



(12) PATENTANSØGNING

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁷: C 12 N 15/10 C 12 Q 1/68
- (21) Patentansøgning nr: PA 2004 01821
- (22) Indleveringsdag: 2004-11-23
- (24) Løbedag: 2003-05-16
- (41) Alm. tilgængelig: 2004-11-23
- (86) International ansøgning nr: PCT/GB2003/002102
- (86) International indleveringsdag: 2003-05-16
- (85) Videreførelsesdag: 2004-11-23
- (30) Prioritet: 2002-05-17 GB 0211369.4 2002-12-17 US 10/321,195
- (71) Ansøger: Alligator Bioscience AB, Scheelevägen 19a, S-223 70 Lund, Sverige
- (72) Opfinder: Christina Furebring, Iliongrand 147, SE-224 72 Lund, Sverige
Roland Carlsson, Stenaldersvägen 99, S-226 54 Lund, Sverige
Carl Borrebæck, Attevägen 8 A, S-245 62 Hjarup, Sverige
Ann-Christin Malmberg Hager, Jonkopingsgatan 83, S-252 50 Helsingborg, Sverige
- (74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark
-

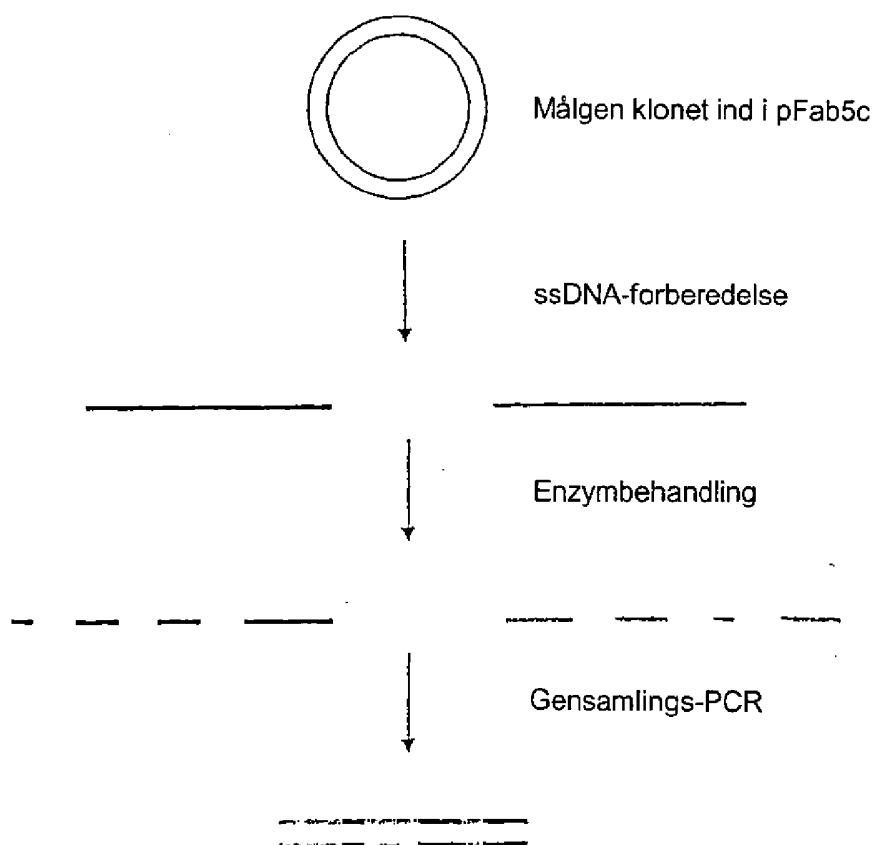
(54) Benævnelse: Fremgangsmåde til in vitro molekylær udvikling af proteinfunktion

(57) Sammendrag:

Fremgangsmåde til frembringelse af en polynukleotidsekvens eller population af sekvenser ud fra enkeltstrengede moderpolynukleotidsekvenser, og som indkoder én eller flere proteinmotiver, idet fremgangsmåden omfatter trinnene, hvor man a) tilvejebringer en første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler og en nummer to population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, idet den første og nummer to populationen tilsammen udgør plus- og minusstrengene af moderpolynukleotidsekvenser; b) udfører en reaktion til fordøjelse af den første og nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler med en exonuklease for at frembringe tilsvarende populationer af enkeltstrengede polynukleotidfragmenter; c) bringer de polynukleotidfragmenter, der er frembragt fra plusstrengene, i berøring med fragmenter, der er frembragt fra minusstrengene; og d) formerer de fragmenter, som hybridiserer til hinanden for at frembringe i det mindste én polynukleotidsekvens, der indkoder én eller flere proteinmotiver, som har ændrede egenskaber sammenlignet med det eller de proteinmotiver, som indkodes af moderpolynukleotiderne, hvorved der i trin b) i det mindste er én parameter i den reaktion, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, der er forskellig fra den eller de ækvivalente parametre, der anvendes i reaktionen til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler. Reaktionsparameteren vælges fortrinsvis blandt exonukleasetypen, exonukleasekoncentrationen,

reaktionsvolumenet, varigheden af fordøjelsesreaktionen, temperaturen af reaktionsblandingen, pH af reaktionsblandingen, længden af de enkeltstrengede moderpolynukleotidsekvenser, mængden af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler og puffersammensætningen af reaktionsblandingen.

FIGUR . 1



PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til frembringelse af en polynukleotidsekvens eller population af sekvenser ud fra enkeltstrengede moderpolynukleotidsekvenser, og som indkoder én eller flere proteinmotiver, idet fremgangsmåden omfatter trinnene, hvor man

5

- a) tilvejebringer en første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler og en nummer to population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, idet den første og nummer to populationen tilsammen udgør plus- og minusstrengene af moderpolynukleotidsekvenser;

10

- b) udfører en reaktion til fordøjelse af den første og nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler med en exonuklease for at frembringe tilsvarende populationer af enkeltstrengede polynukleotidfragmenter;

15

- c) bringer de polynukleotidfragmenter, der er frembragt fra plusstrengene, i berøring med fragmenter, der er frembragt fra minusstrengene; og

20

- d) formerer de fragmenter, som hybridiserer til hinanden for at frembringe i det mindste én polynukleotidsekvens, der indkoder én eller flere proteinmotiver, som har ændrede egenskaber sammenlignet med det eller de proteinmotiver, som indkodes af moderpolynukleotiderne,

hvorved der i trin b) i det mindste er én parameter i den reaktion, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, der er forskellig fra den eller de ækvivalente parametre, der anvendes i reaktionen til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved reaktionsparameteren vælges blandt exonukleasetypen, exonukleasekoncentrationen, reaktionsvolumenet, varigheden af fordøjelsesreaktionen, temperaturen af reaktionsblandingen, pH af reaktionsblandingen, længden af de enkeltstrengede moderpolynukleotidsekvenser, mængden af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler og puffersammensætningen af reaktionsblandingen.

35

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, hvorved den exonuklease, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra den exonuklease, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

5

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, hvorved den exonuklease, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er en 3'-exonuklease og den exonuklease, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler er en 5'-exonuklease.

10

5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved den exonukleasekoncentration der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra den exonukleasekoncentration, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

15

6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved det reaktionsvolumen, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra det reaktionsvolumen, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

20

7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved varigheden af den fordøjelsesreaktion, der anvendes til fordøjelsen af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra varigheden af den fordøjelsesreaktion, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

25

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved temperaturen af den reaktionsblanding der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra temperaturen af den reaktionsblanding, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

30

9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved pH af den reaktionsblanding, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra pH-værdien af den reaktions-

35

blanding, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

10. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved
5 længden af polynukleotiderne i den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler er forskellig fra længden af polynukleotiderne i nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved
10 puffersammensætningen af den reaktionsblanding, der anvendes til fordøjelse af den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler, er forskellig fra puffersammensætningen af den reaktionsblanding, der anvendes til fordøjelse af nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

12. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved
15 mængden af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler i den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler er forskellig fra mængden af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler i nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler.

20

13. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved den første population af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler udgør plusstreng af moderpolynukleotidsekvenser, og nummer to populationen af enkeltstrengede polynukleotidmolekyler udgør minusstreng af moderpolynukleotidsekvenser.

25

14. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved polynukleotidmolekylerne i trin a) er DNA-molekyler.

15. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved trin c)
30 yderligere omfatter, at man tilsætter primersekvenser, som hybridiserer til 3'- og/eller 5'-enderne af i det mindste et af moderpolynukleotiderne under hybridiseringsbetingelser.

16. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved den exonuklease, der anvendes til at fordøje den første og/eller numre to populationen af
35 enkeltstrengede polynukleotidmolekyler er valgt fra gruppen bestående af BAL31,

Exonuklease I, Exonuklease V, Exonuklease VII, Exonuklease T7gen6, bakteriofag lambda exonuklease og Exonuklease Rec J.

17. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved en moderpolynukleotidsekvens eller -sekvenser underkastes mutagenese.

18. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved én eller begge af populationen af fragmenter, der er frembragt i trin b), underkastes mutagenese.

19. Fremgangsmåde ifølge krav 17 eller 18, hvorved mutagenesen er fejltilbøjelig PCR.

20. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved trin b) udføres for at frembringe populationer af enkeltstrengede fragmenter med varierende længder.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 20, hvorved trin b) reguleres for at frembringe en population af enkeltstrengede fragmenter med en gennemsnitlig længde på mere end omkring 50 nukleotider.

22. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav og som yderligere omfatter det trin, hvor man eksprimerer i det mindste én polynukleotidsekvens, der er frembragt i trin d), for at frembringe det indkodede polypeptid.

23. Fremgangsmåde ifølge krav 22 og som yderligere omfatter trinnet, hvor man tester det indkodede polypeptid for ønskede egenskaber.

24. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved moderpolynukleotidsekvensen indkoder et antistof eller fragment deraf.

25. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved moderpolynukleotidsekvensen indkoder et enzym.

26. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, hvorved moderpolynukleotidsekvensen indkoder et antigen.

27. Fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid med ønskede egenskaber, idet fremgangsmåden omfatter de følgende trin:

- 5 a) frembringelse af forskellige former af et moderpolynukleotid ved anvendelse af en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 26;
- b) eksprimerer de forskellige polynukleotider, der er frembragt i trin a), for at frembringe forskellige polypeptider;
- c) screening af de forskellige polypeptider for ønskede egenskaber; og
- 10 d) udvælgelse af et polypeptid med ønskede egenskaber fra de forskellige polypeptider.

28. Polypeptid opnået ved en fremgangsmåde ifølge krav 27.

15 29. Farmaceutisk sammensætning omfattende et polypeptid ifølge krav 28 og en farmaceutisk acceptabel bærer.

30. Polypeptid ifølge krav 28 til anvendelse i medicin.

20 31. Anvendelse af et polypeptid ifølge krav 28 i fremstillingen af et lægemiddel til behandling, terapi og/eller diagnose af en sygdom.

32. Fremgangsmåde til fremstilling af en farmaceutisk sammensætning, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man efter identifikationen af et polynukleotid og/eller et

25 indkodet polypeptid med ønskede egenskaber ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 26, tilsætter polynukleotidet og/eller det indkodede polypeptid til en farmaceutisk acceptabel bærer.

33. Fremgangsmåde som omfatter, at man efter identifikation af et polynukleotid

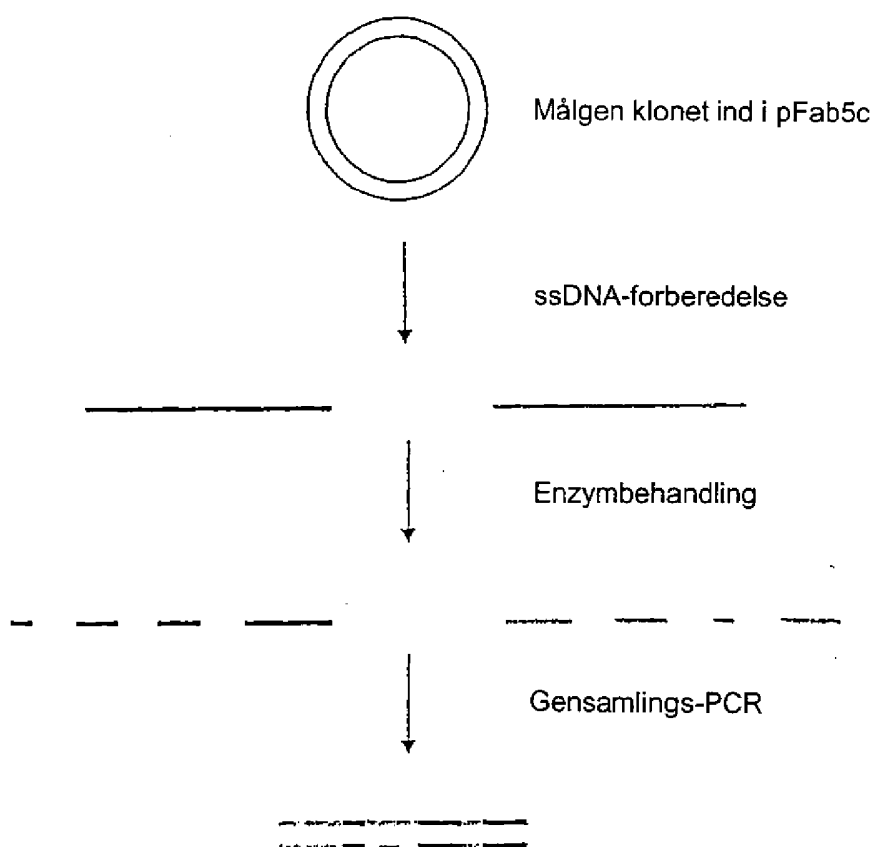
30 og/eller et indkodet polypeptid med ønskede egenskaber ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 26, anvender dette polynukleotid og/eller indkodede polypeptid helt eller delvis inden for medicinen.

34. Fremgangsmåde ifølge krav 33, hvorved anvendelsen inde for medicinen er i

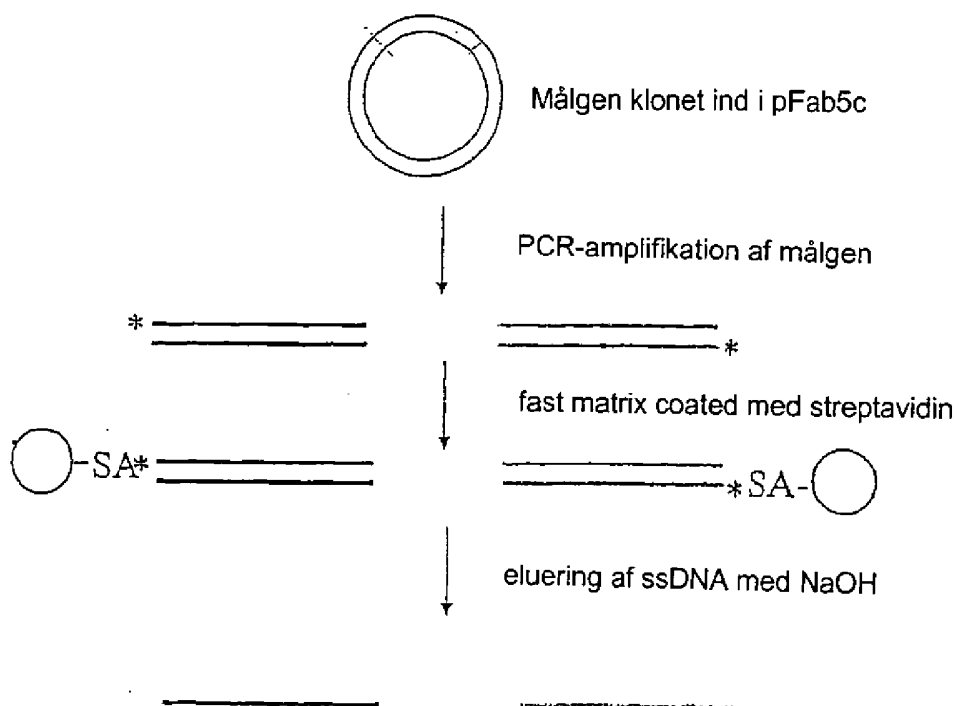
35 behandlingen, terapien og/eller diagnosen af en sygdom.

35. Fremgangsmåde som omfatter, at man efter identifikation af et polynukleotid med ønskede egenskaber ifølge en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 26, anvender dette polynukleotid til påvisning af og/eller forering af et målpolynukleotid i en prøve.

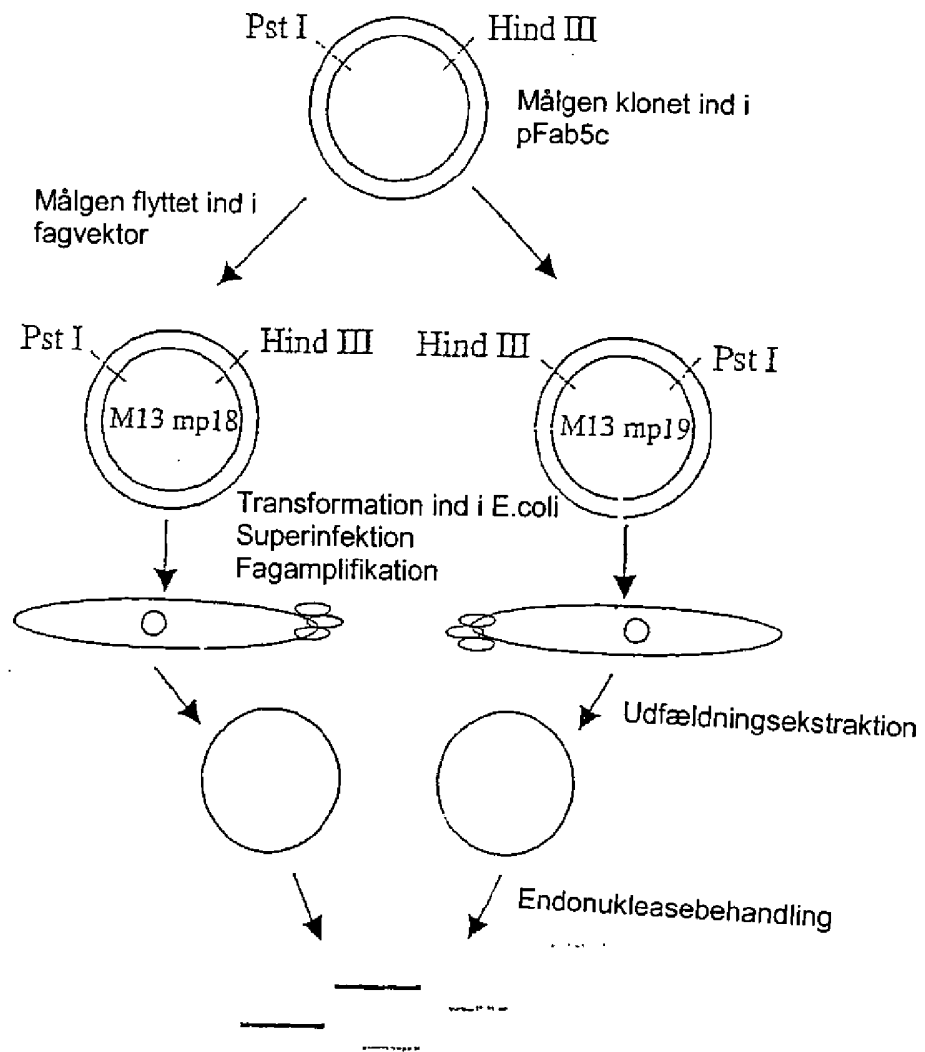
FIGUR 1



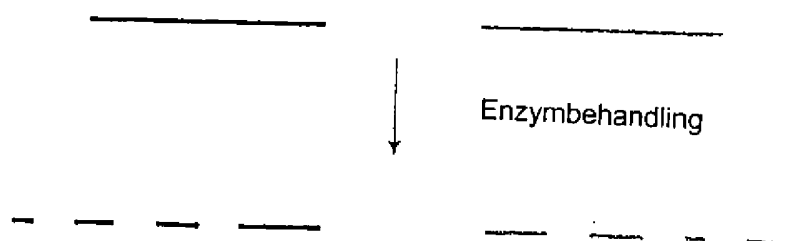
FIGUR 2



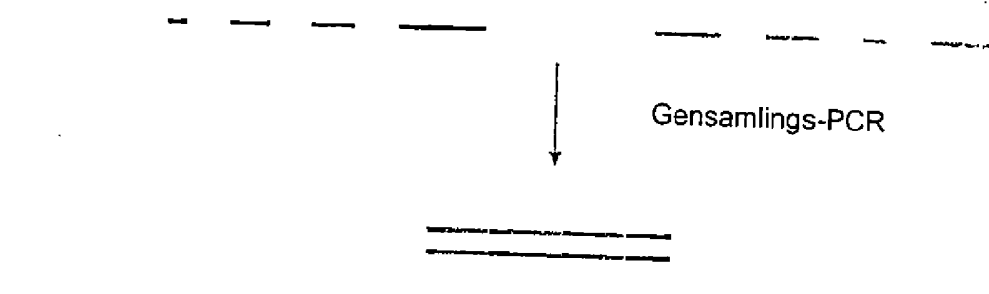
FIGUR 3



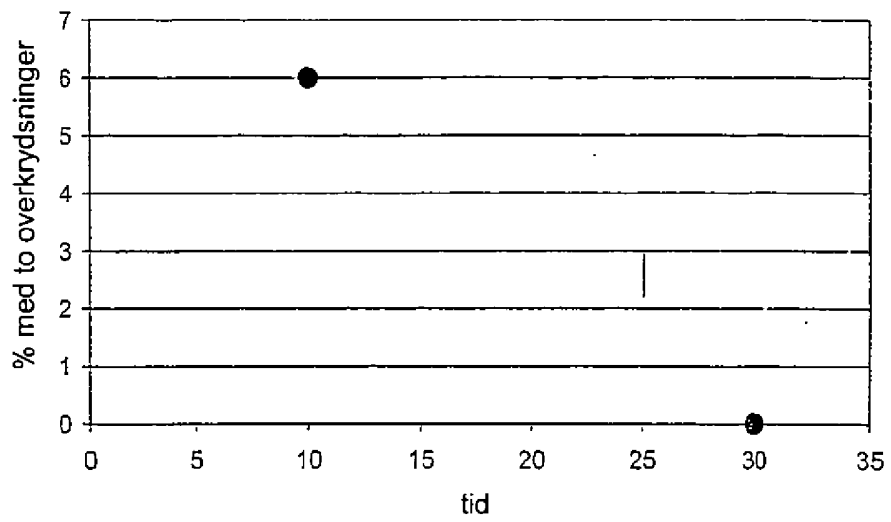
FIGUR 4



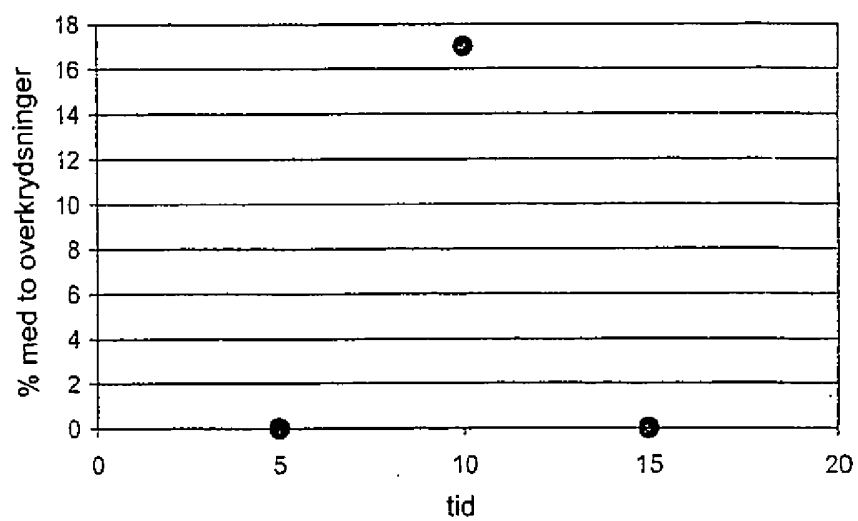
FIGUR 5



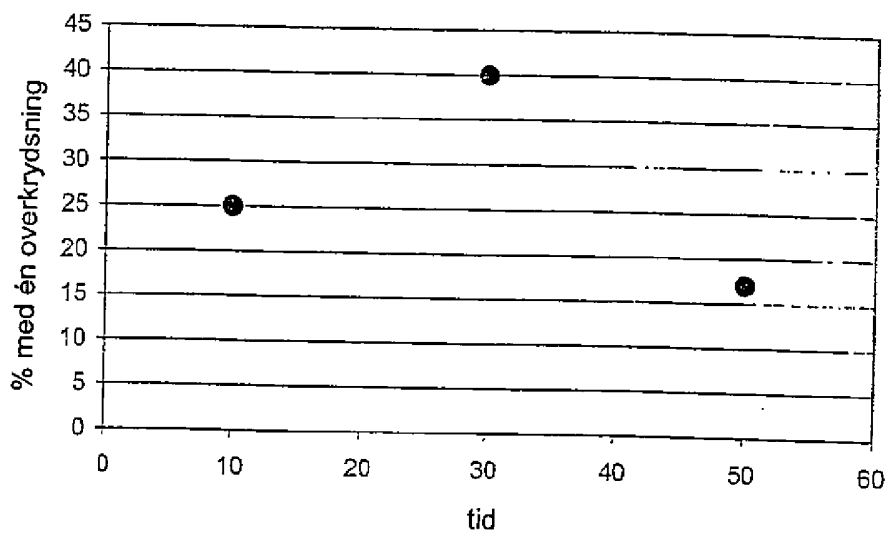
FIGUR 6



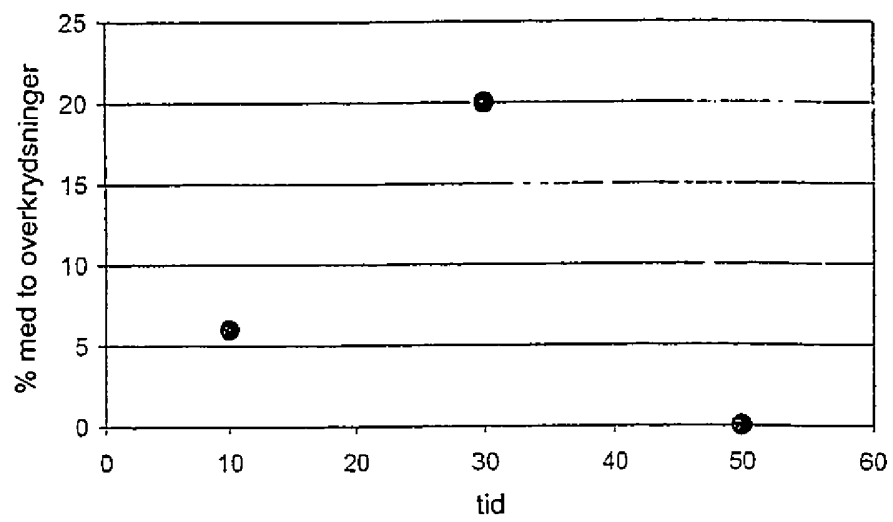
FIGUR 7



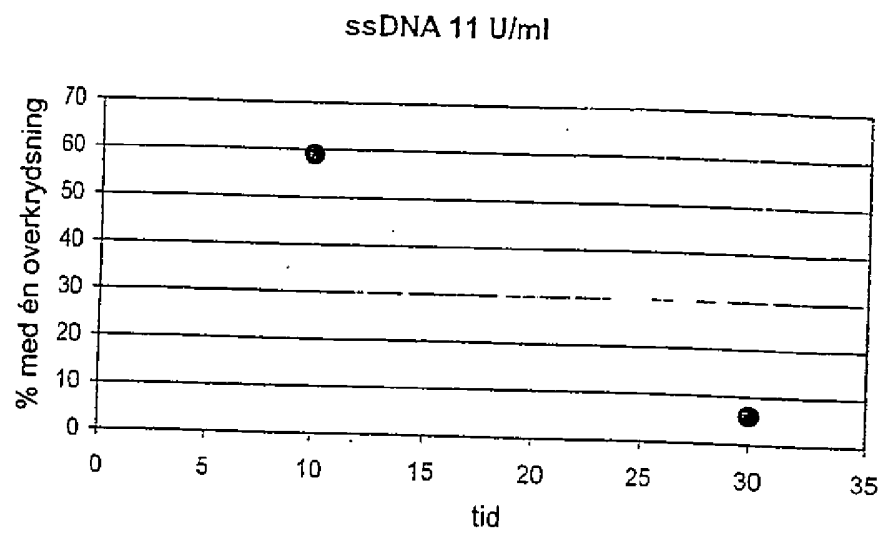
FIGUR 8



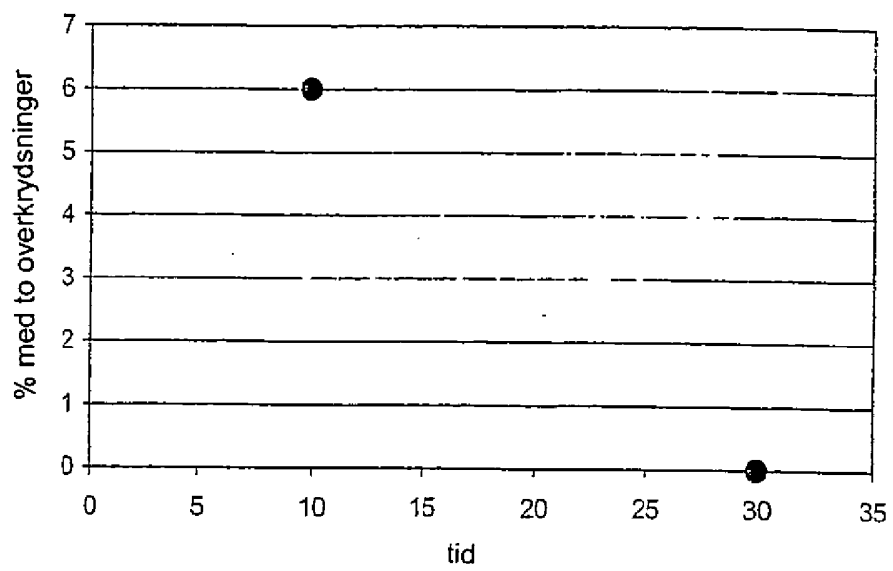
FIGUR 9



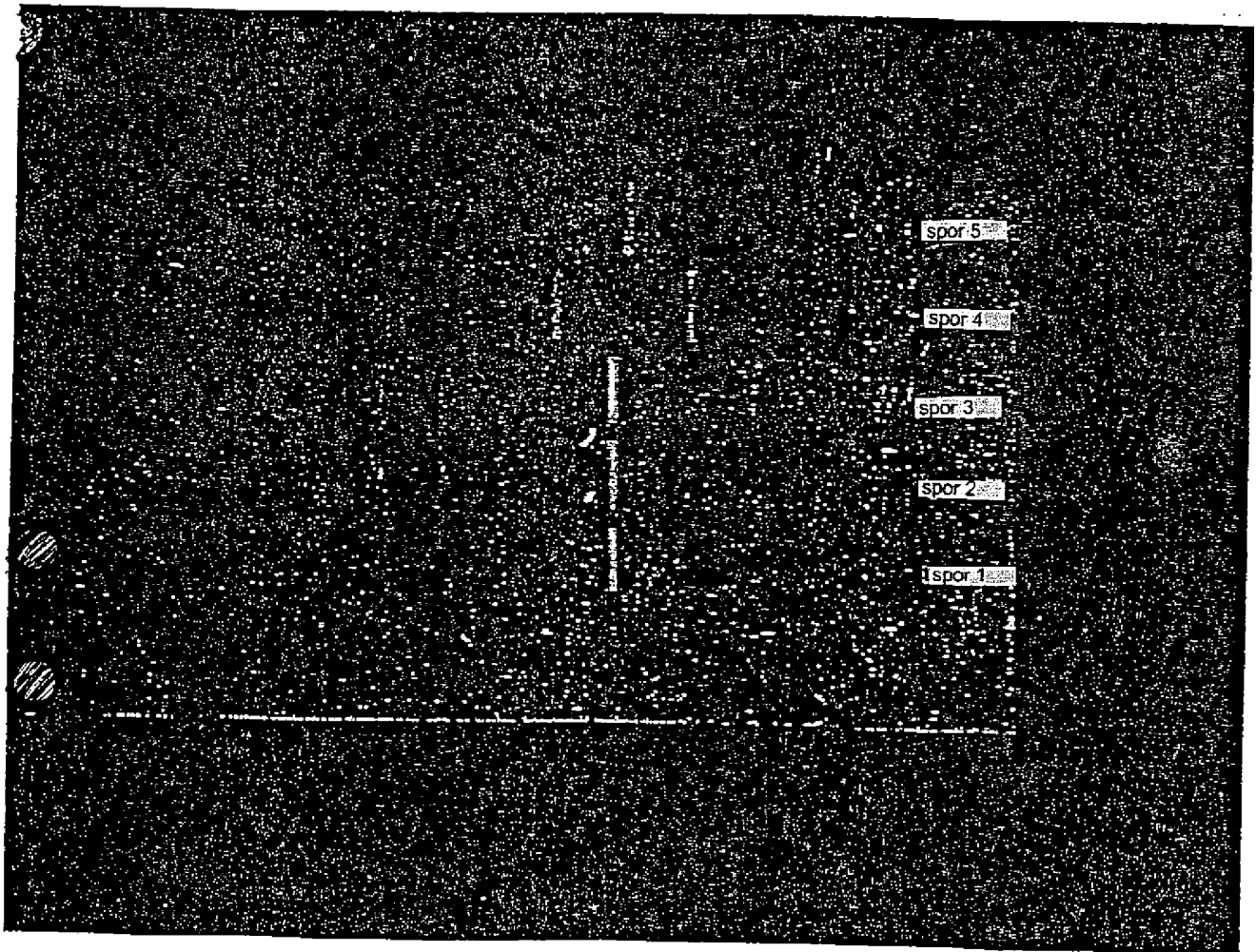
FIGUR 10



FIGUR 11

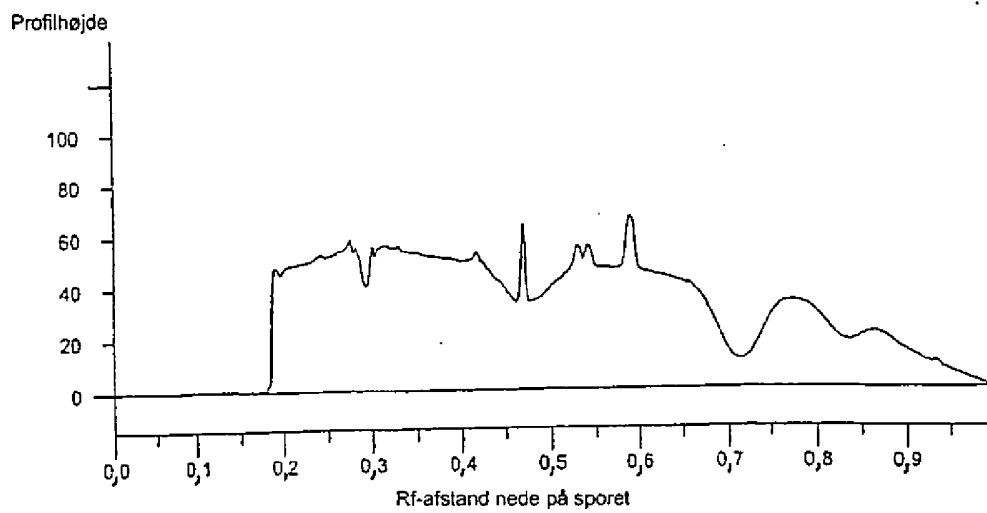
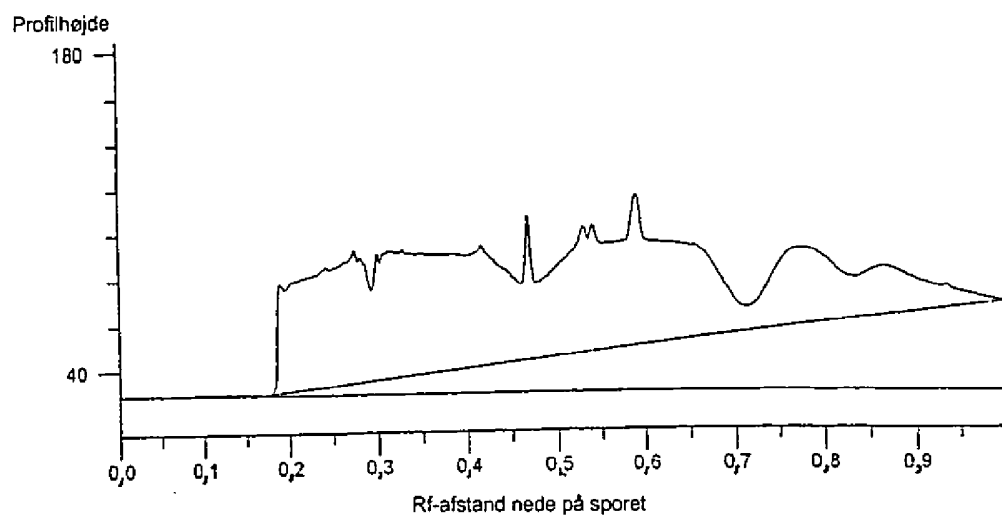


FIGUR 12



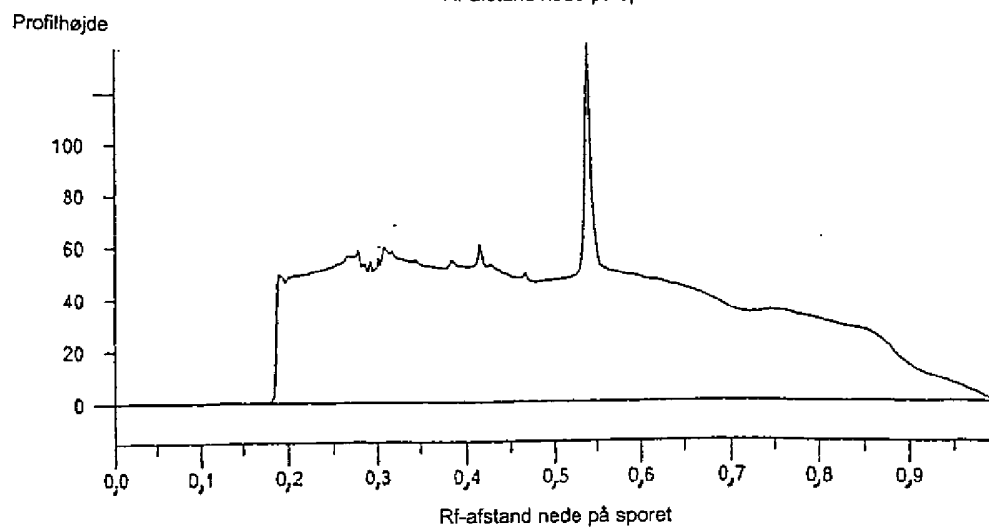
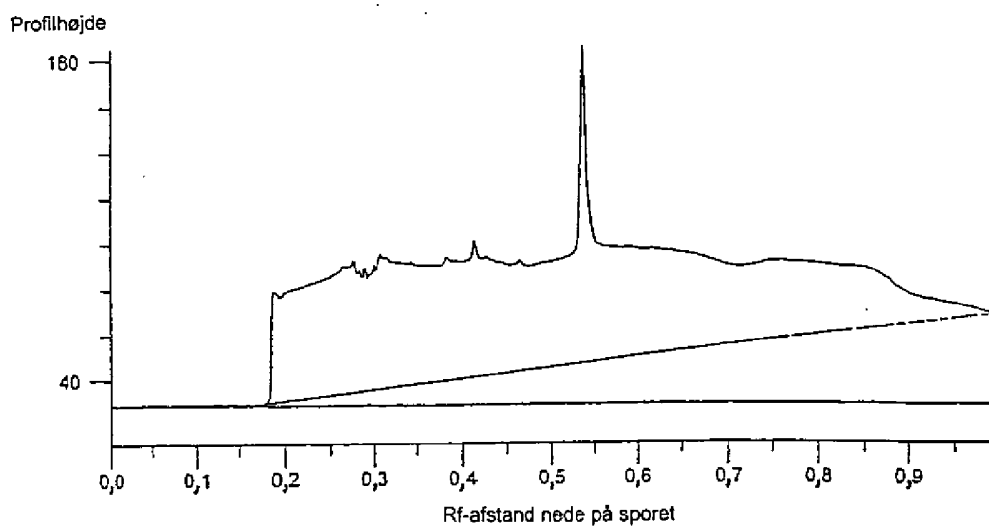
FIGUR 13

Spor 4



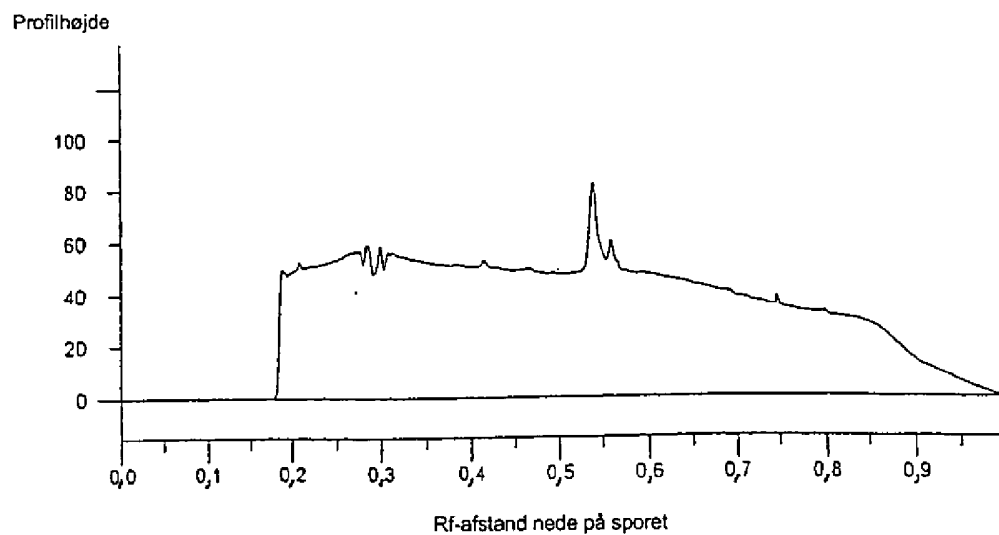
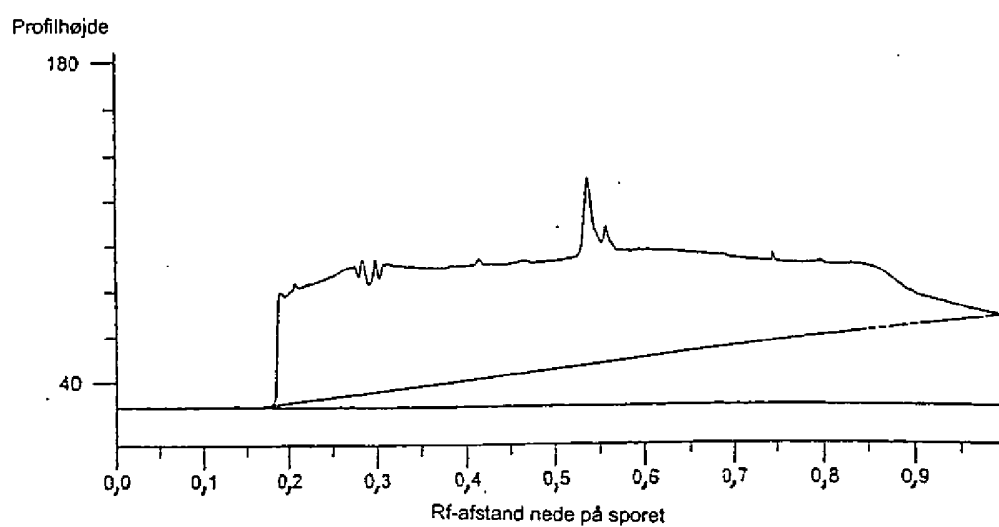
FIGUR 14

Spor 3

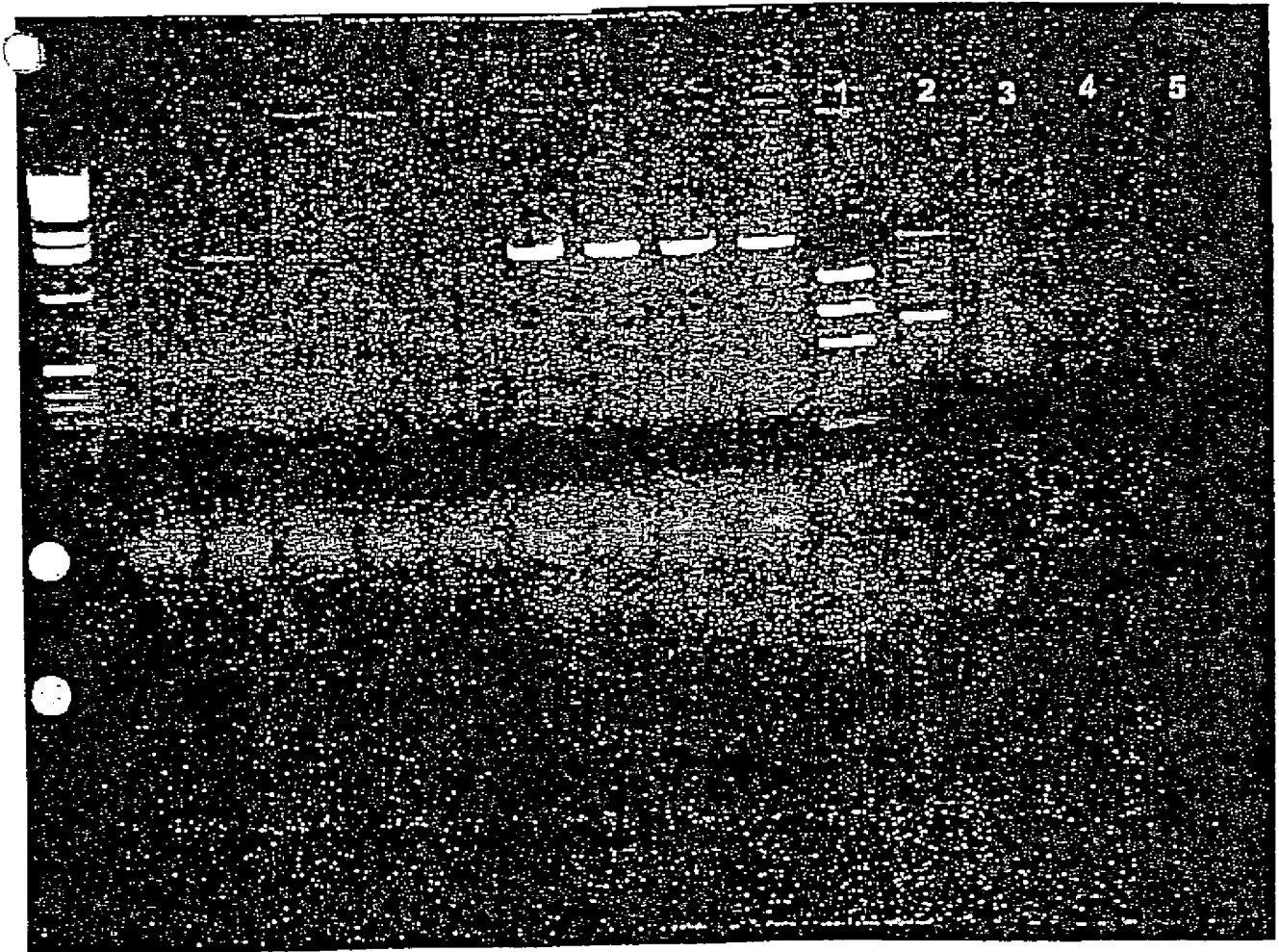


FIGUR 15

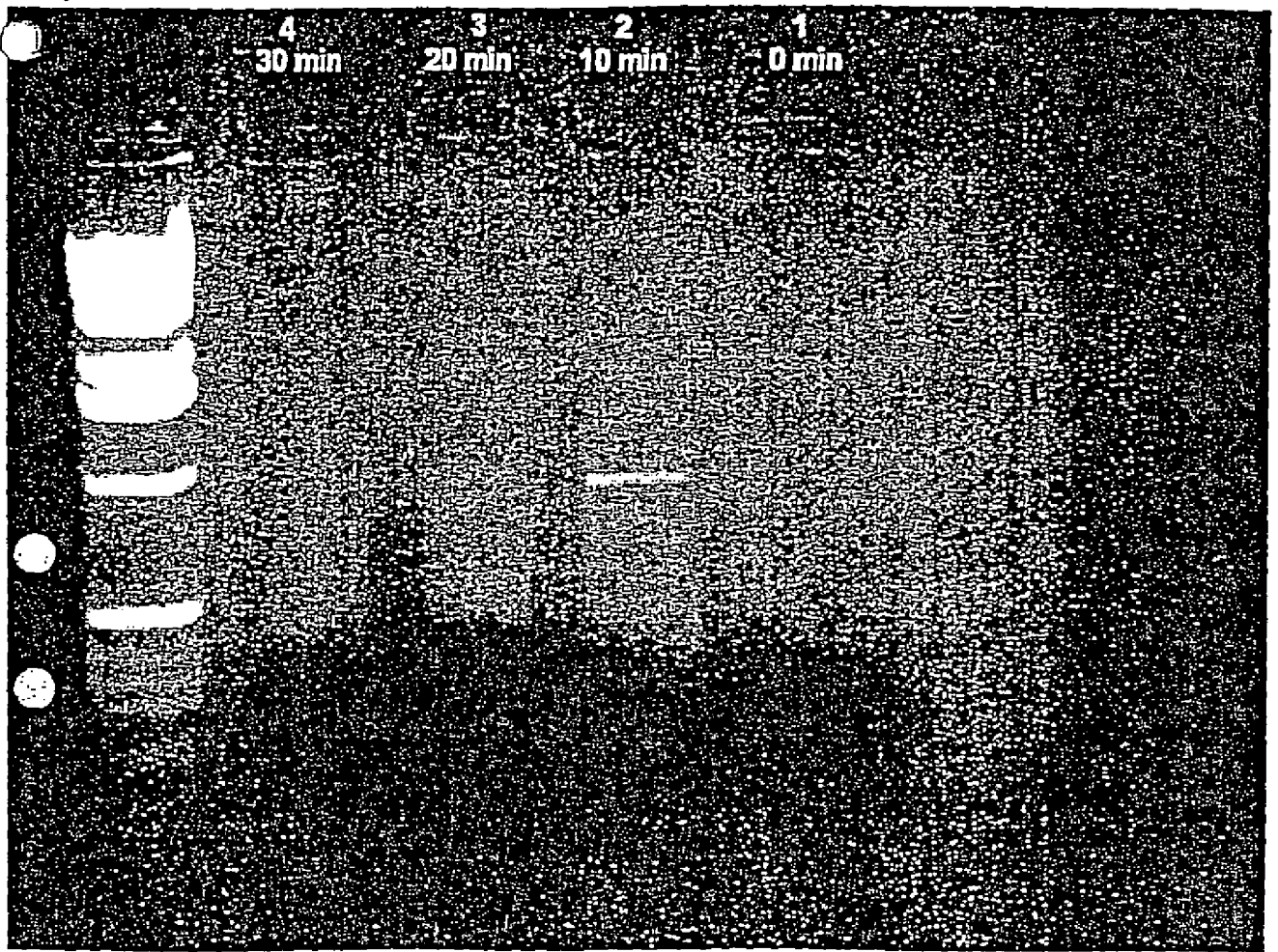
Spor 2



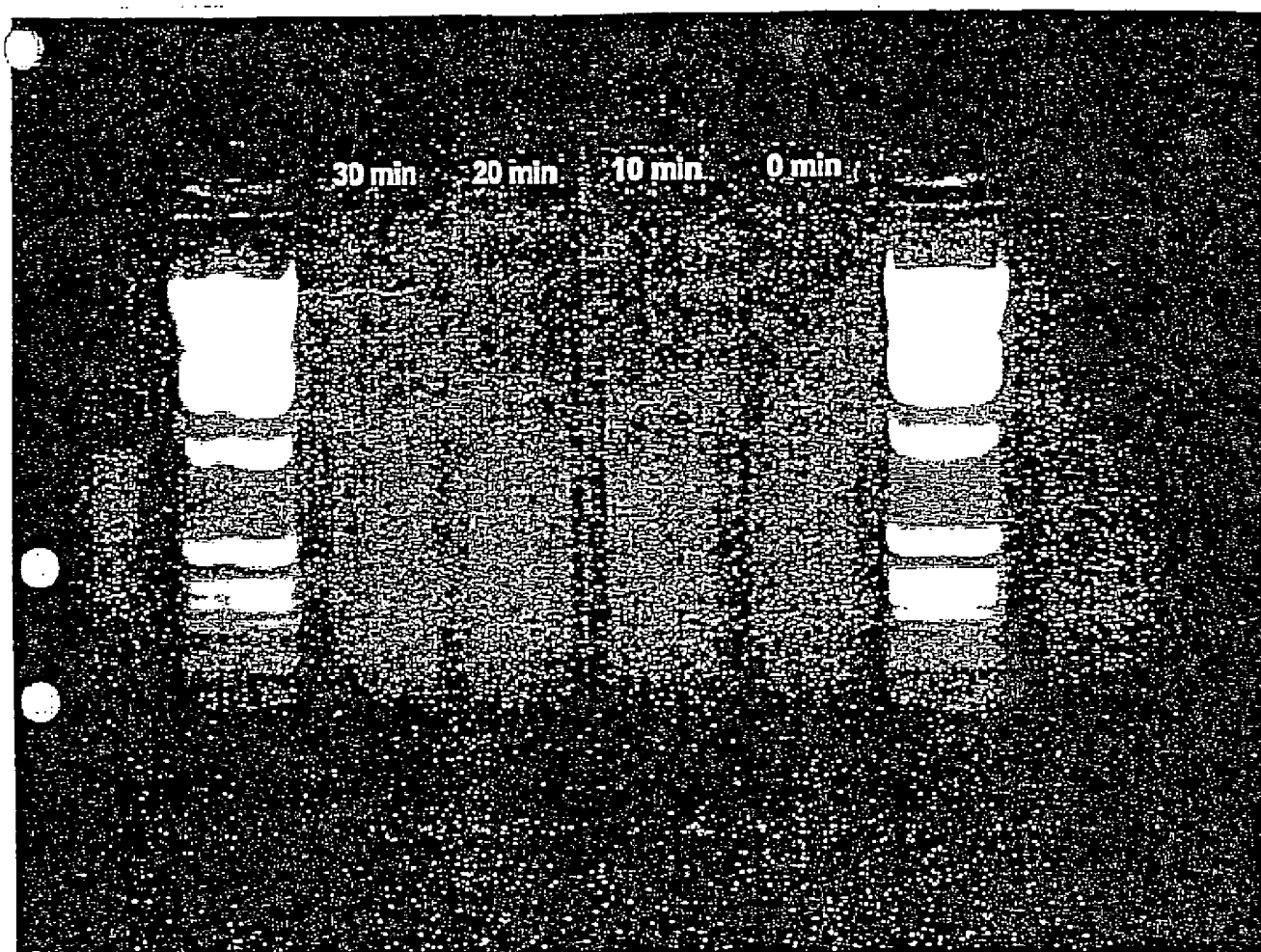
FIGUR 16



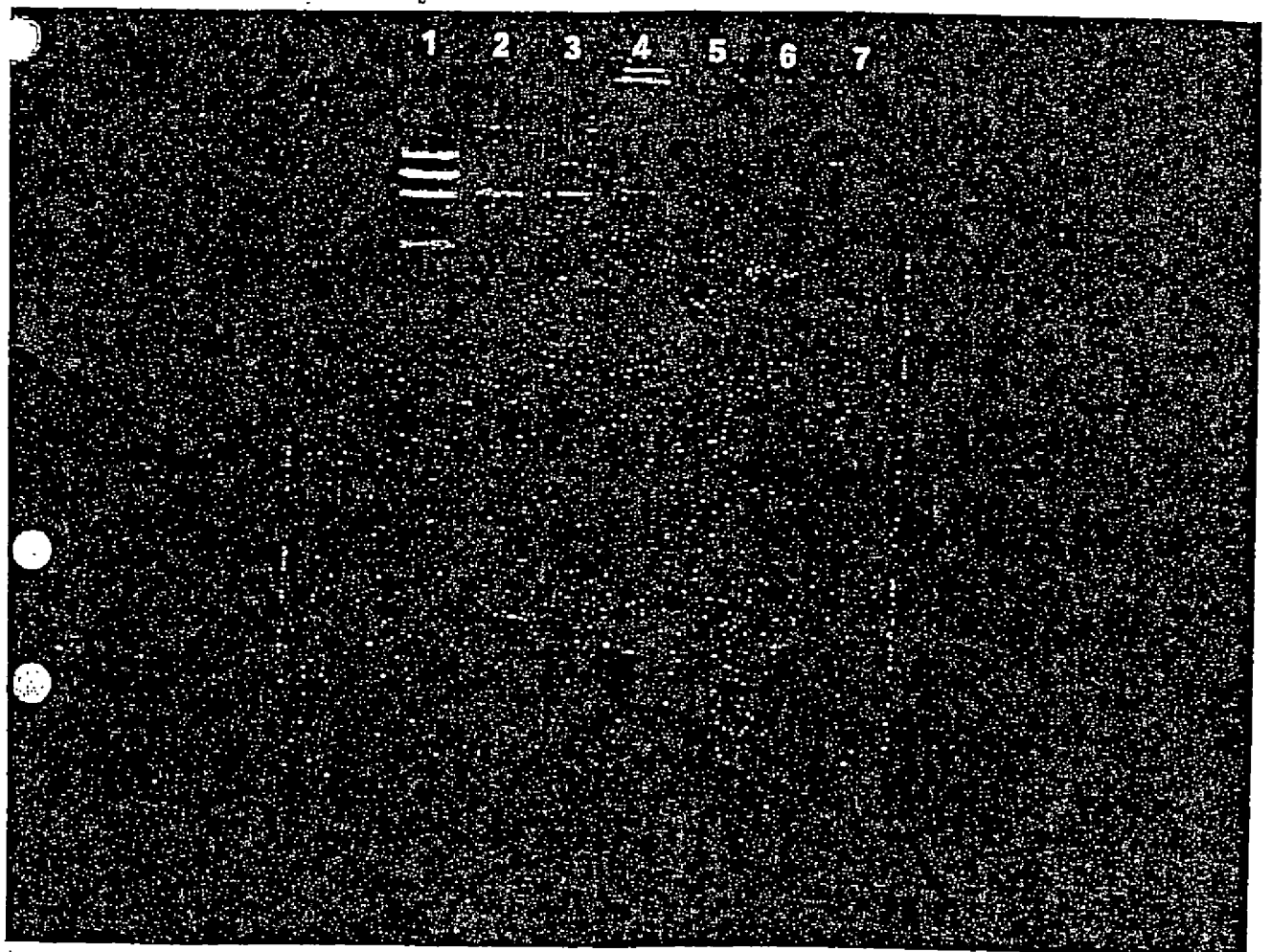
FIGUR 17



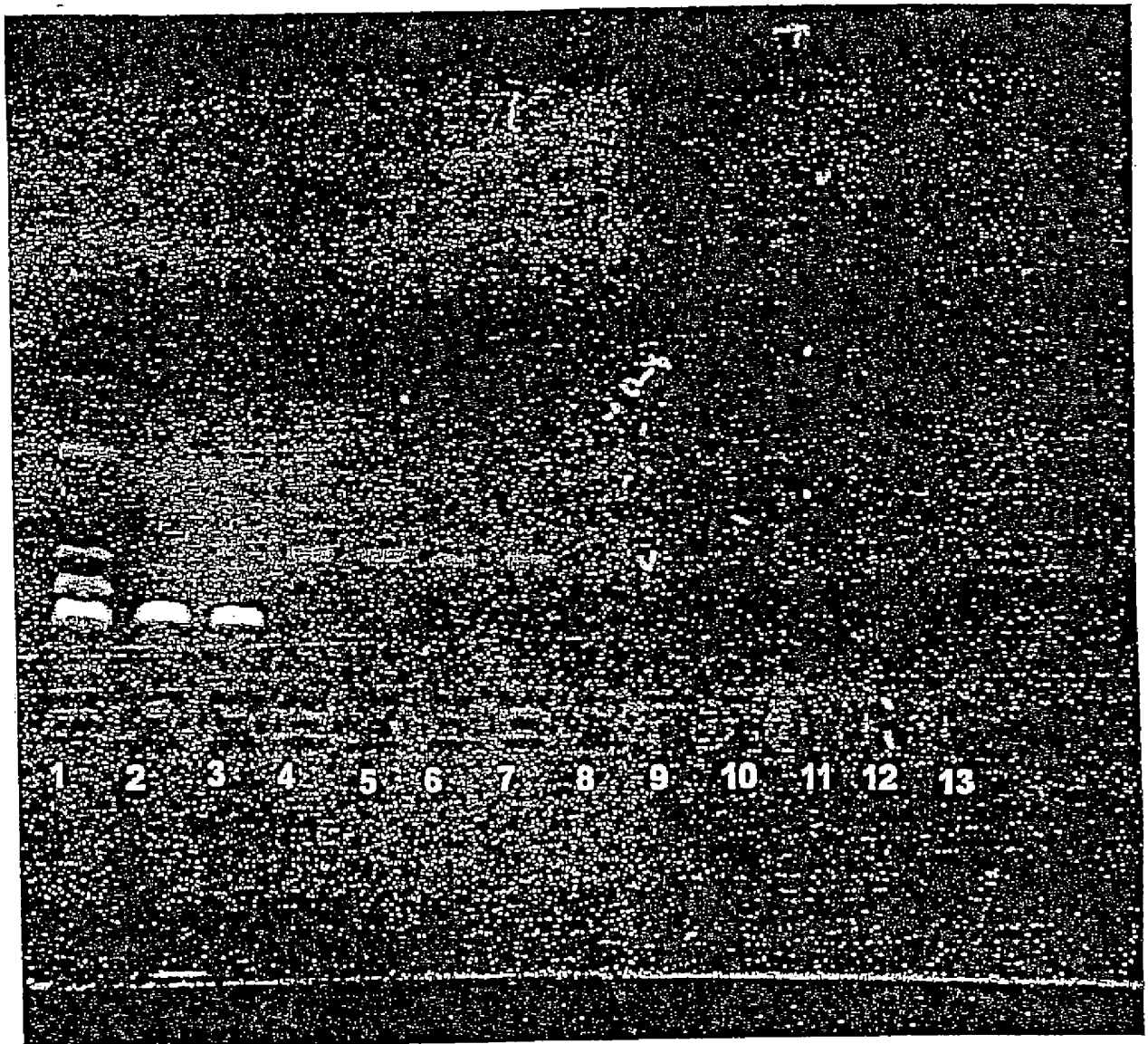
FIGUR 18



FIGUR 19

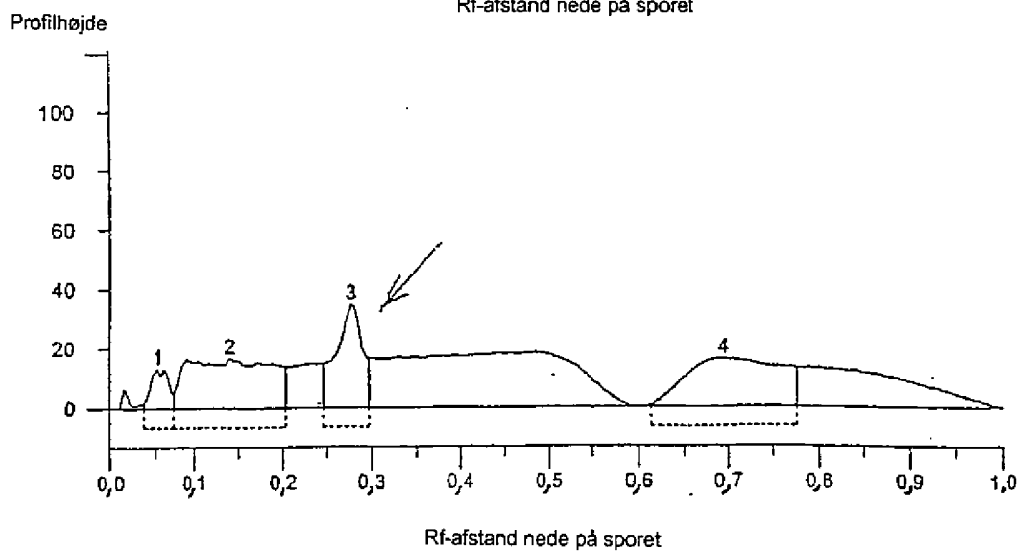
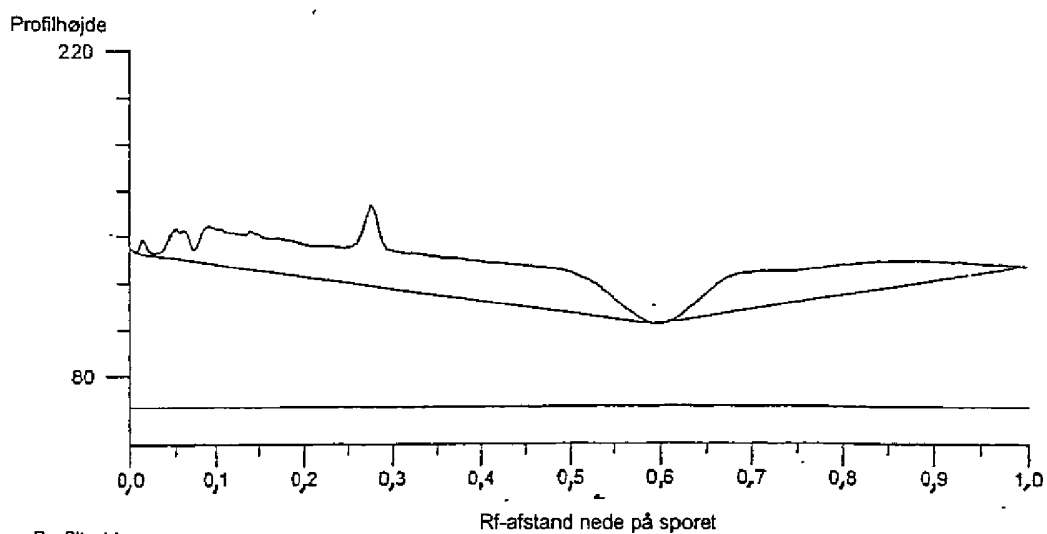


FIGUR 20



FIGUR 21

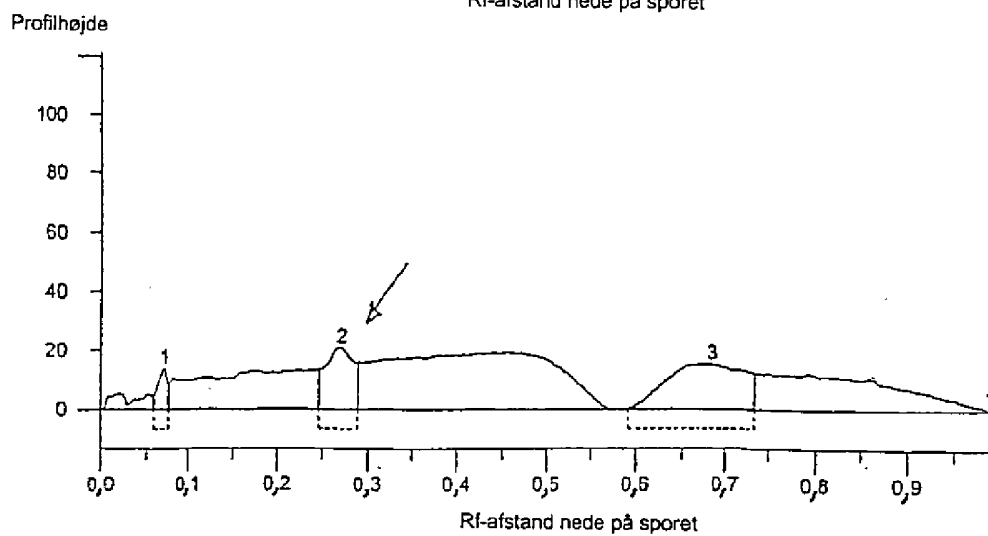
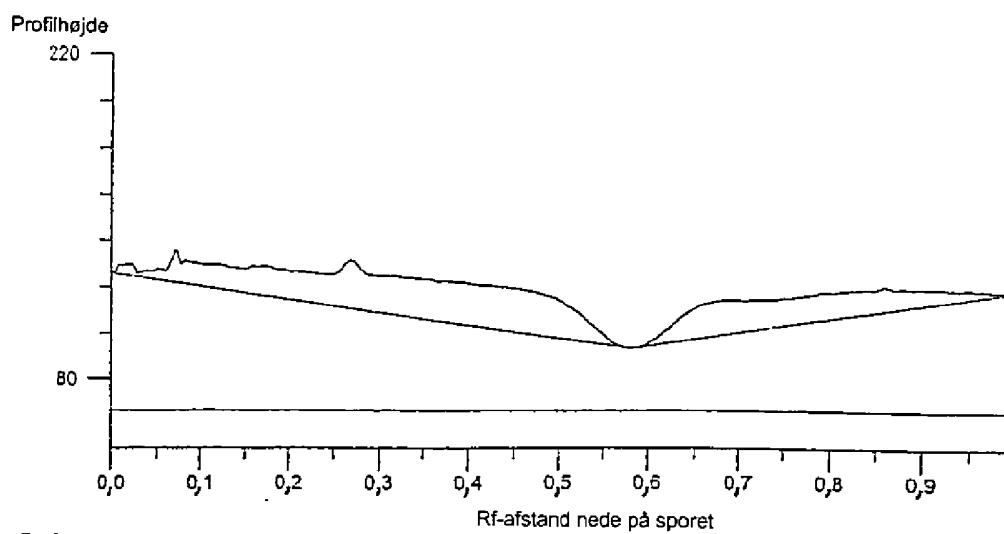
Spor 6



Spor 6			
Nummer	Molvægt	Højde	Rå vol.
1	0,00	13,300	5305,14
2	0,00	16,665	30111,09
3	0,00	34,741	18767,46
4	0,00	16,002	31320,35

FIGUR 22

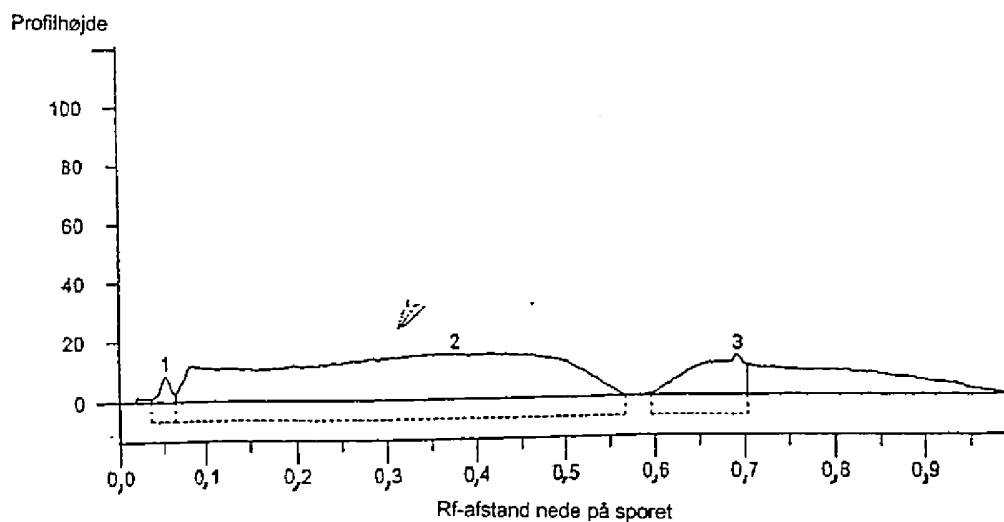
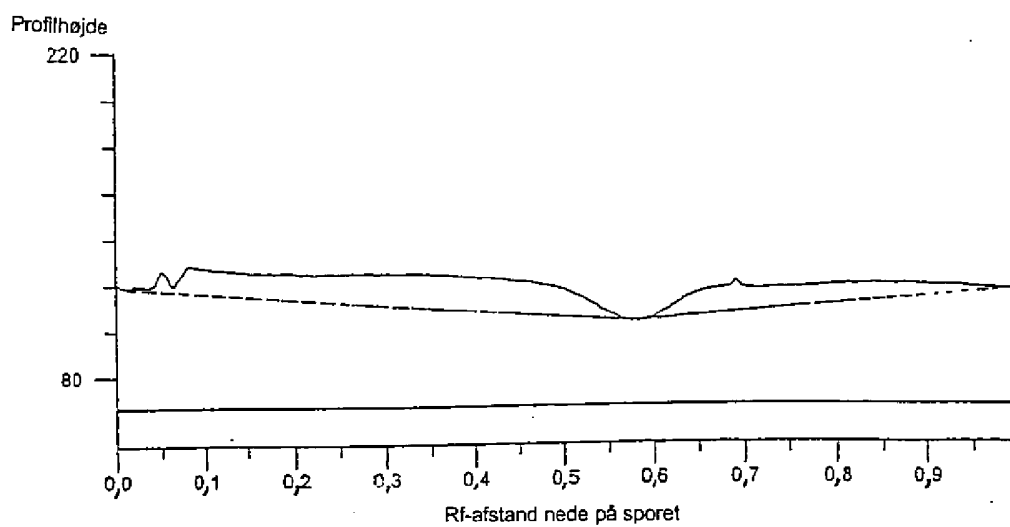
Spor 12



Spor 12			
Nummer	Molvægt	Højde	Rå vol.
1	0,00	13,846	2872,55
2	0,00	20,893	12279,14
3	0,00	15,181	25217,71

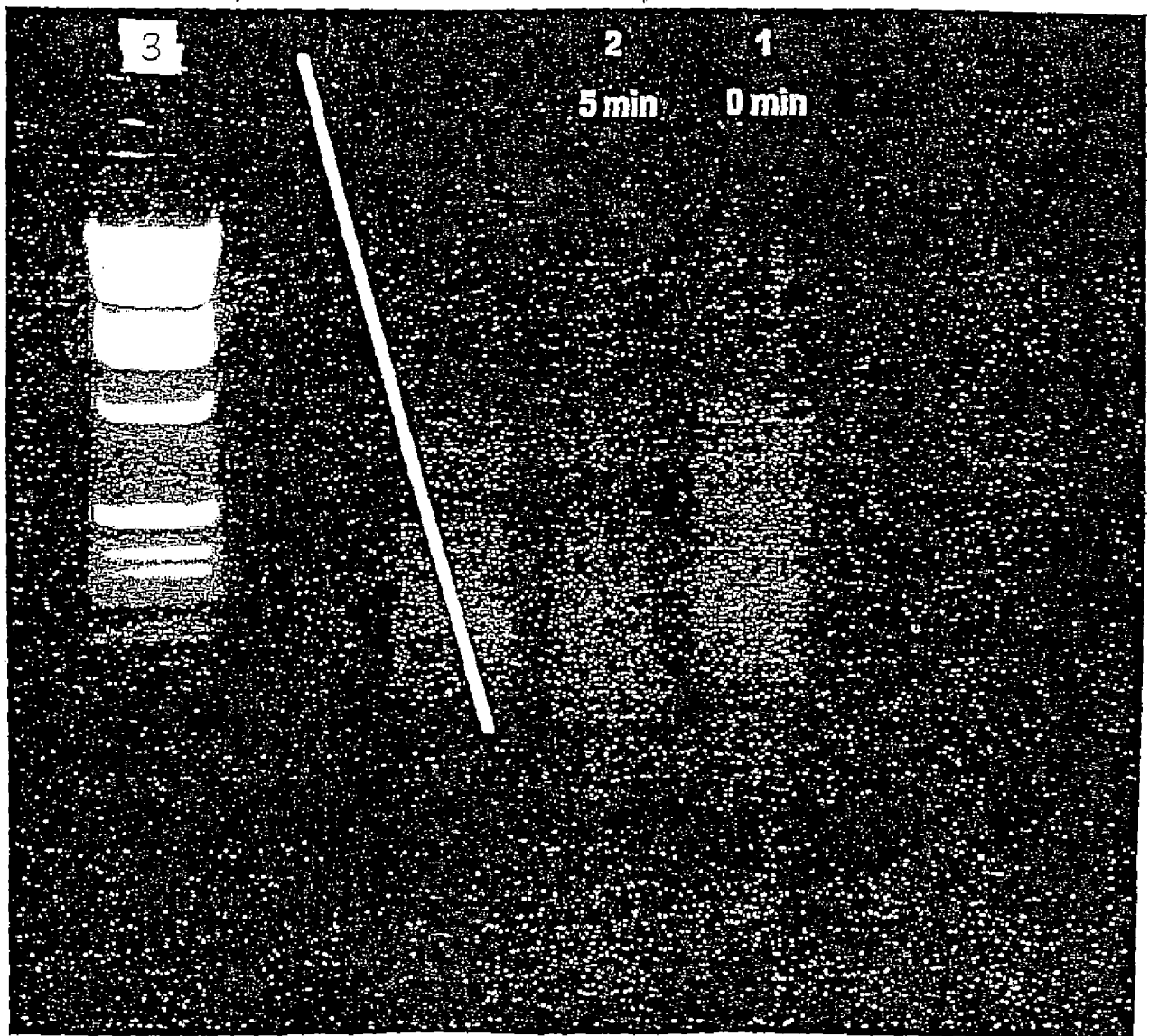
FIGUR 23

Spor 13

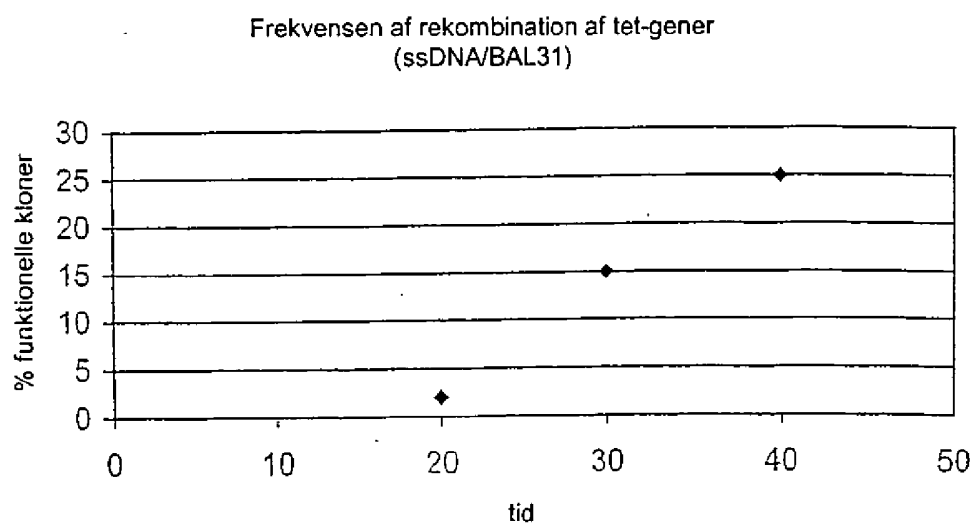


Spor 13			
Nummer	Molvægt	Højde	Rå vol.
1	0,00	9,094	2156,20
2	0,00	15,183	97844,64
3	0,00	13,462	14175,73

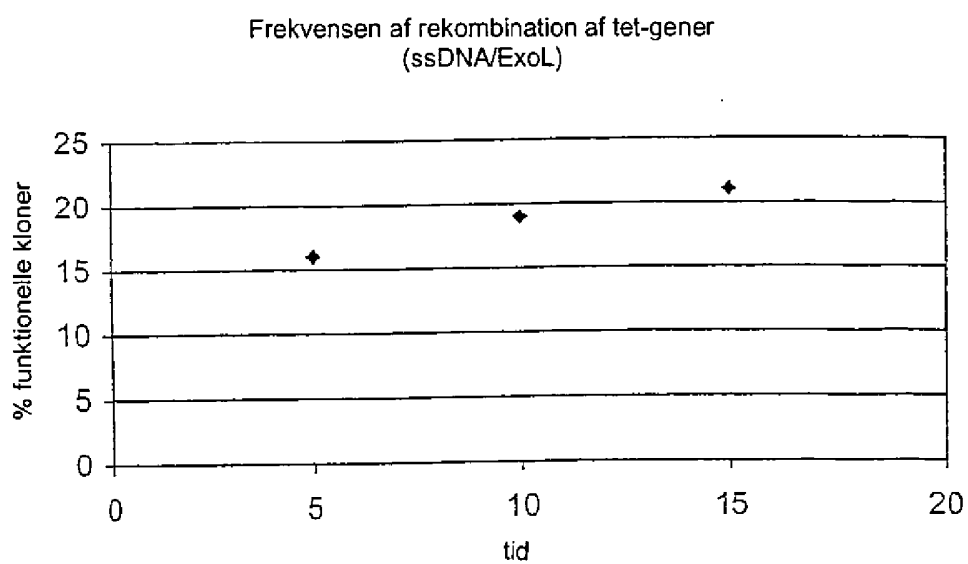
FIGUR 24



FIGUR . 25 (a)

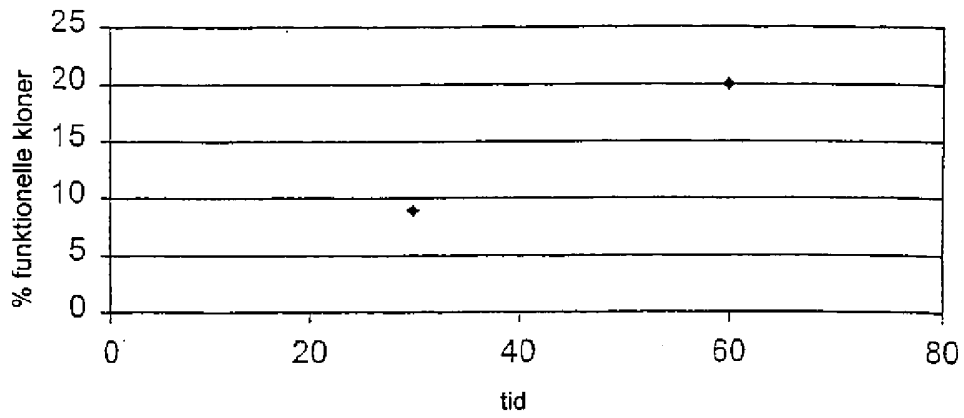


FIGUR 25 (b)

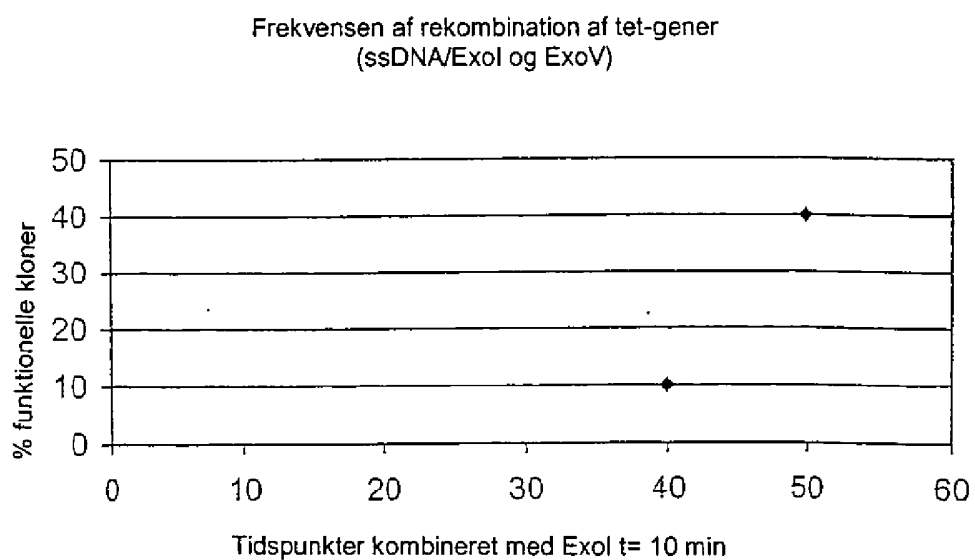


FIGUR 25 (c)

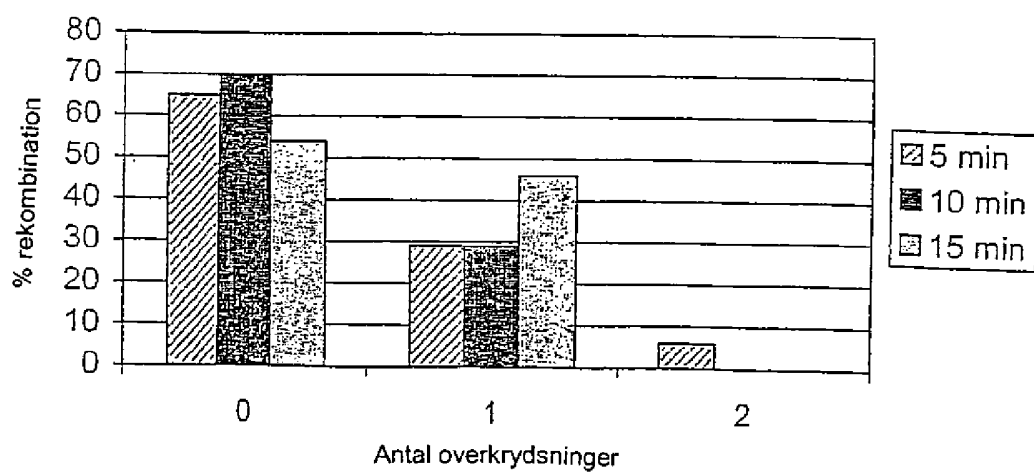
Frekvensen af rekombination af tet-gener
(ssDNA/T7gen6)



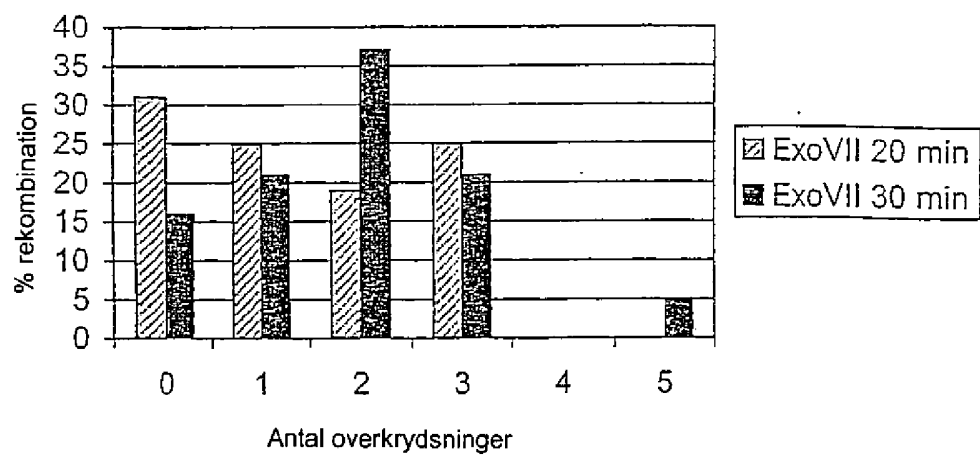
FIGUR 25 (d)



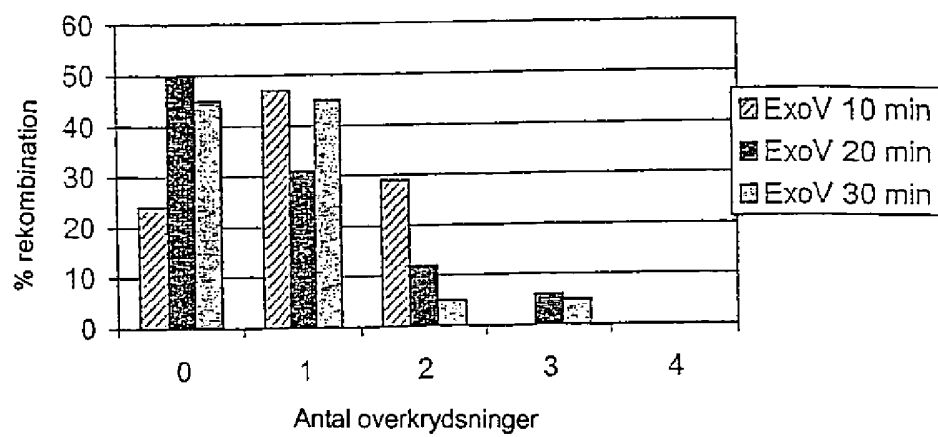
FIGUR 26 (a)



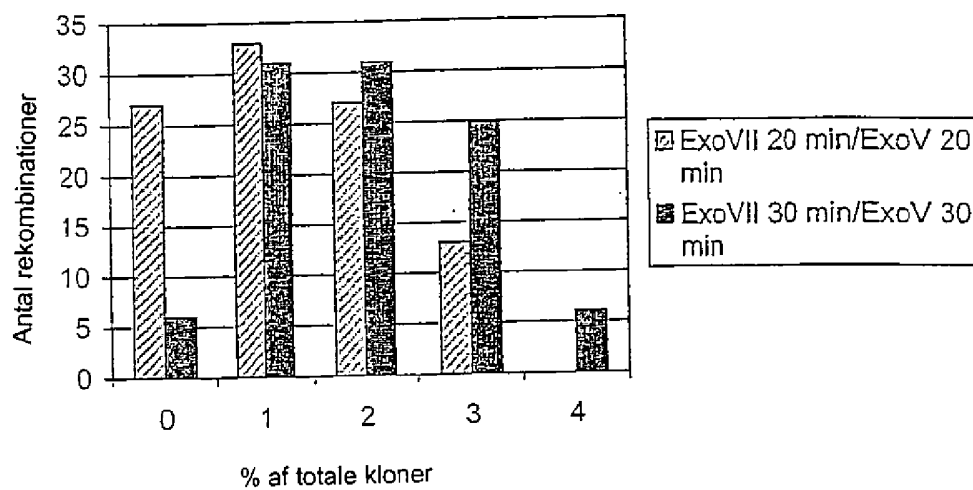
FIGUR 26 (b)



FIGUR 26 (c)



FIGUR 26 (d)



FIGUR 27

