

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 793884 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 793884

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 12.12.1979

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 12.12.1979

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.01.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

26.12.1978 US 972_705

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Cetus Corporation**, 600 Bancroft Way, Berkeley, California, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Gelfand, David Harow**, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Vakaita runsaasti jäljentyviä plasmideja.

Stabila plasmider med stort kopieantal.

Cetus Corporation, 600 Bancroft Way, Berkeley,
Kalifornia, Yhdysvallat

Stabiileja runsaasti jäljentyviä plasmideja, niiden muodostaminen ja käyttö proteiinien tuotannossa - Stabila plasmider med stort kopieantal, deras bildande och användning i proteinproduktion

Keksintö on molekyylibiologian alalta ja erityisesti sen kohteena on menetelmä heterologisen DNA:n koodaamien proteiinituotteiden syntetisoitumismäärien lisäämiseksi kloonausvektoreissa.

Geneettinen muutos voi tapahtua umpimähkäisesti jossakin geenissä tapahtuvien mutaatioiden seurauksena. Muutoksen seurauksena geenissä voi vastaava muutos tapahtua sen koodaamassa proteiinissa, mikä muuttaa organismin saamia ominaisuuksia. Yhdistelmä-DNA-tekniikalla tällaisia geneettisiä muutoksia voidaan tehdä tarkoituksellisesti viemällä tunnettu nukleotidisekvenssi yhdestä kannasta tai lajista toiseen. Tunnettu nukleotidisekvenssi voidaan valita antamaan joku haluttu ominaisuus kannalle tai lajille, johon se on viety. Kun modifioitu kanta tai laji jatkaa normaalia replikaatioprosessiaan, se tällöin jäljentää myös liitetyn sekvenssin.

Eräs tavallisesti käytetty rekombinaatti-DNA-menetelmä käsittää plasmidi-kloonousvektorin kaksirihmaisen DNA:n avaamisen

halutussa kohdassa, johon vieras DNA halutaan insertoida. Tämän tekemiseksi käytetään tavallisesti erikoistyyppisiä proteiineja, joita nimitetään restriktioentsyymeiksi. Tietyt restriktioentsyymit katkaisevat DNA:n määrättyjen nukleotidisekvenssien kohdalta. Jos kaksi erityyppistä DNA:ta katkaistaan samalla tavalla, ovat avoimet päät siten komplementaarisia ja tarttuvat sopivissa olosuhteissa yhteen rinnakkain sijaitsevien täydentyvien päiden kanssa. Ne voidaan sitten sitoa yhteen entsyymaattisesti ligaasilla. Tämä tekee mahdolliseksi insertoida eli "pujoa yhteen" vieras DNA-segmentti mistä tahansa lähteestä plasmidi-kloonausvektorin haluttuun kohtaan.

Kaikki DNA, olipa se peräisin mikrobeista tai monimutkaisista kasveista tai eläimistä, koostuu samoista identtisistä nukleotidisarjoista. Siten, kun DNA-osanen, joka on peräisin vieraasta lähteestä, liitetään plasmidiin, tämä plasmidi voidaan viedä sopivaan isäntämikro-organismiin. Jotta isäntäorganismi pystyisi jäljentämään insertoidun DNA:n, täytyy yhdistelmä-DNA liittää isäntään tavalla, että se tulee isännän geneettisen järjestelmän osaksi. Tällaisen insertion ja transformoinnin jälkeen isännän replikaatiojärjestelmä jäljentää lisätyn segmentin yhdessä alkuperäisen isännän DNA:n kanssa.

Bakteerin Escherichia coli yhteydessä on käytetty kahta sopivan tyyppistä kloonausvälittäjää. Escherichia coli-bakteerilla on, DNA-pääketjun eli kromosomin lisäksi usein plasmideja tai yksi tai useampi itsenäisesti replikoituva virustyyppi, joka tunnetaan lambda-bakteriofagina (fagi), jotka pystyvät infektoimaan Escherichia coli'n ja tulemaan osaksi sen geneettistä systeemiä. Rekombinantti-DNA-menettelyissä ryhmää erilaisia plasmideja ja fageja käytetään kloonausvälittäjinä. Tämä käsittää plasmidien tai fagien eristämisen bakteereista, eristetyn DNA:n avaamisen restriktioentsyymeillä, heterologisen DNA-pätkän insertion plasmidiin tai fagiin, plasmidi- tai fagi-rakenteen ympyrän muodon palauttamisen ja plasmidin tai fagin palauttamisen Escherichia coli-soluun.

Kun plasmidi tai fagi transformoi isännän, plasmidin tai fagin tuoma vieras eli heterologinen DNA ei ainoastaan jäljenny sukupolvesta toiseen, vaan tuottaa myös proteiinia, jota se koodaa. Tämä edellyttää tietenkin oikeata lukusuuntaa ja promoottorien olemassaoloa. Heterologisen DNA:n transformoinnin seurauksena muodostuneen proteiinin määrä riippuu käytetyn prosessin suuruudesta ja tehokkuudesta käyttäen hyväksi proteiinituotantoa ja modifioitujen

isäntäbakteerien replikaatiota. Toinen tekijä, joka liittyy tuotetun proteiinin määrään, on proteiinin tuotannon määrä tai tehokkuus kussakin bakteerissa. Heterologisen DNA:n tuottamien ainesten suhde isännän oman DNA:n tuottamaan aineeseen on tyypillisesti sama solusta soluun ja sukupolvesta toiseen.

Monissa bakteerityypeissä on tyypillisesti olemassa vain yksi kloonausvälittäjän kopio bakteerisolua kohti. Ts. on vain yksi ainoa plasmidi solukromosomia kohti. Joitakin plasmideja on kuitenkin olemassa suuremmalla kopioluvulla kuin yksi. Esimerkiksi plasmidi Co1EI esiintyy tyypillisesti 10-20 plasmidikopiona kromosomia kohti Escherichia coli:ssa.

Tällaisten mutanttien käyttö proteiinin tuottamiseksi eksogeenisestä DNA:sta voi usein epäonnistua, mikä johtuu lukuisista deleetioista tärkeillä alueilla plasmideissa.

On esitetty myös muita suuren kopioluvun plasmideja. Esimerkiksi Nordström et al., EP-patenttihakemus 0.003.062 esittää lämpötilasensitiivisiä plasmideja, joilla on suuri jäljentymiskyky ja joita voidaan käyttää heterologisen DNA:n tuottamiseen. Valitettavasti tällaiset plasmidit näyttävät osoittautuvan suuren kopioluvun plasmideiksi ainoastaan korkeissa lämpötiloissa. Näyttää myös siltä, että Nordström'in et al. esittämät lämpötilasensitiiviset suuren kopioluvun plasmidit vaativat myös proteiini-synteesiä osaksi replikaation säätelystä vapautumista, mikä johtaa niiden lisääntyneisiin lukumääriin korotetuissa lämpötiloissa. Tämän takia tällaiset plasmidit eivät ole toivottuja tietyissä olosuhteissa, erityisesti suurimittakaavaisissa teollisissa sovellutuksissa. Tämä johtuu siitä, että monet tällaiset alan aikaisemmat plasmidit eivät ole stabiileja, ne voivat vaatia rikastettuja väliaineita oikeata amplifikaatiota varten tai ne voivat vaatia isäntämikro-organismien laajaa viljelyä log-vaiheessa ennenkuin tyydyttävä amplifikaatio saavutetaan lämpötilan muutoksella. Lisäksi jotkut alan aikaisemmista plasmideista, jotka ovat lämpötilasensitiivisiä, suuren kopioluvun plasmideja vaativat toistettuja kasvu/laimennusvaiheita, ennen kuin amplifikaatio saavutetaan.

Tämä keksintö koskee suuren kopioluvun plasmidikloonausvektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia proteiinien teollista tuotantoa varten. Nämä plasmidit ovat uusia verrattuna alan aikaisempiin lämpötilasensitiivisiin suuren kopioluvun plasmideihin, koska

tämän keksinnön mukaisesti suuren kopioluvun plasmidit eivät tarvitse lämpötilan muutosta heterologisen DNA:n ekspressoimisen aloittamiseksi. Tämän keksinnön mukaisesti suuren kopioluvun plasmidit eivät myöskään tarvitse proteiinisynteesiä osaksi replikaation säätelystä vapautumista. Sen sijaan tämä keksintö koskee DNA-plasmidia, joka käsittää heterologisen geenin ja inaktivoivan konfiguraation, joka estää transkription plasmidin replikaation primeerijuoste-geeniin saakka. Tämän keksinnön mukainen plasmidi on DNA-plasmidi, joka käsittää replikaation aloituskohdan, ekspression aloituskohdan, segmentin heterologista DNA:ta liitettynä ekspression aloituskohtaan, ja on koodattu ja oikeassa lukusuunnassa halutun proteiinin muodostamiseksi, sekä modifioidun repressorigeenin, joka mahdollistaa replikaation suurina kopiomäärinä, ja jolle on tunnusomaista, että tässä plasmidissa on myös inaktivoitikonfiguraatio, joka estää transkription geeniin asti replikaation primeerijuostetta varten.

Keksinnön kohteena on menetelmä kyvyn lisäämiseksi tuottaa proteiinia, jota heterologinen DNA tuottaa plasmidikloonausvälittäjässä, jonka menetelmän mukaisesti valikoidaan plasmidin mutantteja, joissa on modifioituja repressorigeenejä, jotka tekevät mahdolliseksi replikaation suurella kopioluvulla, ja menetelmälle on tunnusomaista, että näillä plasmideilla on myös inaktivoiva konfiguraatio, joka estää transkription geeniin asti replikaation primeerijuostetta varten.

Lisäksi keksintö käsittää halutun proteiinin tuottamista varten menetelmän, jonka mukaisesti plasmidi, jota on käsitelty edellä esitetyllä menetelmällä, viedään transformoituvan isäntäorganismien geneettiseen systeemiin ja annetaan organismin kasvaa ja fenotyypillisesti ekspressoida sen geenityyppejä.

Keksintöä kuvataan ja valaistaan edelleen viitaten oheisiin piirroksiin, joissa:

kuva 1 on diagramma plasmidista pBGP120;

kuva 2 esittää kopiomutanttiplasmidia, joka on johdettu kuvan 1 plasmidista, jossa on tapahtunut deleetio;

kuvat 3 ja 4 ovat diagrammeja kahdesta plasmidi-muodosta, jotka on konstruoitu keksinnön mukaisesti ja

kuva 5 on plasmidin pOP9 restriktioentsyymi-kartta.

Keksinnön plasmidi käsittää hyvin yleisesti DNA-sekvenssin,

joka sisältää replikaation aloituskohdan 11, kohdan 12 replikaation primeerijuosteen muodostamista varten, kohdan 13 läpiluku-ekspressoinnin aloittamiseksi ja heterologisen DNA-segmentin, joka on liitetty ekspressoimisen aloituskohtaan ja oikeaan lukusuuntaan antamaan haluttu proteiini. Sekvenssillä on lisäksi inaktivoiva konfiguraatio. Inaktivoiva konfiguraatio, kuten sitä tässä käytetään, tarkoittaa transkription estämistä plasmidin replikaation primeerijuosteeseen asti. Inaktivoivat konfiguraatiot voivat käsittää voimakkaan lopetussignaalin sijoittamisen operonin päähän, jota käytetään ekspressoimaan heterologinen geeni. Se voi käsittää myös promoottorin, jota käytetään heterologisen geenin transkription aloittamiseen, kääntämiseen niin, että transkription aloitussuunta tältä promoottorilta on poispäin replikaation primeerijuosteen aloituskohdasta. Inaktivoinnin tuloksena syntyy plasmidi, jolla on suuri jäljentymiskyky ja joka on stabiili, koska deletiot on pääasiallisesti vältetty.

Esimerkki I

Keksinnön mukaisia stabiileja runsaasti jäljentyviä plasmideja

Konstruoitaessa keksinnön mukaisia plasmideja valitaan plasmideja, jotka ovat käyttökelpoisia kloonausvektoreina. Joitakin tällaisia plasmideja ovat kuvanneet Bolivar ja Backman julkaisuissa *Methods in Enzymology*, 68:245-267 (1968). O'Farrell et al., *J. Bacteriology* 134(2): 645-654 (1978) kuvaavat myös plasmidin, joka on käyttökelpoinen kloonausvektorina. Tämä plasmidi, pBGP120, sisältää isäntäbakteereille synnynnäisen lac-promoottorin ja lac-operonin funktionaalisen osan, ja se loppuu EcoR1-restriktioentsyymi-kohtaan 14 lac-operonin beta-galaktosidaasigeenissä. Tämä osa voidaan liittää restriktiokohdassa 14 heterologiseen geeniin, joka on suunnattu samaan suuntaan ja jolla on sama lukusuunta, niin että läpiluku voi tapahtua lac-operonilta heterologiseen geeniin asti samassa lukusuunnassa.

Plasmidi pBGP120 esiintyy korkeilla n. 10-20 plasmidin/solukromosomi kopiokopioitasoilla. Plasmideja, jotka pystyvät esiintymään vieläkin suuremmilla kopiokopioitasoilla, voidaan valita alan aikaisemmilla tyypillisillä menetelmillä. Tällaiset menetelmät käsittävät plasmidi-DNA:n tuottaman kloonatun tuotteen määrien titraamisen.

Suuren kopiomäärän antavien ominaisuuksien läsnäolon stimuloimiseksi on päätelty, että tyypillisesti juuri "repressori", jonka tuottaa plasmidin itsensä "repressori"-geeni 16, pitää kopiomäärän pienenä, eikä mikään positiivinen säätely, joka antaa stimuloivan vaikutuksen, joka ylläpitää kasvaneen kopiomäärän. Ks. Cabello et al., Nature, 259:285-290 (1976). Tätä keksintöä käytetään edullisesti plasmidiin, jossa tämäntyyppinen negatiivinen säätely on läsnä. Tyypillisesti tarvitaan useita peräkkäisiä seulontavaiheita suurina kopiomäärinä esiintyvien mutanttien valikoimiseksi. Toisin sanoen keksinnölle on tärkeätä, että suuren kopiomäärän antava ominaisuus on synnynnäinen itse plasmidille eikä ole tulos joidenkin nimenomaisten isäntäbakteerien ainutlaatuisesti omaamasta funktiosta. Joka tapauksessa valikoidulla plasmidilla on mutaatio "repressori"-geenissä 16 (kuva 2), joka johtaa suureen kopiomäärään, ts. yli 10-20 kopioon kromosomia kohti.

On havaittu, että näin valikoiduissa plasmideissa, silloinkin, vaikka ne esiintyvät suurina kopiomäärinä, miltei poikkeuksetta tapahtuu plasmidin olennaisten osien ei-toivottuja deletioita, ts. ne ovat pysymättömiä. Itse asiassa plasmidin ratkaisevien osien, kuten promoottorin, joka edistää liitetyn heterologisen DNA:n transkriptiota, puuttumisesta on seurauksena, että plasmidi ei pysty muodostamaan haluttua proteiinia. Suuren kopioluvun plasmidin deletio-muoto on esitetty kuvassa 2. Nähdään, että lac-promoottori ja suuri osa lac-operonista puuttuu, EcoR1-kohtaan 14 liitetty DNA voi replikoitua, mutta transkriptiota ei enää voida säätää lac-promoottorilta.

Replikaatio ei ala itsestään kuvassa 1 esitetystä plasmidi-replikaation aloituskohdasta 11. Ks. Tomizawa ja Selzer, Ann. Rev. Biochem. 48:999-1034 (1979). Sen sijaan on replikaation aloittamiseksi tarpeen kehittää replikaation primeeri-RNA-juoste. Tämän RNA-primeerijuosteen transkriptio alkaa replikaation primeerijuosteen aloituskohdasta 18, joka sijaitsee EcoR1-kohdan 14 ja repressorin 16 välissä. Se transkriboituu vastapäivään ulommalla DNA-juosteella 12 ja, normaalitapauksissa, loppuu plasmidin replikaation aloituskohdassa 11. Todellisuudessa tehdään kuitenkin suuri joukko RNA-primeerijuosteita, jotka ulottuvat aloituskohdan 11 yli. Jotta

replikaatio tapahtuisi, näitä RNA-primeerijuosteita täytyy käsitellä juosteiden tasoittamiseksi ja epäolennaisen aineksen poistamiseksi. On osoitettu, että repressorin 16 on RNA-segmentti, joka estää RNA-replikaation primeerijuosteiden käsittelyä ylimääräisten RNA-molekyylien tasoittamiseksi juosteista. Niinmuodoin replikaatio ei pysty alkamaan aloituskohdassa 11. Tämä repressorin RNA on tehty sisäjuosteesta, kuten kuvassa 1 on esitetty, myötapäivään, esitettynä nuolella 20.

Kuvassa 1 esitetyn tyyppisissä suuren kopiolumen mutanteissa tapahtuu plasmideissa deleetioita tuloksena läpiluku-transkriptiosta, joka aloitetaan lac-promoottorista (syklisen AMP:n säätelyn alaisena) vastapäivään, kuten on esitetty kuvassa 1, replikaation primeerijuostegeeniin asti ja sen läpi. Solu joko menettää plasmidin olemalla jäljentämättä sitä tai solu torjuu lac-promoottorin sopivilla deleetioilla.

Lac-promoottorin transkriptiosuunta on esitetty kuvissa 1, 3 ja 4 nuolella 19. Primeerijuosteiden transkriptio tapahtuu samaan suuntaan kuin lac ja on osoitettu nuolella 22. Kopiomäärä ei yksinään riitä aikaansaamaan instabiilisuutta, koska mutanti on melko stabiili, ts. täysikokoinen soluissa, joissa tapahtuu lac-transkriptioita alhaisilla tasoilla. Pikemminkin instabiilisuus, ts. deleetiot, ovat suhteessa läpiluku-transkriptioon, joka alkaa lac-promoottorista (tai muusta promoottorista, jota käytetään heterologisen geenin transkription aloittamiseen) ja joka jatkuu replikaation primeerijuostegeeniin asti ja sen läpi.

Koska instabiilisuus on suhteessa promoottorin aloittamaan läpikulku transkriptioon, joka jatkuu replikaation primeerijuostegeeniin saakka ja sen läpi, voidaan käyttää menetelmiä stabiilien, täysikokoisten mutanttien kehittämiseksi. Eräs menetelmä on lopettaa läpiluku-transkriptio lac-promoottorista tai muusta promoottorista, jota käytetään heterologisen geenin transkription aloittamiseen, ennenkuin se saavuttaa replikaation primeerijuostegeenin, sijoittamalla sopiva transkriptioneellinen "lopetus"-signaali liitetyn heterologisen geenin jälkeen. Tämä voidaan tehdä tunnettuja menetelmiä käyttäen. Ks. yleisesti Bolivar ja Backman julkaisussa Methods in Enzymology 6:245-267 (1979). Ks. myös Beck et al., Nucleic Acids Res 5:4495-4503 (1978).

Myös erästä toista menetelmää voidaan käyttää suurina kopiomäärinä esiintyvien mutanttien stabilointiin. Kuten edellä esitettiin on syytä siihen, että replikaation primeerijuosteen transkriptio häiriintyy, läpiluku-transkriptio promoottorista, jota käytettiin heterologisen geenin transkription aloittamiseen. Toinen menetelmä on siten kääntää tämä promoottori ympäri niin, että se transkriboi poispäin replikaation primeerijuostegeenin alueelta.

Tämä keksinnön seikka voidaan kuvata plasmidilla pBGP120. Viitaten kuvaan 1 nähdään, että lac-operoni on EcoR1- ja HindIII-restriktioentsyymi-kohtien 14 ja 29 vastaavasti hakasuluilla katkaissena. Käytettäessä keksinnön tätä menetelmää plasmidi pBGP120 pilkotaan näillä kahdella restriktioentsyymillä, EcoR1 ja HindIII. DNA-osaset, jotka syntyvät tällaisesta entsyymi-uutosta, erotetaan sitten koon mukaan. Ks. yleisesti Bolivar ja Backman julkaisussa Methods in Enzymology 68:245-267 (1979). Lac-fragmentti valikoidaan ja sekoitetaan sitten HindIII-EcoR1-bifunktionaalisten liittäjien kanssa. Ks. Rothstein et al. julkaisussa Methods in Enzymology 68:98-109 (1979). Kuten on tunnettua, on näissä liittäjissä avoin HindIII-kohta avoimessa päässä ja avoin EcoR1-kohta toisessa päässä. Tietynä prosenttimääränä ajasta toinen liittäjistä kiinnittyy lac-fragmentin kumpaankin päähän. Ne liittyvät paikoilleen kovalenttisesti. Tämä osanen voidaan nyt yhdistää uudelleen toiseen plasmidi pBGP120-osaseen ja valikoidaan ne plasmidit, joissa uudelleenkytketyillä osasilla on toivottu vastakkainen suuntautuminen. Koska transkriptio nyt tapahtuu poispäin primeeri-kohdasta, on plasmidi stabiili.

Vielä eräs lisämuutos tarvitaan heterologisen DNA:n liittämiseksi näin konstruoituihin plasmideihin. Nähdään, että edellä kuvattu suunnan vaihto jättää kaksi EcoR1-kohtaa kumpaankin päähän (ja myös kaksi HindIII-kohtaa). Ei-toivotut EcoR1-kohdat ja HindIII-kohdat poistetaan sopivilla tunnetuilla menetelmillä, kuten DNA:n osittaisuutolla, mitä seuraa eksonukleaasi-käsittely. Ks. Polisky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3900-3904 (1976). Nämä plasmidit voidaan nyt valikoida suurina kopiomäärinä esiintyvien mutanttien suhteen. Stabiileja suurina kopiomäärinä esiintyviä mutantteja voidaan käyttää teolliseen käyttöön, jossa bakteereita transformoidaan tuottamaan haluttuja geenituotteita. Halutut geenituotteet voivat olla hyödyllisiä proteiineja, kuten ihmisen insuliinia,

ihmisen kasvuhormonia ja erilaisia interferoneja.

Esimerkki II

Suurina kopiomäärinä esiintyvän plasmidin, joka sisältää promoottorin heterologisia geenituotteita varten ja joka transkriboi pois päin replikaation primeerijuostegeenin alueelta, konstruointi

Plasmidi pOP9 on ColE1-johdannais-plasmidi, joka on valmistettu ColE1-plasmidista pOP6, jonka ovat kuvanneet Gelfand et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5869-5873 (1978) tunnettujen geenimanipulaatiomenetelmien mukaisesti. Plasmidin pOP9 pilkontakartta on esitetty kuvassa 5. Plasmidilla pOP9 on perustava suuri kopio-luku, se on stabiili ja sitä voidaan käyttää heterologisten DNA-osasten ekspressointiin yhdistyneinä polypeptideinä joko beta-laktamaasigeeni- tai tetrasykliiniresistenssigeeni-tuotteissa.

Taulukossa I esitetään informaatiosekvenssin lukusuunta useiden erilaisten restriktioendonukleaasi-tunnistussekvenssien poikki tetrasykliini (Tc)- tai ampisilliini (Amp)-geeneissä. Lisäksi taulukossa I annetaan informaatio lukusuunnan muuttamiseksi joko S1-nukleaasikäsitelyllä, "täyttö" ("fill-in"-korjauskäsitelyllä tai osittaisella korjaus ja S1-käsitelyllä.

Taulukko I (sivuilta 12 ja 13)

Konstruoitaessa suurina kopiomäärinä esiintyvä plasmidi, joka sisältää promoottorin heterologisia geenituotteita varten ja joka transkriboi pois päin replikaation primeerijuostegeenin alueelta, substituointiin erittäin tehokas, ravitsemuksellisesti säädetty promoottori plasmidiin pOP9. Nimenomaan Cerratia marcescens trp-promoottori kloonattiin plasmidiin pOP9, niin että promoottori aloitti transkription pois päin ColE1-primeeripromoottorilta. Cerratia marcescens trp-promoottori saatiin 101 emäsparin (bp) EcoR1/HindIII-osasena, joka sisältää Cerratia marcescens trp-promoottorin suorat kaksitoistot plasmidista, joka on nimetty pGW1:ksi. Plasmidia pMS9 uutettiin täydennettäväksi HindIII:lla, päät korjattiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-osasella kaikkien neljän deoksinukleosiditriposfaatin (dA, dG, dC, dT) läsnäollessa, uutettiin Pst:lla ja suurempi 3685 Emäsparin osanen eristettiin kuten edellä. Nämä kaksi puhdistettua DNA-osasta liitettiin yhteen, ensin olosuhteissa, joissa päät olivat komplementaariset, ja sitten tylppäpäiset.

Ligandi-DNA:ta käytettiin transformoimaan Escherichia coli K12-kanta MM294 ampisilliiniresistentiksi. Plasmidi pGW1 tunnistettiin 4540 emäsparin monomeeri-ympyräksi, joka sisälsi yhdet ainoat EcoR1- ja HindIII-tunnistuskohdat. Kaksoisuutto EcoR1- ja HindIII:lla vapautti 210 bp:n DNA-osasen ja uutto HpaI:llä vapautti 105 bp:n DNA-osasen, mikä vahvisti Cerratia marcesens trp-promoottori-osasten tandemisoitumisen.

Yksinkertaiset tai kaksoistandem-Cerratia marcesens trp-promoottori-osaset liitettiin plasmidiin pOP9. Plasmidia pOP9 uutettiin täydentämistä varten EcoR1:llä ja HindIII:llä ja suurempi 4,95 kiloemäsparin (kb) DNA-osanen eristettiin. EcoR1/HindIII:llä leikattu pOP9 vektori-DNA-osanen liitettiin joko EcoR1/HindIII:llä leikattuun 105 Bp:n yksinkertaiseen Cerratia marcesens trp-promoottori-DNA-osaseen pMS9:stä, tai 210 bp:n kaksois-Cerratia marcesens trp-promoottori-DNA-osaseen, joka oli eristetty pGW1:stä. Liitettyä DNA:ta käytettiin transformoimaan Escherichia coli K12-kanta MM294 ampisilliiniresistentiksi. Plasmidi pCS1 tunnistettiin 5,05 kb:n monomeeriksi, jossa oli yksi ainoa EcoR1-, HpaI- ja HindIII-kohta. Uuttaminen EcoR1:llä ja HindIII:llä vapautti 105 bp:n DNA-osasen, joka ryhmittyi yhteen Cerratia marcesens trp-promoottorin kanssa, joka eristettiin pMS9:stä. Plasmidi pCS2 tunnistettiin 5,15 kb:n monomeeriksi, jossa on yksi ainoa EcoR1- ja HindIII-kohta. Kaksoisuutto EcoR1:llä ja HindIII:lla vapautti 210 bp:n DNA-osasen ja uutto HpaI:llä vapautti 105 bp:n DNA-osasen, joka ryhmittyi yhteen DNA-osasten kanssa, jotka vapautuivat pGW1:stä samanlaisen käsittelyn jälkeen. Plasmidit pCS1 ja pCS2 olivat stabiileja Escherichia coli:ssa. Siten sekä yksinkertainen että kaksois-tandem-Cerratia marcesens trp-promoottori on kloonattu perustavaan suurina kopiomäärinä esiintyvään plasmidiin; kaikissa tapauksissa plasmidi pysyy stabiilina Escherichia coli:ssa. Kummassakin tapauksessa transkription aloitussuunta on pois päin ColE1 primeeri-RNA-promoottorilta ja kohti tetrasykliiniresistenssi-funktioita.

Esimerkki III

Tämän keksinnön stabiilit suurina kopiomäärinä esiintyvät plasmidit voivat olla myös lämpötila-sensitiivisiä.

Joskus on hyödyllistä, että on käytettävissä lämpötila-sensitiivisiä (Ts) suurina kopiomäärinä esiintyviä mutanteja.

Tämä siksi, että heterologisen DNA:n proteiinituotteiden suur-
tuotannolla voi olla vahingollisia vaikutuksia isäntäsoluihin.
Lämpötila-sensitiivisissä runsaasti jäljentyvissä mutanteissa
alhainen kopioluku säilyy, kun isäntäsolut kasvatetaan "sallivassa"
lämpötilassa, joka on tavallisesti suhteellisesti alempi. Kun
heterologisen DNA:n tuotetta halutaan suurempi määrä, lämpötilaa
muutetaan. Lämpötilan muutos on tavallisesti lisäys. Tässä ei-
sallivassa tai rajoittavassa lämpötilassa mutaatio näkyy ja plasmidin
kopioluku kasvaa, mistä on seurauksena lisääntynyt proteiinin tuo-
tanto näistä plasmideista.

Lämpötila-sensitiiviset mutantit ovat harvinaisia, mutta
niitä voidaan löytää melkein jokaiselle mutanttityypille sopivalla
valikoinnilla, tämän keksinnön suurina kopiomäärinä esiintyvät
plasmidit mukaanlukien.

Ensin suurina kopiomäärinä esiintyvän mutantin sijainti
määritetään hienokartoittamalla, geneettistä rekombinaatiota käyt-
tämällä. Kun sijainti on tunnettu, kohta mutagenoidaan spesifisesti.
Tämä voidaan tehdä nukleotidimodifioinnilla, ks. Bahl, U.S. patentti
4.351.901, tai leikkaamalla alue pois restriktioentsyymeillä,
mutagenoimalla fragmentti voimakkaasti joillakin aineilla, kuten
bisulfiitilla, hydroksyyliamiinilla tai ultraviolettisäteilytyksellä
ja sijoittamalla fragmentti takaisin paikoilleen. Saadut plasmidit
transformoidaan soluihin, jotka tuottavat ylimäärin lac-repressoria.
Nämä levitetään sitten Xgal-levyille sallivissa lämpötiloissa.
Siniset alueet poistetaan viljelystä. Sitten, korotetuissa lämpö-
tiloissa, ilmestyvät uudet siniset alueet ovat lämpötilasensitiivisiä
mutantteja. Tällaiset lämpötilasensitiiviset mutantit kerätään
käytettäväksi haluttujen geenituotteiden teollisessa tuotannossa.

Siten voidaan nähdä, että keksintö antaa parannettuja
plasmideja, jotka pystyvät olemaan olemassa ja jäljentymään suurella
kopioluvulla ja antamaan oikean proteiinisynteesin. Suurella
kopioluvulla tarkoitetaan tyypillisesti yli 50 plasmidia kromosomia
kohti ja edullisesti 100:sta 500:aan plasmidia tai enemmän. Plasmidit
tekevät siten mahdolliseksi saada hyvin suuren proteiinituotannon
heterologisesta DNA:sta. Seurauksena tästä tällaiset plasmidit ovat
äärimmäisen hyödyllisiä heterologisten geenituotteiden teollista
tuotantoa varten.

Erilaiset keksinnön muunnokset tässä esitettyjen ja kuvattujen lisäksi käyvät alaan perehtyneille selviksi edellä esitetystä selityksestä ja oheisista piirroksista. Tällaiset muunnokset on tarkoitettu kuulumaan oheisten patenttivaatimusten piiriin.

Patenttivaatimukset:

1. DNA-plasmidi, joka käsittää replikaation aloituskohdan, geenin replikaation primeerijuosteen muodostamista varten, ekspression aloituskohdan, segmentin haluttua proteiinia koodaavaa heterologista DNA:ta, joka on kytketty mainittuun ekspression aloituskohtaan oikeassa lukusuunnassa halutun proteiinin muodostamiseksi, ja modifioidun repressorigeenin, joka mahdollistaa replikoitumisen suurena kopiomääränä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi sisältää myös inaktivointikonfiguraation, joka estää transskription replikaation primeerijuosteen geeniin saakka.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että inaktivointikonfiguraatio käsittää konfiguraation, jossa ekspression aloituskohta ja heterologinen DNA ovat suuntautuneet niin, että niiden transskriptio tapahtuu vastakkaiseen suuntaan kuin replikaation primeerijuosteen geenin transskriptio.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että inaktivointikonfiguraatio käsittää konfiguraation, jossa transskription päätesekvenssi sijaitsee heterologisen DNA:n ja replikaation primeerijuostegeenin välissä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu repressorigeeni on modifioitu niin, että muodostuu puutteellinen repressor.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu repressorigeeni on modifioitu niin, että ei muodostu lainkaan repressor.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu ekspression aloituskohta käsittää translaation aloituskohdan sekä ainakin olennaisen osan geeniä, joka on syntyperäinen isäntäbakteerilajille, jolloin läpiluku voi tapahtua mainitusta syntyperäisestä geeniosasta mainittuun heterologiseen DNA:han saakka.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää suurena kopiomääränä esiintyvän mutanttirepressorigeenin, joka on lämpötilasensitiivinen.

8. Menetelmä proteiinin tuotannon lisäämiseksi heterologisen DNA:n avulla, joka on sijoitettu plasmidikloonausvektoreihin, jotka sisältävät replikaation aloituskohdan, geenin replikaation primeerijuosteen muodostusta varten, ekspression aloituskohdan sekä heterologisen DNA:n insertiokohdan, joka sijaitsee alavirtaan ekspression aloituskohdasta, t u n n e t t u siitä, että valitaan mainitun plasmidikloonausvektorin sellaiset mutantit, jotka sisältävät modifioituja repressori-geenejä, jotka mahdollistavat replikoitumisen suurina kopiomäärinä, insertoidaan heterologinen DNA mainittuihin plasmidikloonausvektoreihin heterologisen DNA:n insertiokohtaan, joka sijaitsee alavirtaan ekspression aloituskohdasta, niin että heterologinen DNA on promoottorin säätelyn alaisena ja oikeassa lukusuunnassa muodostaakseen heterologisen DNA:n koodaamaa proteiinia, jolloin mainitut mutanttiplasmidikloonausvektorit inaktivoidaan niin, että transskriptio heterologisesta DNA:sta replikaation primeerijuosteen plasmidigeeniin saakka inhiboituu, näitä inaktivoituja mutantteja käytetään sopivien isäntäorganismien transformointiin, ja transformoitujen isäntäorganismien muodostama heterologinen proteiinituote otetaan talteen.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transskriptio heterologeenisesta DNA:sta replikaation primeerijuosteen plasmidigeeniin saakka inhiboidaan suuntaamalla promoottori ja heterologinen DNA siten, että niiden transskriptio tapahtuu vastakkaiseen suuntaan kuin replikaation primeerijuosteen geenin transskriptio.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transskriptio inhiboidaan sijoittamalla transskription päätesekvenssi heterologisen DNA:n ja replikaation primeerijuostegeenin väliin.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kopioituvat mutantit ovat lämpötilasensitiivisiä kopioituvia mutantteja.

12. Menetelmä heterologisen DNA:n koodaaman proteiinin valmistamiseksi isäntämikro-organismissa, t u n n e t t u siitä, että käytetään isäntämikro-organismia, joka sisältää

plasmideja normaalia suurempina kopiomäärinä, jolloin kukin plasmideista käsittää replikaation aloituskohdan, geenin replikaation primeerijuosteen muodostamiseksi, ekspansion aloituskohdan, segmentin haluttua proteiinia koodaavaa heterologista DNA:ta, joka on sijoitettu alavirtaan mainitusta ekspansion aloituskohdasta oikeassa lukusuunnassa halutun proteiinin muodostamiseksi, sekä modifioitun repressorigeenin, joka mahdollistaa replikaation suurina kopiomäärinä, t u n n e t t u siitä, että mainitussa plasmidissa on myös inaktivointikonfiguraatio, joka estää transskription replikaation primeerijuostetta koodaavaan geeniin saakka.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu inaktivointikonfiguraatio käsittää konfiguraation, jossa mainittu ekspansion aloituskohta ja heterologinen DNA ovat suuntautuneet siten, että niiden transskriptio tapahtuu päinvastaiseen suuntaan kuin mainitun replikaation primeerijuosteen geenin transskriptio.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu repressorigeeni on modifioitu niin, että muodostuu puutteellinen repressor.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu repressorigeeni on modifioitu niin, että ei muodostu lainkaan repressoria.

16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu ekspansion aloituskohta käsittää translaation aloituskohdan ja osan geeniä, joka on syntyperäinen isäntäbakteerilajille, jolloin mainittu syntyperäisen geenin osa on sopivan kokoinen varmistaakseen translaation kokonaisuudessaan mainitusta syntyperäisen geenin osasta mainittuun heterologiseen DNA:han saakka.

17. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään suurina kopiomäärinä esiintyvää mutanttirepressorigeeniä, joka on lämpötilasensitiivinen.

18. Proteiini, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksen 12-18 mukaisella menetelmällä.

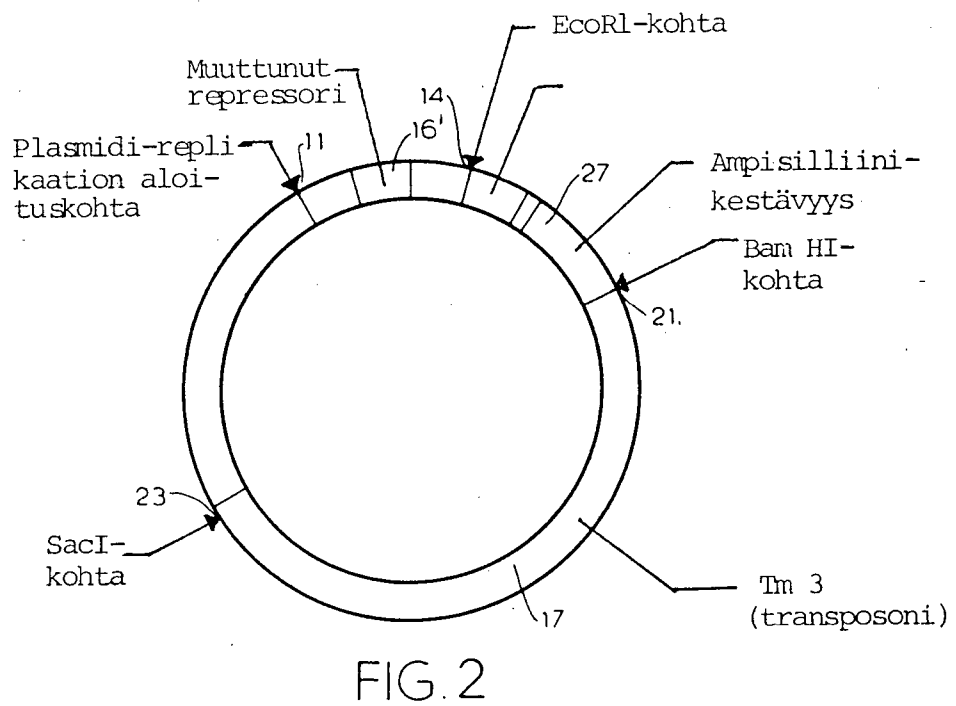
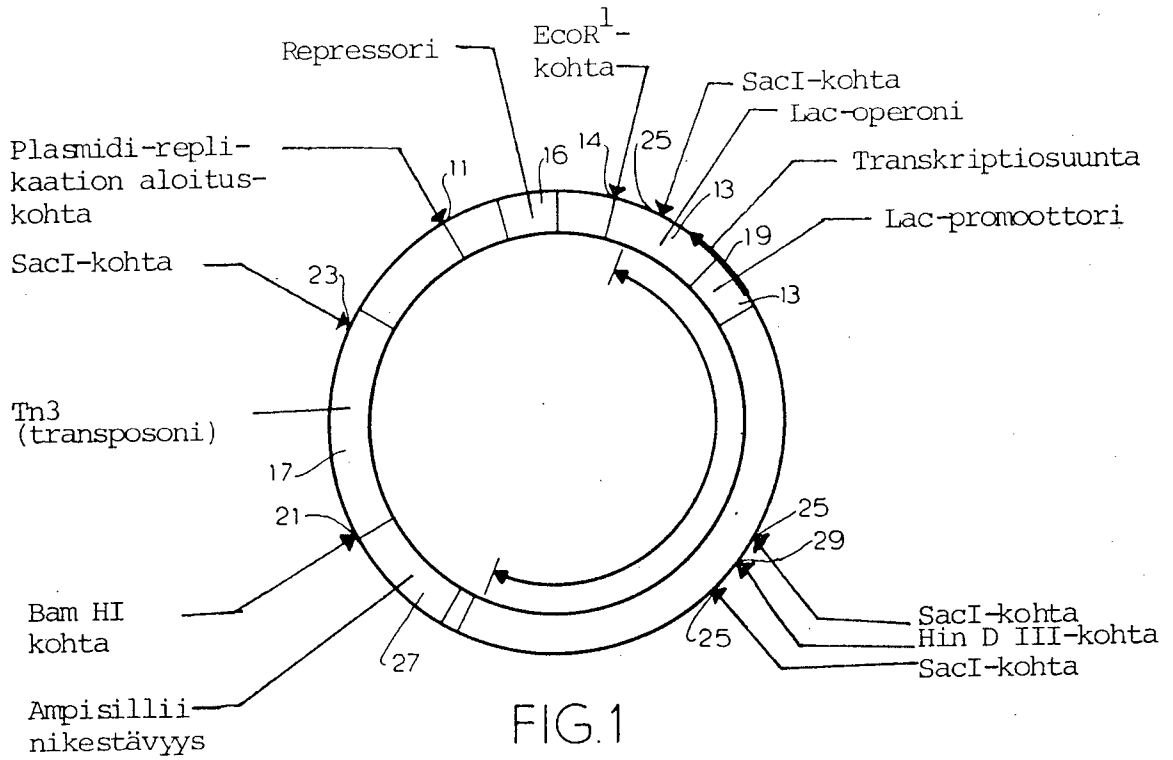


FIG. 3.

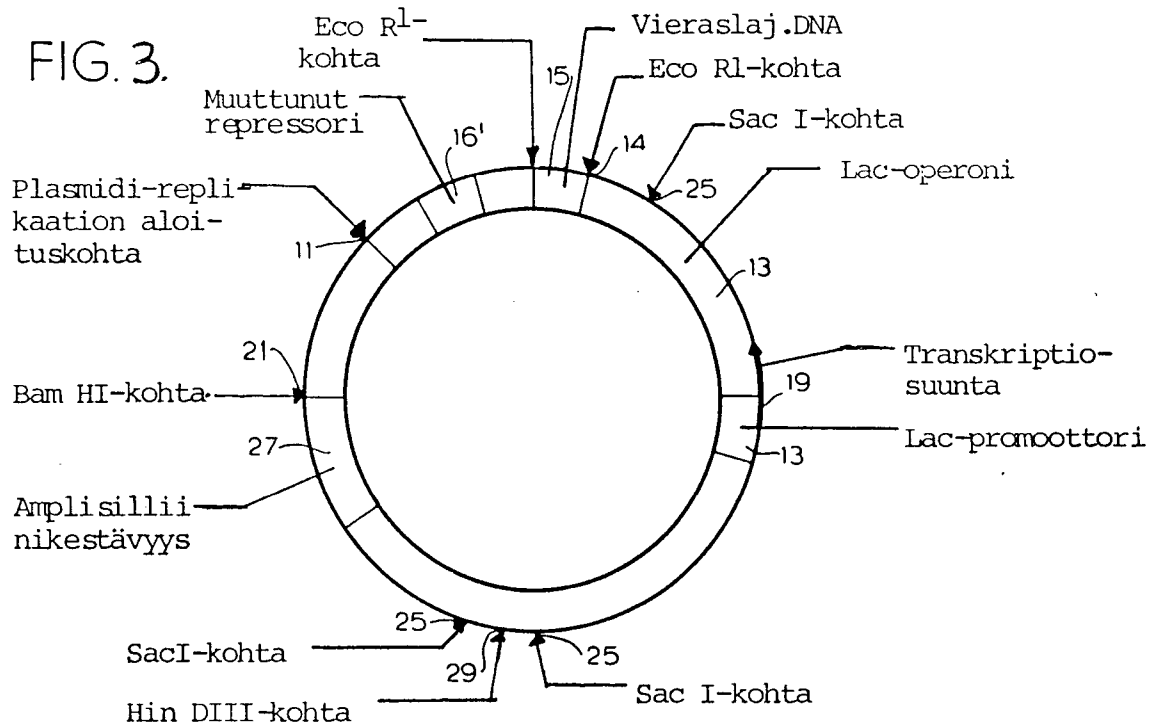
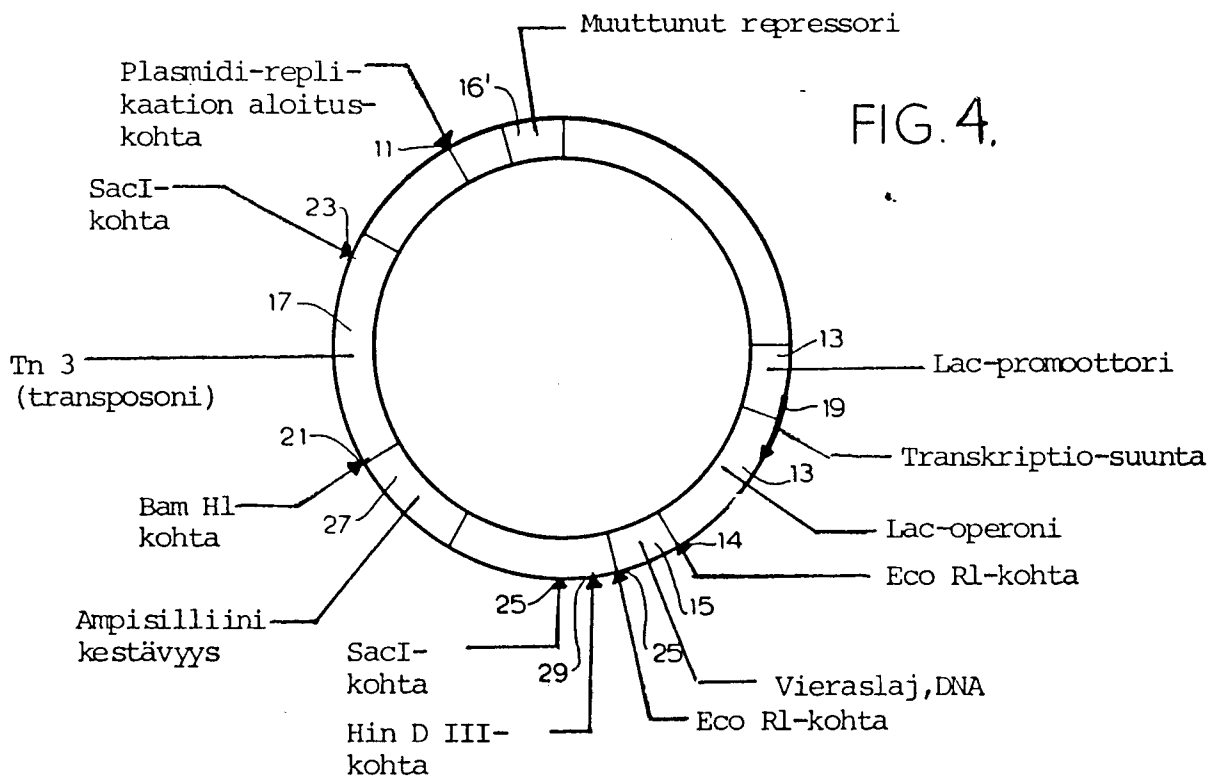


FIG. 4.



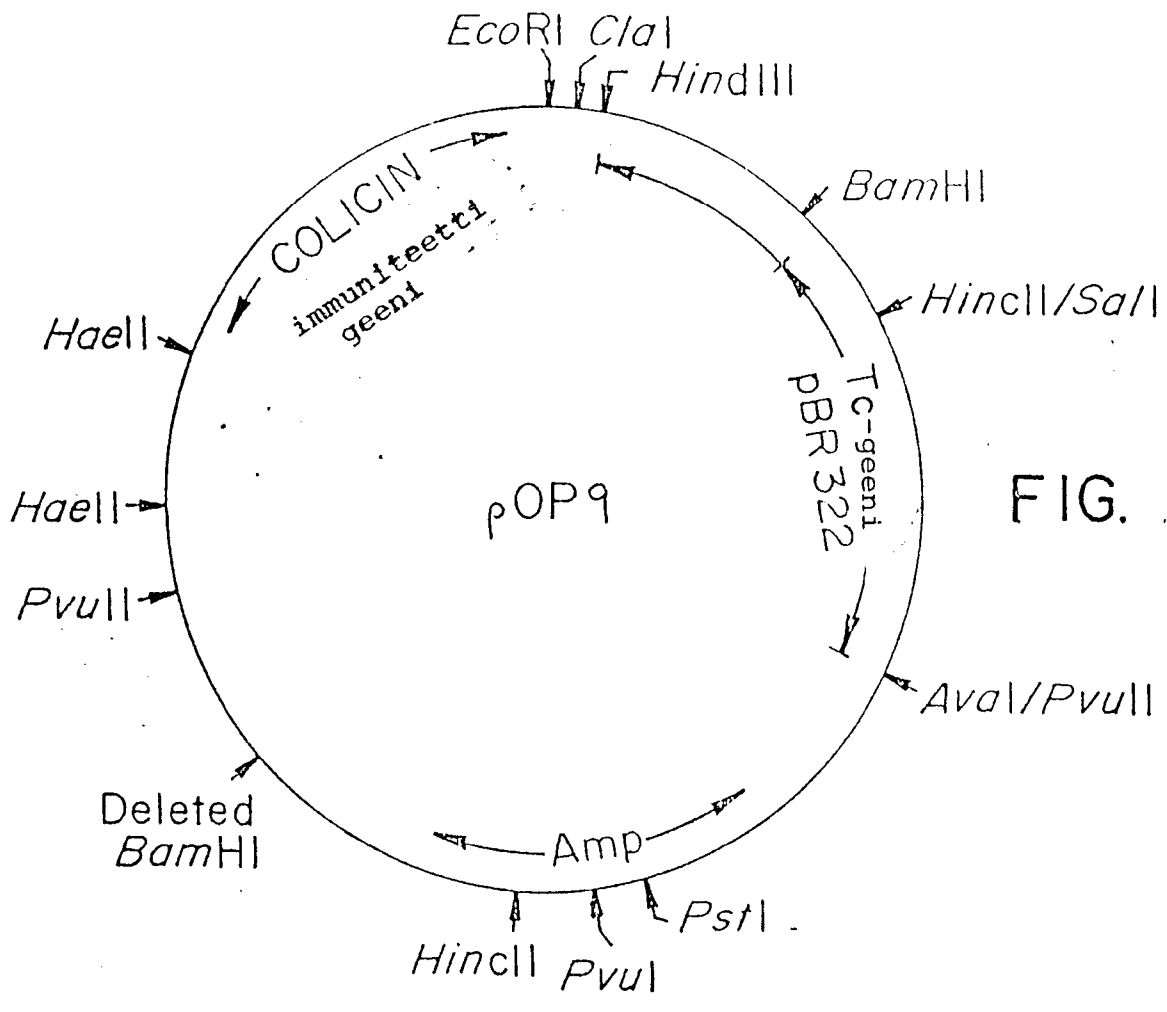


FIG. 5

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitys hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen ja vastauksella kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP _____

WO _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chem. Abstr. vol. 90(1979) 3001 r

— " — 8351 d

Chem. Abstr. vol. 89(1978) 159981 e

" vol. 91(1979) 35558 u

2/5-86 L. Linné

Allekirjoitus