



## (12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

(51) Int.Cl.: C 12 N 1/15      C 12 N 15/80      C 12 N 15/90      C 12 P 21/02

(21) Patentansøgning nr: PA 1989 03998

(22) Indleveringsdag: 1989-08-15

(24) Løbedag: 1989-08-15

(41) Alm. tilgængelig: 1990-02-17

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-07-05

(83) Deponering af mikroorganismer.

(30) Prioritet: 1988-08-16 EP 88201743

(73) Patenthaver: DSM IP Assets B.V., Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, Holland

(72) Opfinder: Wim van Hartingsveldt, Laan van Altena 43, 2613 DL Delft, Holland  
Cees A.M.J.J. van den Hondel, Waterlelie 124, 2804 PZ Gouda, Holland  
Annemarie E. Veenstra, Nierop 27, 2151 XH Nieuw Vennep, Holland  
Johannes A. van den Berg, Hanegevecht 8, 2811 AD Reeuwijk, Holland

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark

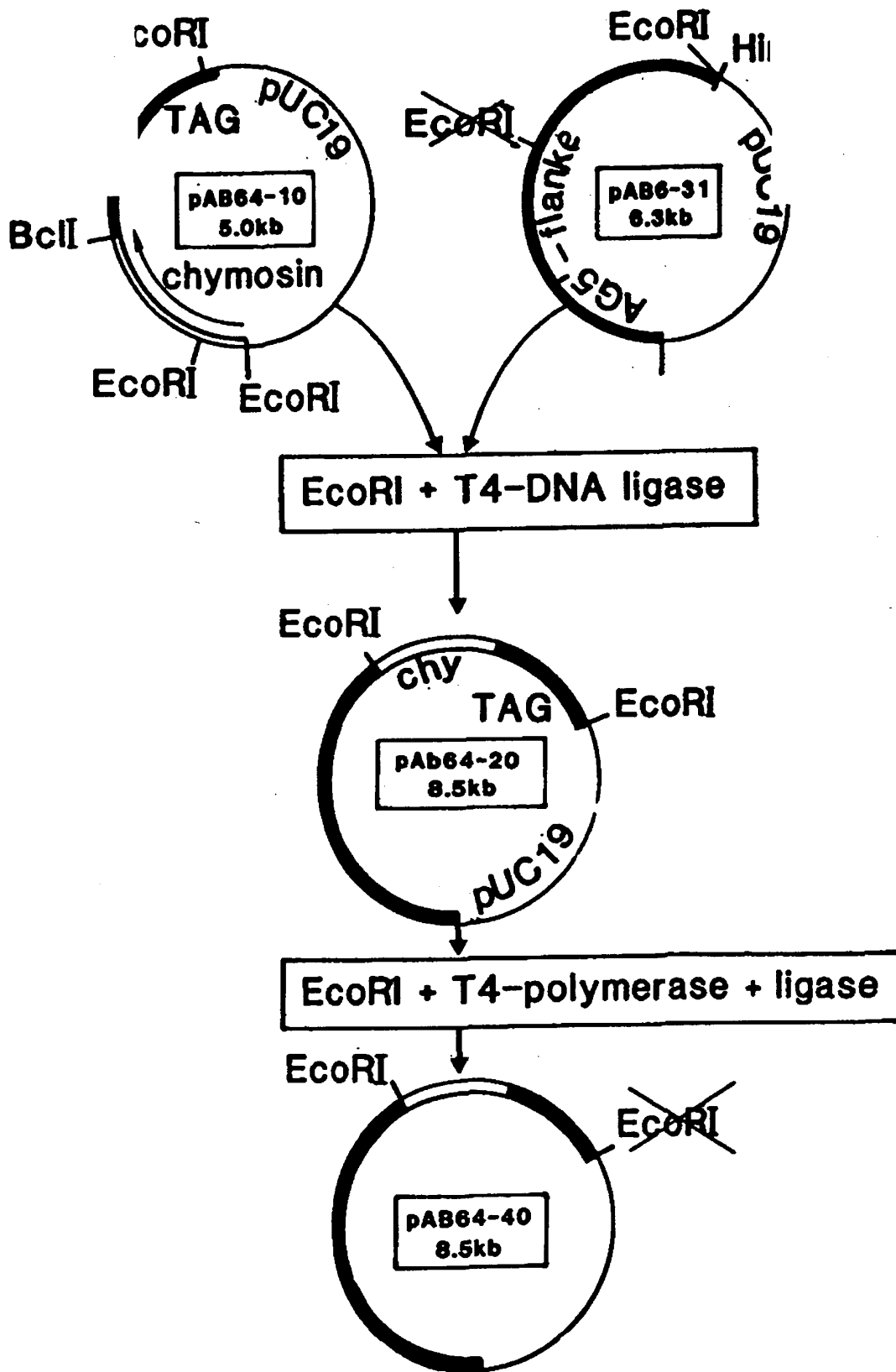
---

(54) Benævnelse: **Transformeret filamentøs fungusvært med en ekspressionskassette, DNA-konstruktion med en sådan ekspressionskassette og fremgangsmåde til fremstilling af et protein under anvendelse af en sådan transformeret filamentøs fungusvært**

(57) Sammendrag:

Transformation af Aspergillus, især A. niger, vises, og der gives eksempler på integration ved glucoamylaselocus. Der indsættes en chymosin ekspressionskonstruktion ved en locus, hvor chymosin kan forbindes med en signalsekvens til opnåelse af effektiv udskillelse.

Figur 3



Opfindelsen angår en transformeret filamentøs fungusvært omfattende en ekspressionskassette stammende fra *in vitro* rekombination og omfattende en transkriptionsinitieringsregulerende region, en åben læseramme kodende  
5 for en signalsekvens til udskillelse, i læseramme med et strukturgen af interesse og en transkriptionstermineringsregulerende region. Opfindelsen angår yderligere en DNA konstruktion med en som ovenfor nævnt ekspressionskassette, og endelig angår opfindelsen en fremgangsmåde  
10 til fremstilling af et protein af interesse.

Muligheden for at transformere levedygtige celler med DNA, der er i stand til at eksprimere, har åbnet mange veje til nye og forbedrede produkter. Denne mulighed har tilladt produktion af en lang række pattedyrsproteiner, der ellers ikke uden videre var tilgængelige. I andre tilfælde, især når det drejede sig om  
15 blodproteiner, var nødvendigheden af at benytte naturlige kilder til produktionen af sådanne proteiner efterhånden blevet mere og mere uakceptabel på grund af de udbredte problemer med hepatitis og AIDS. Ud over  
20 pattedyrsproteiner til medicinsk anvendelse eksisterer en række andre proteiner, især enzymer, der finder anvendelse i en række kommercielle processer. Chymosin kan anvendes ved ostefremstilling, lipaser kan blandt andet anvendes ved transesterificeringsreaktioner, proteaser kan bl.a. anvendes i forbindelse med fødevarer  
25 og medicinvarer og lignende.

Ved produktionen af sådanne forskellige produkter er der en stærk interesse i produktionsøkonomien. Det første, man bør betragte, er ekspressionsniveauet for det ønskede produkt. Derefter er stabiliteten af  
30 produktet i den udvalgte vært af betydning. Et tredje problem er isolering og rensning af produktet, især når dette skal være et additiv til medicinalvarer eller fødevarer.

Afhængig af en funktionel signalsekvens vil ved produktion af proteinproduktet produktet kunne blive tilbageholdt i cytoplasmaet eller blive udskilt i næringsmediet. Forskellige værter har forskellige udskil-

5 lelsesprodukter samt forskellige niveauer for udskillelse, idet udskillelse kan være inducibel eller ikke inducibel. I de fleste situationer har udskillelse mange fordele, da produktet kan isoleres fra næringsmediet i det væsentlige fri for intracellulære proteiner og

10 celleaffald. Den nødvendige adskillelse vil således kun skulle foregå fra andre proteiner udskilt af værten og de små mængder protein, der kan skyldes lysering eller nedbrydning af celler. Det er derfor af betydelig interesse at tilvejebringe systemer, der fører til effektiv eksprimering og udskillelse af produkter af inter-

15 esse under betingelser, der tillader let isolering og oprensning.

Transformerings af filamentøse fungi findes beskrevet af mange forfattere (Tilburn et al., Gene 26 (1983) 205-221; John og Peberdy, Enzyme Microb. Technol. 6 (1984) 386-389; Ballance og Turner, Gene 36 (1985) 321-331; Van Hartingsveldt et al., Mol. Gen. Genet. 206 (1987) 71-75; Goosen et al., Curr. Genet. 11 (1987) 499-503); i EP-A-0134438 og 0238023 og International Patentansøgning (PCT) WO 86/06097.

25 Fungale specier såsom Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Mucor miehei, og Trichoderma reesei benyttes i høj grad til industriel produktion af enzymer f.eks. til anvendelse i fødevarerindustrien (se f.eks. Strijkert, Antonie van Leeuwenhoek 53 (1987) 357-362). Deres anvendelse er baseret på udskillelseskapa-

30 af sådanne mikroorganismer. A. niger og A. oryzae benyttes i store mængder og i kommerciel skala til denne industrielle produktion og er som følge deraf godt ka-

rakteriserede mikroorganismer, hvad angår deres fermenteringsopførsel. Man har benyttet forskellige former for genteknologi på Aspergilli og har opnået transformanter, der syntetiserer yderligere nyttige produkter. 5 (Cullen et al., Bio/technology 5 (1987) 369-376; Gwynne et al., Bio/technology 5 (1987) 713-719). I disse tilfælde er det udvalgte protein blevet eksprimeret ud over de proteiner, der normalt udskilles af værten, og således skal det udvalgte protein adskilles fra disse.

10 Generstatning findes beskrevet for Aspergilli (f.eks., Miller et al., Mol. Cell. Biol. 5 (1985) 1721; Van Hartingsveldt et al., se ovenfor; Goosen et al., Curr. Genet. 11 (1987) 499-503; Wernars et al., Mol. Gen. Genet. 209 (1987) 71-77). For A. nidulans, har 15 man for gener, der koder for enzymer, der danner dele af biosynteseveje, f.eks. for aminosyrer og nucleotider, benyttet forskellige fremgangsmåder. Miller et al. (se ovenfor) benytter enten en ét-trins generstatning af TrpC-genet med et restriktionsfragment, der kun in- 20 deholder et modificeret homologt gen eller en to-trinsproces under anvendelse af et cirkulært plasmid. "Et-trins" generstatning kræver en forekomst af to overkrydsninger ved en enkelt generstatning (sammenlign figur 7); ved en to-trinsproces er det første trin et enkelt integreringsforløb fulgt af rekombinering, der 25 bevarer den integrerede genkopi og fjerner den oprindelige. (andet trin). Forekomsten af det andet trin udvælges, idet man gennemsøger for at finde fænotypen af den integrerede genkopi.

30 Man ved, at det naturlige niveau for eksprimering af mange gener i det metaboliske forløb for aminosyrer, f.eks. TrpC og ArgB, kun når et moderat niveau. Enzymerne, som disse gener koder for, udgør kun en meget lille brøkdelen af den totale mængde af celleprotein. Imidlertid er disse gener absolut nødvendige,

idet tabet af sådanne gener fører til auxotrofi og nødvendighed af at tilføre metabolitten eller aminosyren til vækstmediet. Derfor kan man let udføre erstatning af begge disse gener og foretage generstatning af analoge gener, og man kan let isolere transformanter. (Esser og Mohr, Process Biochemistry (1986) 153-159).

For A. niger findes tilsvarende resultater publiceret af Van Hartingsveldt et al., se ovenfor og Goosen et al., se ovenfor, hvad angår pyrG locus. pyrG genet koder for et enzym i biosyntesevejen, der fører til uridin. I disse eksempler blev generstatningen igen foretaget i et let udvælgeligt gen, f.eks. i det gen, der blev benyttet som udskillelsesmarkør ved transformationen.

Det bør bemærkes, at ingen af de proteiner, der blev opnået ifølge de ovenfor nævnte referencer, blev udskilt, hverken af A. nidulans eller af A. niger.

Der er således et behov for at tilvejebringe generstatningssystemer for genetiske loci, der eksprimeres aktivt og koder for proteiner, der udgør en væsentlig del af den totale mængde celleprotein, og for genetiske loci, der koder for proteiner, der aktivt udskilles af cellen.

Der tilvejebringes ekspressionssystemer for filamentøse fungi under anvendelse af værter med effektiv udskillelse, med kassetter konstrueret for homolog rekombinering ved placeringen af en sekvens, der koder for et højt eksprimeret og udskilt protein.

Mere detaljeret er den ovenfor definerede transformerende filamentøse fungusvært ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at ekspressionskassetten er integreret i et kromosom fra den transformerende filamentøse fungusvært ved et på forhånd bestemt mållocus omfattende et gen, hvis ekspressionsprodukt udskilles til en koncen-

tration på mindst ca. 0,1 g/l, og hvor genet i mållocus yderligere er ejendommeligt ved, at det er blevet inaktiveret.

DNA konstruktionen ifølge opfindelsen er ejendommelig ved at den omfatter a) en ekspressionskassette med en transkriptionsinitieringsregulerende region fulgt nedstrøms af et gen af interesse under transkriptionskontrol af den transkriptionsinitieringsregulerende region, fulgt nedstrøms af en transkriptionstermineringsregulerende region, hvor genet af interesse er forsynet med en DNA sekvens kodende for en signalsekvens til udskillelse af produktet kodet for af genet af interesse, b) et udvalgeligt markørgen til valg af transformerede værter, og c) 5'- og 3'-flankerende regioner, der er homologe til 5'- og 3'-regioner i et forudbestemt mållocus omfattende et gen, hvis ekspressionsprodukt udskilles til en koncentration på mindst ca. 0,1 g/l, idet dette locus er endogent for en filamentøs fungus, og hvor DNA konstruktionen yderligere er ejendommelig ved, at komponenterne under a) og b) er anbragt sammen mellem de 5'- og 3'-flankerende regioner.

Endelig er fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et protein af interesse ejendommelig ved, at den omfatter i et næringsmiddel at dyrke en transformeret filamentøs fungusvært ifølge opfindelsen.

Integrationen kan bekvemt inkludere et markørprotein, hvor ekspressionskassetten er afgrænset af de 5'- og 3'- ikke-kodende regioner af det gen, der er målet. Transformationen tilvejebringer høje ekspressionsniveauer og en effektiv udskillelse. Man opretholder eventuelt en proteaseinhibitor i næringsmediet for at forhindre proteolyse af det ønskede produkt.

På tegningen viser:

Figur 1 de oligonucleotider, der benyttes til at isolere A. niger glucoamylase (AG) genet;

Figur 2 et kort over A. niger glucoamylase (AG) 5 genet, over konstruerede underkloner og over en hybridiseringssonde, der benyttes i eksperimenterne;

Figur 3 konstruktionen af pAB64-40;

Figur 4 en skematisk repræsentation af pAN76-1;

Figur 5 en skematisk repræsentation af mAB64-0;

Figur 6 skematiske repræsentationer af pAB64-72, 10 pAB64-73 og pAB64-75; og

Figur 7 en skematisk repræsentation af generstatning ved glucoamylase locus.

Der tilvejebringes effektive ekspressionssystemer under anvendelse af filamentøse fungi. Systemerne 15 benytter værter til udskillelse til integrering af ekspressionskonstruktionerne. Sådanne ekspressionskonstruktioner omfatter genet af interesse, der til homolog rekombinering er flankeret af 5'- og 3'- ikke koderende regioner af mållocus, til integrering. Mållocus 20 vil omfatte et gen, der koder for et protein til udskillelse. Vækst og induktion af transformantværtens fører til effektiv eksprimering og udskillelse af det ønskede produkt samt til en let isolering på grund af fravær af ekspressionsprodukterne fra mållocus i næringsmediet.

25 Værter af interesse er sådanne filamentøse fungi, der besidder effektive udskillelsesniveauer for deres endogene proteiner. Industrielle produktionsstammer af Aspergillus, især niger, awamori eller oryzae er af særlig interesse. Alternativt kan man benytte Trichoderma reesei, M. miehei og aspergilli, såsom A. f 30 icum.

Ekspressionskonstruktionen vil omfatte genet af interesse sædvanligvis besiddende en signalsekvens, der fungerer i værten og tilvejebringer udskillelse af ekspressionsproduktet. Til homolog rekombinering vil signalsekvensen oftest være homolog eller i det væsentlige være homolog med signalsekvensen for genet ved mållocus. Imidlertid kan man konstruere signalsekvenser, der giver udskillelse. Se f.eks. Von Heijne, Eur. J. Biochem. 133 (1983) 17-21; og Perlman og Halvorson J. Mol. Biol. 167 (1983) 391-409. Ekspressionsproduktet eller genet af interesse kan være homologt eller heterologt i værten. Ved "homolog" menes et protein, der er nativt for værten af vild type, hvorimod "heterolog" skal betyde et protein, der er fremmed for værten og inkluderer mutanter, der ikke mødes i naturen.

Genet af interesse kan have sin egen signalsekvens eller være føjet til en signalsekvens fra værten eller til en syntetisk signalsekvens, efter behov. Den særligt udvalgte signalsekvens kan variere afhængig af genet af interesse og mållocus. Af særlig interesse er det at anvende signalsekvensen fra mållocus, der tilvejebringer en yderligere homologiregion til integration på dette sted, og som vides at give effektiv udskillelse. Den DNA-sekvens, der koder for signalsekvensen, kan føjes direkte via sekvensen, der koder for processignalet (restriktionsgenkendelsessted), til den sekvens, der koder for det færdige protein, eller via en kort bro, sædvanligvis bestående af mindre end ti koder.

Den region, der er 5'-stillet til den åbne læsramme for genet af interesse, vil omfatte den transkriptionsinitieringsregulerende region. Man kan benytte en hvilken som helst region, der virker i værten. Oftest vil regionen til anvendelse imidlertid være homolog med regionen fra mållocus. Det har den virkning at

erstatte ekspressionsproduktet fra mållocus med ekspressionsproduktet af interesse. Hvis ekspressionsniveauet og udskillelsen af det endogene protein giver en effektiv produktion, vil denne transskriptioninitieringsregulerende region normalt kunne betragtes som tilfredsstillende. Man kan i visse tilfælde imidlertid ønske et højere transskriptionsniveau end ved genet af vild type, eller man kan ønske at have inducerbar ekspression, idet man anvender et særligt inducerende middel. I sådanne tilfælde vil man benytte en transskriptionsinitieringsregulerende region, der er forskellig fra regionen ved mållocus. Man kender en lang række transskriptionsinitieringsregulerende regioner, der virker i filamentøse fungi. Disse regioner inkluderer gener, der koder for glucoamylase, fungal amylase, sur phosphatase, GAPDH, TrpC, AmdS, Alca, AldA, histron H2A, Pyr4, PyrG, isopenicillin N syntetase, PGK, sur protease, acyltransferase, og lignende.

Mållocus skal foretrukket kode for et højt eksprimeret proteinget, dvs. et gen, hvis ekspressionsprodukt udskilles til opnåelse af en koncentration på i det mindste 0,1 g/l ved slutningen af fermenteringen. Varigheden af denne proces kan variere bl.a. afhængig af det ønskede proteinprodukt. Et eksempel på et sådan gen er genet, der koder for glucoamylase (AG). Andre gener af interesse inkluderer fungal  $\alpha$ -amylase, sur phosphatase, protease, sur protease, lipase, og cellobiohydrolase.

Genet af interesse kan være et hvilket som helst gen med en planlagt anvendelse. Udvalgte proteiner der er heterologe til Aspergillus, er f.eks. chymosin, interleukiner, blodkoagulerende faktorer, såsom faktor VIII eller IX, phosphorlipaser, lipaser og cellevækstnedbrydende enzymer (enzymer, der er i stand til at spalte polysaccharider, der findes i plantecellevægge).

Eksempler på proteiner, der er homologe til Aspergillus er phytaser, phosphataser, xylanaser,  $\beta$ -galactosidaser, forskellige typer løbe, glucoseoxidaser og amylaser.

5 Den transskriptionstermineringsregulerende region kan være fra et gen af interesse, fra mållocus eller være en hvilken som helst anden passende sekvens. Når konstruktionen inkluderer yderligere sekvenser af interesse nedstrøms i transskriptionsretningen fra genet af interesse, bør den transskriptionstermineringsregulerende region, hvis den er homolog med mållocus, 10 være betydelig mindre end den homologe flankerende region.

Man benytter normalt en udvælgelsesmarkør, der kan være en del af ekspressionkonstruktionen eller være 15 adskilt fra ekspressionskonstruktionen, så den kan integreres på et sted, der afviger fra genet af interesse. Da de rekombinante molekyler ifølge opfindelsen foretrukket transformeres til en værtsstamme, der kan benyttes ved industriel produktion, er udvælgelsesmarkører til kontrol af transformationen foretrukket dominante udvælgelsesmarkører, dvs der skal ikke indføres nogen mutationer i værtsstammen, hvis man skal benytte sådanne udvælgelsesmarkører. Eksempler på sådanne er 20 markører, der tillader transformanter at vokse på veldefinerede næringskilder (f.eks. tillader A. nidulans amdS genet A. niger transformanter at vokse på acetamid som eneste nitrogenkilde) eller markører, der overfører antibiotikaresistens (f.eks. overfører ble genet phleomycin resistens eller hph genet overfører hygromycin B resistens).

30 Udvalgsesgenet vil besidde sine egne transskriptions- og translationsinitierings- og termineringsregulerende regioner for at tillade uafhængig eksprimering af markøren. Man kender et stort antal trans-

skriptionsinitieringsregulerende regioner, som tidligere beskrevet, og disse kan benyttes i forbindelse med koncentrationen af det anvendte antibiotikum til udvælgelse variere afhængig af antibiotikumet, men vil sædvanligvis være ca. 30-300 µg/ml af antibiotikumet.

De forskellige sekvenser kan føjes til hinanden ved kendt teknik såsom ved restriktion, sammenføjning af komplementære restriktionssteder og ligering, afrunding ved udfyldning af overhængende ender og stump ligering, Bal31 gennemskæring, primerreparation, in vitro mutagenese eller lignende. Man kan benytte polylinkere og adaptorer efter behov, og disse kan indføres eller fjernes ved kendt teknik for at lette samlingen af ekspressionskonstruktionen. På ethvert trin af syntesen af konstruktionen kan fragmentet klones, analyseres ved fordøjelse med restriktionsenzymmer, ved sekvensopdeling, ved hybridisering eller lignende. En lang række vektorer er tilgængelige til kloning og det specielle valg af en sådan er ikke kritisk for opfindelsen. Man vil normalt foretage kloningen i E. coli.

De flankerende regioner kan inkludere i det mindste en del af den åbne læseramme for mållocus, især signalsekvensen, de regulerende regioner, der er 5'- og 3'- stillet til genet for mållocus eller kan strække sig ud over de regulerende regioner. Proteinerne fra de flankerende regioner, der omfatter den åbne læseramme, vil normalt ikke kode for et helt gen, der kan eksprimere et funktionelt produkt. Normalt vil en flankerende region være på mindst 100 bp, sædvanligvis i det mindste 200 bp, og den kan være på 500 bp eller mere. Man vælger de flankerende regioner for at forstyrre målgenet og forhindre dets ekspression. Dette kan opnås ved at indsætte ekspressionskassetten i den åbne læseramme umiddelbart op ad 5'- regionen, ved at substituere hele eller en del af målgenet med ekspressionskonstruktionen

eller ved at lade ekspressionskonstruktionen indgå mellem den transskriptionsregulerende region ved mållocus og den åbne læseramme. Som allerede antydnet bør, når den termineringsregulerende region er homolog med regionen ved mållocus, den 3'-flankerende region være betydeligt større end en termineringsregulerende region, der findes i konstruktionen.

Konstruktionen kan transformeres ind i værten som den klonende vektor, enten lineær eller ringformig, eller kan fjernes fra den klonende vektor efter ønske. 10 Plasmidet skal sædvanligvis lineariseres inden for ca. 1 kbp fra enden af ekspressionskonstruktionen. Man kender en række fremgangsmåder til transformation af filamentøse fungi. Disse fremgangsmåder inkluderer protoplastfusion eller transformation, elektroporering og beskydning af cellerne med mikroprojektiler. Man har med 15 held benyttet protoplasttransformation, og denne anbefales. Man omdanner først myceliet fra den fungale stamme af interesse til protoplaster ved enzymatisk fordøjelse af cellevæggen under tilstedeværelse af en osmotisk stabilisator, såsom KCl eller sorbitol. DNA 20 optag af protoplasterne ophjælpes ved tilsætning af  $\text{CaCl}_2$  og en koncentreret opløsning af polyethylenglycol; den sidste forbindelse fører til sammenklumpning af protoplasterne, hvorved det transformerende DNA indgår i aggregaterne og optages af protoplasterne. Der 25 efter lader man protoplasterne regenerere på et fast medium med indhold af en osmotisk stabilisator og efter behov et udvælgelsesmiddel, idet det transformerende DNA koder for resistens mod dette.

Efter udvælgelse af transformanter kan man bestemme tilstedeværelsen af genet af interesse på forskellige måder. Man kan benytte antistoffer, hvor ekspressionsproduktet er heterologt til værten, og herved påvises tilstedeværelse af eksprimering af genet af in-

teresse. Man kan alternativt benytte Southern eller Northern Blotting til at påvise tilstedeværelse af det integrerede gen eller dets transskriptionsprodukt.

Derefter kan man dyrke cellerne i et passende næringsmedium. Man kan benytte små koncentrationer af en proteaseinhibitor såsom phenylmethylsulfonylfluorid,  $\alpha$ 2-macroglobuliner, pepstatin eller lignende. Sædvanligvis vil koncentrationen af dette være cirka 1  $\mu$ g/ml - 1 mg/ml. Proteasegenet eller -generne kan inaktiveres for at undgå eller reducere nedbrydning af det  
10 ønskede protein.

Målloci, der med fordel kan anvendes, er glycoamylasegenet fra A. niger eller A. awamori, det fungale amylasegen fra A. oryzae, cellobiohydrolasegenerne fra T. reesei eller det sure proteasegen fra Mucor miehei.

15 Transformanterne kan dyrkes portionsvis eller kontinuert i reaktionsbeholdere, hvorfra man isolerer næringsmediet og ekstraherer det ønskede produkt. Man kan efter behov benytte forskellige fremgangsmåder til oprensning af produktet såsom chromatografi, f.eks.  
20 HPLC eller præparativ tyndtlagschromatografi, solvent-solvent-ekstraktion, elektroforese, kombinationer deraf eller lignende:

De følgende eksempler gives som illustration.

#### Eksempel 1

25 Konstruktion af forskellige ekspressionskassetter.

##### A. Fremgangsmåder.

30 Alle konstruktioner blev fremstillet under anvendelse af standardfremgangsmåder fra molekylærbiologi som f.eks. beskrevet i Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Plasmiderne pAB6-1, pAB6-2A, pAB6-3 og pAB6-4

Man isolerede glucoamylasegenet fra A. niger fra plasmidbiblioteker indeholdende 3-4 kb EcoRI fragmenter  
5 eller 13-15 kb HindIII fragmenter i pUC19 (Yanisch-Per-  
ron et al., Gene 33 (1985) 103-119, tilgængelig f.eks.  
fra Boehringer Mannheim, Tyskland) under anvendelse af  
oligonucleotidsonder (fig. 1) baseret på nucleotidse-  
kvensen publiceret for A. niger (Boel et al., EMBO J, 3  
10 (1984) 1097-1102; Boel et al., Mol. and Cell. Biol. 4  
(1984) 2306-2315). Oligonucleotidsonderne blev afledt  
fra sekvensen, der omgiver intron 2; den 42-mere står i  
3'-stilling for intronen og har en polaritet, der er i-  
dentisk med AG-mRNA. Man finder den 24-mere opstrøms  
for intron 2, og den vælges antiparallelt til mRNA.  
15 Plasmid pAB6-1 indeholder AG-genet på et 14,5 kb Hind  
III fragment. I plasmid pAB6-2A findes hele AG-genet på  
et 3,4 kb EcoRI fragment. Plasmid pAB6-3 indeholder et  
1,8 kb EcoRI fragment, der findes netop opstrøms for  
AG-genet; dette fragment indeholder sandsynligvis regu-  
20 lerende sekvenser, og er blevet underklonet fra pAB6-1.  
Plasmid pAB6-4, en anden underklon af pAB6-1, indehol-  
der et 4,6 kb HindIII-BglIII fragment omfattende regio-  
nen opstrøms for AG-genet og en del af 5'-enden af det-  
te gen (se kortet på fig. 2). Alle fragmenter blev klo-  
net i pUC19.  
25

Plasmid pAB64-40

Man behandlede plasmid pAB6-2A (fig. 2) med AccI  
og T4 polymerase til dannelse af AccI fragmenter med  
30 stumpe ender. Man isolerede 1,2 kb fragmentet, der in-  
deholder de 3'-flankerende sekvenser fra AG-genet,  
deriblandt terminatoren. Plasmid pUR1524 med indhold af  
bovin chymosin cDNA (se EP-A-077109) blev delvis fordø-

jet med Sali og EcoRI. Man isolerede fragmentet med indhold af chymosin cDNA, udfyldte klæbende ender med T4-DNA polymerase og ligerede det stumpendede fragment med Sali linkere. Man fordøjede dette fragment med Sali  
5 plus HindIII og ligerede det i pPA153-209 (Van Putten et al., J. Bacteriol. 168 (1986) 728-733), der var fordøjet med Sali og HindIII. Den opnåede konstruktion, pRCH4, blev gennemskåret med BclI og behandlet med T4 polymerase til opnåelse af stumpe ender. Derefter ligerede man AccI fragmentet med indhold af AG-terminatoren  
10 i dette sted til opnåelse af pAB64-10. I denne konstruktion er det udfyldte BclI sted, der er 3'-stillet til chymosingenet, genoprettet.

Derefter fordøjede man plasmid pAB6-3 (fig. 2) delvis med EcoRI og behandlede det med T4 polymerase.  
15 I denne vektor ligerede man HindIII plus EcoRI fragmentet af plasmid pAB6-4, igen efter behandling med T4 polymerase. Den opnåede konstruktion er pAB6-31; denne konstruktion indeholder et 3,6 kb opstrømsfragment af AG-genet med et ødelagt EcoRI sted i midten og et unikt  
20 EcoRI sted nær ved AG-genet. I dette unikke EcoRI sted ligerede man et delvis EcoRI fordøjet fragment fra pAB64-10 med indhold af chymosin cDNA plus AG-terminatoren; den opnåede konstruktion hedder pAB64-20. Man ødelagde EcoRI stedet, der fandtes mellem terminatoren og vektoren, ved delvis fordøjelse med EcoRI, hvorefter  
25 man behandlede med T4 polymerase og ligerede. Den nye konstruktion er pAB64-40; denne konstruktion indeholder igen et unikt EcoRI sted, nu ved sammenføjeingen af AG-opstrømssekvenser og chymosin cDNA (fig. 3).

### 30 Plasmid pAN76-1

Man fordøjede plasmid pAN7-1 (Punt et al., Gene 56 (1987) 117-124) med HindIII. I dette sted ligerede

man SalI plus HindIII fragmentet fra pAB6-1 (fig. 2), der findes 3'-stillet til AG-genet efter udfyldning af SalI stedet med T4 polymerase. Fra denne konstruktion pAN76-1 (fig. 4) isolerede man HygB genet plus det 3'-5 flankerende AG-fragment som et StuI plus HindIII fragment.

#### Fag mAB64-0

10 Man isolerede det lille EcoRI plus NruI fragment fra plasmid pAB6-2A med indhold af AG-promotor og regulerende sekvenser og ligerede det i fag M13mpl1 (Messing og Vieira, Gene 19 (1982) 269-276, f.eks. tilgængelig fra Pharmacia Inc., Sverige) fordøjet med EcoRI og BamHI, sammen med SalI plus BclI fragmentet fra plasmid  
15 pRCH4 med indhold af bovin chymosin cDNA og behandlede det ved SalI stedet med T4 polymerase. Den opnåede konstruktion fag mAB64-0 indeholder en proteinfusion mellem AG og præprochymosin (fig. 5); denne konstruktion blev underkastet in vitro mutagenese.

#### 20 B. Specifikke ekspressionskassetter.

Man konstruerede tre ekspressionskassetter for bovin chymosin fra mAB-64-0, hver indeholdende et forskelligt fusionssted mellem den AG regulerende region  
25 og bovin chymosin cDNA.

Til dette formål konstruerede man følgende tre oligonucleotider:

- nr 1: 5'- AT TAC ACC TCA GCA ATG AGG TGT CTC GTG GTG  
30 3'
- nr 2: 5'- TGC ACA GGG TTG GCA GCT GAG ATC ACC AGG ATC  
CCT CT 3'
- nr 3: 5'- ACG GAT AAC CCG GAC GCT GAG ATC ACCC AGG 3'.

Disse oligonucleotider blev benyttet til at sammenbinde AG-promotoren med præprochymosin (nr 1) eller at binde AG-promotoren og signalpeptidet til prochymosin (nr. 2). Under anvendelse af oligo nr. 3 fremstiller man en proteinfusion mellem aminosyre 71 i det færdige AG-gen og prochymosin.

Identiteten af konstruktionerne blev fastslået ved sekvensanalyse af ssDNA af de opnåede konstruktioner (mAB64-2, mAB64-3 og mAB64-5).

10 Fra disse konstruktioner isolerede man EcoRI fragmenterne med indhold af de ønskede genfusioner og indsatte i pAB64-40 til opnåelse af henholdsvis pAB64-42, pAB64-43 og pAB64-45. I disse plasmider pAB64-42, pAB64-43 og pAB64-45 indsatte man et StuI plus HindIII fragment isoleret fra pAN76-1, hvilket fragment inde-  
15 holdt HygB-genet på et 3'-flankerende element af AG-genet. Slutkonstruktionerne benævnes pAB64-72, pAB64-73 og pAB64-75. Disse konstruktioner indeholder et unikt HindIII sted 3'-stillet til ekspressionskassetten og den 3'-flankerende region (fig. 6).

20

### Eksempel 2

#### Transformation af Aspergillus niger til opnåelse af generstatning

25

Man udførte transformationen af A. niger ifølge opfindelsen under anvendelse af fremgangsmåder beskrevet af Van Hartingsveldt et al., (se ovenfor) og Velton et al. (se ovenfor).

30 Man dyrkede A. niger DS 2975 (en prøve af denne stamme blev deponeret hos CBS den 10. august 1988 med deponeringsnummer 513.88) i 24 timer eller længere, hvis det var nødvendigt, ved 34°C. Man indhøstede myceliet ved filtrering gennem et sterilt nylonklæde og

vaskede det med 0,6 M  $MgSO_4$  (højst 1,25 ml pr. 100 ml kultur). Derefter overførte man myceliet til et sterilt reagensglas, vejede det og suspenderede det igen i 5 ml osmotisk medium (1,2 M  $MgSO_4$ , pufret med 10 mM phosphat pH 5,8) pr. gram våd vægt. Efter tilsætning af Novozym 234 (NOVO, Danmark; 20 mg pr. ml i osmotisk medium) med en mængde på 1 ml pr. gram våd vægt og BSA (Sigma, Holland; 12 mg/ml i osmotisk medium) med 0,5 ml pr. gram våd vægt, lod man protoplasterne dannes under forsigtig omrystning (50 o/m) ved 25-27°C. Man kontrollerede dannelsen af protoplaster ved mikroskopkontrol med regelmæssige mellemrum. Efter fuldstændig dannelse af protoplaster overførte man 15 ml af protoplastopløsningen til et 30 ml sterilt Corexrør og anbragte et øvre lag på 10 ml indfangende puffer (0,6 M sorbitol, 100 mM Tris/HCl pH 7,0) forsigtigt ovenpå protoplastsuspensionen. Man centrifugerede rørene ved 5000 o/m, 4°C, i 15 minutter i en rotor med udsving. Man kunne forsigtigt indsamle protoplasterne fra mellempfasen med en steril Pasteurpipette med bred åbning til undgåelse af beskadigelse ved forskydningspåvirkninger af protoplasterne. Man gentog faseadskillelsen, hvis man opnåede et stort centrifugebundfald, i dette tilfælde suspenderede man igen centrifugebundfaldet i osmotisk medium, foretog en ny overlægning af indfangende puffer og gentog centrifugeringen. Man samlede protoplasterne og vaskede dem omhyggeligt ved at udsuspendere dem i kold STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM  $CaCl_2$ ) og centrifugerede dem ved 3000 o/m, 4°C i 10 minutter. Man gentog vasken, indtil man opnåede et protoplastpræparat, der var fri for kontaminerende partikler. Man udsuspenderede protoplastbundfaldet i kold STC til en slutkoncentration på  $1 \times 10^8$  protoplaster (pps)/ml.

Man benyttede enten protoplasterne øjeblikkeligt eller lagrede dem natten over ved 4°C. Hvis protoplasterne blev lagrede, blev de vasket igen næste dag i kold STC.

5 Med henblik på transformation satte man 10<sup>7</sup> protoplaster til 10 µg DNA i 25 µl STC eller i 10 µl TE (TE indeholder 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Til opnåelse af generstatning lineariserede man plasmidkonstruktionerne pA64-72, pA64-73 og pA64-75 ved at skære  
10 dem ved det unikke Hind III restriktionssted, der findes i alle 3 konstruktioner netop nedstrøms for udvælgelsesmarkøren og den 3'-flankerende region i AG-genet (figur 6).

Man inkuberede blandingen af protoplaster og DNA ved stuetemperatur i 25 minutter. Dernæst tilsatte man  
15 PEG-opløsning, (60% polyethylenglycol 4000, Brocacef/BDH; 10 mM Tris/HCl pH 5,7, 50 mM CaCl<sub>2</sub>) i portioner på 200 µl, 200 µl og 850 µl. Man homogeniserede blandingen omhyggeligt efter tilsætningen af hver portion PEG og inkuberede ved stuetemperatur i 20 minutter efter til-  
20 sætning af den sidste portion PEG. Der foregik af og til udfældning af store plasmider (>18 kb). Dette kunne forhindres ved at erstatte 60% PEG opløsning med en 25% PEG opløsning. Man vaskede de transformerede protoplaster med 10-15 ml kold STC ved blid sammenblanding og  
25 centrifugering ved 5000 o/m ved 4°C i 10 minutter. Derefter suspenderede man protoplasterne i 100 µl STC og udplattede dem omhyggeligt på selektive plader med indhold af 200 µg/ml hygromycin B (Sigma H 2638). Hygromycinresistente kolonier blev analyseret yderligere, i-  
30 det man begyndte med enkelte isolerede sporer.

Eksempel 3Påvisning af generstatning5 A. Southern blotting

Til påvisning af, om generstatning overhovedet var forekommet i transformanterne, benyttede man den teknik, der kaldes Southern Blotting, til at påvise  
10 fravær af glucoamylasespecifik DNA fra transformanterne. Man gjorde et DNA fragment, der var homologt til glucoamylasegenet, radioaktivt og hybridiserede det til DNA fra transformanterne, efter adskillelse af DNA ved elektroforese og fiksering af det kromosomale DNA til en nylonmembran. Man kan påvise meget små mængder homo-  
15 log DNA ved denne fremgangsmåde. DNA blev isoleret fra adskillige transformanter fra hver af de tre konstruktioner, der blev benyttet til transformation. DNA blev isoleret efter formaling af myceliet i flydende nitrogen under anvendelse af standardfremgangsmåder. Man fordø-  
20 jede genomisk DNA med EcoRI, adskilte ved elektroforese og plottede på "Gene Screen Plus" nylonmembran (Dupont, USA). Først hybridiserede man blottende med en radioaktiv AG-specifik sonde, det AG-interne BamHI plus BglII fragment (figur 2). Transformanter, der ikke gav noget hybridiseringssignal med denne sonde (der ventes et 3,4  
25 kybic EcoRI fragment, hvis AG-genet stadig findes i transformanterne), blev gennemløst med andre sonder for at bekræfte, at generstatning havde fundet sted. Med henblik på dette blev EcoRI fordøjelsesprodukter hybridiseret både med radioaktivt pAB64-75 til bekræftelse  
30 af tilstedeværelse af alle væsentlige plasmidaflædte fragmenter, og med radioaktivt pU19 til at bekræfte fravær af bakteriel DNA. Resultatet af disse eksperimenter viste tilstedeværelse af alle forventede plasmidaflædte

fragmenter deriblandt bovin chymosin cDNA, og fravær af bakteriel DNA i 7 af de 36 oprindeligt analyserede transformanter. Alle udvalgte transformanter indeholdt én enkelt chymosinekspressionskassette.

5

#### B. Western blotting

Fraværet af et udvalgt gen i genomet på en organisme kan fastslås på forskellig måder. Southern Blot hybridisering som beskrevet ovenfor under A er en effektiv måde til at fastslå fravær af genetisk materiale, der er homologt til den anvendte sonde. En anden måde at påvise fraværet af et specifikt gen er at påvise fraværet af produktet fra genet af interesse, i dette tilfælde glucoamylasegenet. En meget følsom fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelse eller fravær af en protein i et præparat er Western Blotting. Ved denne teknik benytter man specifikke antistoffer mod proteinet af interesse til at påvise tilstedeværelse eller fravær af dette specifikke protein. Sådanne antistoffer binder til proteinet, der er blevet fikseret på en nitrocellulosemembran. Derefter benytter man et andet antistofpræparat, der er frembragt mod det første antistofpræparat. Dette andet antistofpræparat er konjugeret med et enzym, der kan bearbejde et farveløst substrat til opnåelse af et farvet produkt. Man vil se et farvet bånd på de steder, hvor der findes immunogent materiale, der kan reagere med det første antistofpræparat.

De transformanter, som man ifølge Southern Blotting resultaterne mente havde AG-genet erstattet med bovin-chymosingenet, blev dyrket under tilstedeværelse af stivelse for at inducere den AG-regulerende region, og man analyserede supernatanten fra Western Blotting og sammenlignede med en fermenterings supernatant fra

30

værtsstammen. Man lagde 20 µl af hver supernatant på en 7,5% polyacrylamid-SDS-gel og adskilte proteinbåndene ved elektroforese. Gelerne blev overført elektroforetisk til en nitrocellulosemembran ved kendt teknik.

5 Efter adskillige vasketrin inkuberede man nitrocellulosemembranen med et polyklonalt antiserum, frembragt mod glucoamylase, der var oprenset fra et kommercielt præparat ved hjælp af HPLC søjlekromatografi. Behandling af membranen med det andet antistof-konjugat-præparat

10 gav ingen farvede bånd i præparaterne fra transformanterne, hvorimod der i præparatet fra værten sås et bånd omtrent, hvor man ventede at finde glucoamylase. Dette eksperiment viser, at der ikke i de udvalgte transformanter syntetiseres materiale, der kan reagere med anti-AG-serum, og det sluttet heraf, at AG-genet er blevet

15 erstattet med bovin-chymosin-genet.

C. Indflydelse af generstatning på mængden af udskilt protein.

20 Glucoamylase udgør en væsentlig del af den totale proteinmængde, der udskilles af A. niger (se f.eks. Cullen et al., ovenfor). Af denne grund kan erstatning af glucoamylasegenet med et andet proteingen påvirke mængden af protein, der udskilles af A. niger transformanter; et fald i proteinindholdet i fermenteringsurten

25 kan lette oprensningen af andre udskilte proteiner. Hvis desuden kapaciteten af udskillellesvejen er begrænset, vil fjernelse af glucoamylase fra cellen åbne udskillellesvejen mere for andre proteiner. Til undersøgelse af virkningen af generstatningen på mængden af

30 udskilt protein bestemte man proteinindholdet af supernatanter fra fermenteringer ved standardfremgangsmåder og sammenlignede med data fra værtsorganismen. De opnåede resultater ses i tabel 1.

Tabel 1Proteinindhold af fermenteringsurt (se eksempel 4)

5

---

	Stamme	Proteinkoncentration (mg/ml)
10	A. <u>niger</u> DS 2975	0.143
	A. <u>niger</u> DS 2975 + pAB64-72	0,096
	A. <u>niger</u> DS 2975 + pAB64-73	0,082
	A. <u>niger</u> DS 2975 + pAB64-75	0,076

---

15

Resultater opnået i dette eksperiment er konsistente med fraværet af det højt eksprimerede glucoamylasegen i de analyserede transformanter.

Eksempel 4

20

Eksprimering og udskillelse af bovin chymosin af A. niger under anvendelse af chymosin og AG-signalpeptid.

Man transformerede A. niger med lineariseret pAB64-72  
 25 og pAB64-73 som beskrevet i eksempel 2. Man kontrollerede forekomsten af generstatning i transformanterne, som beskrevet i eksempel 3. Udvalgte transformanter blev analyseret for produktion og udskillelse af chymosin, idet man begyndte med enkeltsporeisolater. Chymosin  
 30 udskilles normalt som zymogen: Det udskilte enzym er inaktivt på grund af tilstedeværelse af et kort N-terminalt peptid (prochymosin). Dette zymogen aktiveres ved fjernelse af det korte N-terminale peptid, f.eks.

ved enzymatisk spaltning eller i tilfælde af chymosin, ved inkubering ved en lav pH-værdi. Af denne grund omdanner man for nøjagtigt at kunne måle aktiviteten af det udskilte chymosin alt udskilt prochymosin til aktiv form ved behandling ved lav pH.

A. Fermentering af transformanter af *A. niger* med indhold af en generstatning for AG-genet.

Man inokulerede ca.  $10^7$  sporer af udvalgte transformanter i rystekolber med indhold af 100 ml flydende prækulturmedium indeholdende  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/l), maltose (30 g/l), gærekstrakt (5 g/l), hydrolyseret casein (10 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/l) og Tween 80 (3 g/l). Disse kulturer blev dyrket ved  $34^\circ\text{C}$  i 48 timer. Man udtog prøver til analyse for chymosinproduktionen og isolering af mRNA; 10 ml af denne kultur blev inokuleret i 100 ml fermenteringsmedium med indhold af  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/l), majsstivelse (70 g/l), gærekstrakt (12,5 g/l), hydrolyseret casein (25 g/l),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (2 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/l),  $\text{ZnCl}_2$  (0,03 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (0,02 g/l),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/l) og  $\text{FeSO}_4$  (0,3 g/l). Disse kulturer blev inkuberet i 48 timer ved  $34^\circ\text{C}$ ; igen udtog man prøver til analyse for chymosinproduktion og til isolering af mRNA.

B. Påvisning af mRNA niveauer i myceliumprøver

Man indhøstede mycelium, vaskede det med destilleret vand og knuste det til et fint pulver under flydende nitrogen under anvendelse af en RNasefri morter og støder. Dette pulver blev opløst i 2 ml/g homogeniseringspuffer (4M guanidiniisothiocyanat; 5 mM Nacitrat pH 7,0; 0,1 M  $\beta$ -mercaptoethanol; 0,5% (w/v) N-lauroylsarcosin, natriumsalt (Sigma L-5125)) og inkuberet ved

37°C i 30 minutter. Til supernatanten fra en 15 minutter 5000 o/m centrifugering satte man 0,4 g/ml af RNasefri CsCl. Denne opløsning blev lagt omhyggeligt ovenpå et 5,7 M CsCl tæppe i 0,1 M EDTA; centrifugeringen varede i 17 timer ved 38000 o/m, 20°C i en Ti 42,1 centrifuge. Man opløste det klare RNA centrifugebundfald i RNasefri puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 1% SDS) efter fjernelse af guanidinisothiocyantopløsningen. Efter ekstraktion med et ligeså stort rumfang af en chloroform/butanolblanding (4:1) udfældede man RNA ved hjælp af natriumacetat og ethanol og opløste det i RNasefrit vand.

Man underkastede RNAprøverne elektroforese og blottede dem på Gene Screen Plus under anvendelse af kendt teknik. Blottene blev hybridiseret under anvendelse af en oligonucleotidsonde, homolog både til AG og til chymosin mRNA: til dette formål udvalgte man oligonucleotidsekvensen fra AG-leaderen, der findes både i AG-mRNA og i chymosin-AG-fusion-mRNA (i alle konstruktioner findes AG-chymosinfusionen ved translationsstarten (pAB64-72) eller efter translationsstarten (pAB 64-73 og 75), hvorfor alle transkripter indeholder AG-leaderen).

Efter dyrkning af myceliet i stivelseholdigt medium kunne man påvise hybridiserende RNA-molekyler i alle prøver, udbyttet er højst for pAB64-73. I værten var det hybridiserende mRNA af en længde, som man kunne vente for AG/mRNA: De hybridiserende mRNA'er i transformanterne var af længder, der kunne ventes for de forskellige ekspressionskassetter. Niveauet for mRNA for AG i værten svarede til niveauet for chymosin mRNA i pAB64-73-transformanterne, et tegn på at hybridgenet ved AG-locus i disse transformanter transskriberes med en effektivitet, der svarer til effektiviteten for det oprindelige AG-gen.

C. Påvisning af udskillelse af bovin chymosin af A. niger.

Man underkastede prøver af fermentationsurt af  
5 både transformanter og værten elektroforese på en 12,5%  
polyacrylamid-SDS-gel; derefter blottede man ge-  
len på nitrocellulose ved kendt teknik. Et monoklonalt  
antistof frembragt mod rensset chymosin blev benyttet  
til immunologisk påvisning af chymosin.

10 Som en kontrol underkastede man også rensset chy-  
mosin elektroforese og blottede det i samme eksperiment.  
Tilstedeværelse af et bånd med korrekt længde i alle  
prøver fra transformanten, men ikke i prøver fra vært-  
en, tydede på ekspresion og udskillelse af bovin chymo-  
sin ved begge de to afprøvede konstruktioner. Det høje-  
15 ste chymosinudbytte blev opnået under anvendelse af  
konstruktionen pAB64-73, men udskillelse af chymosin  
ved pAB64-72 transformanter tyder også på, at chymosin-  
signalpeptidet virker i A. niger.

Man bestemte koagulerende aktivitet ved kendt  
20 teknik, under anvendelse af dehydreret skummemælkspul-  
ver (DIFCO) som substrat og kalveløbe af kendt styrke  
som standard. For pAB64-73 var udbytterne 18-45 MCU/ml,  
og pAB64-72 udbytterne var 7-15 MCU/ml. (En MCU er den  
mængde chymosin, der fører til koagulering af 1 ml  
mælk ved 35°C i løbet af 40 minutter).

25 Mængden af chymosin opnået fra fermentations-  
urten var op til 11,5 mg/l, hvilket er væsentlig mere  
end, hvad der er meddelt for transformanter af A. nidu-  
lans, der sandsynligvis har et større antal kopier af  
tilsvarende chymosinexpressionskassetter (0,5-2,5  
30 mg/l: Cullen et al. (se ovenfor) og 0-7 mg/l: EP-A-  
0215594).

Eksempel 5Ekspression og udskillelse af et AG-prochymosinfusionsprotein fra A. niger

5

Man transformerede lineariseret pAB64-75 til A. niger. Udvalgte transformanter blev analyseret som beskrevet i de forrige eksempler. Man kunne påvise chymosinspecifik mRNA i transformanterne med et ekspressionsniveau, der lå mellem, hvad man fandt for pAB64-72 og pAB64-73. Udskillelse af chymosin af disse transformanter kunne påvises både ved Western blotting og forsøg med koagulation; aktiviteterne var på niveauet 17-29 MCU/ml.

15

Eksempel 6Regulering af AG-genekspression i værten og af chymosinekspression i transformanter

20

Man undersøgte funktionaliteten af AG promotoren i værten og i de udvalgte transformanter ved at dyrke mycelium i et medium med indhold af xylose som eneste carbonkilde. I dette tilfælde bliver AG-promotoren ikke induceret (Nunberg et al., Mol. Cell Biol. 4 (1984) 2306-2315), og man venter hverken ekspresion af AG-genet eller bovin chymosingenet, der står under kontrol af AG-promotoren. Derefter inokulerede man mycelium i et stivelsesholdigt medium, hvor man ved, at AG-promotoren bliver induceret (Nunberg et al., se ovenfor).

Den forudsagte induktion blev påvist ved Northern Blotting eksperimenter ved tilstedeværelse af AG-specifikt mRNA i værten og af chymosinspecifikt mRNA i transformanterne, når de blev dyrket på stivelse modsat til fravær af specifikke mRNA'er i mycelium, der blev dyrket på xylose. Man kunne også påvise udskillelse af

chymosin, når der foregik induktion, enten ved immunblotting af fermentationurt eller ved at måle den koagulerende aktivitet af fermentationsurten. I kulturer dyrket på xylose kunne man ikke påvise nogen chymosinaktivitet ved koaguleringsforsøget; også resultaterne af eksperimenterne med Western blotting var negative i dette tilfælde. Disse eksperimenter viser, at regulering af ekspressionen af bovin chymosingenet svarer til reguleringen af AG-genet, og svarer til den øjeblikke-

5  
10

lige viden om ekspression af glucoamylasegenet.

#### Eksempel 7

#### Ekspression af chymosin under tilstedeværelse af proteaseinhibitorer

15

Man fastslog følsomheden af chymosin over for protease udskilt af A. niger ved at dyrke transformanter under tilstedeværelse eller fravær af proteaseinhibitorer.

20

Med dette formål dyrkede man transformanter af værtsstammen DS 2975 med konstruktion pAB64-73 (Eksempel 3A), som beskrevet i eksempel 4. Til et sådant kulturmedium satte man enten ingen proteaseinhibitorer (" - ") eller pepstatin og  $\alpha$ 2-macroglobulin (" + ") til slutkoncentrationer på henholdsvis 1  $\mu$ g/ml og 5  $\mu$ g/ml. Man udtog prøver efter adskillige tidsintervaller og analyserede for mængden af udskilt chymosin ved Western blot, som beskrevet i eksempel 3B. Resultaterne ses i

25  
30

tabel 2.

Tabel 2

Relativ mængder af chymosin i kulturer uden ("-") og med ("+") proteaseinhibitorer

	Prøveudtagningstid (timer efter inokulering)	"-"	"+"
5			
10	7	-	-
	24	1	3
	32	1	3
	48	0,5	5
15	72	0,3	4
	96	0,2	2

Data tyder på, at chymosin er følsomt over for nedbrydning ved proteaser, der findes i fermentationsurten. Inaktivering af disse proteaser, hvorpå der gives eksempel ved tilsætning af proteaseinhibitorer, fører til et forøget udbytte af chymosin og, vurderet ud fra den længere tilstedeværelse af chymosin i fermenteringsurten ved tilstedeværelse af proteaser, også til en forøget stabilitet. Det er tydeligt at se fra de ovenfor givne resultater, at det omhandlede ekspressionssystem giver en effektiv produktion af proteiner. Yderligere kan man ved at indføre et gen af interesse i et locus, der omfatter et gen, der eksprimerer et protein til udskillelse, når dette protein produceres med høje niveauer, tilvejebringe en produktion på højt niveau ud fra genet af interesse. På denne måde kan man reducere udskillelsesbelastningen af værtscellen, så man kan opnå en effektiv udskillelse af det ønskede produkt. Hvis man oprindeligt benytter værter, der har en effek-

tiv udskillelse, kan det omhandlede system benyttes til kommerciel produktion af produkt af interesse, såsom medicinalvarer, kommercielle enzymer og lignende.

## P A T E N T K R A V

1. Transformeret filamentøs fungusvært omfattende en ekspressionskassette stammende fra *in vitro* rekombination og omfattende en transkriptionsinitieringsregulerende region, en åben læseramme kodende for en signalsekvens til udskillelse, i læseramme med et strukturgen af interesse og en transkriptionstermineringsregulerende region, hvor den transformerede filamentøse fungusvært er kendet ved, at ekspressionskassetten er integreret i et kromosom fra den transformerede filamentøse fungusvært ved et på forhånd bestemt mållocus omfattende et gen, hvis ekspressionsprodukt udskilles til en koncentration på mindst ca. 0,1 g/l, og hvor genet i mållocus yderligere er kendet ved, at det er blevet inaktiveret.

2. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge krav 1, kendet ved, at det stærkt eksprimerede gen i mållocus er blevet inaktiveret som følge af integration af ekspressionskonstruktionen.

3. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge krav 1 eller 2, kendet ved, at integrationen af ekspressionskonstruktionen ved mållocus er sket under et forløb med generstatning.

4. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 3, kendet ved, at værten er Aspergillus.

5. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 4, kendet ved, at værten er Aspergillus niger.

6. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge krav 5, kendet ved, at det stærkt eksprimerede gen i mållocus er glucoamylasegenet.

7. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 6, k e n d e t e g - n e t ved, at genet af interesse koder for en form for chymosin, et interleukin, en phospholipase, en lipase, en phytase, en phosphatase, en xylanase, en amylase, en type løbe, en  $\beta$ -galactosidase eller et cellevægsnedbrydende enzym.

8. Transformeret filamentøs fungusvært ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 7, k e n d e t e g - n e t ved, at ekspressionskonstruktionen omfatter en markør til valg af værter omfattende denne markør.

9. DNA konstruktion, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter

a) en ekspressionskassette med en transkriptionsinitieringsregulerende region fulgt nedstrøms af et gen af interesse under transkriptionskontrol af den transkriptionsinitieringsregulerende region, fulgt nedstrøms af en transkriptionstermineringsregulerende region, hvor genet af interesse er forsynet med en DNA sekvens kodende for en signalsekvens til udskillelse af produktet kodet for af genet af interesse,

b) et udvalgeligt markørgen til valg af transformerede værter, og

c) 5'- og 3'-flankerende regioner, der er homologe til 5'- og 3'-regioner i et forudbestemt mållocus omfattende et gen, hvis ekspressionsprodukt udskilles til en koncentration på mindst ca. 0,1 g/l, idet dette locus er endogent for en filamentøs fungus,

og hvor DNA konstruktionen yderligere er kendetegnet ved, at komponenterne under a) og b) er anbragt sammen mellem de 5'- og 3'-flankerende regioner.

10. DNA konstruktion ifølge krav 9, k e n d e -  
t e g n e t ved, at en del af den 5'-flankerende re-  
gion er fælles med den transkriptionsinitieringsregu-  
lerende region, der kontrollerer transkriptionen af  
5 gen et af interesse.

11. DNA konstruktion ifølge krav 10, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den fælles del af den 5'-  
flankerende region inkluderer en DNA sekvens kodende  
for en signalsekvens til udskillelse af produktet fra  
10 gen et af interesse.

12. DNA konstruktion ifølge krav 9, k e n d e -  
t e g n e t ved, at en del af den 3'-flankerende re-  
gion er fælles med den transkriptionstermineringsre-  
gulerende region for af gen et af interesse.

15 13. DNA konstruktion ifølge et vilkårligt af  
kravene 9 til 12, k e n d e t e g n e t ved, at det  
endogene mållocus er et glucoamylasegen.

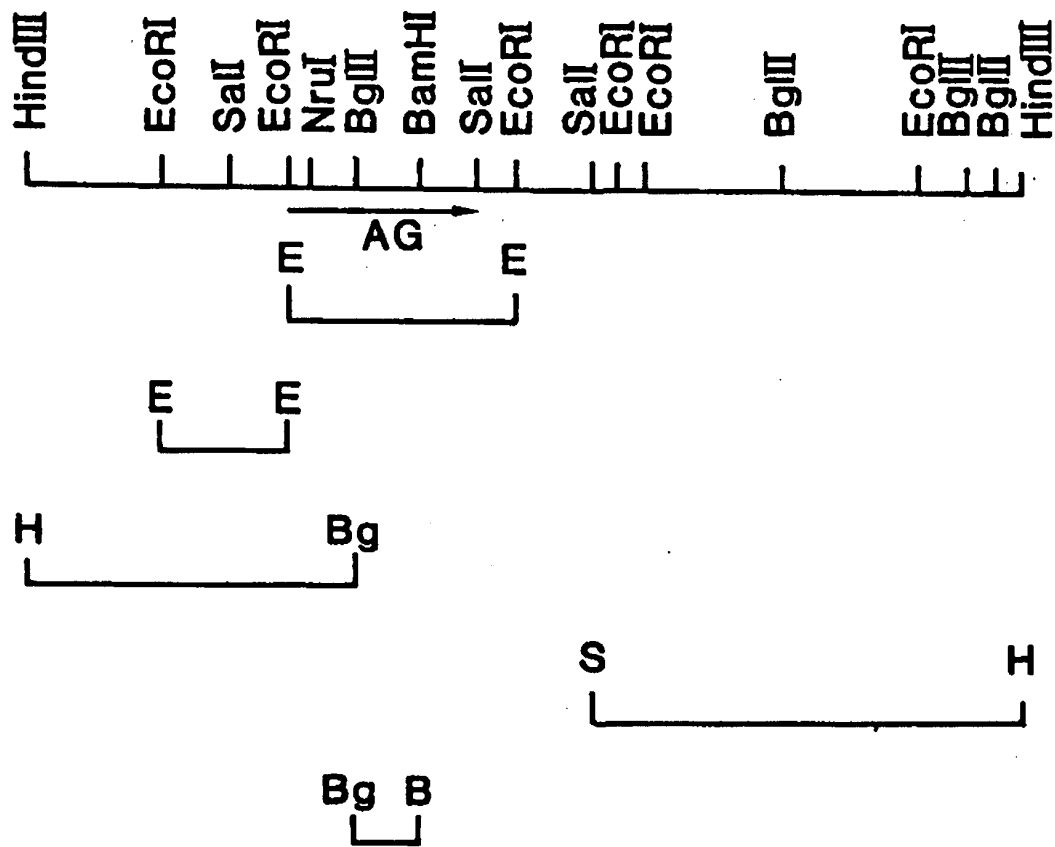
14. DNA konstruktion ifølge et vilkårligt af  
kravene 9 til 13, k e n d e t e g n e t ved, at ge-  
20 net af interesse koder for en form for chymosin, et  
interleukin, en phospholipase, en lipase, en phytase,  
en phosphatase, en xylanase, en amylase, en type lø-  
be, en  $\beta$ -galactosidase eller et cellevægsnedbrydende  
enzym.

25 15. Fremgangsmåde til fremstilling af et protein  
af interesse, k e n d e t e g n e t ved, at den om-  
fatter i et næringsmiddel at dyrke en transformeret  
filamentøs fungusvært ifølge et vilkårligt af kravene  
1 til 8.

Figur 1

5'-GAC AAT GGC TAC ACC AGC ACC GCA ACG GAC ATT GTT TGG CCC-3'  
(42-mer)

5'-AAG CAG CCA TTG CCC GAA GCC GAT-3' (24-mer)



klon

pAB 6-1

pAB 6-2A

pAB 6-3

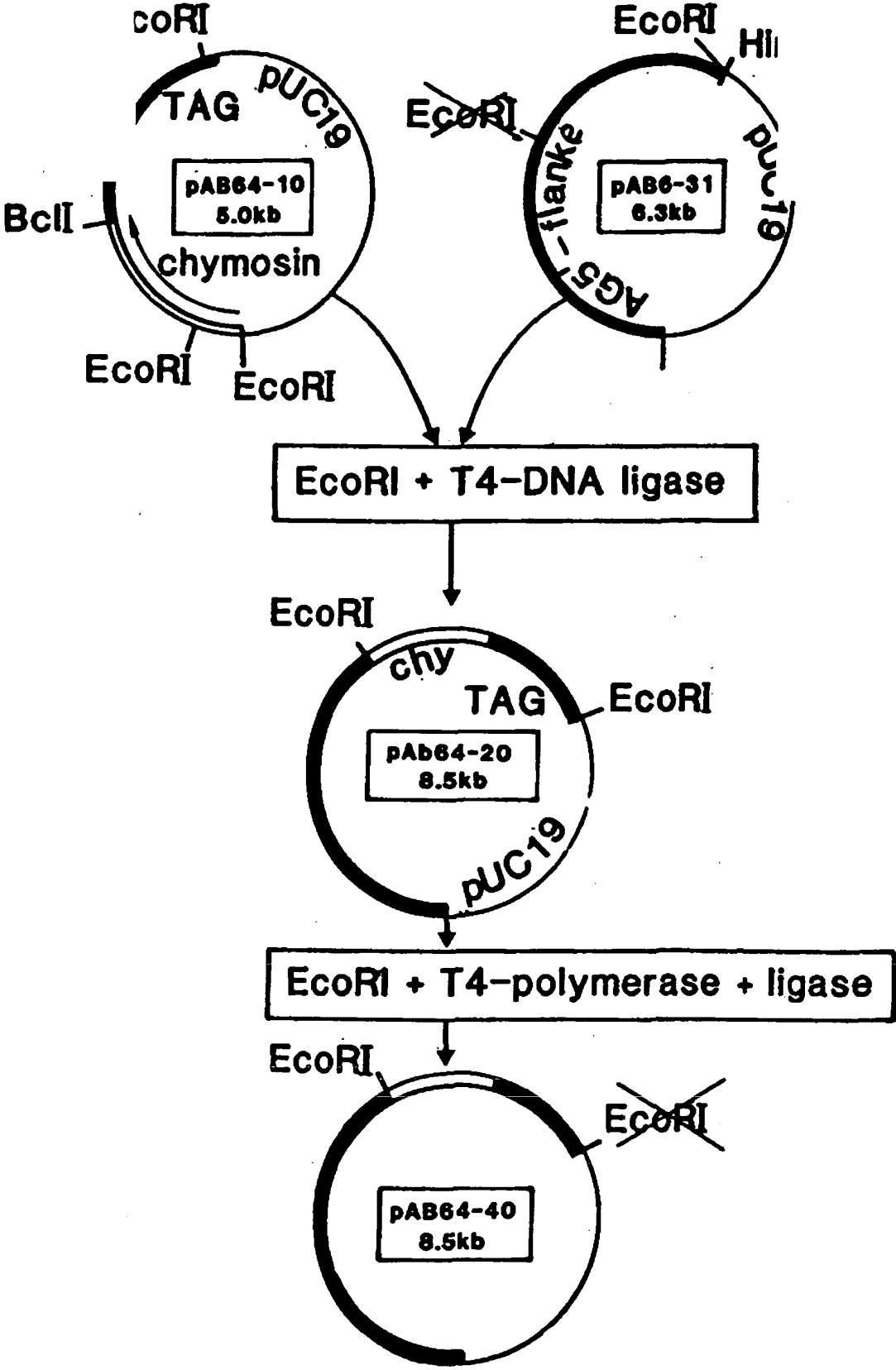
pAB 6-4

pAB 76-1

hybridiseringssonde

Figur 2

Figur 3



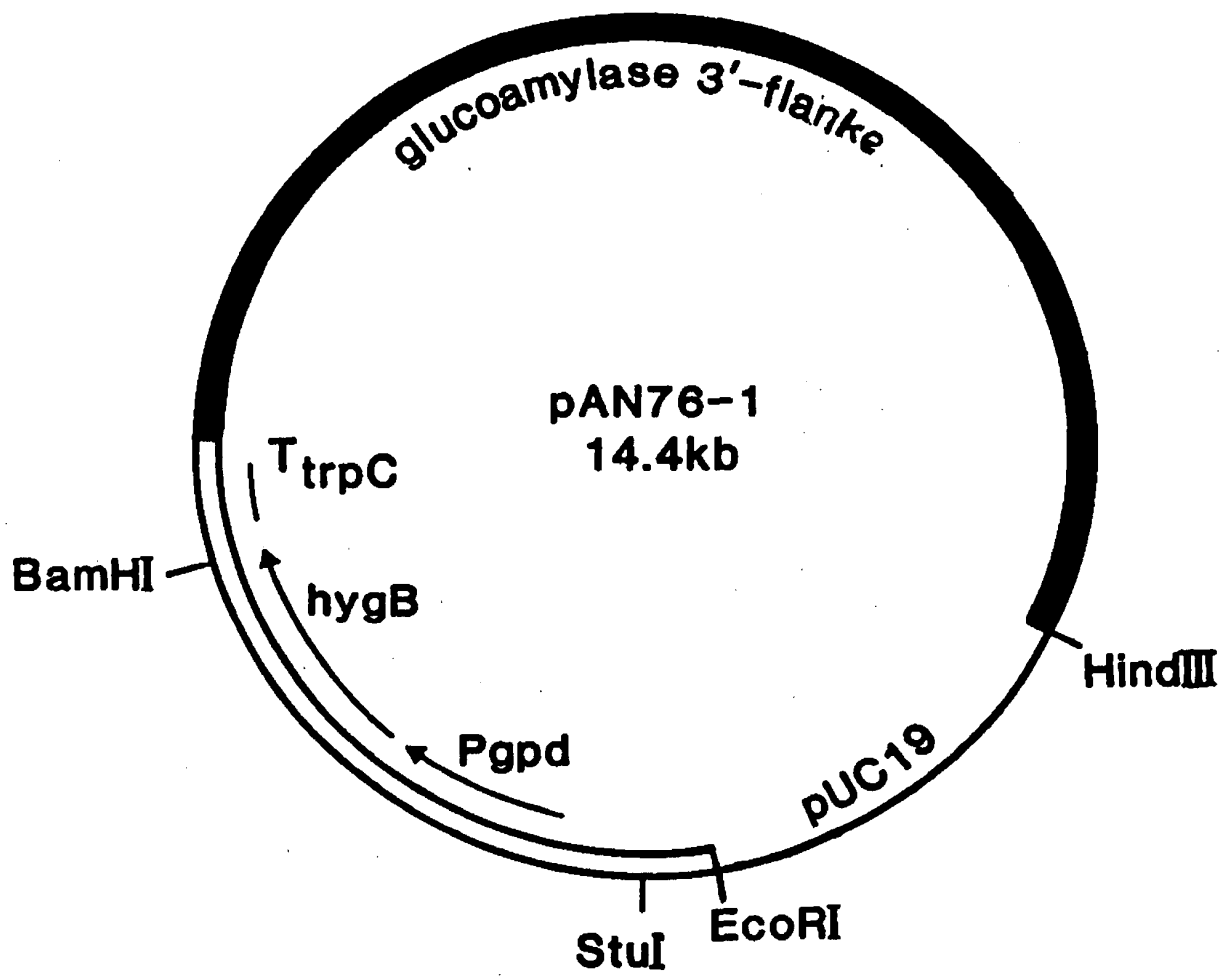


Figure 4

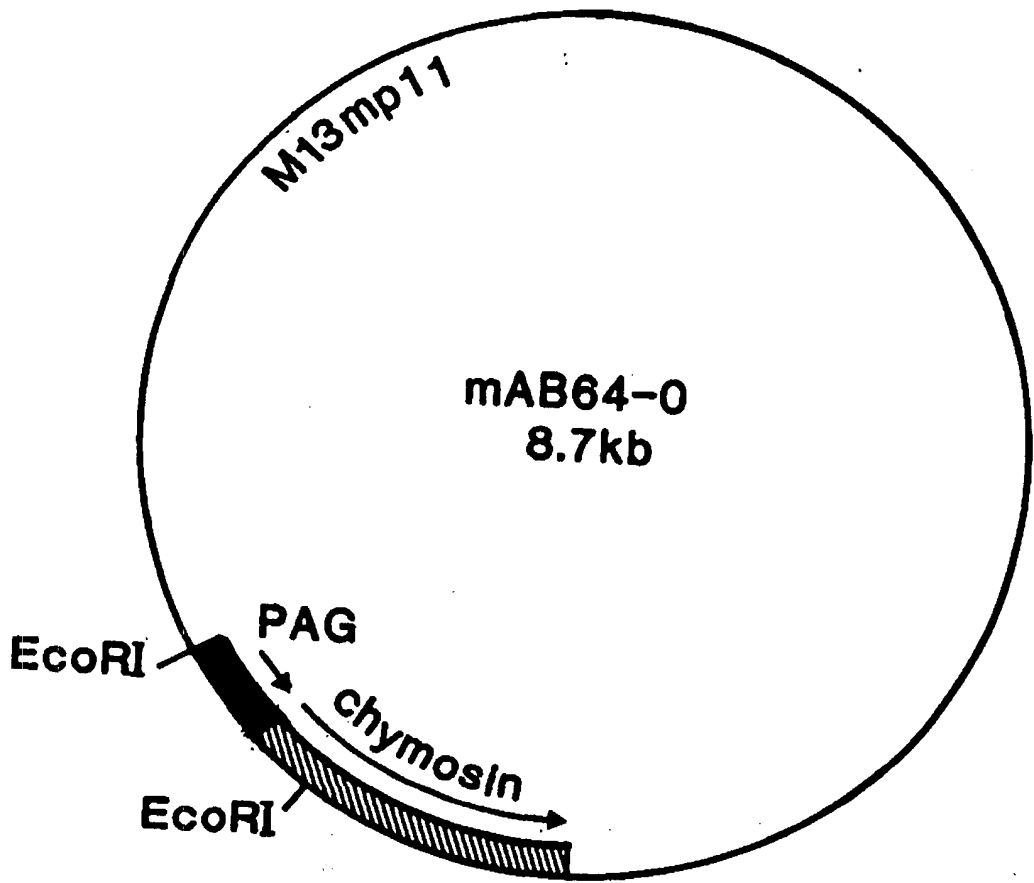
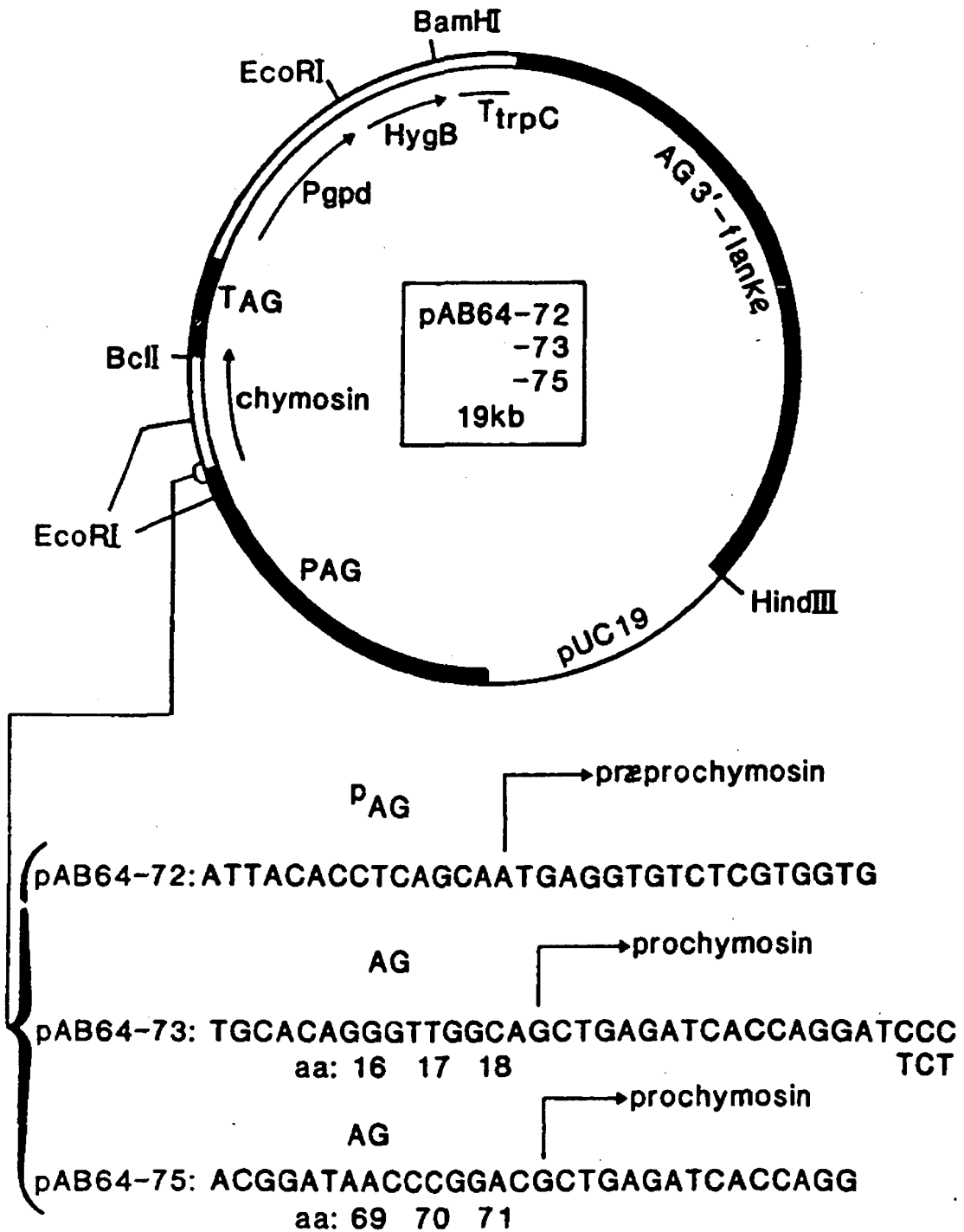
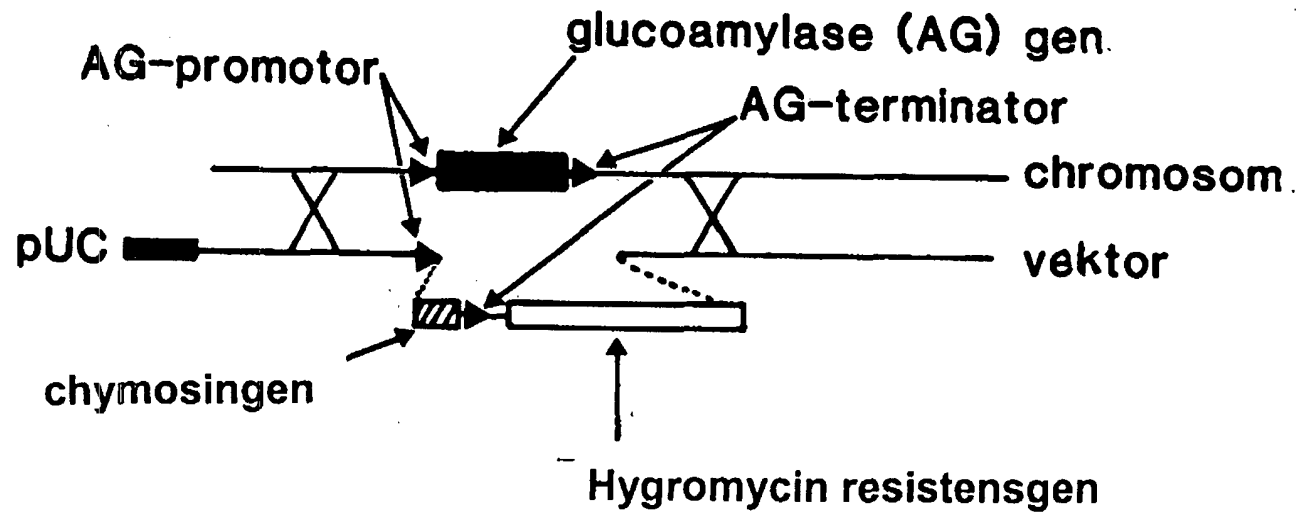


Figure 5

Figur 6





Figur 7