(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 914947 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 914947

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/00
C12N 15/85
C12N 15/90
C12N 15/62
A01K 67/00
C12N 15/58

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.02.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **21.10.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.10.1991**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **22.02.1991 PCT/US1991/001222**

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

22.02.1990 US 483450

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Gene Pharming Europe B.V.,** 2333 CA Leiden, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Meade, Harry,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Polypeptidien parantunut ilmentyminen
Förbättrad expression av polypeptider

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

68775 ATCC 68776 ATCC

Polypeptidien parantunut ilmentyminen

Keksinnön tekninen ala

Tämä keksintö koskee menetelmiä ja välituotteita halutun polypeptidin tuottotason rekombinantti-isännässä parantamiseksi. Aivan erityisesti tämä keksintö koskee "ilmentämissaareketta" - DNA-kappaletta, joka sisältää vieraslajisen polypeptidin koodaavan DNA-sekvenssin ja ilmentämissaarekkeen käyttöä isännän transfektoimiseen. Tämän ilmentämissaarekkeen omaavat isännät tuottavat haluttua vieraslajista polypeptidiä yllättävän suuren määrän. Ilmentämissaarekkeen sisällyttäminen isäntään tekee mahdolliseksi, että halutun vieraslajisen polypeptidin ilmentyminen on oleellisesti riippumatonta sen integroitumiskohdasta isännän genomissa ja oleellisesti riippuvaista isännän genomiin integroituvien ilmentämissaarekkeen kopioiden lukumäärästä.

Taustatietoja

On tunnettua, että polypeptidejä voivat ilmentää ja erittää isännät, jotka on transformoitu tai transfektoitu tuon polypeptidin koodaavalla DNA-sekvenssillä. Esimerkiksi Gilbert et al., US-patentti 4 565 785 (1986) ja L. Villa-Komaroff et al., "A Bacterial Clone Synthesizing Proinsulin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3727 - 3731 ovat osoittaneet, että valittu polypeptidi voidaan syntetisoida bakteeri-isännässä ja voi erittyä isännän kalvon lävitse. Samankaltainen menetelmä voidaan suorittaa eläinsoluissa. J. Doehmer et al., "Introduction of Rat Growth Hormone Gene Into Mouse Fibroblasts Via A Retroviral DNA Vector: Expression And Regulation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 2268 - 2272. Rekombinanttiproteiineja on ilmennetty nisäkkäissäkin käyttämällä ilmentämisjärjestelmän transgeenistä sisällyttämistä hedelmöitetyn alkion esitumaan. D. Bucchini et al., "Pancreatic Expression Of Human Insulin Gene In Transgenic Mice", Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 83 (1986) 2511 - 2515; K. Gordon et al., "Production Of Human Tissue Plasminogen Activator In Transgenic Mouse Milk", Bio/Technology 5 (11) (1987) 1183 - 1187.

Kuitenkaan tähän päivään mennessä mikään näistä tekniikoista ei ole säännöllisesti onnistunut sallimaan isännän, jonka genomiin on integroitunut vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi, ilmentää suuria määriä haluttua vieraslajista polypeptidiä. Tämä on erityisen yllättävää ottaen huomioon luontaisten proteiinien korkea tuotantotaso, joka aikaansaadaan aivan samoista ilmentämisen säätelysekvensseistä niiden luonnollisissa ympäristöissä. Esimerkiksi maidolle spesifiset ilmentämisen säätelysekvenssit sallivat suurten määrien luontaisia proteiineja, esim. kaseiinia, tuottuvan maitorauhasissa ja erittyvän niistä. Aivan samojen maidolle spesifisten ilmentämisen säätelysekvenssien ei ole kuitenkaan osoitettu aikaansaavan suuria määriä vieraslajisia polypeptidejä, kun ne on toimivasti liitetty vieraslajisia polypeptidejä koodaaviin sekvensseihin. Katso esimerkiksi C.W. Pittius et al., "A Milk Protein Gene Promoter Directs The Expression Of Human Tissue Plasminogen Activator cDNA To The Mammary Gland In Transgenic Mice", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5874 - 5878. Ilmentymistaso on näissä jälkimmäisisssä rakennelmissa myös riippumaton isännän genomiin integroituneiden vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin kopioiden lukumäärästä. Lisäksi ilmentymistaso on paikkavaikutusten alainen, s.o. se on riippuvainen siitä, mihin vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi on integroitunut genomissa. K.F. Lee et al., "Tissue-Specific Expression Of The Rat Beta-Casein Gene In Transgenic Mice", Nucleic Acids Res. 16 (3) (1988) 1027 - 1041.

Siten tarvitaan menetelmää vieraslajisen proteiinin tai polypeptidin koodaavan DNA-sekvenssin ilmentymisen lisäämiseksi riippumatta sen integraatiokohdasta isännän genomissa. Lisäksi näiden menetelmien pitäisi aikaansaada

ilmentyminen, joka on riippuvaista isännän genomiin integroituneiden kopioiden lukumäärästä, niin että ilmentymistasoja voidaan kontrolloida.

Keksinnön sisältö

Tämä keksintö ratkaisee nämä ongelmat tarjoamalla "ilmentämissaarekkeen", joka sisältää halutun vieraslajisen polypeptidin koodaavan DNA-sekvenssin. Tämän keksinnön mukainen ilmentämissaareke aikaansaa ensimmäisen kerran vieraslajisen polypeptidin koodaavan DNA-sekvenssin runsaan, paikasta riippumattoman ja kopioluvusta riippuvaisen ilmentymisen.

Kuten on kuvattu kuviossa 1, tämän keksinnön mukainen ilmentämissaareke käsittää 5' - 3'-suunnassa 5'-vierusalueen, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin (joka koodaa halutun vieraslajisen proteiinin tai polypeptidin) ja 3'-vierusalueen. 5'-vierusalue käsittää 5'-3'-suunnassa 5'-ilmentämisen säätelysekvenssejä ja 5'-translaatiota vaille jäävän alueen. Ilmentämisen säätelysekvenssit on toimivasti liitetty vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin. 5'- translaatiota vaille jäävä alue alkaa transkription aloituskohdasta ja päättyy vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin translaation aloituskohtaan. 3'-vieruslue käsittää 5' - 3'-suunnassa 3'- translaatiota vaille jäävän alueen, ja 3'- ilmentämisen säätelysekvenssejä, jotka säätelysekvenssit on toimivasti liitetty vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin. Lopuksi keksinnön mukaisen ilmentämissaarekkeen 5'- ja 3'-vierusalueille on tunnusomaista riittävä koko ja rakenne, joka on tehokas saamaan halutun proteiinin tai polypeptidin tuottotaso oleellisesti riippuvaiseksi isännän genomiin integroituneiden ilmentämissaarekkeen kopioiden lukumäärästä ja oleellissesti riippumattomaksi sen integraatiokohdasta.

Tämä keksintö koskee myös ilmentämissaarekkeen käyttöä isännän transfektoimiseen ja tuollaisia transfek-

toituja isäntiä. Isännät, joiden genomiin on integroitunut ilmentämissaareke, tuottavat korkeita tasoja tuossa ilmentämissaarekkeessa olevan DNA-sekvenssin koodaamaa vieraslajista polypeptidiä. Lisäksi tämän keksinnön mukaiset ilmentämismenetelmät ovat oleellisesti riippuvaisia isännän genomiin inetgoituneiden ilmentämisaarekkeen kopioiden lukumäärästä ja riippumattomia integraatiokohdasta, mikä sallii edullisesti ilmentämistasojen kontrolloinnin.

Tämän keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa ilmentämissaareke sisältää myös DNA-sekvenssin, joka koodaa signaalipeptidin. Tämä signaalisekvenssin koodaava alue on fuusioitu vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin 5'-päähän ja sen kanssa lukuraamiin. Signaalisekvenssin koodaava alue on myös toimivasti liitetty ilmentämisen säätelysekvensseihin, jotta sallittaisiin isännän, jonka genomissa on tämä edullinen ilmentämissaareke, valmistaa, erittää ja edullisesti muokata haluttu proteiini tai polypeptidi esiproteiinista tai esipolypeptidistä, jonka yhdistetty signaalin ja vieraslajisen polypeptidin koodaussekvenssi koodaa.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on kaavioesitys tämän keksinnön mukaisesta tyypillisestä "ilmentämissaarekkeesta" (A) ja edullisesta "ilmentämissaarekkeesta" (B).

Kuvio 2 kuvaa plasmidin (CAS1288), joka sisältää naudan alfa-S-1-kaseiinin 5'- ja 3'-vierusalueen, kokoonpanemisen.

Kuvio 3 kuvaa urokinaasin rakennegeenin lisäämisen CAS1288:aan, jolloin saadaan CAS1295, ilmentämissaareke.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Jotta tässä kuvatusta keksinnöstä voitaisiin saada perusteellisempi käsitys, esitetään seuraava yksityiskohtainen kuvaus.

Tässä kuvauksessa käytetään seuraavia termejä:

Ilmentämisen säätelysekvenssit - DNA-sekvenssejä,

jotka kontrolloivat ja säätelevät geenin tuotteiden ilmentymistä sekä transkription että translaation tasolla, kun ne on toimivasti liitetty rakennegeeniin (polypeptidin koodaava DNA). Ne sisältävät promoottori- ja voimistaja (enhancer) -alueet, ribosomin sitoutumiskohtia, polyadenylaatiosignaaleja ja muita sekvenssejä, jotka ovat hyödyllisiä geenien ilmentämisessä.

Toimivasti liitetty - 5'- ja 3'- ilmentämisen säätelysekvenssien liittäminen vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin niin että sallitaan ilmentämisen säätelysekvenssien kontrolloida ja säädellä vieraslajisen polypeptidin ilmentämistä ja tuottamista.

Vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi - DNA-sekvenssi, joka koodaa halutun polypeptidin tai proteiinin ja joka lisätään isännän genomiin. Tämä DNA-sekvenssi koodaa polypeptidin, joka on vieraslajinen joko isännälle, vierussekvensseille tai kummillekin. Vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi sissältää valinnaisesti sen oman translaationaloitussignaalinsa 5'-päässään ja oman translaation pysäytyskodoninsa 3'-päässään. Vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi voi myös sisältää oman signaalisekvenssin koodaavan alueensa.

Signaalisekvenssin koodaava alue - DNA-sekvenssi, joka koodaa tyypillisesti hydrofobisista aminohappojen sekvenssin, jota kutsutaan signaalipeptidiksi. Signaalipeptidi tekee polypeptidille, johon se on kiinnittynyt, mahdolliseksi läpäistä biologisen kalvon.

Ilmentämissaareke - DNA-rakennelma, joka käsittää 5' - 3'-suunnassa 5'-vierusalueen, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ja 3'-vierusalueen. 5'- ja 3'-vierusalueet ovat kooltaan ja rakenteeltaan riittäviä tekemään halutun proteiinin tai polypeptidin tuottotason oleellisesti riippuvaiseksi isännän genomiin liittyneiden ilmentämissaarekerakennelman kopioiden lukumäärästä ja oleellisesti riippumattomaksi ilmentymissaarekkeen integraatiokohdasta isännän genomissa.

5'-vierusalue - on se ilmentämissaarekkeen osa, joka sijaitsee 5' vierasperäisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin nähden. Se sisältää 5' - 3'-suunnassa 5'- ilmentämisen säätelysekvenssejä ja 5'- vaille translaatiota jäävän alueen, jolloin ilmentämisen säätelysekvenssit on toimivasti liitetty vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin. 5'- vaille translaatiota jäävä alue ulottuu tyypillisesti transkription aloituskohdasta vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin translaation aloituskohtaan.

3'-vierusalue on se ilmentämissaarekkeen osa, joka sijaitsee 3' vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin nähden. Se sisältää 5' - 3'-suunnassa 3'- vaille translaatiota jäävän alueen ja 3'- ilmentämisen säätelysekvenssejä. 3'-vierusalue voi myös sisältää koko koodaussekvenssin tai sen osan rakennegeenistä, joka on alun perin ollut liittyneenä 3'-vierusalueeseen.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Haluamatta sitoutua teoriaan uskomme, että ilmentämissaareke antaa 5'- ja 3'-vierusalueilla olevien toistaiseksi määrittelemättömien tekijöiden operoida ilmentämisen säätelysekvensseillä ja sallia vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ilmentyä suurina saantoina. Ilmentyminen on myös riippuvaista isännän genomiin liittyneiden ilmentämissaarekerakennelman kopioiden lukumäärästä mahdollistaen siten polypeptidin tuottotason säätämiseen.

Tämän keksinnön mukaisten ilmentämissaarekkeiden suuret 5'- ja 3'-vierusalueet voivat myös tarjota puskurivyöhykkeen, niin että ilmentämisen säätelysekvenssit ovat eristettyjä isännän ilmentämisen säätelyistä, joita ympäröivä DNA, johon ilmentämissaareke on integroitunut, voi aikaansaada. Sen vuoksi riippumatta siitä, mihin isännän genomissa ilmentämissaareke integroituu, vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi ilmentyy runsaasti. Se kantaa oman genomiympäristönsä mukanaan, "ilmentämissaarekkeena".

Haluamatta sitoutua teoriaan uskomme, että useimmat DNA-alueet, jotka voivat voimistaa ilmentämistä ilmentämisen säätelysekvensseistä, esiintyvät määrätyn rakennegeenin 5'- ja 3'-vierussekvensseissä. Sen vuoksi sen jälkeen kun on eristetty rakennegeeni sen 5'- ja 3'-vierusalueiden kanssa, rakennegeeni voidaan tämän keksinnön yhden suoritusmuodon mukaan poistaa kokonaan tai osaksi ja korvata millä tahansa vieraslajisen polypeptidin koodaavalla sekvenssillä, jotta mahdollistettaisiin ilmentyminen alkuperäisen rakennegeenin tasoa vastaavalla tasolla. Vaihtoehtoisesti vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi voidaan sijoittaa rakennegeenin 5'-päähän poistamatta tällöin tuota geeniä. Tuossa suoritusmuodossa vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi ilmentyy myös tasolla, joka on verrattavissa alkuperäisen rakennegeenin ilmentymistasoon.

Niiden ilmentämisen säätelysekvenssien joukossa, jotka ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön eri suoritusmuodoissa, on sellaisia, jotka määräävät ilmentymistä korkeilla tasoilla määrätyn tyyppisissä soluissa tai solujen kasvun tai erilaistumisen määrätyissä vaiheissa tai tarkoin määrätyissä viljelyolosuhteissa. Kudosspesifisiä ilmentämisen säätelysekvenssejä pidetään erityisen edullisina tämän keksinnön transgeenisissä isännissä.

Jos käytetään nisäkäsisäntäsoluja, käyttökelpoisia ilmentämisen säätelysekvenssejä voidaan saada luontaisista sekvensseistä, jotka koodaavat runsaasti ilmennetyn tuotteen isäntäsolusta itsestään, tai ne voidaan saada muista eukaryoottigeeneistä, joiden ilmentymistasot ovat korkeat. kuten ß-aktiinin, kollageenin, myosiinin, albumiinin, metallitioneiinin ja ihmisen kasvuhormonin.

Eräs tämän keksinnön edullinen suoritusmuoto tarjoaa proteiinien tuottamisen transgeenisissä nisäkkäissä. Tässä suoritusmuodossa käytetään edullisesti ilmentämisen säätelysekvenssejä, jotka kontrolloivat ja ohjaavat geenin

tuotteiden ilmentymistä nisäkäskudoksessa, kuten ilmentämisen säätelysekvenssejä, jotka vastaavat kaseiinipromoottoreita ja beetalaktoglobuliinipromoottoria. Kaseiinipromoottorit voidaan esimerkiksi valita alfakaseiinipromoottorin, beetakaseiinipromoottorin tai kappakaseiinipromoottorin joukosta. Edullisemmin kaseiinipromoottori ja siihen liittyvät ilmentämisen säätelysekvenssit ovat peräisin naudasta ja edullisimmin ovat alfa-S-1-kaseiinipromoottori ja siihen liittyviä ilmentämisen säätelysekvenssejä.

Ilmentämisen säätelysekvenssit voidaan myös saada suoraan soluista, joita on tarkoitus käyttää ilmentämissaarekerakennelman isäntänä. Promoottori ja siihen liittyvät ilmentämisen säätelysekvenssit, joilla on haluttu aktiivisuustaso isännässä, täytyy ensin identifioida. Ilmentämissaareke täytyy suunnitella siten, että jokainen ilmentämissaarekerakennelma, joka integroituu isännän genomiin, ilmentyy kopioluvusta riippuvaisella, paikasta riippumattomalla tavalla.

Kuvaamme tässä keinoja ilmentämisen säätelysekvenssien identifioimiseksi, nämä sekvenssit sisältävien vaadittujen vierusalueiden kloo naamiseksi, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin lisäämiseksi ja sen testaamiseksi, onko tulokseksi saatu rakennelma tämän keksinnön mukainen "ilmentämissaareke".

Ensimmäinen vaihe on ratkaista isäntä ja olosuhteet, jotka sallivat tuolle isännälle homologisen geenin ilmentyvän halutulla tasolla tai erityisinä aikoina. Kudosviljelmän tapauksessa käytetään edullisesti CHO-soluja, jotka kasvavat kollageenihelmillä, joita esiintyy VERAX™-järjestelmässä.

Ilmentämisen säätelysekvenssien eristämiseksi homologista geeniä varten, joka ilmentyy suurina määrinä isäntäsoluissa valituissa olo suhteissa, täytyy identifioida runsaasti ilmentyvä RNA-laji. Tämä voidaan suorittaa valmistamalla cDNA-kirjasto polyA-RNA:sta, joka on eristetty

valitusta isäntäsolusta valituissa induktion ja kasvun olosuhteissa. cDNA-kirjasto seulotaan sitten käyttäen merkittyä näytettä samaa RNA:a, josta cDNA-kirjasto on tuotettu. Positiivisimmat signaalit ilmaisevat ne cDNA:t, joiden RNA:ja on runsaimmin isäntäsolussa valituissa induktion ja kasvun olosuhteissa. Valittuja cDNA:ja voidaan sitten käyttää sellaisten genomi-DNA-kirjastojen seulontaan, jotka on valmistettu valituista isäntäsoluista, jotta saataisiin valittua genomi-DNA-sekvenssejä, jotka vastaavat runsaimmin esiintyviä RNA:ja. Nämä genomisekvenssit, jotka ovat tyypillisesti kosmideissa [T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)], voidaan sitten analysoida, jotta saataisiin määritettyä restriktiokohtia, vierussekvenssien määrä kosmidissa ja siihen sisältyvät polypeptidin koodaavat alueet.

Vaihtoehtoisesti, mutta vähemmän edullisesti, ilmentämisen säätelysekvenssi voidaan eristää seulomalla isäntäsolu, jota on kasvatettu valituissa olosuhteissa ja käyttäen valittua induktiota, runsaasti tuotetun proteiinin tai polypeptidin suhteen. Tämä suoritetaan analysoimalla kaikki isännästä valmistunut polypeptidit käyttäen joko SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE) tai kaksiulotteista geelielektroforeesia. Polypeptidit, joita on eniten, identifioidaan vahvimman vyöhykkeen SDS-PAGE-geelissä tai suurimman täplän kaksiulotteisessa geelissä perusteella. Kun vyöhyke tai täplä on identifioitu, se leikataan geelistä, eluoidaan ja sille suoritetaan automaattinen proteiinin sekvenssointi. Sitten syntetisoidaan oligonukleotideja proteiinin sekvenssoinnista saadun aminohappojärjestyksen perusteella. Nämä oligonukleotidit voidaan sitten merkitä ja käyttää koettimina niiden vastaavien genomisekvenssien identifioimiseksi kosmidikirjastosta, joka on kokoonpantu isäntäsolun DNA:sta.

Kun tämän runsaasti ilmentyvän geenin riittävän yk-

sityiskohtainen restriktiokartta on määritetty, rakennegeenin koodaavat sekvenssit ja välisekvenssit voidaan poistaa kosmideista esimerkiksi sopivien restriktioentsyymien avulla ja korvata vieraslajisen polypeptidin koodaavalla sekvenssillä. Vaihtoehtoisesti vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi voidaan sijoittaa 5' rakennegeeniin nähden. Tässä suoritusmuodossa rakennegeeniä ei tarvitse poistaa. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vieraslajinen polypeptidi on urokinaasi, jonka DNA-sekvenssi on eristetty ja kloonattu genomikirjastosta käyttäen julkaistuja sekvenssejä koettimina. A. Riccio et al., "The Human Urokinase-Plasminogen Activator Gene And Its Promoter", Nucleic Acid Res., 13 (8) (1985) 2759 - 2771.

Tulokseksi saadussa rakennelmassa vieraslajisen polypeptidin koodaavaa DNA-sekvenssiä reunustavat kummallakin puolella sen runsaasti ilmentyvän geenin genomisekvenssit, joka eristettiin alun perin isäntäsoluista. Rakennelmia, jotka sisältävät eri pituiset 5'- ja 3'-vierussekvenssit, täytyy testata, jotta saataisiin määritettyä, minkä kokoiset vierusalueet ovat välttämättömät ohjaamaan vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ilmentymistä kopioluvusta riippuvaisella, paikasta riippumattomalla tavalla.

Tarkoituksesa määrittää, että eristetty kosmidi sisältää riittävät 5'- ja 3'-vierusalueet sallimaan lisätyn vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ilmentyä tasolla, joka on oleellisesti sama kuin runsaasti ilmenneetyn homologisen DNA-sekvenssin ilmentymistaso, valittu DNA-sekvenssi transfektoidaan soluihin kudosviljelmässä tai siirretään alkioiden genomiin transgeenisten eläinten aikaansaamiseksi. Edullisesti käytetään tässä vaiheessa soluja tai alkioita, joita käytetään lopulliseen tuottamiseen. Transformoidut isännät testataan sitten vieraslajisen proteiinin ilmentämisen suhteen minkä tahansa monista tunnetuista analyyseistä avulla. Näitä ovat, mainittuihin

kuitenkaan rajoittumatta, radioimmunoanalyysi, ELISA, immunoblottaus ja analyysit, jotka mittaavat halutun polypeptidin aktiivisuutta. Vaihtoehtoisesti ja edullisesti käytetään mRNA-tasoja monissa eri kasvatusolosuhteissa. Tämä voidaan suorittaa Northern blot -tekniikan avulla käyttäen aikaisemmin kuvattuja oligonukleotideja (jotka vastaavat polypeptidisekvenssejä) tai aikaisemmin identifioituja cDNA:ja koettimina.

Koska isäntäsoluista valitut ilmentämisen säätelysekvenssit osoittavat kykyä määrätä homologisen geenin ilmentymistä korkealla tasolla tunnetuissa olosuhteissa (esim. CHO-solut, jotka kasvavat kollageenihelmillä VERAX™-järjestelmässä), odotetaan, että nähtäisiin oleellisesti sama vieraslajisen polypeptidin ilmentymistaso noissa samoissa olosuhteissa. Mikäli kosmidista saatu DNA-sekvenssi ei aikaansaa sellaista ilmentymistasoa, silloin tulisi muita kosmideja, jotka sisältävät eri pituisia 5'- ja 3'-vierusalueita, analysoida oleellisesti samalla tavallaa, kunnes löydetään sopiva DNA-sekvenssi.

Tämän sekvenssin esiintuomia vieraslajisen proteiinin tuottotasoja verrataan sitten integroituneen ilmentämissaarekkeen kopiolukuihin. Kopioluku määritetään sopivan restriktioentsyymianalyysin avulla. Ilmentämisrakennelmat, jotka osoittavat paikasta riippumatonta, kopioluvusta riippuvaista ilmentymistä, ovat tämän keksinnön mukaisia optimaalisia "ilmentämissaarekkeita".

Edullisen suoritusmuodon mukaan haluttua polypeptidiä erittää isäntä, jossa on tämän keksinnön mukainen ilmentämissaareke. Polypeptidien erittäminen aikaansaadaan fuusioimalla signaalipeptidin koodaava DNA-sekvenssi vieraslajisen polypeptidin koodaavaan DNA:oon ja sen kanssa lukuraamiin. Signaalipeptidin koko ei ole kriittinen tässä keksinnössä. Kaikki mitä vaaditaan on, että signaalipeptidi on kooltaan ja sekvenssiltään riittävä aikaansaamaan vieraslajisen polypeptidin erittymisen. Signaalipeptidin

koodaavasta signaalisekvenssistä voivat olla esimerkkeinä signaalisekvenssit, jotka ovat luonnossa liittyneinä ilmentämisen säätelysekvensseihin, signaalisekvenssit, jotka ovat luonnossa liittyneinä haluttuun vieraslajiseen proteiiniin tai polypeptidiin, signaalisekvenssit, jotka ovat isännälle luonnostaan kuuluvia, signaalisekvenssit, jotka kuuluvat luonnostaan vieraslajisen polypeptidin lähteelle, signaalisekvenssit, jotka kuuluvat luonnostaan ilmentämisen säätelysekvenssien lähteelle, ja mitkä tahansa muut sekvenssit, jotka koodaavat funktionaalisia signaalipeptidejä.

Monet ilmennettävistä proteiineista eritetään normaalisti ja niillä on oma signaalipeptidinsä, jonka pitäisi olla sopiva hoitamaan erittymisen. Tässä tapauksessa tuon signaalin koodaava DNA voi sisältyä vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin, joka sijoitetaan ilmentämissaarekkeeseen. Sellaisen polypeptidin tuottamiseksi, jota ei normaalisti eritetä, on mahdollista käyttää signaalisekvenssiä polypeptideistä, jotka normaalisti eritetään isäntäsoluista, tai muista eritetyistä polypeptideistä. Tämän keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa käytetään sekvenssejä, jotka koodaavat maidolle spesifisiä signaalipeptidejä tai muita signaalipeptidejä, jotka ovat hyödyllisiä proteiinin kypsymisessä ja erittymisessä nisäkudoksessa. Näihin kuuluu alfa-S-1-kaseiinista saatu signaalisekvenssi. Jos ilmennettävä vieraslajinen polypeptidi on luonnossa liittynyt omaan signaalisekvenssiinsä, signaalisekvenssi, joka on liittynyt luonnossa vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin, on edullisempi signaalisekvenssi.

Tarpeellisille 5'- ja 3'-vierusalueille on tunnusomaista kyky saada ilmentyminen ilmentymissaarekerakennelmasta olemaan paikasta riippumatonta ja kopioluvusta riippuvaista. Vierussekvenssien pituus ei ole kriittinen, kunhan vain ilmentämisrakennelmalle tuotetaan nämä ominaisuu-

det. Koon ylärajan määrää DNA:n käsittelyn helppous. Ilmentämisen säätelysekvenssien alkuperäisessä lähteessä (eläimessä tai solulinjassa) ilmentämisen säätelysekvenssejä reunustaa teoriassa koko kromosomi. Nykyiset tekniikat sallivat 40 - 50 kiloemäksen DNA-kappaleiden helpon käsittelyn. Tämä vaatii tunnetun kosmiditeknologian käyttöä. Voi myös olla raja DNA:n koolle, joka voidaan ruiskuttaa alkioiden käsittelyssä käytettyjen neulojen kautta. Edullisimpana pidetty tekniikka on käyttää niin suuria 5'- ja 3'-vierusalueita kuin mahdollista, jotta taattaisiin riittävästi eristysaluetta aikaansaamaan riippuvuus kopioluvusta ja riippumattomuus paikasta.

Halutun vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi voidaan saada joko cDNA:sta, genomisekvensseistä, synteettisestä DNA:sta tai puolisynteettisestä DNA:sta. Polypeptidituotteisiin, joita voidaan tuottaa tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä, kuuluvat esimerkiksi hyytymistekijät VIII ja IX, ihmisen tai eläimen seerumin albumiini, kudoksen plasminogeenin aktivaattori (tPA). urokinaasi, alfa-1-antitrypsiini, eläinten kasvuhormonit, Müller- inhiboiva aine (MIS), solujen pintaproteiinit, insuliini, interferonit, interleukiinit, maidon lipaaseit, virusvastaiset proteiinit, peptidihormoonit, immunoglobuliinit, lipokortiinit ja muita vieraslajisia proteiinituotteita.

Haluttu vieraslajinen polypeptidi voidaan tuottaa fuusioproteiinina, joka sisältää aminohappoja halutun tai alkuperäisen proteiinin aminohappojen lisäksi. Esimerkiksi tämän keksinnön mukainen vieraslajinen polypeptidi voidaan tuottaa suuremman vieraslajisen proteiinin tai polypeptidin osana halutun proteiinin stabiloimiseksi tai sen puhdistamisen tekemiseksi helpommaksi ja/tai nopeammaksi. Tämä voidaan aikaansaada sijoittamalla vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi ilmentämissaarekkeeseen kohtaan, joka on 5' siihen rakennegeeniin tai sen osaan näh-

den, joka oli alun perin liittyneenä ilmentämisen säätelysekvensseihin, ja lukuraamiin sen kanssa. On selvää, että sellainen rakennelma vaatii vieraslajisen polypeptidin terminaatiokodonien poistamisen ennen liittämistä ilmentämissaarekkeeseen.

Vaihtoehtoisesti fuusioproteiinin koodaava alue voidaan kokoonpanna ennen liittämistä ilmentämissaarekkeeseen. Fuusioproteiinirakennelma voi käsittää 2 tai useampia vieraslajisen polypeptidin koodaavia sekvenssejä tai niiden osia, kunhan vain sekvenssit ovat samassa lukuraamissa. Tällaisia rakennelmia voidaan valmistaa käyttäen alalla tunnettuja tekniikkoja. Fuusioproteiini voidaan sitten katkoa haluttaessa ja haluttu proteiini eristää. Haluttu vieraslajinen polypeptidi voidaan tuottaa sen polypeptidin palana tai johdannaisena, joka oli alun perin liittyneenä ilmentämisen säätelysekvensseihin. Kukin näistä vaihtoehdoista tuotetaan helposti pelkästään valitsemalla ja/tai käsittelemällä oikeita DNA-sekvenssejä. Tällaiset käsittelyt ovat alalla tunnettuja.

Yllä kuvatut ilmentämissaarekerakennelmat voidaan valmistaa käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä. Esimerkiksi voidaan hyvin käyttää erilaisia ligaatiotekniikkoja käyttäen tavanomaisia liittäjiä (linker), restriktiokohtia jne. Edullisesti tämän keksinnön mukaiset ilmentämissaarekkeet valmistetaan suurempien plasmidien osana. Tällainen valmistus mahdollistaa oikeiden rakennelmien kloonauksen ja valinnan tehokkaalla tavalla kuten on tunnettua alalla ja sallii suurten määrien ilmentämisrakennelmaa tuottamisen helposti.

Erityinen plasmidi ei ole kriittinen tämän keksinnön käytännössä. Pikemminkin mikä tahansa plasmidi, joka tiedetään alalla voitavan replikoida, valita ja jossa on suuria DNA-palasia, olisi sopiva kantaja, johon tämän keksinnön mukaiset ilmentämissarekket voitaisiin sijoittaa. Edullisimmin tämän keksinnön mukaiset ilmentämissaarekkeet

sijoitetaan sopivien restriktiokohtien väliin plasmidiin, niin että ne voidaan helposti eristää jäljellä olevista plasmidisekvensseistä haluttuun isäntään sijoittamista varten.

Sopivan isännän valintaa keksinnön mukaista ilmentämissaareketta varten ohjaavat monet alalla tunnetut tekijät. Näitä ovat esimerkiksi yhteensopivuus valitun vektorin kanssa, polypeptidituotteiden myrkyllisyys, halutun vieraslajisen polypeptidin talteenoton helppous, ilmentämisominaisuudet, vieraslajisen polypeptidin erityiset muokkausvaatimukset, biologinen vaarattomuus ja kustannukset. Absoluuttista isännän valintaa määrättyä haluttua proteiinia tai polypeptidiä varten ei voida tehdä minkään yhden ainoan näistä tekijöistä perusteella. Sen sijaan täytyy löytää näiden tekijöiden tasapaino ottaen huomioon, etteivät kaikki isännät voi olla yhtä tehokkaita määrätyn vieraslajisen polypeptidin ilmentämisessä.

Käyttökelpoisia nisäkäsisäntäsoluja voivat olla B- ja T-imusolut, valkosolut, fibroblastit, maksasolut, haimasolut ja erilaistumattomat solut. Edullista olisi käyttää kuolemattomaksi tehtyjä nisäkässolulinjoja. Esimerkiksi olisivat hyödyllisiä nisäkässolulinjoja 3T3, 3T6, STO, CHO, Ltk$^-$, FT02B, Hep2B, AR42J ja MPC1L. Erityisen edullisia nisäkässolulinjoja ovat CHO, 3T3 ja Ltk$^-$.

Monilta eri nisäkkäiltä peräisin olevia alkioita voidaan käyttää tässä keksinnössä transgeenisten eläinten aikaansaamiseen. Isäntäalkion valinta voi riippua sellaisista tekijöistä kuin vieraslajisen polypeptidin haluttu lopullinen määräpaikka eläimessä. Esimerkiksi edullisessa suoritusmuodossa vieraslajisten polypeptidien ilmentämiseksi nisäkkään maidossa edulliset isäntäalkiot ovat peräisin eläimiltä, joita jo kasvatetaan suurta maidon tuotantoa varten, esim. lehmiltä, lampailta, vuohilta ja sioilta.

On olemassa standardimenetelmiä ilmentämisrakennel-

ma-DNA:n siirtämiseksi eläinsoluihin. Yleisesti käytettyjä transfektiomenetelmiä ovat elektroporaato [H. Potter et al., "Enhancer-Dependent Expression Of Human Kappa Immunoglobulin Genes Introduced Into Mouse Pre-B Lymphocytes By Electroporation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (22) (1984) 7161 - 7165; G. Urlaub et al., "Isolation Of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient In Dihydrofolate Reductase Activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (7) (1980) 4216 - 4200], protoplastifuusio [R.M. Sandri-Goldin et al., Mol. Cell. Biol. 1 (1981) 743 - 752], kalsiumfosfaattiyhteissaostus [F.L. Graham ja A.J. van der Eb, "A New Technique For The Assay Of Infectivity Of Human Adenovirus 5 DNA", Virology 52 (2) (1973) 456 - 467; A.D. Miller et al., "c-fos Protein Can Induce Cellular Transformation: A Novel Mechanism Of Activation Of A Cellular Oncogene", Cell. 36 (1) (1981) 51 60] ja DEAE-dekstraanisulfaatin avulla suoritettavat menetelmät. Lisäksi on olemassa monia muunnelmia DEAE-dekstraanisulfaatti- ja kalsiumfosfaattimenetelmistä [C. Queen ja D. Baltimore, "Immunoglobulin Gene Transcription Is Activated By Downstream Sequence Elements", Cell 33 (3) (1983) 741 - 748; C.M. Groman et al., "Recombinant Genomes Which Express Chloramphenicol Acetyltransferase In Mammalian Cells", Mol. Cell. Biol. 2 (9) (1982) 1044 - 1011; R.S. McIvor et al., "Expression Of A cDNA Sequence Encoding Human Purine Nucleoside Phosphorylase In Rodent And Human Cells", Mol. Cell. Biol.. 5 (6) (1985) 1349 - 1357], jotka voivat tarjota eräitä etuja. Esimerkiksi kalsiumfosfaattiyhteissaostusmenetelmät ovat erityisen tehokkaita nisäkässolujen tapauksessa mukaan lukien CHO-solut.

Valittavissa oleva merkkigeeni siirretään tavallisesti yhdessä ilmentämissaarekerakennelman kanssa nisäkässoluihin erillisenä DNA-palasena, niin että ne solut, jotka sisältävät ilmentämisrakennelman, voidaan helposti eristää. Hyödyllisiä valittavissa olevia merkkigeenejä

ovat dihydrofolaattireduktaasi, metallotioneiini, neo, gpt ja hisD muiden muassa. Valitut solut testataan sitten vieraslajisen proteiinin ilmentämisen suhteen.

On myös olemassa standarditekniikkoja ilmentämisrakennelman siirämiseksi nisäkäsalkion genomiin. Yksi tekniikka nisäkkään muuttamiseksi transgeenisesti on ilmentämissaarekerakennelman ruiskuttaminen hedelmöitettyjen nisäkkään munasolujen esitumaan, jotta saataisiin aikaan yhden tai useamman rakennelman kopion integroituminen genomiin ja säilyminen kehittyvien nisäkkäiden soluissa. Lyhyesti kuvattuna ruiskuttaminen käsittää hedelmöitettyjen munasolujen eristämisen, esituman tekemisen näkyväksi ja sitten DNA:n ruiskuttamisen esitumaan pitämällä munasoluja tylpällä pitopipetillä (halkaisijaltaan noin 50 µm) ja käyttämällä teräväkärkistä pipettiä (halkaisijaltaan noin 1,5 µm) DNA:n sisältävän puskuriliuoksen ruiskuttamiseen esitumaan. Katso esimerkiksi D. Kraemer et al., "Gene Transfer Into Pronuclei Of Cattle And Sheep Zygotes", Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo, s. 221 - 227, Cold Spring Harbor Laboratory (1985); R.E. Hammer et al., "Production Of Transgenic Rabbits, Sheep And Pigs By Microinjection", Nature 315 (1985) 680 - 683 ja J.W. Gordon ja F.H. Ruddle, "Gene Transfer Into Mouse Embryos: Production Of Transgenic Mice By Pronuclear Injection", Methods in Embryology 101 (1983) 411 - 433.

Ruiskuttaminen suoritetaan edullisesti alkiolle yksisoluvaiheessa, jotta maksimoitaisiin sekä mahdollisuudet, että ruiskutettu DNA tulee sisältymään kaikkiin eläimen soluihin ja että eläimen jälkeläiset tulevat myös olemaan transgeenisiä. Tavallisesti vähintään 40 % nisäkkäistä, jotka kehittyvät ruiskutetuista munasoluista, sisältää kloonatun rakennelman vähintään yhden kopion ruumiin kudoksissa, ja nämä "transgeeniset eläimet" tavallisesti siirtävät geenin sukusolulinjan kautta seuraavalle sukupolvelle. Tulokseksi saadun transgeenisen nisäkkään kudok-

sesta eristetty DNA voidaan testata ilmentämissaarekkeen läsnäolon suhteen Southern blot -analyysin avulla. Jos yksi tai useampia ilmentämissaarekkeen kopioita jää stabiilisti integroituneena sellaisten transgeenisten nisäkkäiden genomiin, on mahdollista perustaa pysyviä transgeenisiä nisäkäslinjoja, jotka omaavat ilmentämissaarekerakennelman.

Transgeenisesti muutettujen nisäkkäiden jälkeläiset voidaan tutkia syntymän jälkeen ilmentämissaarekerakennelman genomiin sisältymisen suhteen. Edullisesti tämä tutkimus suoritetaan jälkeläisestä saadun kromosomimateriaalin Southern-hybridisaation avulla käyttäen koetinta, joka vastaa vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin osaa. Ne nisäkkäiden jälkeläiset, joiden todetaan sisältävän rakennelman vähintään yhden kopion genomissaan, kasvatetaan kypsiksi. Tämän keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa naaraspuoliset näistä jälkeläisistä tuottavat haluttua vieraslajissta polypeptidiä maidossaan tai yhdessä sen kanssa. Vaihtoehtoisesti transgeenisiä nisäkkäitä voidaan kasvattaa tuottamaan muiden sellaisten transgeenisten jälkeläisten tuottamiseksi, jotka ovat hyödyllisiä haluttujen vieraslajisten polypeptidien tuottamisessa.

ESIMERKKEJÄ

Esimerkki 1 - Naudan alfa-S-1-kaseiini -ilmentämissaarekkeen kokoonpaneminen

Yksi esimerkki tästä teknologiasta on ilmentämissaarekerakennelman käyttäminen vieraslajisen proteiinin tuottamiseksi vahingoittumattoman eläimen erityisessä kudos- tai elinsysteemissä. Tässä tapauksessa järjestimme vieraslajisen proteiinin runsaan ilmentymisen nisäkkään maitorauhasessa.

Tässä kuvattu geenirakennelma sisältää "ilmentämissaarekkeen", jossa naudan alfakaseiinigeenistä peräisin olevat genomisekvenssin suureet 5'- ja 3'-vierusalueet

ohjaavat ihmisen urokinaasin genomikloonin ilmentymistä. 5'-vierusalue käsittää 21 kiloemästä ylävirran alfakaseiinisekvenssejä mukaan lukien ensimmäinen ei koodaava eksoni ja toisen eksonin ei koodaava osa. 9 kiloemäksen 3'-vierusalue käsittää eksonit, jotka koodaavat alfaka+ seiinin COOH-terminaalisen puoliskon, polyadenylaatiosignaalin, ja 2 kiloemästä lisää alavirran puoleisia sekvenssejä.

Kloonasimme naudan alfa-S-1-kaseiinigeenin (CAS) vasikan kateenkorva-DNA:n kosmidikirjastosta kosmidivektorissa HC79 (peräisin toiminimeltä Boehringer Mannheim) kuten ovat kuvanneet B. Hohn ja J. Collins, "A Small Cosmid For Efficient Cloning Of Large DNA Fragments", Gene 11 (3 - 4) (1980) 291 - 298. Kateenkorva saatiin teurastamosta ja DNA eristettiin käyttäen alalla tunnettuja yleisiä tekniikkoja (T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratony Manual sivulla 271, Cold Spring Harbor Laboratyry (1982)). Kokoonpanimme kosmidikirjastoa käyttäen yleisiä tekniikkoja (F. Grosveld et al., "Isolation Of Beta - Globin - Related Genes From A Human Cosmid Library", Gene 13 (3) (1981) 227 - 231. Pilkoimme vasikan kateenkorva-DNA:n osittain Sau3A:n avulla (New England Bio Labs) ja ajoimme sen NaCl-gradientissa (1 M - 5 M) rikastamiseksi 30 - 40 kiloemäksen palasten suhteen. Osittain pilkotun DNA:n palaset yhdistettiin sitten ligaation avulla BamHI:llä pilkottuun HC79-kosmidivektoriin, mitä seurasi in vitro pakkaaminen lambdauutetiden avulla (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL) valmistajan ohjeiden mukaan. In vitro pakattu materiaali käytettiin sitten E. coli K-12 -kannan HB101 transfektointiin. Tämän vektorin sisältäviä klooneja valittiin kasvattamalla LB-maljoilla, jotka sisälsivät ampisilliiniä 50 µg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Seuloimme tulokseksi saadun kirjaston käyttäen 45

emäsparin oligonukleotidikoetinta CAS-1. Tämä CAS-1-sekvenssi 5'-ATGGCTTGATCTTCAGTTGATTCACTCCCAATATCCTTGCTCAG-3' syntetisoitiin alfa-S-1-kaseiinin osa-cDNA-sekvenssin perusteella, jonka ovat kuvanneet I.M. Willis et al., "Construction And Identification By Partial Nucleotide Sequence Analysis Of Bovine Casein And Beta-Lactoglobulin cDNA Clones", DNA 1 (4) (1982) 375 - 386. Tämä sekvenssi vastaa kypsän naudan kaseiinin aminohappoja 20 - 35. Tämän seulonnan tuloksena eristimme kolme kloonia, jotka sisälsivät kosmideja (C9, D4 ja E1).

5'- ja 3'-vierussekvenssit hankittiin kosmidiklooneista E1 ja C9. Restriktiokartoitus ja Southern blot -analyysi (E. Southern, "Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated By Gel Electrophoresis", J. Mol. Biol. 98 (3) (1975) 503 - 517) käyttäen oligonukleotidikoettimia, jotka vastasivat kaseiini-cDNA:n tunnettuja sekvenssoituja alueita (A.F. Stewart et al., "Nucleotide Sequences Of Bovine Alpha S1- And Kappa-Casein cDNAs", Nucleic Acids Res. 12 (9) (1984) 3895 - 3907; M. Nagao et al., "Isolation And Sequence Analysis Of Bovine Alpha S1-Casein cDNA Clone", Agric. Biol. Chem. 48 (6) (1984) 1663 - 1667) osoittivat, että kosmidit D4 ja E1 sisälsivät osan kaseiinin rakennegeenistä (DNA-sekvenssi, joka koodaa kaseiini-proteiinin) ja 21 kiloemästä ylävirran puoleisia eli 5'-vierussekvenssejä. C9-kosmidi sisälsi osan kaseiinin rakennegeenistä ja ulottui kohtaan 7 kiloemästä alavirtaan polyadenylaatiosekvenssistä. Sekvenssoimme kosmidit E1 ja D4 alueella, joka vastasi kaseiinin rakennesekvenssin transkription aloituskohtaa, ja määritimme sekvenssia, että sekvenssi vastasi saman alueen julkaistun sekvenssin. (L.Y. Yu-Lee et al., "Evolution Of The Casein Multigene Family: Conserved Sequences In The 5' Flanking And Exon Regions", Nucleic Acid Res. 14 (4) (1986) 1883 - 1902).

Tämän ilmentämissaarekkeen kokoonpaneminen tässä

keksinnössä on kuvattu kuviossa 2. C9-kosmidista subkloonasimme 9 kiloemäksen BamHIpalasen, joka alkaa alfakaseiinin aminohappoa # 98 seuraavassa intronissa olevasta BamHI-kohdasta ja jatkuu toiseen Bam-kohtaan, joka sijaitsee 2 kiloemästä alfakaseiinin polyadenylaatiosignaalista alavirtaan. Tämä palanen on merkitty kuviossa 2 nimityksellä "C-term". Tämä 9 kiloemäksen palanen kloonattiin BamHI:llä leikattuun pUC9:ään, jolloin saatiin pCAS947. Alavirran BamHI-kohta muutettiin SalI-kohdaksi pilkkomalla pCAS947:ä osittain BamHI:llä ja yhdistämällä sen jälkeen ligaation avulla SalI-liittäjän CAS 10 kanssa, jonka sekvenssi on 5'-GATCGTCGAC-3'. Tulokseksi saadulle plasmidille annettiin nimitys pCAS1238. Tätä 9 kiloemäksen BamHI - SalI-palsta käytettiin "saarekkeen" 3'-vierussekvenssinä. Se sisältää 3'- vaille translaatiota jäävän alueen ja 3'-ilmentämisen säätelysekvenssejä ja osan rakennegeenistä alfa-S-1-kaseiinista.

Seuraava vaihe oli 5'-vierusalueen rakentaminen. Alue, joka sisälsi transkription aloituskohdan, ei koodaavan eksonin ja toisen eksonin, josta osa oli myös ei koodaava, subkloonattiin. 4 kiloemäksen SmaI/BamHI-palanen kosmidista E1 eristettiin ja subkloonattiin BamHI/SmaI:llä pilkottuun pUC9:ään, jolloin saatiin pCAS1176. Plasmidia pilkottiin BglII:lla toisen eksonin koodaavan osan poistamiseksi ja sitten BglII-kohta muutettiin BamHI-kohdaksi yh-distämällä ligaation avulla CAS 12 -liittäjään, jonka sekvenssi oli 5'-GATCTTGGATCCAA-3'. Tulokseksi saatua plasmidia pCAS1181 pilkottiin sitten SmaI:llä ja BamHI:llä 3 kiloemäksen palasen kosmidi E1 -DNA:a poistamiseksi. Palanen eristettiin, yhdistettiin ligaation avulla pCAS1238:sta saatuun 9 kiloemäksen BamHI - SalI-palaseen ja liitettiin SmaI/SalI:llä pilkottuun pUC19:ään, jolloin saatiin pCAS1276.

Tulokseksi saadussa rakennelmassa on transkription aloituskohta liitetty alavirran genomisekvenssiin siten,

että niiden välissä on ainoana esiintyvä BamHI-kloonauskohta, johon vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi voidaan sijoittaa. Koska lopullisissa rakennelmissa on useita muita BamHI-kohtia genomisekvensseissä, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin kloonauskohta muutettiin sekä XhoI-kohdaksi että NotI-kohdaksi lisäämällä liittäjä CAS 30, jonka sekvenssi on 5'-GATCTCGAGCGCGGCCGCGCT-3'. Tulokseksi saatu vektori pCAS1277 sisältää XhoI- ja NotI-kohdan kloonauskohtina alfakaseiinin transkription aloituskohdan ja alfakaseiinin C-terminaalisen genomiosan välissä.

pCAS1277:stä saaduilla transkription aloituskohdalla ja C-terminaalisella alueella korvattiin sitten kosmidissa E1 olevat alfakaseiinin genomisekvenssin vastaavat osat. Koska rakennelma on pituudeltaan 39 kiloemästä, käytettiin kosmiditeknologiaa plasmidien käsittelyyn. Alkuperäinen E1-kosmidi pilkottiin osittain XmaI:llä, mitä seurasi täydellinen pilkkominen SalI:llä tuossa kosmidissa olevan alfakaseiinigeenin 3'- suurimman osan poistamiseksi. SmaI- ja XmaI-entsyymeillä on sama tunnistuskohta, paitsi että XmaI jättää 5'-ulokkeen, kun taas SmaI jättää tylpän pään. pCAS1277:stä saatu 12 kiloemäksen XmaI - SalI-palanen sijoitettiin sitten XmaI/SalI:llä pilkottuun kosmidiin korvaamaan poistettu osa.

Ligaation avulla yhteen liitetyille tuotteille suoritettiin in vitro pakkaaminen käyttäen in vitro -pakkaustarvikkeita (Amersham Corporation) ja pakattu DNA käytettiin E. coli DH5 -solujen transfektointiin, mitä seurasi valinta LB-maljoilla, jotka sisälsivät ampisilliiniä 50 µg/ml (Sigma Chemical Co.). Ampisilliinille resistenteistä kolonioista saadut plasmidit seulottiin käyttäen kaseiinin 3'-päälle spesifisiä oligonukleotidikoettimia. Identifioimme ja karakterisoimme plasmideja, jotka sisältävät 21 kiloemästä ylävirtaan transkription aloituskohdasta ja XhoI/NotI-kloonauskohdan yhdessä genomi-3'-pään kanssa ka-

seiinigeenistä. Yhtä näistä plasmideista, CAS1288:a, käytettiin sitten vieraslajisen DNA-sekvenssin ilmentämiseen.

Ihmisen urokinaasin genomiklooni eristettiin genomikirjastosta käyttäen julkaistuja sekvenssejä koettimina. A. Riccio et al., supra. Julkaistusta sekvenssistä voidaan nähdä, että läsnä on ApaI-kohta ylävirtaan geenin translaation aloitusskohdasta ja myös alavirtaan polyA-transkriptiosignaalista. Oligonukleotidiadaptereita (URO 8, jonka sekvenssi on 5'-CGTCGACG-3', ja URO 9, jonka sekvenssi on 5'-GTACCGTCGACGGGCC-3') käytettiin SalI-kohtien lisäämiseksi näihin kahteen sivuilla olevaan ApaI-kohtaan. Tämä teki mahdolliseksi genomikloonin sijoittamisen eläinsoluilmentämisvektoriin alavirtaan SV40- varhaisesta promoottorista, niin että saatoimme testata ilmentämistä ennen alfakaseiini-ilmentämissaarekkeeseen liittämistä. Tulokseksi saatu plasmidi pUK0409 määräsi aidon ihmisen urokinaasin ilmentymistä transfektoiduissa kudosviljelmän soluissa. Tiesimme sen vuoksi, että genomiklooni oli toimiva. Seuraava vaihe oli sijoittaa urokinaasin genomiklooni CAS1288:n XhoI-kloonauskohtaan. Nämä vaiheet on kuvattu kuviossa 3.

Urokinaasin genomiklooni eristettiin 8 kiloemäksen SalI-palasena pUK0409:stä. SalI-ulokepäät voidaan yhdistää ligaation avulla CAS1288:ssa olevaan XhoI-kloonauskohtaan. Alfakaseiinin 21 kiloemäksen ylävirran alueella on kuitenkin toinen XhoI-kohta. Suoritimme sen vuoksi osittaisia XhoI-pilkkomisia, mitä seurasi ligaation avulla yhdistäminen eristetyn SalI-urokinaasipalasen kanssa (katso kuvio 3). Plasmideja eristettiin kolonioista ja seulottiin urokinaasi-DNA-sekvenssin läsnäolon ja sijaitsemissuunnan suhteen. Yksi näistä plasmideista, CAS1295, sisälsi urokinaasigeenin oikean suuntaisena määritettynä restriktioanalyysin avulla. Tämä plasmidi sisältää 5' - 3'-suuntaisena kaseiinin 21 kiloemäksen ylävirran alueen, ensimmäisen ei koodaavan eksonin ja intronin sekvenssit, urokinaa-

sin koodaavan genomisekvenssin, 9 kiloemäksen 3'-genomial-fakaseiinialueen.

Esimerkki 2 - "Ilmentämissaareke"-rakennelman transgeeninen liittäminen hiirille

Transgeenisten kokeiden suorittamista varten CAS1295:ssä läsnä olevat prokaryoottivektorisekvenssit poistettiin ennen ruiskuttamista alkioihin. Tämä suoritettiin pilkkomalla CAS1295:tä ClaI:llä ja SalI:llä, mitä seurasi geelielektroforeesi 1 % agaroosi-TBE:ssä (katso Maniatis et al., supra). 41 kiloemäksen palanen, joka vastasi ilmentämissaarekerakennelman eukaryoottisekvenssejä, leikattiin pois geelistä ja DNA eristettiin sähköeluoinnin avulla. DNA:a sentrifugoitiin sitten yön ajan tasapaino-CsCl-gradientissa. Poistimme DNA-vyöhykkeen gradientista ja dialysoimme perusteellisesti TNE-puskuriliuosta vastaan (5 mM Tris, pH 7,4, 5 mM NaCl ja 0,1 mM EDTA, pH 8).

Menetelmä halutun geneettisen informaation transgeenistä sisällyttämistä varten kehittyvään hiiren alkioon on alalla tunnettu. Noudatimme tekniikkoja, jotka on esitetty julkaisussa B. Hogan et al., Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1986). Käytimme C57Bl- ja CB6-hiirten (Jackson Laboratories) välistä F1-sukupolven (Sloan Kettering) risteytystä. Kuuden viikon ikäisille naaraille aiheutettiin superovulaatio ruiskuttamalla Gestileä (tiineen tamman seerumi) ja sen jälkeen ihmisen sikiön suonikalvon gonadotropiinia kaksi päivää myöhemmin. Käsitellyille naaraille aiheutettiin C57Bl-siitosuroksilla siitos 24 tuntia myöhemmin. Munasolun kohdun seinämään kiinnittymistä edeltävässä vaiheessa olevat hedelmöitetyt alkiot poistettiin 12 tunnin, kuluessa parittelun jälkeen DNA:n ruiskuttamista ja valetiineisiin naaraisiin siirtämistä varten.

Alkion eristämisen jälkeen poistimme ensin munasolua ympäröivät munakumpusolut hyaluronidaasin avulla. Ilmentämissaarekerakennelma ruiskutettiin sitten alkion

esitumaan, niin että se paisui kooltaan 30 % - 50 %. Siirsimme sitten alkiot, joihin oli suoritettu ruiskuttaminen, valetiineiden F1-naaraiden munanjohtimiin. Tulokseksi saatujen elävien jälkeläisten hännästä saatu DNA tutkittiin sitten käyttäen koettimena lovi (nick) -translaation avulla valmistettua CAS1295-DNA:a sellaisten eläinten identifioimiseksi, jotka omasivat ilmentämissaarekerakennelman. Identifioitiin kolme transgeenistä eläintä. Näiden eläinten annettiin paritella ja jälkeläiset testattiin ilmentämissaarekerakennelman läsnäolon suhteen kuten on kuvattu supra.

Yksi transgeenisistä linjoista, joka omasi 2 - 3 ilmentämissaarekerakennelman kopiota, antoi geneettisen materiaalin siirtyä Mendelin mukaan. Tämän transgeenisen linjan naaraat, joilla on CAS1295-insertti, tuottavat kaikki ihmisen urokinaasia maidossaan määränä noin 1 mg/ml, määritettynä entsymaattisen määrityksen avulla. Urokinaasin inhiboi monoklonaalinen vasta-aine # 394, joka on spesifinen ihmisen urokinaasille (Americana Diagnostica, Inc., New York, NY).

Muut kaksi transgeenistä linjaa omasivat 20 - 50 rakennelman kopiota, mutta eivät siirtäneet kyseistä DNA:a seuraavalle hiirisukupolveelle. Uskomme, että suuren kopiolukumäärän omaavien linjojen kyvyttömyys siirtää geenit johtuu urokinaasin korkeasta perustasosta sikiönkehityksen aikana. Urokinaasia ilmentyy normaalisti sikiökautisessa kudoksessa (sikiön kantasolut) ja se voi toimia kehityksessä. Kaseiinin ilmentämisen säätelysekvensseistä tapahtuvan urokinaasin ilmentymisen alhainen perustaso ei häiritsisi kehittymistä niissä alkioissa, jotka ovat perineet kaksi geenin kopiota. Kuitenkin jos ilmentyminen on riippuvaista kopioiden lukumäärästä, niissä linjoissa, joissa on 20 - 50 kopiota, olisi 20 - 50 kertaa korkeampi perustaso, ja ne ilmentäisivät sen vuoksi riittävästi urokinaasia häiritsemään oikeaa kehittymistä. Nämä tulokset osoit-

tavat, että urokinaasin ilmentymistaso on kopioluvusta riippuvainen.

Esimerkki 3 - Ilmentämissaarekerakennelman transfektio eläinsoluihin

Ilmentämissaarekerakennelma ja selektoitava merkkigeeni pSV2-DHFR (saatavissa kokoelmasta the American Type Culture Collection (ATCC 37146)), joka koodaa dihydrofolaattireduktaasin tuottamista nisäkässoluissa, lisätään yhdessä DHFR$^-$-CHO-soluihin elektroporaation avulla. Tämä tekniikka valitaan, koska sen avulla kyetään tuottamaan isäntäsoluja, joille on ominaista suurina kopiolukumäärinä stabiilisti integroitunut vieras DNA. Eurooppapatenttihakemuksessa 0 343 783 kuvataan perusteellisesti tämä tekniikka ja se liitetään tähän viitteenä.

Ennen elektroporaatiota pSV2-DHFR-plasmidi saatetaan lineaariseen muotoon pilkkomalla yön ajan 37 °C:ssa AatII:lla. Ilmentämissaarekesekvenssit eristetään vektorisekvensseistä katkomalla restriktioentsyymeillä kuten on kuvattu esimerkissä 2, mitä seuraa geelielektroforeesi erottelun ja puhdistumisen aikaansaamiseksi (Maniatis et al., supra). Lohen maidin DNA:a (200 µg), joka on aikaisemmin sonikoitu 300 - 1000 emäsparin palasiksi, lisätään seokseen, joka sisälää 200 µg lineaariseen muotoon saatettua pSV2-DHFR ja 0,5 mg/ml ilmentämissaareke-, rakennelmaa. DNA-seoksen saostamiseksi lisätään NaCl lopulliseksi pitoisuudeksi 0,1 M. Seuraavaksi lisätään 2,5 tilavuutta etanolia ja seosta inkuboidaan kymmenen minuutin ajan hiilihappojään päällä. Sen jälkeen kun on sentrifugoitu kymmenen minuutin ajan 4 °C:ssa, etanoli imetään pois ja DNA-pellettiä ilmakuivataan 15 minuutin ajan kudosviljelykaapissa. DNA-pelletti uudelleensuspendoidaan sitten 800 µl:aan 1X HeBS (20 mM Hepes/NaOH, pH 7,05; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na2HP04; 6 mM dekstroosia) vähintään kahden tunnin ajaksi ennen elektroporaatiota.

Noin 2 x 10^7 DHFR$^-$-CHO-solua (subkloonattu kloonis-

ta, jolle ovat antaneet nimityksen CHO-DUKXB1 Urlaub ja Chasis, "Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient In Dihydrofolate Reductase Activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216 - 4220) käytetään kuhunkin elektroporaatioon. DHFR$^-$-CHO-solut siirrostetaan elektroporaatiota edeltävänä päivänä, ja ne ovat noin 50 % konfluentteja 10 cm:n maljoilla, kun ne kootaan elektroporaatiota varten. DHFR$^-$-CHO-solut irrotetaan maljoilta trypsiinikäsittelyn avulla ja trypsiini inaktivoidaan sen jälkeen lisäämällä 8,0 ml α^+-elatusainetta (MEM-alfa, johon on lisätty ribonukleotideja ja deoksiribonukleotideja (10 mg/l kutakin yhdisteistä adenosiini, sytidiini, guanosiini, uridini, 2'-deoksiadenosiini, 2,-deoksiguanosiini ja 2'-deoksitymidiini; 11 mg/l 2'-deoksisytidiinihydrokloridia) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY), 10 % sikiökautisten nauda seerumia (Hazelton, Lenexa, KS) ja 4 mM glutamiinia (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD)) maljaa kohti. Maljoilta irrotetut solut kootaan sitten ja sentrifugoidaan nopeudella 1000 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan. Suurin osa elatusaineesta imetään pois solupelletiltä ja solut uudelleensuspendoidaan jäljelle jääneeseen elatusaineeseen näpäyttämällä putkea.

Ilmentämissaareke, pSV2-DHFR ja lohen maidin DNA, jotka on suspendoitu 800 µl:aan 1 X HeBS, lisätään sitten DHFR$^-$-CHO-solusupensioon. Tulokseksi saatu seos siirretään välittömästi elektroporaatiokyvettiin. elektroporaatiolaitteen kondensaattori säädetään arvoon 960 µF ja jännitteeksi säädetään 300 V. Yksi ainoa pulssi, joka kestää noin 10 millisekuntia, annetaan kyvetin sisällölle huoneenlämpötilassa. Soluja inkuboidaan sitten 8 - 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa ja ne siirretään sitten 15 ml:n putkeen, joka sisältää 14 ml α^+-elatusainetta. Solut sentrifugoidaan kuten yllä. Sen jälkeen kun elatusaine on imetty pois, märkä solupelletti uudelleensuspendoidaan näpäyttämällä putkea ja uutta α^+-elatusainetta lisätään. Sus-

pendoidut solut istutetaan sitten viljelymaljoille ei selektiiviseen elatusaineeseen 2 päivän ajaksi, jotta ne saisivat toipua elektroporaatiosta ja ilmentää selektiivistä geeniä. Noin 20 - 30 %:n elinkykyisistä CHO-soluista odotetaan sisältävän ilmentämissaareke/pSV2-DHFR:n ja siten selviävän valintamenettelyssä. Sen vuoksi noin 1 x 10^7 solun kokonaismäärä 10 cm:n maljaa kohti istutetaan ja viljellään 37 °C:ssa, 5,5 % CO_2 sisältävässä kasvatuskaapissa.

Kahden päivän toipumisajan jälkeen solut poistetaan viljelymaljoilta trypsiinikäsittelyn avulla kuten yllä on kuvattu, lasketaan ja istutetaan kuudelle 10 cm:n maljalle tiheydelle noin 1 x 10^6 solua maljaa kohti, α^--elatusaineeseen (Sigma Chemical Co.). Ilmentämissaarekkeen ja pSV2-DHFR:n sisältävät solut valitaan sen jälkeen kun on inkuboitu 4 päivän ajan α^--elatusaineessa. Valitut solut testataan sitten urokinaasin ilmentämisen suhteen käyttäen yleisiä tekniikkoja, esim. kaupallisesti saatavissa olevaa kolorimetristä testiä Spectrozyme UK (Americana Diagnostica, Inc.).

Valitaan useita klooneja, joilla on erilaisia urokinaasin ilmentymistasoja. DNA ja RNA eristetään näistä klooneista ja suoritetaan Northern- ja Southern-analyysi ilmentämissaarekerakennelman transkriptiotason ja kopioluvun määrittämiseksi. Tämä analyysi paljastaa, onko urokinaasitiedon ilmentyminen kopioluvun funktio ja riippumatonta integroituneen rakennelman integraatiokohdasta.

Tämän keksinnön mukaisesta rakennelmasta, joka sisältää plasmidin CAS1288, on esimerkkinä viljelmä, joka on talletettu kokoelmaan In Vitro International, Inc., Linthicum, Maryland, 1. helmikuuta 1990 ja identifioitu siellä CAS1288:ksi, jossa plasmidi CAS1288 on E. coli DH5:ssä. Sille on annettu talletusnumero IVI 10232. Talletus siirrettiin 20.6.91 talletuslaitokseen American Type Culture Collection, ATCC-talletusnumerolla 68776.

Toisesta tämän keksinnön mukaisesta rakennelmasta, joka sisältää plasmidin CAS1295, on esimerkkinä viljelmä, joka on talletettu kokoelmaan In Vitro International, Inc., Linthicum, Maryland, 1. helmikuuta, 1990 ja identifioitu siellä CAS1295:ksi, jossa plasmidi CAS1295 on E. coli DH5:ssä. Sille on annettu talletusnumero IVI 10231. Talletus siirrettiin 20.6.91 talletuslaitokseen American Type Culture Collection, ATCC-talletusnumerolla 68775.

Vaikka olemme edellä esittäneet monia keksintömme suoritusmuotoja, on ilmeistä, että peruskonstruktiotamme voidaan muuttaa muiden sellaisten suoritusmuotojen aikaansaamiseksi, joissa käytetään tämän keksinnön mukaisia menetelmiä ja koostumuksia. Sen vuoksi on tarkoitus, että tämän keksinnön piirin määrittelevät oheiset patenttivaatimukset eivätkä erityiset suoritusmuodot, jotka on esitetty edellä esimerkkeinä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä halutun vieraslajisen polypeptidin tuottamiseksi suurena määränä isännässä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

a) integroidaan vähintään yksi ilmentämissaareke mainitun isännän genomiin, jolloin mainittu ilmentämissaareke käsittää 5' - 3'-suunnassa 5'-vierusalueen, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ja 3'-vierusalueen; mainittu 5'-vierusalue käsittää 5'- ilmentämisen säätelysekvenssejä toimivasti liitettynä mainittuun vieraslajisen polypeptodon koodaavaan sekvenssiin ja 5'- translaatiota vaille jäävän alueen; mainittu 3'-vieruslaue käsittää 3'- translaatiota vaille jäävän alueen ja 3'- ilmentämisen säätelysekvenssejä toimivasti liitettynä mainittuun vieraslajisen polypeeptidin koodaavaan sekvenssiin ja mainittujen ilmentämissaarekkeiden 5'- ja 3'-vierusalueet ovat kooltaan ja rakenteeltaan riittäviä saamaan halutun vieraslajisen polypeptidin tuottotason oleellisesti riippuvaiseksi isännän genomiin integroituneiden ilmentämissaarekkeen kopioiden lukumäärästä ja oleellisesti riippumattomaksi ilmentämissaarekkeen integraatiokohdasta isännän genomissa; ja

b) viljellään mainittua isäntää olosuhteissa, jotka sallivat mainitun halutun vieraslajisen polypeptidin ilmentyvän.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi sisältää funktionaalisen signaalisekvenssin koodaavan alueen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että signaalisekvenssin koodaava alue on peräisin maidolle spesifisen proteiinin geenistä.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että maidolle spesifisen proteiinin geeni on kaseiini.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 2 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntä on maitoa erittävä nisäkäs, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat hiiret, lehmät, lampaat, vuohet ja siat, ja 5'- ja 3'-vierussekvenssit ovat peräisin maidolle spesifisen proteiinin geenistä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi on valittu sekvensseistä, jotka koodaavat polypeptidin ryhmästä: tPA, urokinaasi, Muller- inhiboiva aine, interferoneja, hyytymistekijät VIII ja IX, eläinten kasvuhormoneja, insuliini, interleukiineja, immunoglobuliineja ja lipokortiineja.

7. Ilmentämissaareke-DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 5' - 3'-suunnassa 5'-vierusalueen, vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin ja 3'-vierusalueen; jolloin 5'-vierusalue käsittää 5'- ilmentämisen säätelysekvenssejä toimivasti liitettynä vieraslajisen polypeptidin koodaavaan sekvenssiin ja 5'- translaatiota vaille jäävän alueen; 3'-vierusalue käsittää 3'-translaatiota vaille jäävän alueen ja 3'- ilmentämisen säätelysekvenssejä toimivasti liitettyinä vieraslajisen polypeptidin koodaavaan alueeseen; jolloin ilmentämissaarekkeen integroiduttua isännän genomiin ilmentämissaarekkeen 5'- ja 3'-vierusalueet ovat kooltaan ja rakenteeltaan riittäviä aikaansaadakseen vieraslajisen polypeptidin koodaavan sekvenssin koodaaman polypeptidin tuottotason oleellisesti riippuvaiseksi integroituneiden ilmentämissaarekkeen kopioiden lukumäärästä isännän genomissa ja oleellisesti riippumattomaksi ilmentämissaarekkeen integraatiokohdasta isännän genomissa.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen ilmentämissaareke, t u n n e t t u siitä, että vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi sisältää funktionaalisen signaalisekvenssin koodaavan alueen.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen ilmentämissaareke, t u n n e t t u siitä, että 5'- ja 3'-vierussekvenssit ovat peräisin maidolle spesifisen proteiinin geenistä.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen ilmentämissaareke, t u n n e t t u siitä, että signaalisekvenssin koodaava alue on peräisin maidolle spesifisen proteiinin geenistä.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen ilmentämissaareke, t u n n e t t u siitä, että maidolle spesifisen proteiinin geeni on kaseiini.

12. Patenttivaatimuksen 7 mukainen ilmentämissaareke, t u n n e t t u siitä, että vieraslajisen polypeptidin koodaava sekvenssi on valittu sekvensseistä, jotka koodaavat jonkin polypeptidin seuraavien muodostamasta ryhmästä: tPA, urokinaasi, Muller- inhiboiva aine, interferonit, hyytymistekijät VIII ja IX, eläinten kasvuhormonit, insuliini, interleukiinit, immunoglobuliinit ja lipokortiinit.

13. Transformoitu isäntä, t u n n e t t u siitä, että sen genomi sisältää integroituneen ilmentämissaarekkeen, joka ilmentämissaareke on minkä tahansa patenttivaatimuksen 7 - 12 mukainen.

L13

Patentkrav

1. Förfarande för produktion av en önskad heterolog polypeptid i stora mängder ur en värdcell, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet omfattar steg, vid vilka man

a) integrerar åtminstone en avvikande, exprimerande cellgrupp i värdcellens genom, varvid den avvikande, exprimerande cellgruppen i 5' - 3'-riktningen omfattar en 5'-flankerande region, en heterolog polypeptidkodande sekvens och en 3'-flankerande region; och den 5'-flankerande regionen omfattar en 5'-expressionen styrande sekvens som operativt bundits vid sekvensen som kodar för den heterologa polypeptiden och en 5'-otranslaterad region; och den 3'-flankerande regionen omfattar en 3'-otranslaterad region och en 3'-expressionsstyrsekvens som operativt bundits vid sekvensen som kodar för den heterologa polypeptiden; och de 5'- och 3'-flankerande regionerna hos de avvikande, exprimerande cellgrupperna är av tillräcklig storlek och struktur för att göra produktionsnivån av den önskade heterologa polypeptiden väsentligen beroende av antalet identiska, avvikande och exprimerande cellgrupper som integrerats i värdcellgenomet och väsentligen oberoende av stället, var de avvikande och exprimerande grupperna integrerats i värdcellgenomet; och

b) odlar nämnda värdcell under förhållanden, vilka tillåter att den önskade, heterologa polypeptiden exprimeras.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att sekvensen som kodar för den heterologa polypeptiden, omfattar en funktionell signalsekvenskodande region.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att signalsekvenskodande regionen deriverats från en mjölkspecifik proteingen.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att den mjölkspecifika proteingenen är kasein.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 2-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att värden är ett laktatproducerande däggdjur, vilket vals bland möss, kor, får, getter och svin och att de 5'- och 3'-flankerande sekvenserna deriverats från en mjölkspecifik proteingen.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att sekvensen som kodar för den heterologa polypeptiden, valts bland sekvenser som kodar för en polypeptid, vilken valts bland tPA, urokinas, Mullers hämmande substans, interferoner, koaguleringsfaktorerna VIII och IX, animala tillväxthormoner, insulin, interleukiner, immunoglobuliner och lipokortiner.

7. Avgränsad, exprimerande DNA-sekvens, vilken i 5' - 3'-riktningen omfattar en 5'-flankerande region; en sekvens som kodar för en heterolog peptid, och en 3'-flankerande region; varvid den 5'-flankerande regionen omfattar en 5'-expressionsstyrsekvens som operativt förenats med sekvensen som kodar för den heterologa polypeptiden, och en 5'-otranslaterad region; och den 3'-flankerande regionen omfattar en 3'-otranslaterad region och en 3'-expressionsstyrsekvens som operativt förenats med regionen som kodar för den heterologa polypeptiden; varvid då de avvikande, exprimerande cellgrupperna integreras i genomet av en vädrcell, 5'- och 3'-flankerande regionerna av de avvikande och exprimerande grupperna är av tillräcklig storlek och struktur för görande av produktionsnivån för en polypeptid, vilken kodas av en sekvens som kodar för den heterologa polypeptiden, väsentligen beroende av antalet identiska, avvikande och exprimerande cellgrupper i värdcellgenomet och väsentligen oberoende av stället där de avvikande och exprimerande grupperna integrerats i värdgenomet.

8. Avvikande och exprimerande cellgrupp enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att sekvensen som kodar för den heterologa peptiden, omfattar en funktionell signalsekvenskodande region.

9. Avvikande och exprimerande cellgrupp enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att de 5'- och 3'-flankerande sekvenserna deriverats från en mjölkspecifik proteingen.

10. Avvikande och exprimerande cellgrupp enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a d därav, att den signalsekvenskodande regionen deriverats från en mjölkspecifik proteingen.

11. Avvikande och exprimerande cellgrupp enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a d därav, att den mjölkspecifika proteingenen är kasein.

12. Avvikande och exprimerande cellgrupp enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att sekvensen, vilken kodar för den heterologa polypeptiden valts bland sekvenser som kodar för en polypeptid, vilken valts bland tPA, urokinas, Mullers hämmande substans, interferoner, koagulationsfaktorerna VIII och IX, animala tillväxthormoner, insulin, interleukiner, immunoglobuliner och lipokortiner.

13. Transformerad värdcell, k ä n n e t e c k n a d av ett genom som omfattar en integrerad avvikande expressionscellgrupp, varvid den avvikande expressionscellgruppen är enligt något av patentkraven 7-12.

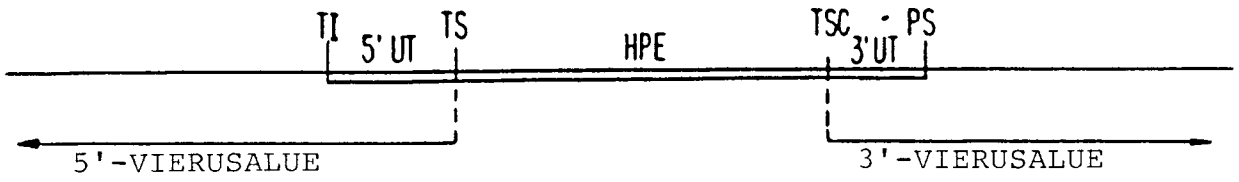
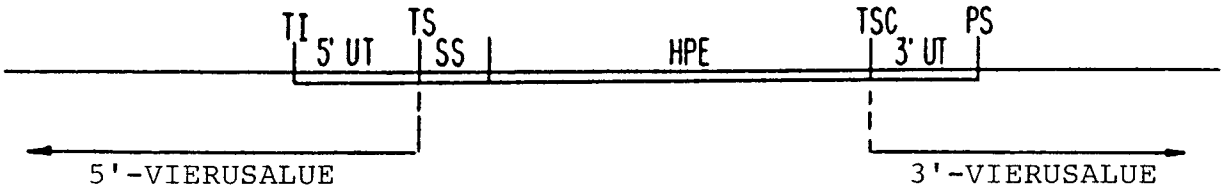


FIG. 1a



TI = TRANSKRIPTION ALOITUSKOHTA
UT = TRANSLAATIOTA VAILLE JÄÄVÄ ALUE
TS = TRANSLAATION ALOITUSSIGNAALI
SS = SIGNAALISEKVENSSIN KOODAAVA ALUE
HPE = VIERASLAJISEN POLYPEPTIDIN KOODAAVA ALUE
TSC = TRANSLAATION PYSÄYTYSKODONI
PS = POLYADENYLAATIOSIGNAALI

FIG. 1b

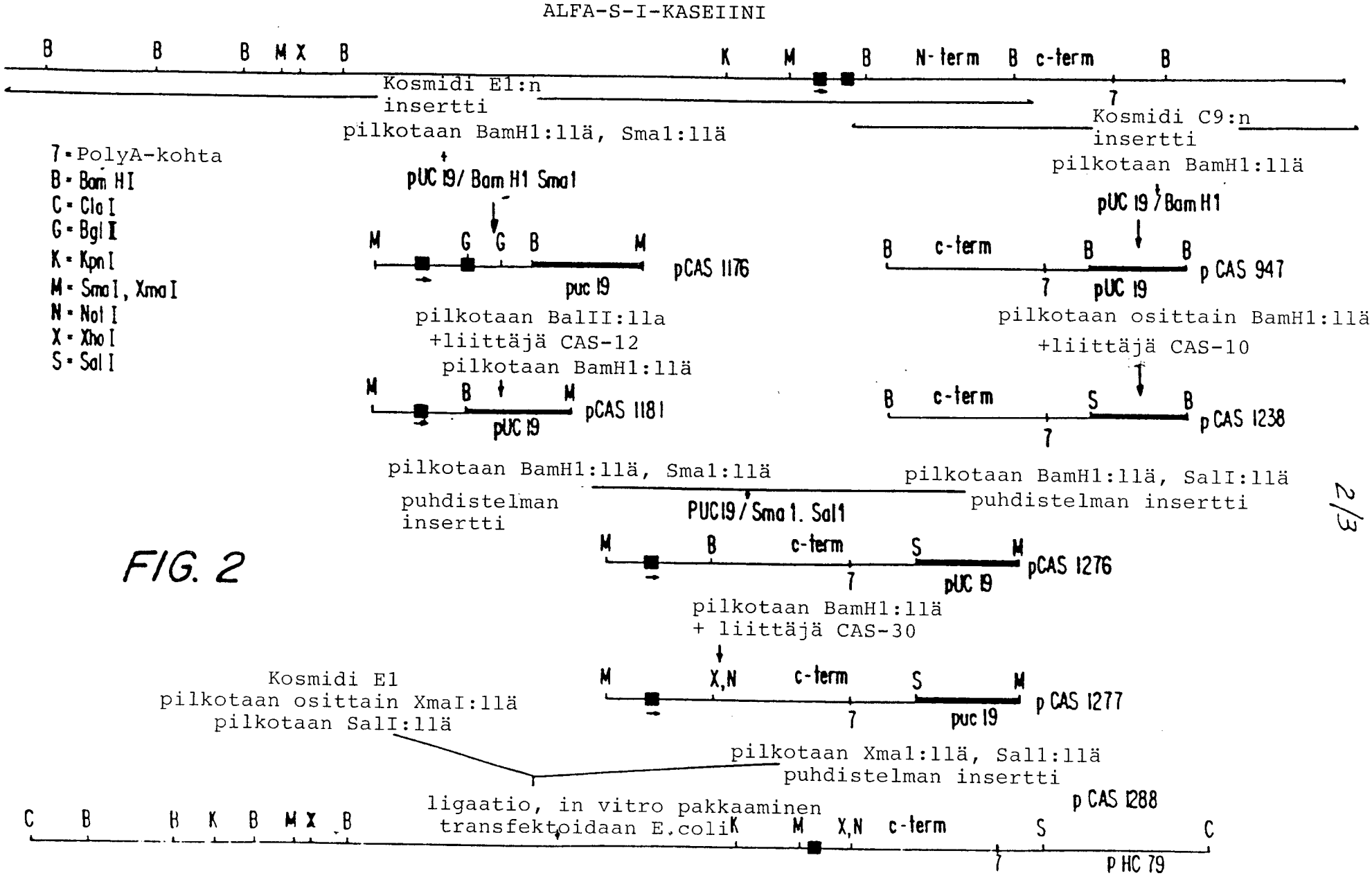

ALFA-S-I-KASEIINI
7 = PolyA-kohta
B = Bam HI
C = Cla I
G = Bgl II
K = Kpn I
M = Sma I, Xma I
N = Not I
X = Xho I
S = Sal I
Kosmidi E1:n insertti pilkotaan BamH1:llä, Sma1:llä
pUC 19/ Bam H1 Sma1
pCAS 1176
puc 19
pilkotaan BalII:lla +liittäjä CAS-12 pilkotaan BamH1:llä
pCAS 1181
pUC 19
pilkotaan BamH1:llä, Sma1:llä puhdistelman insertti
Kosmidi C9:n insertti pilkotaan BamH1:llä
pUC 19 / Bam H1
p CAS 947
pilkotaan osittain BamH1:llä +liittäjä CAS-10
p CAS 1238
pilkotaan BamH1:llä, SalI:llä puhdistelman insertti
PUC19 / Sma 1. Sal1
pCAS 1276
pilkotaan BamH1:llä + liittäjä CAS-30
p CAS 1277
Kosmidi E1 pilkotaan osittain XmaI:llä pilkotaan SalI:llä
pilkotaan Xma1:llä, Sal1:llä puhdistelman insertti
ligaatio, in vitro pakkaaminen transfektoidaan E.coli
p CAS 1288
p HC 79

FIG. 2

FIG. 3a

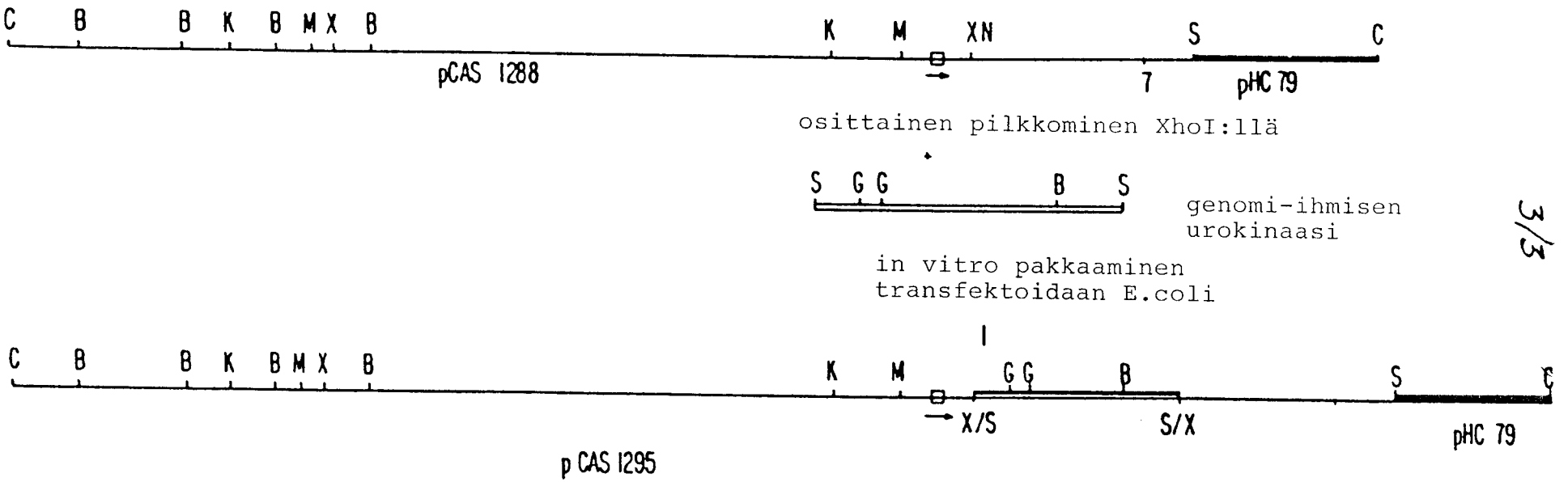

C B B K B M X B
pCAS 1288
K M XN S C
7
pHC 79
osittainen pilkkominen XhoI:llä
S G G B S
genomi-ihmisen urokinaasi
in vitro pakkaaminen
transfektoidaan E.coli
C B B K B M X B
K M G G B S C
X/S
S/X
pHC 79
p CAS 1295

FIG. 3b