που εκφράζεται και εκκρίνεται σε *Aspergillus oryzae* έχει μία ικανότητα σύνδεσης με σίδηρο παρόμοια με της γνήσιας λακτοφερρίνης, αναπτύχθηκε μία δοκιμασία σύνδεσης μικροφίλτρου ^{59}Fe . Καθαρισμένη ανθρώπινη λακτοφερρίνη που απομονώθηκε από το μέσο ανάπτυξης του προϊόντος μεταμόρφωσης #1 υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι 0.1 M κιτρικού οξέος (pH 2.0) προς παραγωγή από-ανθρώπινης LF. Φυσική λακτοφερρίνη από ανθρώπινο γάλα επεξεργάστηκε με παρόμοιο τρόπο. Περίσσεια ^{59}Fe (0.2 mCi) προστέθηκε στα δείγματα αυτά σε ένα ίσο όγκο 1M διπτανθρακικού για να ακολουθήσει επώαση σε 37°C για 30 λεπτά. Τα δείγματα εφαρμόστηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πλύθηκαν αρκετές φορές με διπτανθρακικό. Το φίλτρο αναδείχθηκε οπτικά με αυτοακτινογραφία και η σύνδεση Fe μετρήθηκε ποσοτικά με την χρησιμοποίηση ενός αναλυτή κηλίδων betagon. Όπως απεικονίζεται στην Εικ.5B, τόσο η ανασυνδυαστική όσο και η φυσική LF εμφάνισαν ένα παρόμοιο επίπεδο σύνδεσης σιδήρου σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ανασυνδυαστική ανθρώπινη LF δεν μπορεί να διακριθεί από την φυσική ανθρώπινη LF ως προς την ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο.

Αναφερόμενοι στην εικόνα 6, απεικονίζεται η πλήρης cDNA και η συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης της ανθρώπινης λακτοφερρίνης. Το cDNA που κωδικοποιεί για λακτοφερρίνη χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία πλασμιδίων και την μεταμόρφωση ευκαρυωτικών κυττάρων και για παραγωγή της πρωτεΐνης της λακτοφερρίνης.

Στελέχη *Aspergillus* που χρησιμοποιήθηκαν με την παρούσα εφεύρεση είναι αυξοτροφικοί μεταλλάκτες που περιέχουν ένα ελαττωματικό *ryg4* γονίδιο που καταλήγει σε μία αδυναμία σύνθεσης αποκαρβοξυλάσης 5'-φωσφορικής οροτιδίνης (OMP). Το ένζυμο απαιτείται για την σύνθεση ουριδίνης. Το στέλεχος δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε μέσα που στερούνται ουριδίνης. Το πλασμίδιο περιέχει ένα επιλέξιμο δείκτη, δηλ., μία αλληλουχία που κωδικοποιεί το γονίδιο για αποκαρβοξυλάση OMP. Πρόσληψη του πλασμιδίου από *Aspergillus* μπορεί επομένως να επιλεγεί από την ανάπτυξη σε μέσα που στερούνται ουριδίνης. *Aspergillus* μεταμορφώνεται με το πλασμίδιο έτσι που να μπορεί να αναπτύσσεται σε μέσα ανεπαρκή σε ουριδίνη.

Σε μία ενσωμάτωση της παρούσας εφεύρεσης, παράγεται βιολογικά ενεργή ανασυνδυαστική ανθρώπινη λακτοφερρίνη πρωτεΐνη. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει σύνθεση των αλληλουχιών που περιέχουν ένα επιλέξιμο γονίδιο δείκτη, ένα προαγωγό, μία αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής και μία αλληλουχία συνδέτη. Στην συνέχεια, οι αλληλουχίες κλωνοποιούνται για να σχηματίσουν ένα πλασμίδιο και το πλασμίδιο χωνεύεται με μία ενδονουκλεάση περιορισμού. Ένα cDNA που κωδικοποιεί για λακτοφερρίνη εισάγεται μέσα σε μία θέση περιορισμού και τα ευκαρυωτικά κύτταρα μετά μεταμορφώνονται με το πλασμίδιο που εκφράζει το cDNA της λακτοφερρίνης.

Το επιλέξιμο γονίδιο δείκτης που είναι χρήσιμο στην μέθοδο της παρούσας εφεύρεσης μπορεί να είναι ένα οποιοδήποτε που επιτρέπει την



απομόνωση κυττάρων που έχουν μεταμορφωθεί με ένα πλασμίδιο cDNA λακτοφερρίνης. Κατά προτίμηση, το επιλέξιμο γονίδιο δείκτης επιλέγεται από *pyr4*, *pyrG*, *argB*, *trpC* και *amdS*.

5 Ο προαγωγός ο χρήσιμος στην παρούσα εφεύρεση μπορεί να είναι οποιοσδήποτε προαγωγός που επιτρέπει την ρύθμιση της μεταγραφής του cDNA λακτοφερρίνης. Κατά προτίμηση, ο προαγωγός επιλέγεται από την ομάδα αλκοολικής αφυδρογονάσης, *argB*, α-αμυλάσης και γλυκοαμυλάσης.

10 Η αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής η χρήσιμη με την παρούσα μέθοδο μπορεί να είναι οποιαδήποτε που θα επιτρέπει την σταθεροποίηση του mRNA της λακτοφερρίνης. Κατά προτίμηση, η αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής προέρχεται από α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση, αλκοολική αφυδρογονάση ή *benA*.

15 Η αλληλουχία συνδέτης η χρήσιμη με την παρούσα μέθοδο μπορεί να είναι μία οποιαδήποτε που περιέχει ένα κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης, ένα εκκριτικό σήμα και μία θέση διάσπασης ενζύμου περιορισμού. Κατά προτίμηση, το στοιχείο συνδέτη προέρχεται από α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση ή λακτοφερρίνη.

20 Τα ευκαρυωτικά κύτταρα τα χρήσιμα στην παρούσα εφεύρεση είναι οποιαδήποτε που επιτρέπουν την ενσωμάτωση ενός πλασμιδίου που περιλαμβάνει το cDNA λακτοφερρίνης και την έκφραση του cDNA λακτοφερρίνης και είναι μυκητικά κύτταρα *Aspergillus*.

Κατά προτίμηση, τα προτιμώμενα στελέχη *Aspergillus* είναι *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans* και *A. awamori*.

25 Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η παρούσα εφεύρεση και οι ενσωματώσεις που κοινολογούνται εδώ μέσα είναι καλά προσαρμοσμένες για την διεξαγωγή των αντικειμενικών στόχων και την επίτευξη του σκοπού που παρουσιάζεται στην αίτηση αυτή. Μπορούν να γίνουν ορισμένες αλλαγές στην μέθοδο και το μηχάνημα αλλά χωρίς απομάκρυνση από το πνεύμα και το πεδίο της εφεύρεσης. Αναγνωρίζεται ότι αλλαγές είναι δυνατές και περαιτέρω εννοείται ότι κάθε στοιχείο ή στάδιο που προΐσταται σε οποιαδήποτε από τις καταχωρούμενες αξιώσεις είναι αυτονόητο ότι αναφέρεται σε όλα τα ισοδύναμα στοιχεία ή στάδια για την ολοκλήρωση ουσιαστικά των αυτών αποτελεσμάτων με ουσιαστικά τον αυτό ή ισοδύναμο τρόπο. Εννοείται ότι καλύπτουν την εφεύρεση ευρέως με οποιαδήποτε μορφή μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι αρχές της. Η παρούσα εφεύρεση, επομένως, είναι καλά προσαρμοσμένη για την διεξαγωγή των αντικειμενικών στόχων και την επίτευξη των σκοπών και των πλεονεκτημάτων που αναφέρθηκαν, όπως επίσης και άλλων που ενυπάρχουν εδώ.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

(1) ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:

(i) ΑΙΤΩΝ:

(A) ΟΝΟΜΑ: Baylor College of Medicine

45 (B) ΟΔΟΣ: One Baylor Plaza

(C) ΠΟΛΗ: Houston

(D) ΠΟΛΙΤΕΙΑ: Texas

(E) ΧΩΡΑ: U.S.A

(F) ZIP: 77030

50 (ii) ΤΙΤΛΟΣ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ: Παραγωγή ανασυνδυαστικής



ανθρώπινης λακτοφερρίνης

(iii) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ: 6

(v) ΑΝΑΓΝΩΣΙΜΗ ΑΠΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ ΜΟΡΦΗ:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ: IBM PC συμβατός

(C) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: PC-DOS/MS-DOS

(D) ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
ΕΡΟ)

(v) ΤΡΕΧΟΝΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΙΤΗΣΕΩΣ

(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΙΤΗΣΕΩΣ: ΕΡ 93 91 2287.5

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 1:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 2360 ζεύγη βάσεων

(B) ΤΥΠΟΣ: γουκλειικό οξύ

(C) ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ: απλή

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: cDNA

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΟΧΙ

(iv) ΑΝΤΙ-ΝΟΗΜΑΤΟΣ: ΟΧΙ

(vi) ΑΡΧΙΚΗ ΠΗΓΗ: H. sapiens

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 1

GAATTCGGAC CCCAGACATG AAACCTGTCT TCCTGGTCCT GCTGTTCCCTC GGGGCCCTCG 60
CACTGTGTCT GGCTGGCCCT AGGAGAAGGA GTGTTCAGTG GTGCACCGTA TCCCAACCCG 120
AGCCCAAAA A7GCTTCCA TGGCAAAGGA ATATGAGAAG AGTGGGTGGC CCTCCTGTCA 180
GCTGCATAAA GACAGACTCC CCCATCCAGT GTATCCAGGC CATTGGCGAA AACAGGGCCG 240
ATGCTGTGAC CCTTGATGCT GGTTCATAT ACGAGGCAGG CCTGGCCCCC TACAAACTGC 300
GACCTGTAGC CCCCGAAGTC TACGGGACCG AAAGACAGCC ACGRACTCAC TATTATGCCG 360
TGGCTGTGCT GAAGAAAGGC GGCAGCTTTC AGCTGAACGA ACTGCRAGGT CTGAAGTCCT 420



GCCACACAGG CCTTCGCAGG ACCCGTGGAT GGAATGTGCC TATAGGGACA CTTCGTCCAT 480
TCTTGRAATTG GACGGGTCCA CCTGAGCCCA TTGAGGCAGC TGTGGCCAGG TTCTTCTCAG 540
CCAGCTGTGT TCCCGGTGCA GATAAAGGAC AGTTCGCCAA CCTGTGTCCG CTGTGTGGGG 600
GGACAGGGGA AAACAAATGT GCCTTCTCCT CCCAGGAACC GTACTTCAGC TACTCTGGTG 660
CCTTCAAGTG TCTGAGAGAC GGGGCTGGAG ACGTGGCTTT TATCAGAGAG AGCACAGTGT 720
TTGAGGACCT GTCAGACGAG GCTGAAAGGG ACCAGTATGA GTTACTCTGC CCAGACAACA 780
CTCGGAAGCC AGTGGACAAG TTCAAAGACT GCCATCTGCC CCGGTGCCCT TCTCATGCCG 840
TTGTGGCAGG AAGTGTGAAT GGCAAGGAGG ATGCCATCTG GAATCTTCTC CGCCAGGCAC 900
AGGAAAAGTT TGGAAAGGAC AAGTCACCGA AATCCAGCT CTTTGGTCC CCTAGTGGGC 960
AGAAAGATCT GCTGTTCAG GACTCTGCCA TTGGGTTTTG GAGGGTCCG CCGAGGATAG 1020
ATTCTGGGCT GTACCTTGGC TCCGGCTACT TCACTGCCAT CCAGAACTTG AGGAAAAGTG 1080
AGGAGGAAGT GGCTGCCCGG CGTGC CGCGG TCGTGTGGTG TCGGTGGGC GAGCAGGAGC 1140
TGCGCAAGTG TAACCAGTGG AGTGGCTTGA GCGAAGGCAG CSTGACCTGC TCCTCGGCCT 1200
CCACCACAGA GGACTGCATC GCCCTGGTGC TGAAGGAGA AGCTGATGCC ATGAGTTTGG 1260
ATGGAGGATA TGTGTACTACT GCAGGCCAAAT GTGGTTTGGT GCCTGTCTG GCAGAGAACT 1320
ACAAATCCCA ACAAGCAGT GACCTGATC CTAAGTGTGT GGATAGACCT GTGGAAGGAT 1380
ATCTTGCTGT GCGCGTGGTT AGGAGATCAG AACTAGCCCT TACCTGGAC TCTGTGAAAG 1440
GCAAGAAGTC CTGCCACACC-GCCCTGGACA GGACTGCAGG CTGGAATATC CCCATGGGCC 1500
TGCTTTCAA CCAGACGGGC TCCTGCAAT TTGATGAATA TTTCTGCAA AGCTGTGCC 1560
CTGGGTCTGA CCGCAGATCT AATCTCTGTG CTCTGTGTAT TGGCGACGAG CAGGGTGA 1520
ATAAGTCCGT GCCCAACAGC AATGAGAGAT ACTACGGCTA CRTGGGGCT TTCCGGTCC 1680
TGGCTGAGAA TGCTGGAGAC GTTGCATTTG TGAAGATGT CACTGTCTTG CAGAACACTG 1740
ATGGAAATA CAATGAGCA TGGGCTAAGG ATTTGAAGCT GGCAGACTT GCCTGTCTGT 1800
GCCTCGATG CAAACGGAAG CCTGTGACTG AGGCTAGAAG CTGCCATCTT GCCATGGCCC 1860
CGAATCATGC CGTGGTGTCT CGGATGGATA AGGTGGAACC CCTGAAACAG GTGCTGCTCC 1920
ACCAACAGGC TAAATTTGGG AGAAATGGAT CTGACTGCCC GGACAAGTTT TGCTTATTCC 1980
AGTCTGAAAC CAAAACCTT CTGTTCAATG ACAACACTGA GTGTCTGCC AGACTCCATG 2040
GCAAACAAC ATATGAAAA TATTTGGAC CACAGTATGT CGCAGGCATT ACTAATCTGA 2100
AAAAGTCTC AACCTCCCC CTCTGGAAG CCTGTGAATT CCTCAGGAG TAAACCAGAA 2160
GAGATGGCC CAGCTCCCCA AGAAAGCCTC AGCCATTAC TGCCCCCAGC TCTTCTCCCC 2220



AGGTGTGTTG GGGCCTTGGC TCCCCTGCTG AAGGTGGGGA TTGCCCATCC ATCTGCTTAC 2280
AATTCCCTGC TGTCGTCTTA GCARGAAGTA AATGAGAAA TTTTGTGAA AAAAAAAAAA 2340
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2360

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 2:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 711 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξέων

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: πρωτεΐνη

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΝΑΙ

(iv) ΑΝΤΙ-ΝΟΗΜΑΤΟΣ: ΟΧΙ

(vi) ΑΡΧΙΚΗ ΠΗΓΗ:

(A) ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ: *H. sapiens*

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 2

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
1 5 10 15
Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Thr Val Ser
20 25 30
Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg
35 40 45
Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
50 55 60
Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
65 70 75 80
Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
85 90 95
Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
100 105 110
Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
115 120 125
Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
130 135 140
Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
145 150 155 160



Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
155 170 175

Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
180 185 190

Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
195 200 205

Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly
210 215 220

Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp
225 230 235 240

Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg
245 250 255

Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser
260 265 270

His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp
275 280 285

Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro
290 295 300

Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe
305 310 315 320

Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
325 330 335

Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
340 345 350

Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
355 360 365

Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu
370 375 380

Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
385 390 395 400

Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
405 410 415

Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
420 425 430

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
435 440 445

Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
450 455 460

Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His
465 470 475 480



Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
485 490 495

Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
500 505 510

Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
515 520 525

Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg
530 535 540

Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly
545 550 555 560

Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly
565 570 575

Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala
580 585 590

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Arg Ser
595 600 605

Cys His Leu Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Met Asp
610 615 620

Lys Val Glu Arg Leu Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Lys Phe
625 630 635 640

Gly Arg Asn Gly Ser Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser
645 650 655

Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Arg
660 665 670

Leu His Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Tyr Val
675 680 685

Ala Gly Ile Thr Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu
690 695 700

Ala Cys Glu Phe Leu Arg Lys
705 710

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 3:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 36 ζεύγη βάσεων

(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ

(C) ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ: απλή

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: άλλο νουκλεϊκό οξύ

(A) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: / desc = «ολιγονουκλεοτίδιο»

(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΝΑΙ



xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 3
CTGGGTCCGAC GTAGGAGAAG GAGTGTTCAG TGGTGC 36

5 (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 4:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 24 ζεύγη βάσεων
(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
(C) ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ: απλή
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
10 (ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: άλλο νουκλεϊκό οξύ
(A) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: / desc = «ολιγονουκλεοτίδιο»
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΝΑΙ
xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 4
GCCGTAGACT TCCGCCGCTA CAGG 24

15 (2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 5:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
(A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
20 (C) ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ: απλή
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: άλλο νουκλεϊκό οξύ
(A) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: / desc = «ολιγονουκλεοτίδιο»
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΝΑΙ
25 xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 5
GAGGTACCGA ATTCATGGTG TTTTGATCAT TTAAATTTT TATAT 45

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 6:
(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:
30 (A) ΜΗΚΟΣ: 45 ζεύγη βάσεων
(B) ΤΥΠΟΣ: νουκλεϊκό οξύ
(C) ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑ: απλή
(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική
(ii) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: άλλο νουκλεϊκό οξύ
35 (A) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: / desc = «ολιγονουκλεοτίδιο»
(iii) ΥΠΟΘΕΤΙΚΟΣ: ΝΑΙ
xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ. 6
AGCAGCTGCA GCCAAAGCAG GTGCCGCGAC CTGAAGGCCG TACAG 45

**ΑΞΙΩΣΕΙΣ****Κύρια Αξίωση** →

1. Μίας διαδικασίας για την παραγωγή λακτοφερρίνης που περιλαμβάνει καλλιέργεια ενός μεταμορφωμένου μυκητικού κυττάρου *Aspergillus* που περιέχει ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο, όπου το αναφερόμενο πλασμίδιο περιλαμβάνει ένα πλασμιδικό ενδιάμεσο ξενιστή που περιέχει μία πολυδεοξυριβονουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία κωδικοποιεί για πρωτεΐνες λακτοφερρίνης, όπου τα αναφερόμενα μεταμορφωμένα μυκητικά κύτταρα *Aspergillus* καλλιεργούνται σε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρις ότου να σχηματισθεί η πρωτεΐνη λακτοφερρίνη και όπου η λακτοφερρίνη εκκρίνεται μέσα στο θρεπτικό μέσο και απομονώνεται από το μέσο.

Εξαρτημένη Αξίωση →

2. Της διαδικασίας της αξίωσης 1, όπου το αναφερόμενο μυκητικό κύτταρο *Aspergillus* επιλέγεται από την ομάδα που αποτελείται από *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans* και *A. awamori*.

Εξαρτημένη Αξίωση →

3. Της διαδικασίας της αξίωσης 1 ή 2, όπου ο αναφερόμενος πλασμιδικός ενδιάμεσος ξενιστής περαιτέρω περιλαμβάνει αλληλουχίες που περιέχουν ένα επιλέξιμο γονίδιο δείκτη, ένα προαγωγό, μία αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής και μία αλληλουχία συνδέτη.

Εξαρτημένη Αξίωση →

4. Της διαδικασίας της αξίωσης 3, όπου το αναφερόμενο επιλέξιμο γονίδιο δείκτης επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που αποτελείται από *pyr4*, *pyrG*, *amdS*, *argB* και *trpC*.

Εξαρτημένη Αξίωση →

5. Της διαδικασίας της αξίωσης 3, όπου ο αναφερόμενος προαγωγός επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που αποτελείται από αλκοολική αφυδρογονάση, *argB*, α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση και *benA*.

Εξαρτημένη Αξίωση →

6. Της διαδικασίας της αξίωσης 3, όπου η αναφερόμενη αλληλουχία τερματισμού επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που αποτελείται από α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση, αλκοολική αφυδρογονάση και *benA*.

Εξαρτημένη Αξίωση →

7. Της διαδικασίας της αξίωσης 3, όπου η αναφερόμενη αλληλουχία συνδέτη επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που αποτελείται από α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση και λακτοφερρίνη.

Εξαρτημένη Αξίωση →

8. Της διαδικασίας μίας οποιασδήποτε από τις αξιώσεις 1 ως 7, όπου η πολυδεοξυριβονουκλεοτιδική αλληλουχία περαιτέρω ορίζεται ως η cDNA αλληλουχία της ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.1.

Εξαρτημένη Αξίωση →

9. Της διαδικασίας μίας οποιασδήποτε από τις αξιώσεις 1 ως 8, όπου η πρωτεΐνη λακτοφερρίνη είναι το προϊόν του cDNA που κωδικοποιεί την αλληλουχία αμινοξέων της ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.2.

Κύρια Αξίωση →

10. Ενόσ ανασυνδυαστικού ενδιάμεσου ξενιστή που έχει μία μεταγραφική μονάδα που περιλαμβάνει μία συναρμολόγηση από (1) ένα γενετικό στοιχείο ή στοιχεία που έχει ένα ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση ενός μυκητικού κυττάρου *Aspergillus* (2) cDNA που κωδικοποιεί για λακτοφερρίνη (3) κατάλληλες αλληλουχίες έναρξης και τερματισμού μεταγραφής και μετάφρασης.

Εξαρτημένη Αξίωση →

11. Του ενδιάμεσου ξενιστή της αξίωσης 10, όπου το αναφερόμενο γενετικό στοιχείο είναι ένας προαγωγός που επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που αποτελείται από αλκοολική αφυδρογονάση, *argB*, α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση και *benA*.

Εξαρτημένη Αξίωση →

12. Του ενδιάμεσου ξενιστή της αξίωσης 10, όπου η αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής επιλέγεται από τα γονίδια της ομάδας που



Κόρια Αξίωση →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

Κόρια Αξίωση →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

**Εξαρτημένη
Αξίωση** →

αποτελείται από α-αμυλάση, γλυκοαμυλάση, αλκοολική αφυδρογονάση και *benA*.

13. Ενός πλασμιδίου που συνίσταται ουσιαστικά σε ή περιέχει το cDNA της ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.1 και ρυθμιστικά στοιχεία απαραίτητα για την έκφραση του cDNA σε ένα μυκητικό κύτταρο *Aspergillus*.

14. Του πλασμιδίου της αξίωσης 13 που περαιτέρω ορίζεται ότι έχει ATCC αριθμό εισαγωγής 74222 και έχει χαρακτηριστεί pAhLFG.

15. Ενός μυκητικού κυττάρου *Aspergillus* που περιέχει το πλασμίδιο της αξίωσης 13.

16. Του *Aspergillus* κυττάρου της αξίωσης 15, όπου το κύτταρο είναι *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. awamori* ή *A. niger*

17. Μίας μεθόδου για την απομόνωση λακτοφερρίνης από ένα θρεπτικό μέσο μυκήτων, η οποία περιλαμβάνει καλλιέργεια ενός μεταμορφωμένου μυκητικού κυττάρου *Aspergillus oryzae* που περιέχει ένα ανασυνδυαστικό πλασμίδιο, όπου το αναφερόμενο πλασμίδιο περιλαμβάνει ένα πλασμιδικό ενδιάμεσο ξενιστή που περιέχει το cDNA της ΑΛΛ. ΑΡ. ΤΑΥΤ.1, ένα επιλέξιμο δείκτη γονίδιο, ένα προαγωγό, αλληλουχίες τερματισμού μεταγραφής και αλληλουχίες συνδέτη, όπου τα αναφερόμενα μεταμορφωμένα μυκητικά κύτταρα *Aspergillus oryzae*

καλλιεργούνται σε ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρις ότου να σχηματισθεί πρωτεΐνη λακτοφερρίνη, και όπου η λακτοφερρίνη εκκρίνεται μέσα στο θρεπτικό μέσο και απομονώνεται από αυτό.

18. Της μεθόδου της αξίωσης 17, όπου ο αναφερόμενος πλασμιδικός ενδιάμεσος ξενιστής περαιτέρω ορίζεται ότι περιέχει το *ryg4* επιλέξιμο γονίδιο δείκτη, προαγωγό από το γονίδιο α-αμυλάσης, αλληλουχία τερματισμού μεταγραφής από το γονίδιο γλυκοαμυλάσης και αλληλουχία συνδέτη από το γονίδιο α-αμυλάσης.

19. Πρωτεΐνης λακτοφερρίνης που παράγεται με την διαδικασία μίας οποιασδήποτε από τις αξιώσεις 1 ως 9, 17 ή 18.

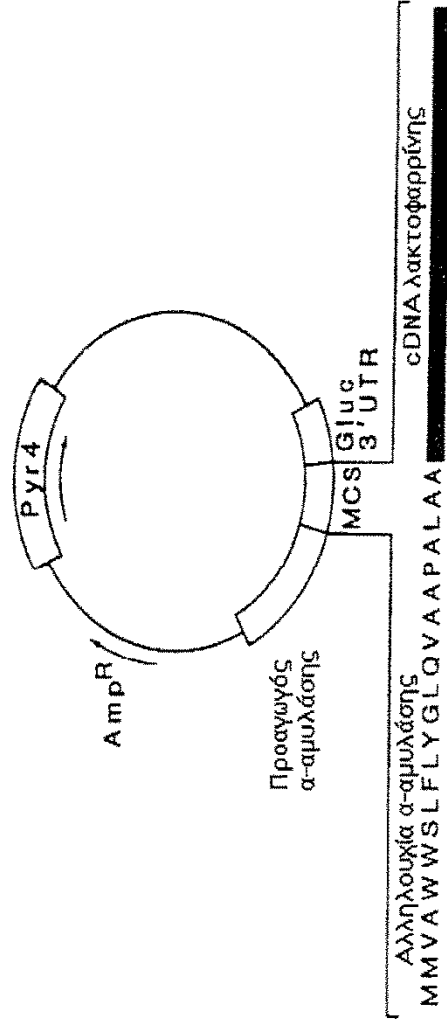
20. Της πρωτεΐνης λακτοφερρίνης της αξίωσης 19, όπου η λακτοφερρίνη είναι ανθρώπινη λακτοφερρίνη.



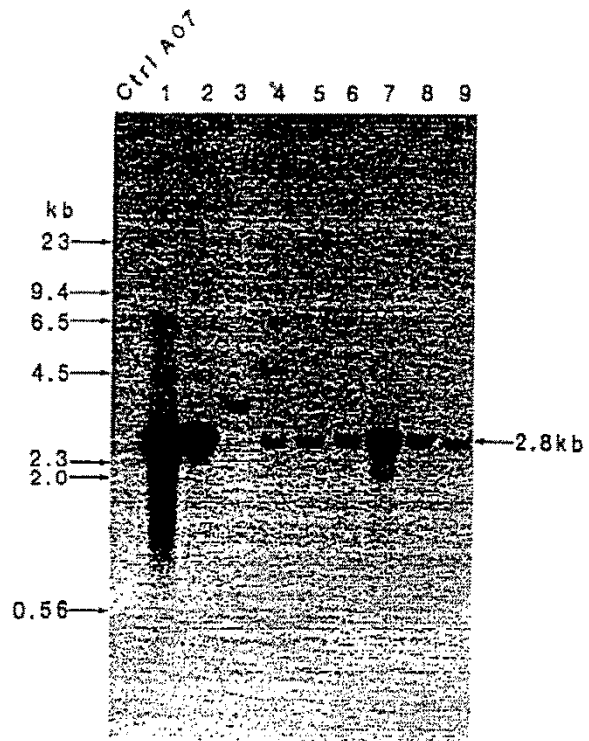
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΛΑΚΤΟΦΕΡΡΙΝΗΣ

Περίληψη

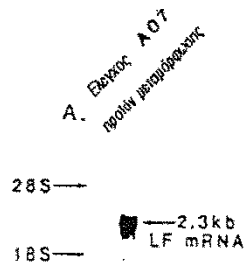
Η παρούσα εφεύρεση παρέχει νέα πλασμίδια, επιμολυσμένα
ευκαρυωτικά κύτταρα και μεθόδους για την παραγωγή αυτών των
5 πλασμιδίων και των επιμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων. Το νέο
πλασμίδιο περιέχει cDNA για ανθρώπινη πρωτεΐνη λακτοφερρίνη.
Παρέχονται επίσης μέθοδοι για την παραγωγή ανθρώπινης
λακτοφερρίνης σε *Aspergillus oryzae*. Έτσι, η παρούσα εφεύρεση παρέχει
10 ένα αποτελεσματικό και οικονομικό τρόπο για την παραγωγή
ανασυνδυαστικής ανθρώπινης πρωτεΐνης λακτοφερρίνης.



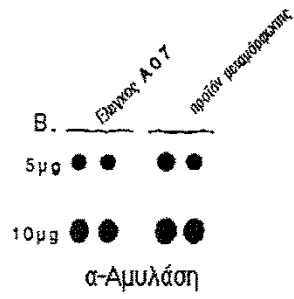
ΕΙΚ. 1



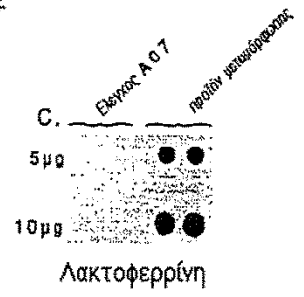
EIK. 2



ΕΙΚ. 3Α



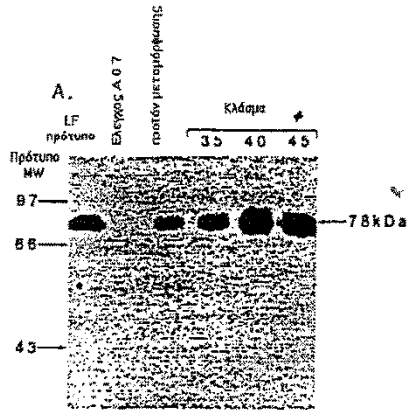
ΕΙΚ. 3Β



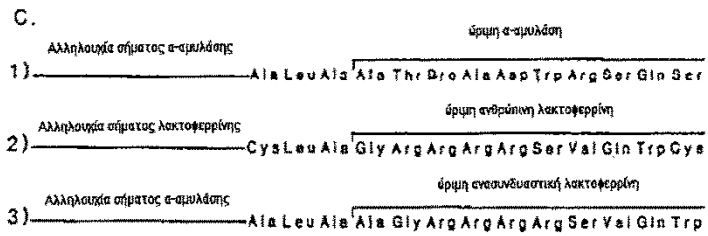
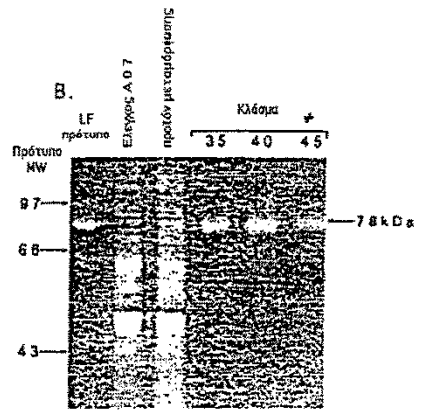
ΕΙΚ. 3Γ



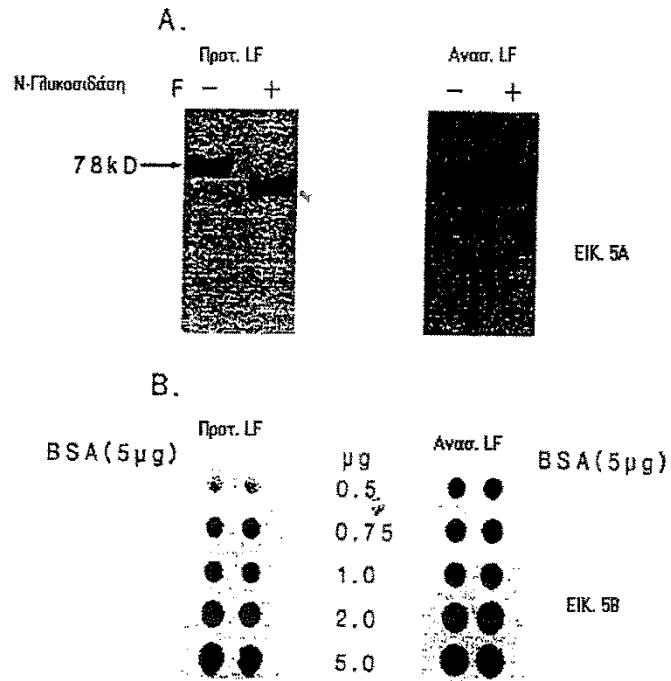
EIK.4A



EIK.4B



EIK. 4Γ





cDNA Αλληλοϋχία και Αλληλοϋχία Αμινοξέων
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΛΑΚΤΟΦΕΡΡΙΝΗΣ

1
GAATTCC GACCGCAGAC

18
ATG AAA CTT GTC TTC CTC GTC CTG CTG TTC CTC GGG GCC CTC GGA CTC
met lys leu val phe leu val leu leu phe leu gly ala leu gly leu
1

66
TGT CTG GCT GGC CGT AGG AGA AGG AGT GTT CAG TCG TGC ACC GTA TCC
cys leu ala gly arg arg arg arg ser val gln trp cys thr val ser
17

114
CAA CCC GAG GCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATG AGA AGA
gln pro glu ala thr lys cys phe gln trp gln arg asn met arg arg
33

162
GTG CGT GCC CCT CCT GTC AGC TCC ATA AAG AGA GAC TCC CCC ATC CAG
val arg gly pro pro val ser cys ile lys arg asp ser pro ile gln
49

210
TGT ATC CAG GCC ATT GCG GAA AAC AGG GCC GAT CCT CTG ACC CTT GAT
cys ile gln ala ile ala glu asn arg ala asp ala val thr leu asp
65

258
GGT GGT TTC ATA TAC GAG GCA GGC CTG GCC CCC TAC AAA CTC CGA CCT
gly gly phe ile tyr glu ala gly leu ala pro tyr lys leu arg pro
81

306
GTA GCG GCC GAA CTC TAC GCG ACC GAA AGA CAG CCA CGA ACT CAC TAT
val ala ala glu val tyr gly thr glu arg gln pro arg thr his tyr
97

354
TAT CCC CTG CCT CTG CTG AAG AAG GGC GGC AGC TTT CAG CTG AAC GAA
tyr ala val ala val val lys lys gly gly ser phe gln leu asn glu
113

402
CTG CAA GGT CTG AAC TCC TCC CAC ACA GCC CTT CGC AGG ACC GCT CGA
leu gln gly leu lys ser cys his thr gly leu arg arg thr ala gly
129

450
TGG AAT GTG CCT ATA GCG ACA CTT CGT CCA TTC TTG AAT TGG ACG GGT
trp asn val pro ile gly thr leu arg pro phe leu asn trp thr gly
145

Φύλλο 1 από 4

EIKONA 5



493
CCA CCT GAG CCC ATT GAG GCA GCT GTG GCG AGG TTC TTC TCA GCG AGC
pro pro glu pro ile glu ala ala val ala arg phe phe ser ala ser
151

545
TGT GTT CCC GGT GCA GAT AAA GGA CAG TTC CCC AAC CTC TGT GCG GTC
cys val pro gly ala asp lys gly gla phe pro asn leu cys arg leu
177

594
TGT GCG GCG ACA GCG GAA AAC AAA TGT GCG TTC TCC TCC CAG GAA CCG
cys ala gly thr gly glu asp lys cys ala phe ser ser gla glu pro
193

642
TAC TTC AGC TAC TCT GGT GCC TTC AAG TGT CTC AGA GAC GCG GCT GGA
tyr phe ser tyr ser gly ala phe lys cys leu arg asp gly ala gly
209

690
GAC GTG GCT TTT ATC AGA GAG AGC ACA CTC TTT GAC CAC CTC TCA GAC
asp val ala phe ile arg glu ser thr val phe glu asp leu ser asp
225

738
GAG GCT GAA AGG GAC GAG TAT GAG TTA CTC TCC CCA GAC AAC ACT CCG
glu ala glu arg asp glu tyr glu leu leu cys pro asp asn thr arg
241

786
AAG CCA CTG GAC AAG TTC AAA GAC TGC CAT CTC GCC CCG GTC CCT TCT
lys pro val asp lys phe lys asp cys his leu ala arg val pro ser
257

834
CAT GCC GTT CTG TCA CGA ACT GTC AAT GGC AAG GAG GAT GCC ATC TCC
his ala val val ala arg ser val asn gly lys glu asp ala ile trp
273

882
AAT CTT CTC GCG CAG GCA CAG GAA AAG TTT GGA AAG GAC AAG TCA CCG
asn leu leu arg gln ala gln glu lys phe gly lys asp lys ser pro
289

930
AAA TTC CAG CTC TTT GGC TCC CCT AGT GCG CAG AAA CAT CTG CTC TTC
lys phe gln leu phe gly ser pro ser gly gln lys asp leu leu phe
305

978
AAG GAC TCT GCC ATT GGG TTT TCG AGG CTG CCC CCG AGG ATA GAT TCT
lys asp ser ala ile gly phe ser arg val pro pro arg ile asp ser
321

1026
GGC CTC TAC CTT GCG TCC GCG TAC TTC ACT GCC ATC CAG AAC TTC AGC
gly leu tyr leu gly ser gly tyr phe thr ala ile gla asn leu arg
337



1074

AAA AGT GAG CAG GAA GTG GCT GCC CGG CGT GCG CGG CTC GTG TGG TGT
lys ser glu glu glu val ala ala arg arg ala arg val val trp cys
353

1122

GCC GTG GGC GAG CAG GAG CTG CGC AAG TGT AAC CAG TGG ACT GCC TTC
ala val gly glu glu glu leu arg lys cys asn gln trp ser gly leu
369

1170

AGC GAA GGC AGC GTG ACC TGC TCC TCG GCC TCC ACC ACA GAG GAC TCC
ser glu gly ser val thr cys ser ser ala ser thr thr glu asp cys
385

1218

ATC GCC CTG GTG CTG AAA GGA GAA GCT GAT GCC ATG AGT TTC GAT GGA
ile ala leu val leu lys gly glu ala asp ala met ser leu asp gly
401

1266

GGA TAT CTG TAC ACT GCA GGC AAA TGT GGT TTC GTG CCT GTC CTG GCA
gly tyr val tyr thr ala gly lys cys gly leu val pro val leu ala
417

1314

GAG AAC TAC AAA TCC CAA CAA AGC AGT GAC CCT GAT CCT AAC TGT GTG
glu asn tyr lys ser gln gln ser ser asp pro asp pro asn cys val
433

1362

GAT AGA CCT GTG GAA GGA TAT CTT GCT GCG GCC GTG GTT AGG ACA TCA
asp arg pro val glu gly tyr leu ala val ala val val arg arg ser
449

1410

GAC ACT AGC CTT ACC TGG AAC TCT GTG AAA GCC AAG AAG TCC TCC CAC
asp thr ser leu thr trp asn ser val lys gly lys lys ser cys his
465

1458

ACC GCC GTG GAC AGG ACT GCA GGC TGG AAT ATC CCC ATG GCC CTG CTC
thr ala val asp arg thr ala gly trp asn ile pro met gly leu leu
481

1506

TTC AAC CAG ACG GCC TCC TGC AAA TTT GAT GAA TAT TTC AGT CAA ACC
phe asn gln thr gly ser cys lys phe asp glu tyr phe ser gln ser
497

1554

TGT GCC CCT GGG TCT GAC CCG AGA TCT AAT CTC TGT GCT CTG TGT ATT
cys ala pro gly ser asp pro arg ser asn leu cys ala leu cys ile
513

1602

GCC GAC GAG CAG GGT GAG AAT AAG TGC GTC CCC AAC ACC AAT CAG ACA
gly asp glu gln gly glu asn lys cys val pro asn ser asn glu arg
529



1650
TAC TAC GGC TAC ACT GGG GCT TTC CGG TGC CTC GCT GAC AAT GCT GGA
tyr tyr gly tyr thr gly ala phe arg cys leu ala glu asn ala gly
545

1698
GAC GTT GCA TTT GTG AAA GAT GTC ACT GTC ITG CAG AAC ACT GAT GGA
asp val ala phe val lys asp val thr val leu gln asn thr asp gly
561

1746
AAT AAC AAT GAG GCA TGG GCT AAG GAT TTG AAG CTG GCA GAC TTT GCG
asn asn asn glu ala trp ala lys asp leu lys leu ala asp phe ala
577

1794
CTG CTG TGC CTC GAT GGC AAA CGG AAG CCT GTG ACT GAG GCT AGA ACC
leu leu cys leu asp gly lys arg lys pro val thr glu ala arg ser
593

1842
TSC CAT CTT GCC ATG GCC CCG AAT CAT GCC GTG GTG TCT CGG ATG GAT
cys his leu ala met ala pro asn his ala val val ser arg met asp
609

1890
AAG CTG GAA CCC CTG AAA CAG GTG CTG CTC CAC CAA CAG GCT AAA TTT
lys val glu arg leu lys gln val leu leu his gln gla ala lys phe
625

1938
GGG ACA AAT CGA TCT GAC TGC CCG GAC AAG TTT TGC TTA TTC CAG TCT
gly arg asn gly ser asp cys pro asp²lys phe cys leu phe gln ser
641

1986
CAA ACC AAA AAC CTT CTC TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG GCC AGA
glu thr lys asn leu leu phe asn asp asn thr glu cys leu ala arg
657

2034
CTC CAT GCC AAA ACA ACA TAT GAA AAA TAT TTG GGA CCA CAG TAT GTC
leu his gly lys thr thr tyr glu lys tyr leu gly pro gln tyr val
673

2082
GCA GGC ATT ACT AAT CTG AAA AAG TGC TCA ACC TCC CCC CTC CTG GAA
ala gly ile thr asn leu lys lys cys ser thr ser pro leu leu glu
689

2130
GCC TGT GAA TTC CTC AGG AAG TAA
ala cys glu phe leu arg lys *** ACCGAA GAAGATGGCC CAGCTCCCA
705

2180
AGAAAGCCTC AGCCATTCAC TGCCCCCAGC TCTTCTCCCC AGGTGTGTG GGGCCTTGGC

2240
TCCCCTCCTC AAGGTGGGA TTGCCATCC ATCTGCTTAC AATTCCTGC TGTGCTTAA

2300
GCAAGAGTA AATGAGAAA TTTTGTGAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA