



MINISTERIE VAN ECONOMISCHE ZAKEN

PUBLICATIENUMMER : 1005432A4
INDIENINGSNUMMER : 09100903
Internat. klassif. : C12N C12P
Datum van verlening : 20 Juli 1993

De Minister van Economische Zaken,

Gelet op de wet van 28 Maart 1984 op de uitvindingsoctrooien, inzonderheid artikel 22;
Gelet op het Koninklijk Besluit van 2 December 1986, betreffende het aanvragen, verlenen en in stand houden van uitvindingsoctrooien, inzonderheid artikel 28;

Gelet op het proces-verbaal opgesteld door de Dienst voor Industriële Eigendom op 01 Oktober 1991 te 10u00

BESLUIT :

ARTIKEL 1.- Er wordt toegekend aan : DSM N.V.
Het Overloon 1, NL-6411 TE HEERLEN(NEDERLAND)

vertegenwoordigd door : HOOGSTRATEN Willem, OCTROOIBUREAU DSM, Postbus 9 - 6160 MA Geleen THE NETHERLANDS.

een uitvindingsoctrooi voor de duur van 20 jaar, onder voorbehoud van de betaling van de jaartaksen voor : EXPRESSIECASSETTE VOOR HETEROLOGE EIWITTEN.

UITVINDER(S) : van Gorcom Robertus Fransiscus Maria, Liberiastraat 7, NL-2622 DE Delft (NL); Sonke Theo, Thorbekkestraat 28, NL-6136 DD Sittard (NL); van den Hondel Cornelis Anthonius Maria Jacobus Johannus, Waterlelie 124, NL-2804 PZ Gouda (NL)

ARTIKEL 2.- Dit octrooi is toegekend zonder voorafgaand onderzoek van zijn octrooieerbaarheid, zonder waarborg voor zijn waarde of van de juistheid van de beschrijving der uitvinding en op eigen risico van de aanvrager(s).

Brussel, 20 Juli 1993
BIJ SPECIALE MACHTIGING :

WUYTS L
Directeur

5

EXPRESSIECASSETTE VOOR HETEROLOGE EIWITTEN

- De uitvinding betreft een expressiecassette,
omvattende
- 10 (A) een 5'-expressie controle systeem met
(1) (a) een promotor met transcriptie controle sequenties
(b) een transcriptie initiatie plaats;
(2) (a) translatie controle sequenties aan de 3'-kant van
de transcriptie initiatie plaats;
15 (b) een translatie initiatie plaats;
(B) een voor een oligo- of polypeptide coderende
sequentie,
welke expressiecassette geschikt is voor het in
filamenteuze schimmels tot expressie brengen van een
20 oligo- of polypeptide.

Een dergelijke expressiecassette is beschreven
door R.M. Berka en C.C. Barnett in een artikel genaamd:
"The Development of Gene Expression Systems for
Filamentous Fungi", Bio-tech. Adv. (1989) 7, blz.127-154,
25 en in WO-A-86/06097.

- Zo een expressiecassette omvat de volgende
componenten
- (1) een regio (de promotor) met 5'-transcriptie controle
sequenties, en de transcriptie initiatie plaats;
30 (2) een regio ten behoeve van de translatie initiatie,
inclusief de translatie initiatie plaats;
(3) een regio met sequenties die coderen voor het gewenste
oligo- of polypeptide en
voorts kan zo'n expressiecassette tevens omvatten:
35 (4) indien extracellulaire productie dient plaats te
vinden, een regio met secretie-bevorderende
sequenties;

- (5) een regio voor de regeling van transcriptie
terminatie;
- 5 (6) een regio voor de regeling van polyadenylering.

Met een expressiecassette zoals hierboven
beschreven is, kunnen heterologe eiwitten tot expressie
gebracht worden in filamenteuze schimmels. Onder
10 heteroloog eiwit wordt hier verstaan, een eiwit wiens
expressie van nature niet door de in de expressiecassette
aanwezige promotor wordt gecontroleerd. Voorts wordt in
deze aanvraag met eiwit zowel een oligo- als een
polypeptide aangeduid. Enkele voorbeelden van tot
15 expressie gebrachte heterologe eiwitten zijn de productie
van kalfs-chymosine in Aspergillus awamori (Ward, M. et
al. Bio/Technology (1990) 8, 435-440), de productie van
menselijk α -interferon in Aspergillus nidulans (Gwynne,
D.I. et al. Bio/Technology (1987) 5, 713-719) en de
20 productie van een lipase uit Humicola lanuginosus in
Aspergillus oryzae (EP-A-0305216).

Ondanks het feit dat het met de huidige stand van
de techniek mogelijk is heterologe eiwitten tot expressie
te brengen in schimmels, bestaan er slechts weinig goede
25 expressiecassettes. Daardoor is er dan ook een zeer grote
behoefte aan nieuwe, verbeterde expressiecassettes,
waarbij vooral een goede regulatie van de expressie van
belang is. De expressiecassettes, die bijvoorbeeld zijn
beschreven in WO-A-86/06097 worden o.a. geïnduceerd door
30 verbindingen, die het organisme als goed metaboliseerbare
voedingsstof (C-bron) kan gebruiken zoals bijvoorbeeld
threonine of ethanol. Zo'n inductor wordt dientengevolge
geconsumeerd.

De onderhavige uitvinding heeft in het bijzonder
35 betrekking op een expressiecassette, die de mogelijkheid
biedt om de groei van het gastheerorganisme en de
productie van het heterologe eiwit door dit gastheer-
organisme onafhankelijk van elkaar te laten plaatsvinden.
Men spreekt dan van een gereguleerde expressiecassette,

waarbij het gastheerorganisme opgekweekt kan worden tot de
juiste celdichtheid, terwijl de expressie van het eiwit
5 coderende deel in de expressiecassette op een laag niveau
blijft. Het gewenste eiwit wordt dan dus niet of
nauwelijks geproduceerd. Nadat de gewenste celdichtheid
verkregen is, wordt vervolgens de expressie geïnduceerd
door toevoeging van een verbinding met inducerende
10 werking. Met behulp van zo'n gereguleerde expres-
siecassette is de groei van het gastheerorganisme dus
onafhankelijk te maken van de productie van het gewenste
eiwit, vermits de inductor in de concentratie, waarin die
in het medium voor het gastheerorganisme voorkomt niet een
15 goed groeisubstraat is.

Een groot voordeel van het onafhankelijk zijn van
groei en productie is, dat bijvoorbeeld een heteroloog
eiwit dat toxisch is voor het gastheerorganisme in dit
gastheerorganisme geproduceerd kan worden.

20 Verrassenderwijze zijn nu nieuwe expressie-
cassettes samengesteld, waarmee goede expressie van
heteroloog eiwit verkregen wordt en waarmee bovendien
groei van het gastheerorganisme onafhankelijk gemaakt kan
worden van expressie van heteroloog eiwit.

25 Met deze nieuwe expressiecassettes is het dus
mogelijk heteroloog eiwit efficiënt en effectief
gereguleerd in filamenteuze schimmels tot expressie te
brengen.

Dit doel is volgens de uitvinding bereikt doordat
30 de expressiecassette een 5'-expressie controle systeem
bevat waarin de promotor van het Aspergillus niger bphA
gen aanwezig is en de voor een oligo- of polypeptide
coderende sequentie niet codeert voor het Aspergillus
niger benzoaat-parahydroxylase (hierna te noemen BPH).

35 In het kader van deze octrooiaanvraag wordt onder
de term heterologe eiwitten (cq. oligo- of polypeptiden)
verstaan alle eiwitten anders dan het Aspergillus niger
BPH. Onder de term promotor wordt verstaan een DNA
fragment waarop sequenties gelegen zijn, die betrokken
40 zijn bij de regulatie en initiatie van de transcriptie.

Het is bijvoorbeeld voor een industriële toepassing van de uitvinding van groot voordeel, dat een
5 stam met een expressiecassette volgens de uitvinding op goedkope en niet volledig gedefiniëerde media zoals bv. melasse kan groeien, zonder dat eiwitproductie geïnduceerd wordt.

De promotor (1a), die in de expressiecassettes
10 volgens de onderhavige uitvinding aanwezig is, is de promotor van het bphA gen (benzooat-parahydroxylase gen) van Aspergillus niger of een hieraan functioneel equivalente sequentie. De nucleotide sequentie van deze promotor is gegeven in figuur 1. Het is bekend dat niet de
15 volledige sequentie essentieel is voor de promotor activiteit, doch dat slechts een beperkt aantal van de nucleotiden, gelegen in bepaalde zones van de promotor, essentieel zijn voor de werking ervan. De nucleotide volgorde, en het aantal nucleotiden in de niet essentiële
20 zones, kan dan ook (binnen redelijke grenzen) gewijzigd worden zonder de werking van de promotor op essentiële wijze te beïnvloeden. Daarnaast is er ook bekend, dat bepaalde sequentiedelen in de essentiële zones vervangen kunnen worden door equivalente sequenties, zonder of met
25 gering effect op de werking. Het zal duidelijk zijn dat dit soort nieuwe promotoren met essentiële zones van de Aspergillus niger bphA promotor of daarmee overeenkomstige sequenties ook in de nieuwe expressiecassettes gebruikt kunnen worden.

30 Bij voorkeur is de transcriptie-initiatie plaats (1b) tevens afkomstig van bovengenoemd bphA gen.

Ten aanzien van de translatie controlesequenties (2a) zijn in een eerste uitvoeringsvorm deze sequentie bij voorkeur afkomstig van het Aspergillus niger bphA gen. Dit
35 heeft een voorkeur, omdat het gevormde mRNA relatief stabiel bleek te zijn.

Uit de nucleotide sequentie van de promotor van het bphA gen (zie figuur 1) blijkt dat de voor het mRNA coderende DNA sequentie drie ATG codons bevat, die gelegen

zijn op de posities 5, 48 en 287, gerekend vanaf de hoofd transcriptie initiatie plaats.

5 Ter vergelijking zij verwezen naar onderzoek van het trpC gen van Aspergillus niger waarbij is gebleken dat de belangrijkste transcriptie initiatie plaatsen gelegen zijn op positie -5 en -6 vanaf het ATG initiatie codon (Kos, T. et al.; Curr. Genet. (1988) 13, 137-144). Ook op
10 het trpC mRNA uit Aspergillus nidulans werd zo'n korte niet-coderende 5'-nucleotide sequentie aangetoond; hierbij bleken de belangrijkste transcriptie initiatie plaatsen namelijk te liggen op positie -9 of -10 vanaf het AUG initiatie codon (Mullaney, E.J. et al.; Mol. Gen. Genet.
15 (1985) 199, 37-45). Daarnaast is voor eukaryoten bekend dat voornamelijk het eerste AUG codon op het mRNA gebruikt wordt als translatie initiatie plaats. Fusie van een voor een heteroloog eiwit coderende sequentie met de transcriptie en translatie controle sequentie van het bphA
20 gen zou volgens de geldende leer derhalve het best plaats vinden op de positie van het eerste ATG codon.

Bijzonder opmerkelijk is echter gevonden dat juist zo'n fusie van een voor een heteroloog eiwit coderende sequentie en transcriptie en
25 translatiecontrolesequentie van het bphA gen niet of nauwelijks leidt tot productie van heteroloog eiwit. Verrassenderwijze is nu gevonden dat fusies van een voor een heteroloog eiwit coderende sequentie met de bphA transcriptie en translatiecontrolesequentie op de positie
30 van het tweede zowel als het derde ATG codon tot uitstekende expressie eigenschappen leidt.

In een tweede uitvoeringsstap betreffende de translatiecontrolesequentie (2a), worden expressiecassettes samengesteld waarbij de translatie-
35 controlesequentie afkomstig is van het heterologe gen, waarvan ook de voor een eiwit coderende sequentie afkomstig is.

In een derde uitvoeringsvorm van de uitvinding betreffende de translatiecontrolesequentie (2a) worden

expressiecassettes samengesteld met de bphA promotor in het 5' expressie controle systeem (deel 1a), waarbij de
5 translatiecontrolesequenties (deel 2a) afkomstig is van een of meerdere heterologe genen. In die situatie is het 5' niet vertaalde deel van het mRNA ten minste ten dele afkomstig van een heteroloog gen dat van andere origine is dan het voor het eiwit coderende gen. Hoewel dit een extra
10 stap kan betekenen kan dit van voordeel zijn, omdat de daarmee in te voeren translatiecontrolesequenties invloed kunnen hebben op translatieefficiëntie, stabiliteit van het 5-mRNA deel e.d.

De translatie-initiatieplaats (2b), te weten een
15 ATG triplet, kan zowel zijn origine hebben in het bphA gen als de tot expressie te brengen sequentie.

De voor een eiwit coderende sequentie (B) kan een willekeurig voor een eiwit coderend gedeelte zijn dat zowel een prokariotische, eukariotische of synthetische
20 oorsprong kan hebben.

Meer in het bijzonder kan de voor een eiwit cq. oligo- of polypeptide coderende sequentie een sequentie zijn die codeert voor een industrieel enzym, voedingseiwit of een eiwit met farmaceutische werking, of voor eiwitten
25 (precursors) die (al dan niet in situ) daarin omgezet kunnen worden.

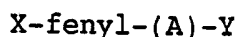
Voorbeelden van oligopeptiden, die vervaardigd kunnen worden in schimmels met een expressiecassette volgens de uitvinding zijn hormonen, neurotransmitters,
30 antibiotica en peptiden die gemodificeerd kunnen worden tot antibiotica. Voorbeelden van polypeptiden zijn interferon, en interleukines, bloedstollingsfactoren, en humaan of dierlijk groeihormoon. Voorbeelden van peptiden met andere dan farmaceutische werking, industriële
35 enzymen, voedingseiwitten e.d. zijn lipase, (gluco)amylase, cellulase, pectinase, chymosine en fylase.

Het is evenzeer mogelijk polypeptiden te maken die daarna omgezet worden in actieve enzymen. Zo wordt
5 chymosine als pro-chymosine gemaakt, kan het efficiëntie verhogend werken om een enzym met een eiwitdeel te maken, dat de excretie uit de schimmel bevordert, of kan het noodzakelijk zijn dat het peptide wordt geglycosileerd.

Het is eveneens mogelijk een eiwit tot expressie
10 te laten komen, dat in de cel het metabolisme beïnvloedt.

De expressiecassettes volgens de uitvinding worden bij voorkeur toegepast in filamenteuze ascomyceten, en dan vooral gekozen uit de reeks der genera Aspergillus, Trichoderma, Penicillium of verwanten. In het geval dat
15 een Aspergillus sp. gebruikt wordt, gaat de voorkeur uit naar een zwarte Aspergillus of Aspergillus nidulans. In het bijzonder hebben Aspergillus niger, Aspergillus tubigensis en Aspergillus awamori de voorkeur.

De uitvinding betreft dus tevens filamenteuze
20 schimmels, bij voorkeur van de klasse der ascomyceten met een expressiecassette zoals boven beschreven. Deze filamenteuze schimmels met een expressiecassette volgens de uitvinding hebben het voordeel dat zij opgekweekt kunnen worden in gebruikelijke groeimmedia zonder dat
25 expressie van het eiwit waarvan de coderende sequentie aanwezig is in een expressiecassette volgens de uitvinding, plaats zal vinden. De filamenteuze schimmels met een expressiecassette volgens de uitvinding kunnen geïnduceerd worden door een breed scala van verbindingen,
30 welke weergegeven kunnen worden door de algemene formule:



waarbij X een amino- of hydroxygroep danwel een waterstof- of halogeenatoom is, A een al dan niet met een amino- of hydroxy-groep gesubstitueerde methyleengroep of een
35 carbonylgroep is of ontbreekt, en Y bestaat uit een carboxylgroep of zouten, amides en esters met lagere alcoholen hiervan, danwel uit een aldehyde-, hydroxy- of hydroxymethylgroep. Voorbeelden van geschikte inducerende verbindingen zijn benzoëzuur, natrium-benzoaat,

D,L-amandelzuur, fenylglyoxylzuur, p-aminobenzoëzuur, benzaldehyde, m-hydroxybenzoëzuur, p-hydroxybenzoëzuur en
5 fenylazijnzuur. De voorkeur gaat uit naar p-aminobenzoëzuur, omdat deze verbinding een sterke inductie geeft, en in vergelijking tot benzoëzuur niet of nauwelijks toxisch is.

Al deze inductoren hebben het voordeel dat ze
10 normaliter niet of slechts in zeer lage concentraties in het groeimedium van het gastheer organisme voorkomen, zodat tijdens de groei geen inductie plaatsvindt. Ter vergelijking zij opgemerkt dat inductie van de veel gebruikte glaA promotor uit Aspergillus niger (Fowler et
15 al.; Curr. Genet. (1990) 18 537-545) o.a. plaatsvindt door zetmeel, glucose en maltose. Een nadeel van dit type inducerende verbindingen is echter dat ze ook makkelijk als koolstofbron gebruikt kunnen worden door het gastheer organisme, waardoor geen ontkoppeling van groei en
20 expressie verkregen kan worden.

Met behulp van de expressiecassettes volgens de uitvinding kan dus wel een echte ontkoppeling plaatsvinden van de groei van het gastheer organisme en de productie van het heterologe eiwit, omdat als inductor een
25 verbinding gekozen kan worden die slechts in dusdanig lage concentratie voorkomt, dat daarop geen (substantiële) groei mogelijk is.

Uit de hierna volgende voorbeelden blijkt dat de expressiecassette volgens de uitvinding, na inductie met
30 p-aminobenzoëzuur, een onverwacht hogere expressie geeft dan de expressiecassette met de constitutieve gpdA promotor uit Aspergillus niger. De expressiecassette volgens de uitvinding is dientengevolge ten minste van vergelijkbare sterkte als de expressiecassette met de glaA
35 promotor uit Aspergillus niger na inductie met maltodextrine (zie Punt et al.; J. Biotech (1991) 17 19-34). In niet geïnduceerde toestand bedraagt het expressieniveau van de expressiecassette volgens de uitvinding minder dan 2% ten opzichte van het niveau na
40 inductie met p-aminobenzoëzuur.

Het is voorts bekend dat de hoeveelheid geproduceerd eiwit sterk verhoogd kan worden door gebruik te maken van multicopy transformanten. Het zal duidelijk zijn dat de expressiecassette volgens de uitvinding ook met voordeel toegepast kan worden in een gastheerorganisme in een multicopy situatie.

Een cellijn met een expressiecassette volgens de uitvinding vertoont cataboliet repressie, het is indien gewenst voor de vakman eenvoudig mogelijk een niet-catabolietrepressieve mutant te isoleren.

De eiwitten (oligo- en/of polypeptiden) die gemaakt worden door het tot expressie brengen van de expressiecassette volgens de uitvinding kunnen gewonnen worden, verder worden omgezet, of worden gebruikt voor in situ reacties. Indien een eiwit al dan niet verder omgezet als zodanig gewonnen wordt is het van voordeel indien het eiwit wordt uitgescheiden door de schimmel, noodzakelijk is dit echter niet. Het kan echter ook van voordeel zijn de expressiecassette volgens de uitvinding te gebruiken om b.v. een enzym te produceren waarmee in de cel een primaire of secundaire metaboliet in -in voor de cellijn-hoge opbrengst gemaakt wordt. Hierbij is dus meer sprake van een gemodificeerde cellijn, die metaboliëten maakt zoals bijvoorbeeld fenylalanine, para-hydroxyfenylalanine, of bijvoorbeeld vitamines, antibiotica, steroïden of terpenoiden. Ook kan zo'n cellijn geschikt zijn voor de afbraak van xenobiotica zoals b.v. PCB's, toluëen, DDT en dergelijke, zodat detoxificatie van bijvoorbeeld grond plaats kan vinden.

De uitvinding zal worden toegelicht aan de hand van de volgende niet beperkende voorbeelden. Bij deze voorbeelden zullen ook de figuren worden toegelicht.

Voorbeelden

Algemeen

De strategie ter verkrijging en het testen van de expressiecassette volgens de uitvinding was als volgt:

Allereerst is het hele bphA gen inclusief de promotor uit Aspergillus niger ATCC 1015 geïsoleerd in een vector ingebracht, zoals beschreven in van Gorcom et al. in Mol. Gen. Genet. (1990) 223 pp. 192-197. De basevolgorde van de promotor, de translatiecontrolesequentie en een klein deel van de voor het BPH eiwit coderende sequentie is bepaald en weergegeven in Figuur 1.

Vervolgens werd in een aantal verschillende experimenten de promotor met eventueel een gedeelte van de translatiecontrolesequentie getest. Hiertoe werd uit de bovengenoemde vector een deel van het bphA gen geknipt en in een tweede vector gebracht waarin ook de nucleotide sequentie aan het begin van het E. coli lacZ gen aanwezig was.

Via in vitro mutagenese met speciaal gesynthetiseerde oligonucleotiden werd het gewenste deel van het bphA gen gekoppeld aan het lacZ gen. Daarna werd het relevante stuk DNA uit de vector geknipt en in een plasmide gebracht. Dit plasmide bezat het volledige lacZ gen, en eveneens als selectie marker een mutant pyrG gen van A. niger. Het plasmide werd daarna in een Aspergillus niger stam gebracht, die een pyrG⁻ mutant stam was. Door op pyrG prototrofie te screenen, konden transformanten gewonnen worden.

Op analoge wijze werd een expressiecassette gemaakt, die bestond uit een promotor afkomstig van het bphA gen, een translatiecontrole-sequentie van het A. nidulans gpdA gen, en de voor een eiwit (β -galactosidase) coderende sequentie van het E. coli lacZ gen. Het translatiecontrolegedeelte van het gpdA gen werd hiervoor gekozen, omdat bekend is dat dit een relatief stabiel 5'-mRNA geeft. Deze transformant wordt hierna bphA-gpdA transformant genoemd.

Er werden uiteindelijk 6 stammen vergeleken en getest op mate van expressie van lacZ: het wild-type (Aspergillus niger wt N245, een afgeleide van ATCC 1015),

de drie transformanten met het translatiecontrolegedeelte van het bphA gen tot de 1e, 2e en 3e ATG op het voor mRNA
5 coderende DNA; de bphA-gpdA transformant en, als referentie een A. niger transformant met een expressiecassette bestaande uit een A. niger gpdA promotor, een gpdA translatiecontrolesequenties en een voor het lacZ eiwit coderende sequentie. Deze expressie-
10 cassette heeft een constitutieve promotor, dit is een promotor die inductie-onafhankelijk is, en dus altijd tot expressie komt.

1) Klonering van het bphA gen met de promotor en de
15 karacterisering van de promotor en van het 5' gedeelte van het bphA gen

De promotor van het Aspergillus niger bphA gen werd gekloneerd uit het chromosomaal DNA van Aspergillus niger ATCC 1015 op het 9.8 kb EcoRI fragment dat aanwezig
20 is in plasmide pAB8-2 zoals beschreven in van Gorcom et al. in Mol. Gen. Genet. (1990) 223, pp. 192-197.

De DNA nucleotiden volgorde van de promotorregio vanaf een SalI site van het bphA gen werd bepaald met de methode beschreven door Sanger et al. Proc. Natl. Acad.
25 Sci. USA (1977) 74 pp. 5463-5467. De volgorde is weergegeven in figuur 1. Uit verdere proeven bleek dat alle relevante sequenties die betrokken zijn bij de efficiëntie, regulatie en initiatie van de transcriptie van het bphA gen ten minste gelegen zijn op een fragment,
30 dat begint bij de SalI site die gelegen is op circa 1650 basenparen voor de start van het bphA gen. De belangrijkste (major transcription-initiation point) initiatieplaats van de transcriptie werd bepaald en is gelegen op nucleotide nummer 1645 in figuur 1. Een paar
35 relevante knipplaatsen van restrictieënzymen zijn daar tevens aangegeven.

De nucleotidesequentie aanwezig na de initiatieplaats van de transcriptie (de translatie controlesequentie van het bphA gen) is eveneens aangegeven

in figuur 1. In dit deel van het gen bleken er drie ATG
codons aanwezig te zijn respectievelijk gelegen op 1650,
5 1693 en 1932. De eerste twee ATG initiatiecodons behoren
toe aan open leesramen die kunnen leiden tot 2
oligo-peptiden van 18 resp. 5 aminozuren. Het derde is het
initiatiecodon van het open leesraam dat codeert voor de
BPH sequentie

10

2) Testen van promotor m.b.v. een reporter gen

De efficiëntie van de promotor van het bphA gen
werd getest met behulp van een expressieanalyse systeem
ontwikkeld voor schimmels door van Gorcom en van den
15 Hondel Nucleic Acids Res. (1988) 16, p. 9052. In zijn
algemeenheid wordt hierbij de efficiëntie van een promotor
bepaald door de promotor te plaatsen voor een zogenaamd
reporter gen (in dit geval het β -galactosidase gen (lacZ)
van E. coli). Deze zogenaamde fusiegenen worden, in één
20 kopie, getest op een vaste plaats in het genoom van de
schimmel, te weten het pyrG locus van Aspergillus niger.
De plasmiden (expressieanalysevectoren) waar vanuit gegaan
is zijn beschreven in het hierboven genoemde artikel.

25 Voorbeeld I

Vervaardiging van een plasmide met een expressiecassette
met als promotor en translatiecontrolesequentie het 5'
gedeelte van het bphA gen tot de 3e ATG (bp 1932, figuur
1):

30 Het circa 2.1 kb SalI fragment, dat onder andere
de promotor van het bphA gen bevat (Figuur 1) werd
gekloneerd in de SalI site van vector m13mp11 (deze vector
is beschreven door Messing in Methods Enzymol. 1983, 101,
pp. 20-78). Er werd een vector geselecteerd waarin de
35 translatierichting van het BPH gedeelte en de
translatierichting van het lacZ- α gedeelte aanwezig in
m13mp11 identiek waren. Deze vector werd genoemd mAB8-81
en is weergegeven in figuur 2 (vervolg).

Uitgaande van deze vector werd m.b.v. in vitro mutagenese experimenten, uitgevoerd volgens de methode van Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, pp. 488-492) met behulp van het oligonucleotide aangegeven in figuur 2, (vervolg; bovenste rechts onder) een nieuwe vector gemaakt (mAB8-83, figuur 3), waarin het translatie initiatiecodon van het BPH (de 3e ATG) in fase werd geplaatst voor de code van lacZ- α gedeelte van ml3mpl1. De door in vitro mutagenese ontstane fusie werd bevestigd met behulp van DNA sequentie analyse.

De promotor van het bphA gen en het eerste gedeelte van het fusiegen, gelegen op een SalI fragment is met behulp van SalI-BamHI adapters (sequentie zie figuur 3, rechtsboven) gekloneerd in de unieke BamHI site van de expressieanalyse vector pAB94-12 (van Gorcom en van den Hondel; Nucleic Acids Res. (1988) 16, p. 9052). Een plasmide met een expressiecassette volgens de uitvinding, genoemd pAB94-83 (figuur 3, vervolg), waarin de bphA promotor, een -in frame- translatiefusie tussen het startcodon van BPH (3e ATG) en het volledige lacZ gen aanwezig waren werd gebruikt voor het verdere onderzoek. De relevantie sequentie in het fusiegebied werd opnieuw geverifieerd.

Voorbeeld II en Vergelijkend experiment A

Vervaardiging van een plasmide met een expressiecassette met als promotor en translatiecontrolesequenties het 5' deel van het bphA gen tot respectievelijk het 1e en het 2e ATG codon (resp. bp 1650 en 1693 uit Figuur 1):

Uitgaande van vector mAB8-81 werden door gebruik te maken van in vitro mutagenisatie technieken volgens de methode van Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82 pp. 488-492) twee vectoren gemaakt met oligonucleotiden zoals weergegeven in figuur 2 (vervolg), middelste en onderste rechts onder. Deze experimenten hebben geresulteerd in de vector mAB8-84 (1e ATG fusie; vergelijkend experiment A) en mAB8-85 (2e ATG fusie;

voorbeeld II). De door in vitro mutagenese ontstane fusies werden gecontroleerd met behulp van DNA sequentie analyse.

5 Uit de resulterende vectoren mAB8-84 en -85 werd het BamHI fragment met promotor en het eerste gedeelte van het fusie gen geïsoleerd, waarna deze in het grootste fragment dat ontstond na partiële BamHI digestie van vector mAB94-83 werd gecloneerd; de gebruikte BamHI sites
10 in mAB94-83 zijn gemerkt met een pijl (Figuur 3, vervolg). Zodoende werd dus in pAB94-83 het BamHI fragment met het grootste gedeelte van de promotor en translatiecontrole sequenties vervangen door de overeenkomstige BamHI fragmenten uit mAB8-84 en mAB8-85. Dit heeft geresulteerd
15 in de vectoren pAB94-84 (vergelijkend experiment A) en pAB94-85 (voorbeeld II) (figuur 4, vervolg). De relevante sequenties in het fusiegebied, werden opnieuw geverifieerd.

20 Voorbeeld III

Vervaardiging van een plasmide met een expressiecassette met de promotor van het bphA-gen, en als translatiecontrolesequentie een deel van een gpdA-gen tot het ATG initiatiecodon van het gpdA open leesraam

25 De promotor van het bphA gen (figuur 1 t/m positie 1644) tot de transcriptiestart werd gefuseerd aan een bestaand construct waarin reeds het Aspergillus nidulans gpdA gen gefuseerd was aan het lacZ gen. Hiertoe is een PvuII-BamHI fragment dat de relevante sequenties
30 (van voor de transcriptiestart tot na de translatiestart) van deze fusie bevat (beschreven door Punt et al. in Gene (1990) 93 101-109), geplaatst tussen de SmaI en EcoRI sites van de tussenvector mAB8-81 (met behulp van een BamHI-EcoRI adapter; zie figuur 5). Dit heeft geresulteerd
35 in de vector mAB8-82.

Met behulp van in vitro mutagenese volgens kunkel werden de transcriptiestartplaatsen van resp. het bphA gen en het gpdA-lacZ fusiegen aan elkaar gekoppeld. Het gebruikte oligonucleotide is vermeld in figuur 5, vervolg.

Op deze wijze is de vector mAB8-86 ontstaan. De door in vitro mutagenese ontstane fusie werd gecontroleerd met
5 behulp van DNA sequentie analyse.

De promotor van het bphA gen en het eerste gedeelte van het fusiegen uit mAB8-86, gelegen op een SalI fragment werd met behulp van SalI-BamHI adapters (sequentie zie figuur 6) gekloneerd in de unieke BamHI
10 site van de expressieanalyse vector pAB94-13 (van Gorcom en van den Hondel; Nucleic Acids Res. (1988) 16 p. 9052). Op deze wijze ontstond een in frame fusie van het startcodon van het bphA-gpdA-lacZ fusiegen aan het volledige lacZ gen aanwezig in de expressieanalyse
15 vectoren. Het resultaat hiervan was de vector pAB94-86 (figuur 6, vervolg). De relevante sequentie in het fusiegebied werd opnieuw geverifieerd.

Van de vier vectoren zijn de geverifiëerde sequenties in het fusiegebied weergegeven in figuur 7.

20

Voorbeelden IV-XV en Vergelijkende experimenten B-N
Transformatie van Aspergillus niger N245 met de vier
geconstrueerde expressieanalyse vectoren pAB94-83, -84,
-85 en -86:

25 Aspergillus niger N245 (ATCC 1015, csp, met, pyrG) werd getransformeerd met de hiervoor beschreven geconstrueerde vectoren (pAB94-83, -84, -85 en -86). Tussen PyrG⁺ transformanten is met behulp van Southern blotting gezocht naar transformanten waarin één kopie van
30 het betreffende plasmide geïntegreerd op het pyrG locus van het chromosomale DNA van de stam aanwezig was (overeenkomstig de methode beschreven door van Hartingsveldt et al.; Mol. Gen. Genet. 206 (1986) pp. 71-75). Voor elk plasmide zijn op deze wijze twee
35 onafhankelijke één-kopie transformanten geïsoleerd.

Analyse van de β -galactosidase expressie in wildtype
Aspergillus niger, in de hiervoor genoemde geïsoleerde
één-kopie transformanten en in Aspergillus niger met een

constitutief tot expressie gebracht, gpdA-lacZ fusiegen:

- Twee onafhankelijke één-kopie transformanten
- 5 verkregen met de plasmide pAB94-83, -84, -85 en -86 werden gekweekt (en geïnduceerd) in diverse media en na oogsten geanalyseerd op hun β -galactosidase activiteit. Ter vergelijking werden de uitgangsstam N245 en een Aspergillus niger-transformant waarin één kopie van een
- 10 Aspergillus niger gpdA-lacZ fusie aanwezig was op het pyrG locus meegenomen (gebruikte stam: Aspergillus niger AB4.1 (van Hartingsveldt et al. zie hiervoor); gebruikt plasmide pAB94-53 (figuur 8). Dit plasmide is gedeponeerd, no.
- 15 Bij elk experiment werd gebruik gemaakt van sporen-suspensies die maximaal één week oud waren. Alle experimenten werden uitgevoerd in een New Brunswick G25 luchtincubator (roterend schudplateau) bij 30°C en 300 rpm. Verder is steeds gebruik gemaakt van identieke 500 ml
- 20 erlenmeyers.
- De voorkweek werd uitgevoerd door 2×10^7 sporen te enten in 200 ml compleet medium (CM; zie verder), + 1 mg/ml methionine (+ met), + 10 mM uridine (+ uri). Na 24 uur werden deze cultures afgefiltreerd over Miracloth
- 25 (Calbiochem) en gewassen met 1* DSM-medium zonder suikers (1* DSM-S; zie verder), + met + uri. Hiervan werd 0,3 gram na wassen met 50 ml 1* DSM-S, + met, + uri, en vervolgens met 50 mM Na-fosfaat pH 7, 1 mM $MgCl_2$, 20 μM PMSF (proteaseremmer) ingevroren in vloeibare stikstof
- 30 voor analyse voor vergelijkende experimenten B-D en voorbeelden IV-VI. Voorts werd 1 gram toegevoegd aan 125 ml 1* DSM-S, + met, + uri, + respectievelijke 0,3% para-amino-benzoëzuur (paba) of 0,1% para-hydroxybenzoëzuur (phb) of 0,1% benzoëzuur (benz.)
- 35 (zie verder). Deze cultures werden 4 uur geïncubeerd bij 30°C, 300 rpm. Na deze inductie werd het mycelium opnieuw gefiltreerd over Miracloth en gewassen met 1* DSM-S, + met, +uri en vervolgens met 50 mM Na-fosfaat pH 7, 1 mM $MgCl_2$, 20 μM PMSF, 0,3 gram van deze monsters werd

- ingevroren in vloeibare stikstof voor verdere analyse.
- Alle mycellium monsters werden gemalen in een mortier in
- 5 vloeibare stikstof en het mycelium poeder werd opgenomen in
1 ml 50 mM Na-fosfaat buffer pH 7, 1 mM $MgCl_2$, 20 μ M PMSF
(van Gorcom et al.; Gene, (1985) 40, 99-106). Na ontdooien
en vortexen werd deze suspensie 15' gecentrifugeerd bij
4°C (Eppendorf centrifuge 12.000 rpm). Van het supernatant
- 10 is de β -galactosidase activiteit (Miller, in 'Experiments
in Molecular Genetics', Cold Spring Harbor Laboratory,
1972) en de eiwitconcentratie bepaald met de Bradford
methode, zoals beschreven in Anal. Biochem. (1976) 72
248-254.
- 15 De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in de
navolgende tabel.

TABEL

5	Expe- riment	type schimmel	Gemiddelde β -galacto- sidase activiteit + spreiding (units per mg eiwit) (Miller)	Sterkte vergeleken met <u>A. niger</u> <u>gpdA</u> promotor
10	B	<u>A. niger wt</u>	25 (16-34)	
	IV	3e ATG	600 (316-1481)	0.06
	C	1e ATG	300 (221-462)	0.03
	V	2e ATG	275 (32-1449)	0.06
15	VI	bphA-gpdA	650 (215-1210)	0.06
	D	gpdA	10.475 (6833-13451)	1
	E	<u>A. niger wt</u>	75 (14-274)	
	VII	3e ATG	3.550 (847-7132)	0.22
20	F	1e ATG	550 (242-1011)	0.03
	VIII	2e ATG	5.950 (3384-8333)	0.37
	IX	bphA-gpdA	10.350 (6128-18240)	0.65
	G	gpdA	16.025 (10694-19783)	1
25	H	<u>A. niger wt</u>	400 (22-815)	
	X	3e ATG	20.450 (13144-32222)	1.31
	J	1e ATG	600 (339-1029)	<0.05
	XI	2e ATG	24.675 (14159-34050)	1.58
	XII	bphA-gpdA	23.000 (15091-39889)	1.47
30	K	gpdA	15.650 (10785-20089)	1
	XIII	3e ATG	27.675*	
	N	1e ATG	500*	
	XIV	2e ATG	70.250*	
35	XV	bphA-gpdA	41.675*	

* waarden zijn een gemiddelde van twee metingen en dus minder betrouwbaar

In experiment B-D en IV-VI zijn de 6
verschillende stammen getest zonder inductor. Alle typen,
5 behalve de constitutieve stam (D) gaven een zeer lage
 β -galactosidase activiteit.

In een tweede serie experimenten werden de 6
stammen geïnduceerd met parahydroxybenzoëzuur. Het
Aspergillus niger wild type (exp. E), die geen expressie-
10 cassette bevatte en de niet functionele expressiecassette
(fusie op het eerste ATG codon, exp. F) gaven geheel geen
inductie te zien in vergelijking tot de constitutieve stam
(exp. G). Voorbeelden VII, VIII en IX laten duidelijk zien
dat verhoogde β -galactosidase expressie optreedt ten
15 opzichte van E of F.

Uit de derde serie blijkt een analoog beeld, zij
het dat nu de met para-aminobenzoëzuur geïnduceerde
filamenteuze ascomyceten volgens de uitvinding zelfs een
duidelijk grotere activiteit vertonen, dan de schimmels
20 met het middels de gpdA promotor constitutief tot
expressie gebrachte lacZ gen (exp. K).

Uit de vierde serie blijkt, dat benzoëzuur ook
een zeer geschikte inductor is.

25 Samenstelling gebruikte media:

Compleet medium (CM) per liter AD:

2 g neopepton, 1 g gistextract, 20 ml 50*AspA (300 g
NaNO₃, 26 g KCl, 76 g KH₂PO₄ per liter; stellen met 10 N
KOH tot pH 5,5), 2 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 1000*sporen (2,2 g
30 ZnSO₄.7 H₂O, 1,1 g H₃BO₃, 0,5 g MnCl₂.4 H₂O, 5 g FeSO₄. 7
H₂O, 0,17 g CoCl₂ . 6 H₂O, 0,16 g CuSO₄ . 5 H₂O, 0,15 g
Na₂MoO₄ . 2 H₂O, 5 g EDTA in 100 ml AD; na sterilisatie
stellen met 10 N KOH op pH 6,5), 10 ml 50% glucose, 2 ml
vitamine oplossing (100 mg thiamine, 1000 mg riboflavine,
35 100 mg para-aminobenzoëzuur, 1000 mg nicotinamide, 500 mg
pyridoxine, 100 mg pantotheenzuur, 2 mg biotine per
liter), 10 ml 10% casaminozuren.

DSM medium zonder suikers (DSM-S) per liter kraanwater:

0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,04 g NaCl, 5,24 g K_2HPO_4 , 0,22 g ureum.

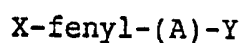
5

A. niger N245 en plasmide pAB94-53 (in E. coli DH 5 α) zijn op 26 september gedeponeerd bij het CBS in Baarn (NL).

C O N C L U S I E S

- 5 1. Een expressiecassette omvattende
- (A) een 5'-expressie controle systeem met
- (1a) een promotor met transcriptie controle
- sequenties
- (1b) een transcriptie initiatie plaats;
- 10 (2a) translatie controle sequenties aan de
- 3'-kant van de transcriptie initiatie
- plaats;
- (2b) een translatie initiatie plaats;
- (B) een voor een oligo- of polypeptide coderende
- 15 sequentie,
- welke expressiecassette geschikt is voor het in
- filamenteuze schimmels tot expressie brengen van een
- oligo- of polypeptide, met het kenmerk dat de
- expressiecassette een 5'-expressie controle systeem
- 20 bevat waarin de promotor van het Aspergillus niger
- bphA gen aanwezig is of een functioneel equivalente
- sequentie en de voor een oligo- of polypeptide
- coderende sequentie niet codeert voor het Aspergillus
- niger benzoaat-parahydroxylase.
- 25 2. Een expressiecassette volgens conclusie 1 waarin de
- aansluiting van de voor een oligo- of polypeptide
- coderende sequentie heeft plaatsgevonden aan het 2° of
- 3° ATG codon op het mRNA coderende deel van het bphA
- gen.
- 30 3. Een expressiecassette volgens conclusie 1 waarin de
- translatie controle sequenties afkomstig zijn van een
- heteroloog gen.
4. Een expressiecassette volgens een der conclusies 1-3,
- met het kenmerk, dat de voor een oligo- of polypeptide
- 35 coderende sequentie codeert voor een industrieel
- enzym, voedingseiwit of een peptide met farmaceutische
- werking, of voor precursors daarvan.
5. Filamenteuze schimmel met één of meerdere expressie-
- cassettes volgens een der conclusies 1-4.

6. Filamenteuze schimmel volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat deze gekozen is uit de reeks der genera Aspergillus, Penicillium, Trichoderma of verwanten.
7. Filamenteuze schimmel volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat deze een Aspergillus niger, tubigenis, awamori of nidulans is.
8. Een expressiecassette of filamenteuze schimmel volgens een der conclusies 1-7, met het kenmerk, dat deze induceerbaar is door verbindingen met de formule I



(I)

- waarbij X een amino- of hydroxygroep danwel een waterstof- of halogeenaatoom is, A een al dan niet met een amino- of hydroxygroep gesubstitueerde methyleengroep of een carbonylgroep is of ontbreekt, en Y bestaat uit een carboxylgroep of zouten, amides en esters met lagere alcoholen hiervan, danwel uit een aldehyde-, hydroxy- of hydroxymethylgroep.
9. Een expressiecassette of schimmel volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat de inducerende verbinding para-aminobenzoëzuur is.
10. Werkwijze voor de bereiding van een oligo- of polypeptide door aan een filamenteuze schimmel volgens een der conclusies 5-7 een verbinding volgens formule I te suppleren en het oligo- of polypeptide dat dan gevormd wordt te winnen en desgewenst te zuiveren.
11. Werkwijze voor de bereiding van een metaboliet door aan een filamenteuze schimmel volgens een der conclusies 5-7 een verbinding volgens formule I te suppleren, en het metaboliet dat gevormd wordt onder invloed van het tot expressie gekomen oligo- of polypeptide te winnen en desgewenst te zuiveren.
12. Werkwijze volgens een der conclusies 10-11, met het kenmerk, dat de filamenteuze schimmel gekweekt wordt nagenoeg zonder een inductor voor de expressiecassette volgens een der conclusies 1-4, en dat bij een

gewenste celdichtheid vrijwel geen groei meer optreedt en een inductor wordt toegevoegd.

- 5 13. Expressiecassette, filamenteuze schimmel en/of werkwijze zoals in hoofdzaak is beschreven in de beschrijving en de voorbeelden.

sequentie van de bphA promotor

SalI

1 GTCGACCGGA AGTGGCTTGT ACCACTTGAG TTCGAGCGGA AGACGGAAAT
 51 CCCGGATACA GGAGGAGCGC AGGTGACTTT GATCGATGGC TAATCATTGT
 101 CCTGGGAGCG CCATCTTTCT CTTGAGAGAA TCAATGGGAT CGGGTCCCTC
 151 GCAGAGAACA CATCGTGTCC TCCACTGTGG TGACTTTTCGC GCCTGCGCCG
 201 TTCATGTGCA ACATGCCCTT CCCC GCCCGG AGATTGCTGA CCCC GCAACC
 251 GGCAAGGCTC GCCAGCAACG AATCGATGCC TGCTATCTGG AACTACATA
 301 TTTGAGCCCC AAGTATGCAT TCCCTGGCCA GGAAGATGTC ATACAAGCCT
 351 GCGCAGAACT TTGCCTTGAG CTCGATGGGG ACGCCAACGA CACCAATGGA
 401 CGAGCATTTC GACGACCAGT CAATGGAAAA AGCGGAATGC TGAGCAAGTT

BamHI

451 TCTTACGGCT GTGACTGGAT CCCCCCGTC TCCGACGCAA GACAGCCGCC
 501 CCCCTGGCCG GCTATTGGTA GTAATAGGGA CGTACAGCAT CGGCAAAGAA

BglII

551 CGCATCTGTC TGGGGATCGC ACGGGCATTG AAGAGCAAGA TCTACGCGAC
 601 GCCAGCTAAG CAGCGCGTCT GTGGGTGCCT CGAGGATGCT GAGCTGTGAT
 651 CGCTGCTGAC AGACCATCCC ACGGAGGCGC AGGTGCATAT GCAAACGCTA
 701 TTCGAGATCC GGGCGGAAAC GCTGGCGGAT TACCTGCACT CCATGAAGCC
 751 GCACTTCACG CGGGTGGTGG GATTTCGACC AACCGGGTGG ACGTATCGCC
 801 CGCCAGCTGG CCGAATGCTG GACAACCCAC CGGTGTCGGT GGTGCTCAAT
 851 TCGGCACATT GGAAGACGCC CTTTCTGCG AAAGACCTGG TGCCACAGCG
 901 AGGCAGTACG CGGGAAGCG CATGCTTTGG ACTGCCGTAC AGTGAGCACA
 951 GCTCATTTTC GGAGTTGAGC ATGTTCTGCT GCGCACTCCG GATCGGACGG
 1001 GTGATCCCGA CAGTGAACGT AGGTAGCCGG AAAACTCGGG AGCGCATGAA
 1051 GGCGTGCAAT GAGCGATGGG AGGCGGAGAA GCGGAAGAAT GGGTTGTACC
 1101 GCGTGAGGG GAATAGCTGG TAGGGAAGGG AATAGATGGC TCTACCAATG
 1151 TCCAAAGTAC TGGTGGAACA GAAGGATCAG AAGGATTGCG AAAGACGGGT
 1201 CGGAACATGA TGCCTAATAG AGTAAGTAAG GAGTTGGTGC TGTAAGTACT

```

1251 CACAAGTTAC GAGTTGTGTA CATAACATCA TTAGTCATGA AGATCAATTG
1301 CCTTTATGCT TCGGTAAGTC TCGCCTCCGC GGAGTCACGA GATCAATAGA
1351 AACCACCGGC GTTGACCATT CGCGATGCTC TCACTGGCTG TATGCTGTGG
1401 ATAGCCATGG AGCCGTTCAA AGTATGGACC TTTGGGTGAG GATCTGCCTC
1451 CAACCCACCG GGACGTAGAC GAACAACCGA GCAGAGGCGG GGGAGGGCAA
1501 AGAGGCCGGC GCTGCAAATC GGCTGGGAGA TCAGTCGGCG CTCAGCAGAG
1551 ACTCCCGATT TTCCCTTCCG TTGCCTGGCT TTGCCTCGGG GTTCGAGAGG

1601 AGCCCGTCTG CCATAAATAA GCCTGCACTT CAACTCAAAA AAAAGGGAGA
                                     +
                                     M
1651 TGACAGATCA ACCACTTTCT CGACAAGAAA CACTCTTCAC CCATGGCGAT
      T D Q P L S R Q E T L F T H G D
                                     M A I
1701 ACTTGAGTGA AGTAAGTGTG ACTGTGACTG ATATTATTTT CTTCTTCAGC
      T *
      L E *
1751 CATCCCTTTT CGATATATTA CTTTACTT GCTTATTTCA TTTCCGAGGT
                                     <-
1801 AAGATGGTCT CTTGGCACC CACATTCCCG GCTGCACTTG GCGGCTGGG
      ----- INTRON -----
1851 AATTGCTTCT CCTGGCTGCA TTGCGCATG TTAACTTCCG AACTCTCACC
      -----
                                     HpaI
1901 AGCTTCCTCC CCTCCGCCA CAAAAACAAT CATGCTCGCC CTGCTCCTGT
      ->                                     M L A L L L S
1951 CACCTTACGG GGCCTATCTG GGTCTAGCCC TGCTAGTCCT CTACTATCTC
      P Y G A Y L G L A L L V L Y Y L
2001 CTTCTTACC TAAAGCGGCG TCACCTCCGC GATATCCCGG CCCCCTGCT
      L P Y L K R A H L R D I P A P G L
2051 GGCGGCTTC ACCAACTTCT GGCTGCTCCT GCAAACTCGT CGCGGTCACC
      A A F T N F W L L L Q T R R G H R
                                     Sali
2101 GTTTGTCTGT CGTCGAC
      F V V V D

```

+: hoofd transcriptie startplaats van het *bphA* gen

open leesramen gelegen op het *bphA* mRNA zijn vertaald gebruik makend van de standaard één letter code (*: stopcodon)

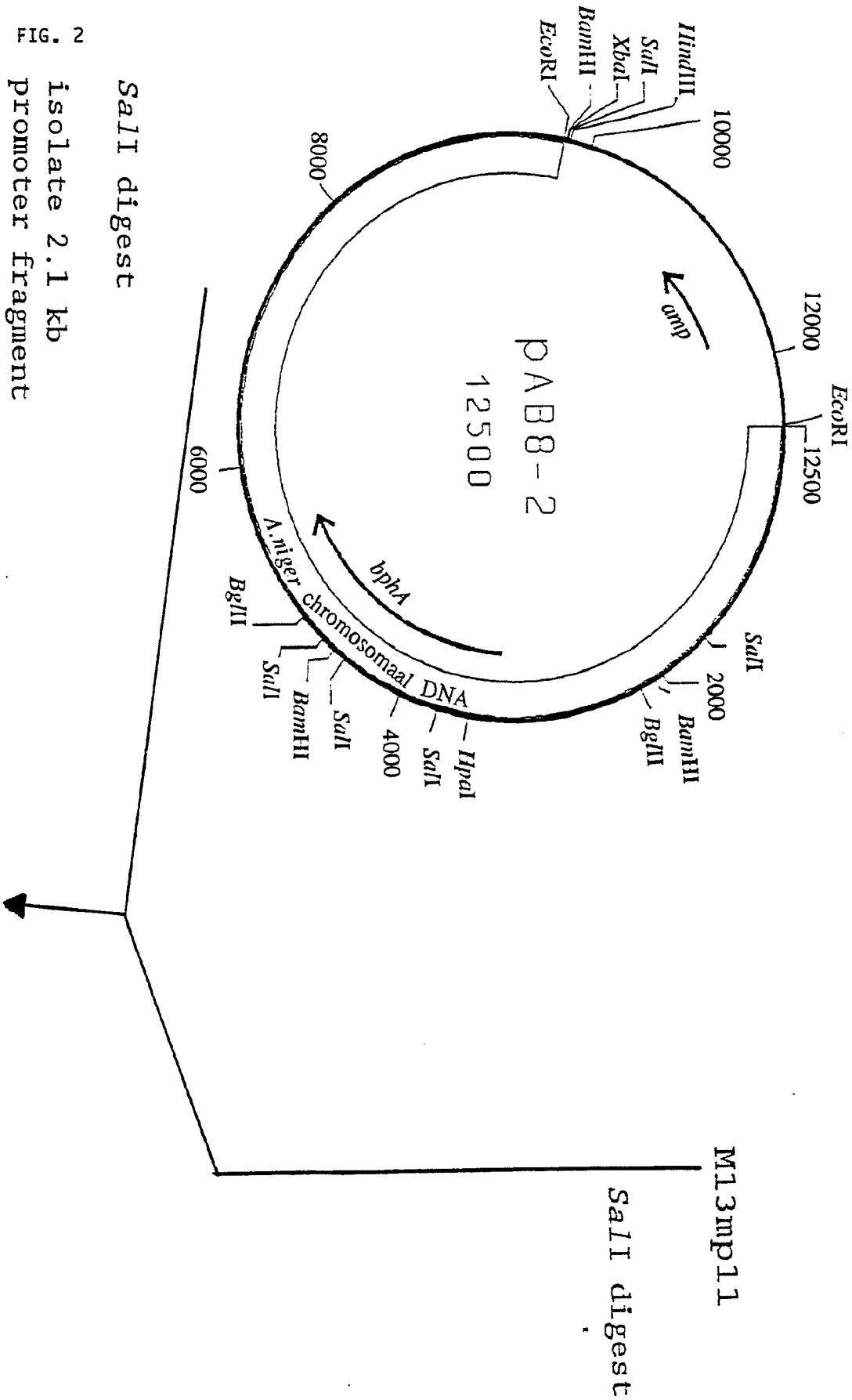
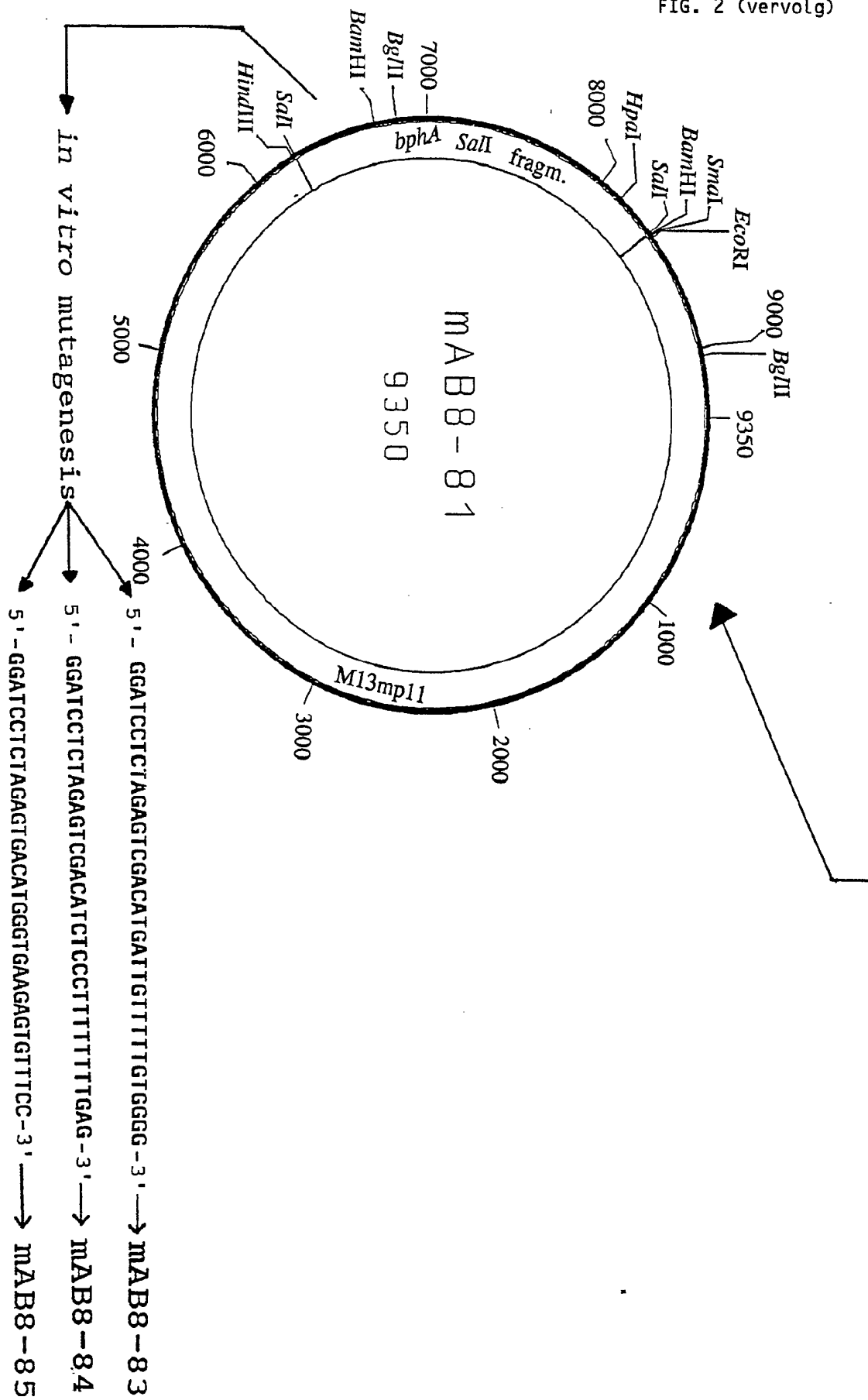


FIG. 2 (vervolg)



- 28 -

FIG. 3

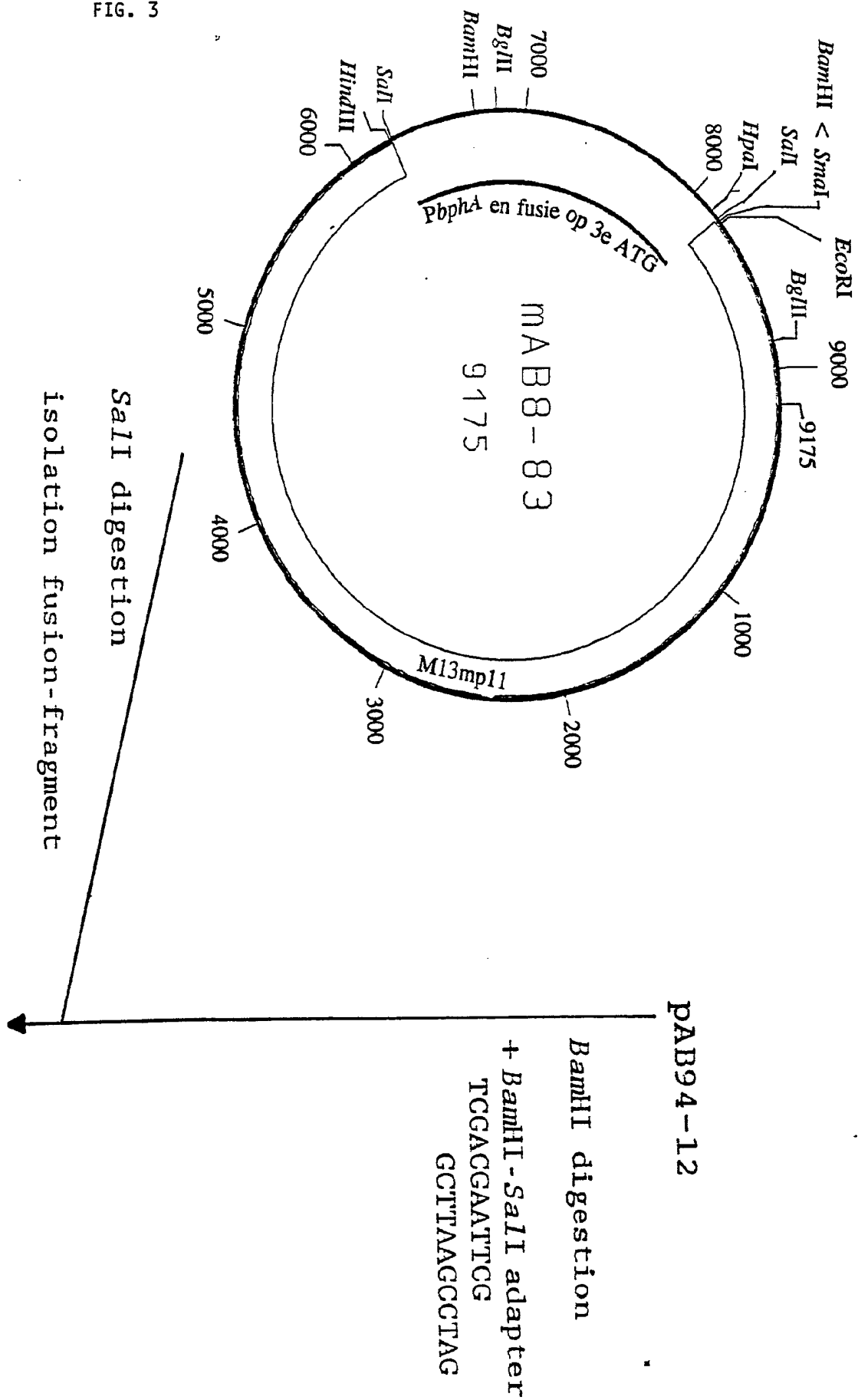


FIG. 3 (vervolg)

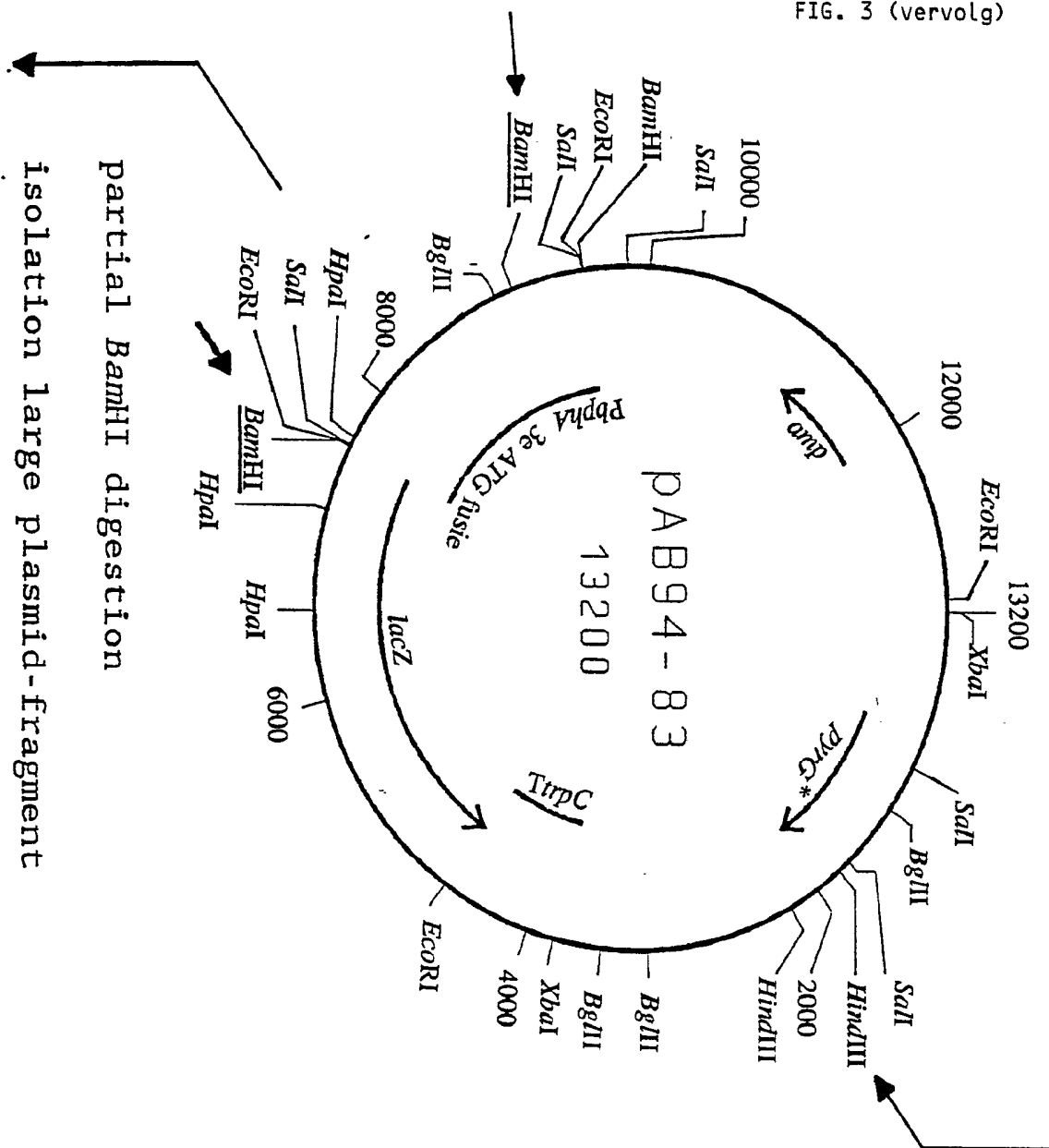


FIG. 4

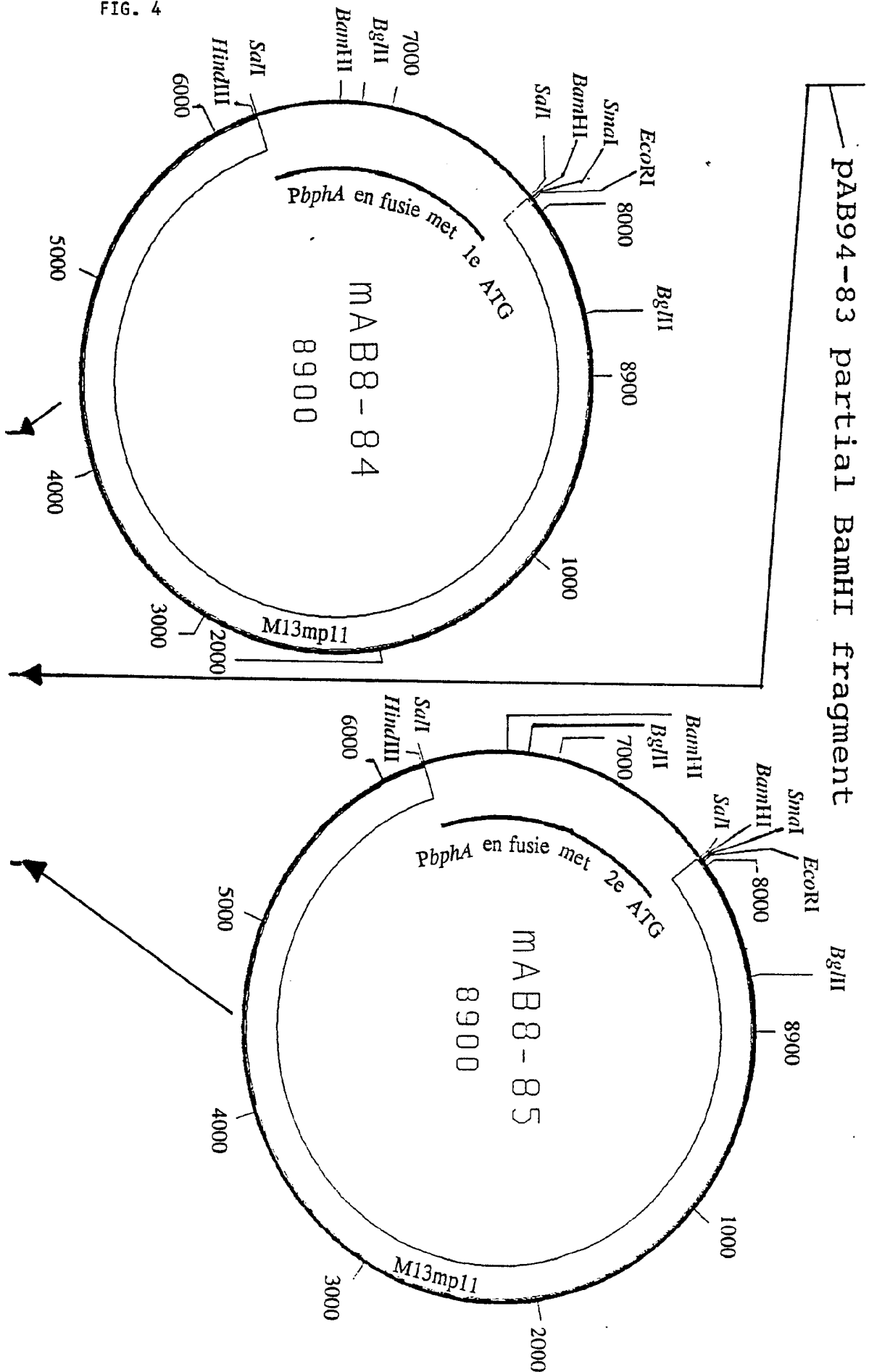


FIG. 4 (vervolg)

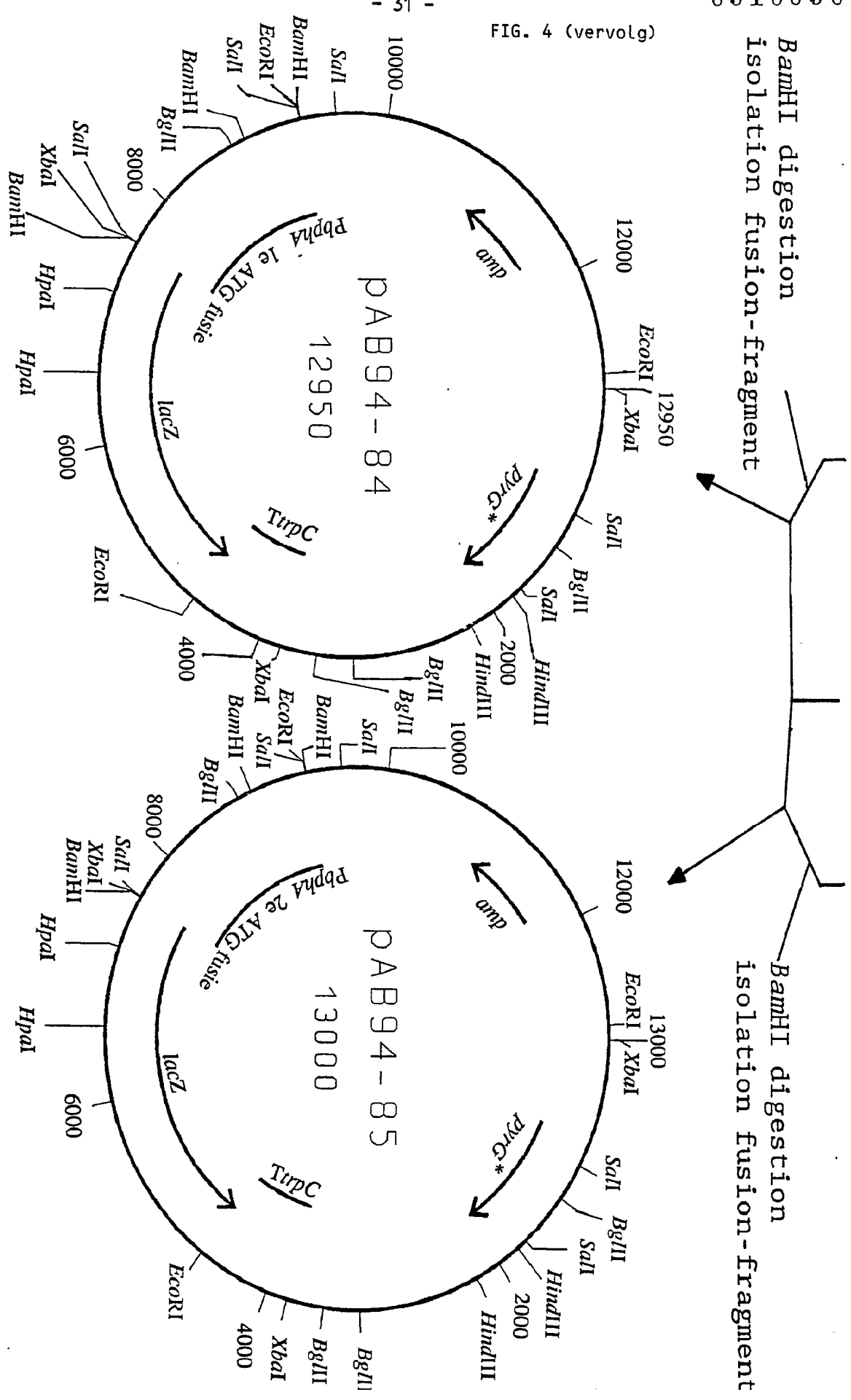


FIG. 5

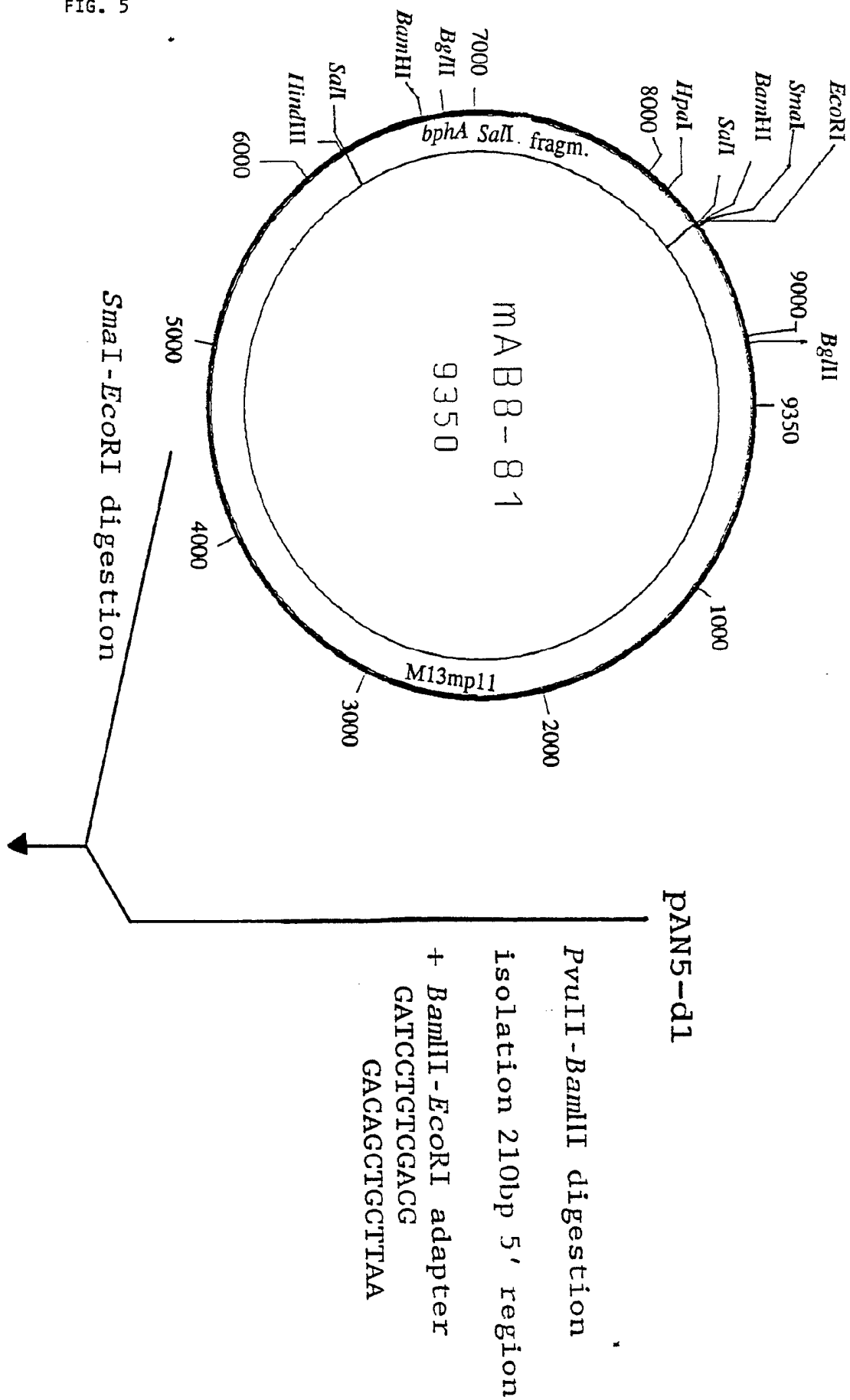


Diagram of the MAB8-82 plasmid map. The plasmid is circular and 9700 bp in size. Key features include the M13mp11 origin at the bottom, a gpA fragment at approximately 6500 bp, and a bphA SalI fragment at approximately 7500 bp. Restriction sites for EcoRI, BamHI, SalI, BglII, HpaI, and HindIII are marked. An arrow points to the 'in vitro mutagenesis' site at approximately 5000 bp, with the sequence GATGAATATACTGACAGATTTTGTGAGTTGAAGTGC provided below the map.

FIG. 6

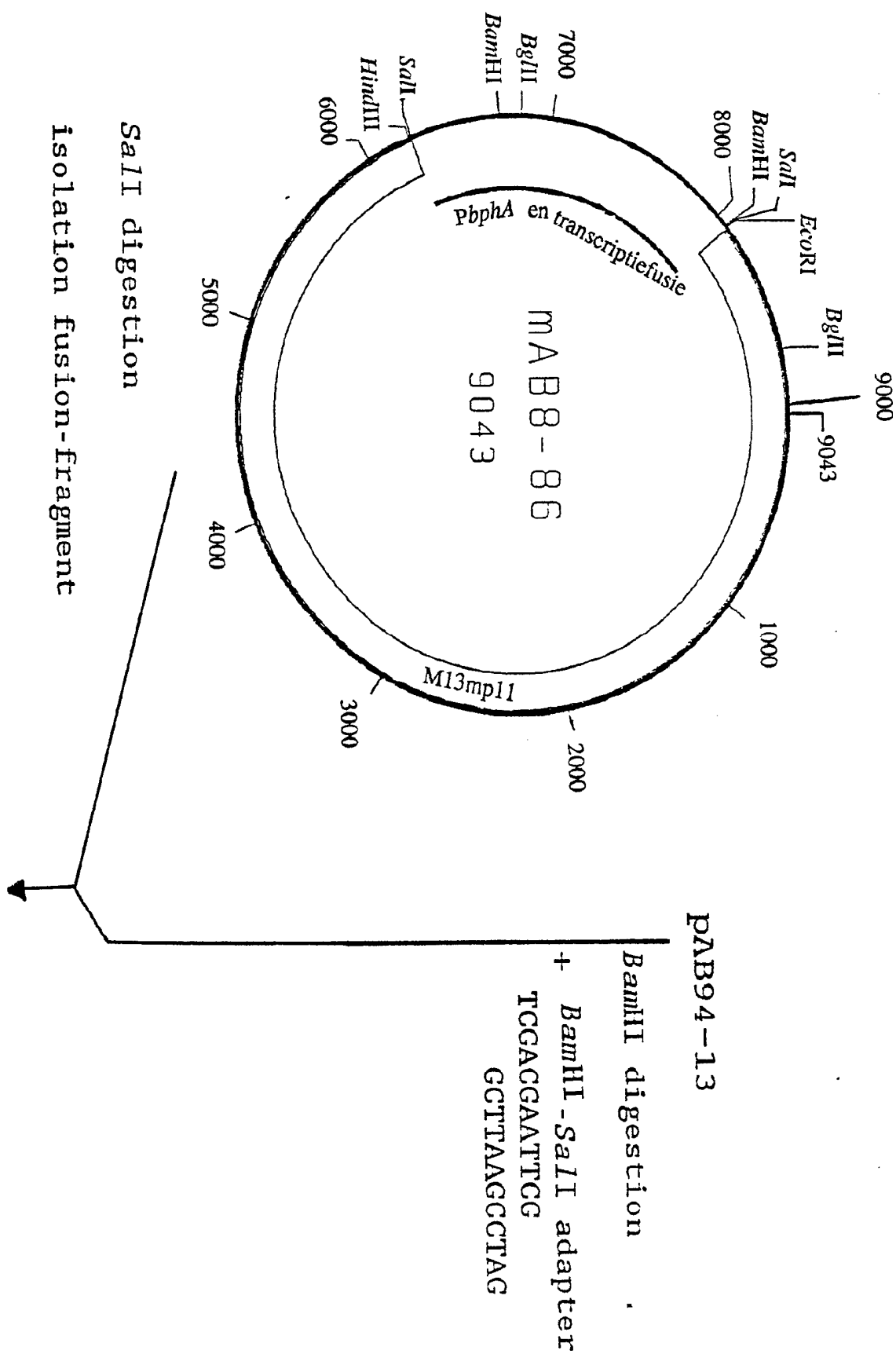
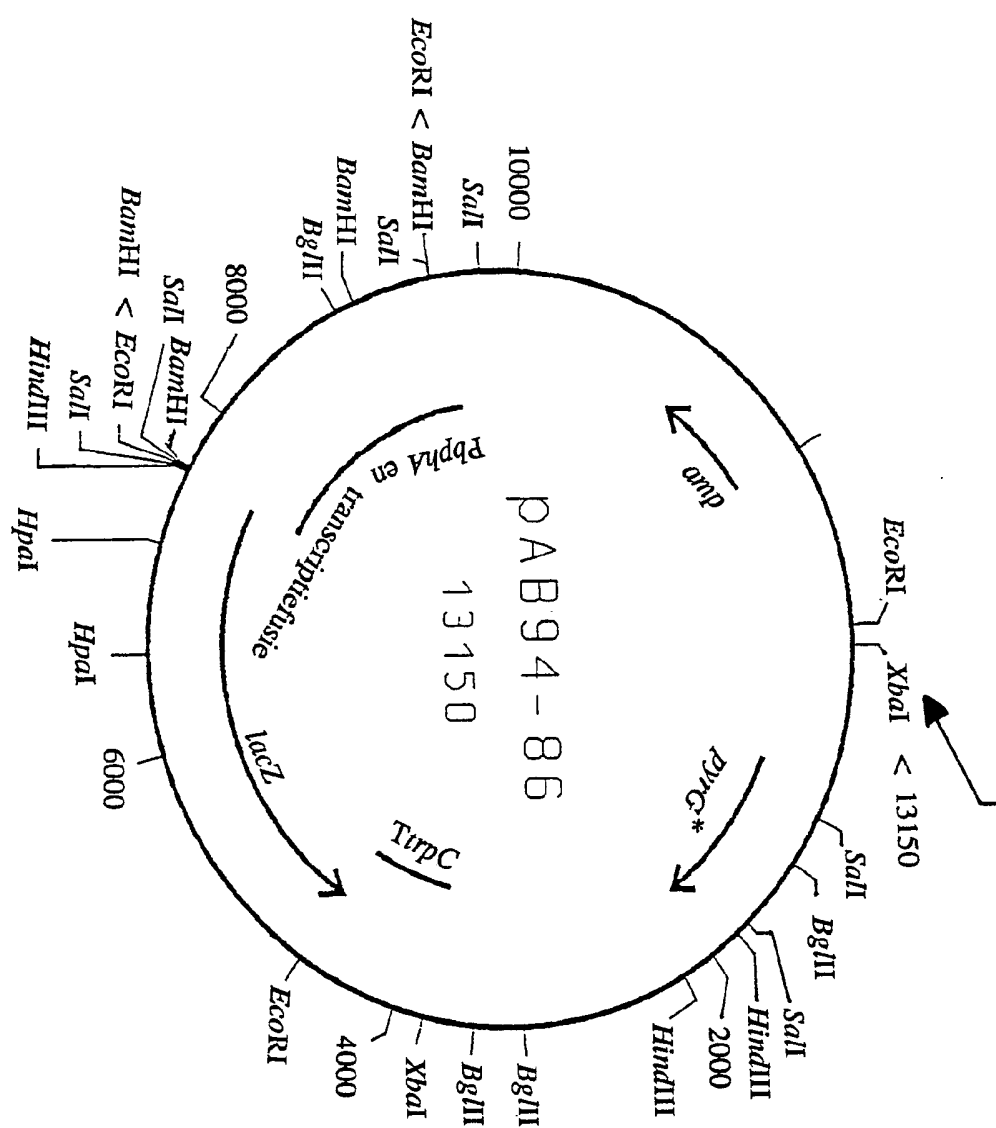


FIG. 6 (vervolg)



83.Rev Length: 363

```

1  TAAATAAGCC TGCACTTCAA CTCAAAAAAA AGGGAGATGA CAGATCAACC
    ^
51  ACTTTCTCGA CAAGAAACAC TCTTCACCCA TGGCGATACT TGAGTGAAGT
101  AAGTGTGACT GTGACTGATA TTATTTTCTT CTTCAGCCAT CCCTTTTCTGA
151  TATATTACCT TATAGTTGCT TATTTTATTT CGGAGGTAAG ATGGTCTCCT
201  TGGCACCACAC ATTCCCGGCT GCACTTGGCG GCTGCGGAAT TGCTTCTCCT
251  GGCTGCATTT GCCGATGTTA ACTTCCGAAC TCTCACCAGC TTCCTCCGCT
301  CCCCCGACAA AAACAATCAT Gtcgacgaat tcggatcccg tcgttttaca
351  acgtcgtgac tgg

```

84.Rev Length: 81

```

1  TAAATAAGCC TGCACTTCAA CTCAAAAAAA AGGGAGATGt cgactctaga
    ^
51  ggatcccgtc gttttacaac gtcgtgactg g

```

85.Rev Length: 124

```

1  TAAATAAGCC TGCACTTCAA CTCAAAAAAA AGGGAGATGA CAGATCAACC
    ^
51  ACTTTCTCGA CAAGAAACAC TCTTCACCCA TGtcgactct agaggatccc
101  gtcgtttttac aacgtcgtga ctgg

```

86.Rev Length: 283

```

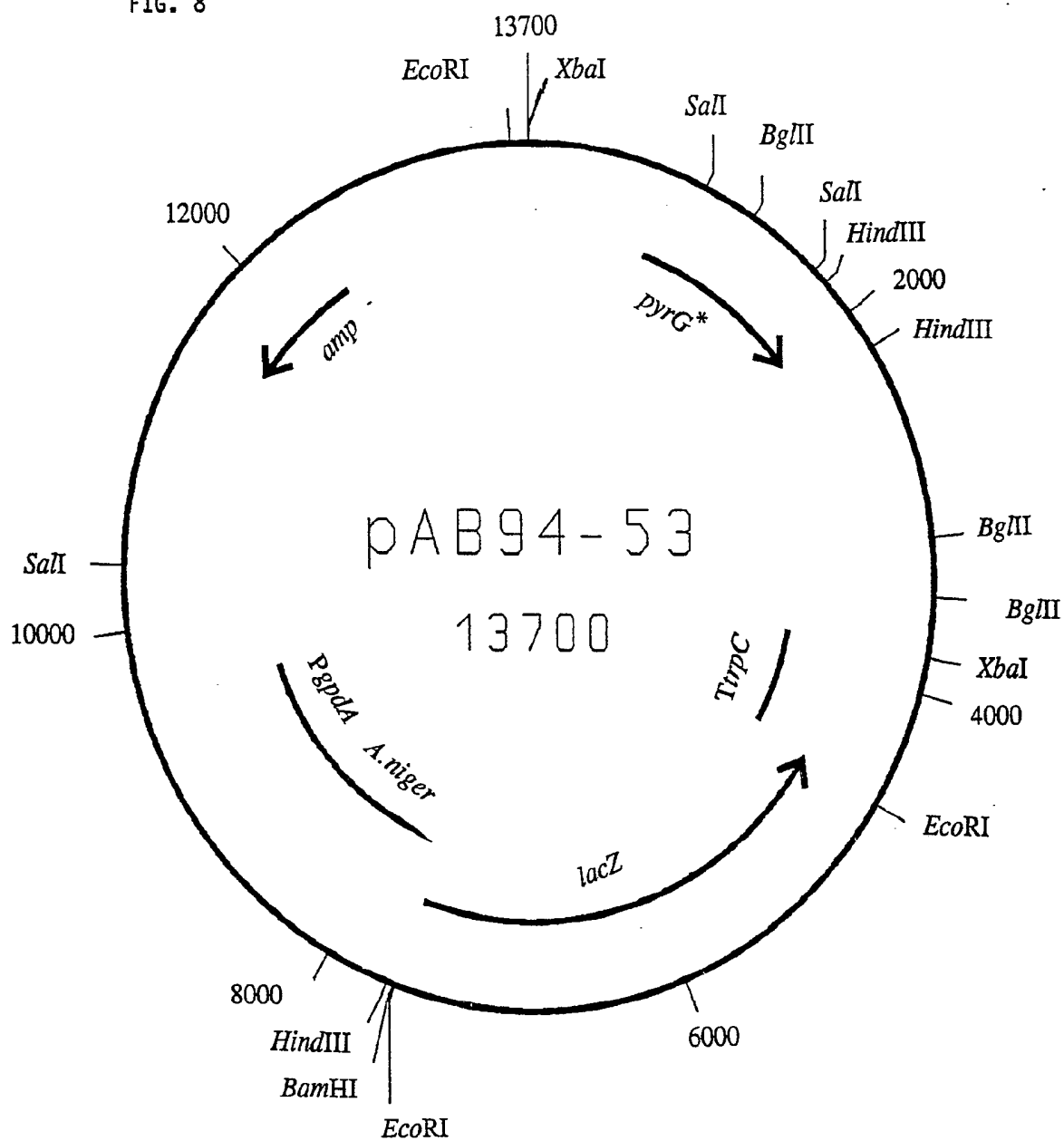
1  TAAATAAGCC TGCACTTCAA CTCAAAAAAA ATCTTCAGTA TATTCATCTT
    " ^ "
51  GCCATCCAAG AACCTTTATT TCCCTAAGT AACTACTTTG CTACATCCAT
101 ACTCCATCCT TCCCATCCCT TATTCCTTTG AACCTTTCAG TTCGAGCTTT
151 CCCACCTTCAT GGCAGCTTGA CTAACAGCTA CCGCGCTTGA GCAGACATCA
201 CCATGgatcc tgcgacgaa ttcggatccg tcgacctgca gccaaagcttg
251  gcactggccg tcgtttttaca acgtcgtgac tgg

```

^: (vermoedelijke) transcriptiestart

ATG: translatie startcodonXXX: sequentie afkomstig van het *A. nidulans* *gpdA* gen

FIG. 8



V. VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR		
° Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding, voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde tekstgedeelten of tekeningen.	Van belang voor conclusie(s) Nr.
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS deel 223, 1990, BERLIN bladzijden 192 - 197; R. VAN GORCOM ET AL: 'Isolation and molecular characterization of the benzoate-para-hydroxylase gene (bphA) of <i>Aspergillus niger</i> : A member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily' in de aanvraag genoemd zie het gehele document ---	1,8
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. deel 16, nr. 18, 1988, ARLINGTON, VIRGINIA US bladzijde 9052; R. VAN GORCOM AND C. VAN DEN HONDEL: 'Expression analysis vectors for <i>Aspergillus niger</i> ' in de aanvraag genoemd zie het gehele document ---	1-13
A	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. deel 7, nr. 10, Oktober 1989, CAMBRIDGE GB bladzijden 283 - 287; G. SAUNDERS ET AL: 'Heterologous gene expression in filamentous fungi' zie bladzijde 283, midden kolom, laatste alinea - rechter kolom, alinea 2 ---	1-13
A	EP,A,0 439 997 (CIBA-GEIGY AG) 7 Augustus 1991 zie het gehele document ---	1-13
° Speciale categorieën van vermelde literatuur : A : literatuur die de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang E : eerdere literatuur, maar gepubliceerd op de datum van indiening of na deze datum L : literatuur die het invoeren van een voorrang in twijfel kan trekken of vermeldt om de publicatiedatum van een andere vermelding te bepalen of om een speciale reden (zoals aangegeven) O : literatuur die betrekking heeft op een mondelinge bekendmaking, een gebruik, een tentoonstelling of elk ander middel P : literatuur gepubliceerd voor de indieningsdatum, maar na de ingeroepen voorrangsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur vermeld ter verduidelijking van het principe of een theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt X : literatuur op zichzelf van bijzonder belang : de geclaimde uitvinding is niet nieuw of mist uitvinderswerkzaamheid Y : literatuur van bijzonder belang : de geclaimde uitvinding mist uitvinderswerkzaamheid wanneer de literatuur in samenhang gelezen wordt met andere literatuur van de categorie Y. Immers, dergelijke combinatie is voorbehandelend voor een man van het vak & : literatuur die deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie		
VI. VERKLARING		
Datum waarop het onderzoek van het internationale type werd voltooid 1 10 JUNI 1992		Verzenddatum van het verslag van het onderzoek van het internationale type 1
Administratie belast met het internationaal onderzoek		Handtekening van de bevoegde ambtenaar VAN DER SCHAAL C.A.

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN

Verslag betreffende het onderzoek van het internationale type
opgesteld krachtens artikel 21 § 9 van de Belgische wet op de
uitvindingsoctrooien van 28 maart 1984

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE	
		7071 BE	
Belgische nationale aanvraag nr. 9100903		Datum van indiening 1 oktober 1991	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam) DSM N.V.			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 12 mei 1992		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 19878 BE	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale octrooi classificatie (CIB) of terzelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB Int.Cl. ⁵ C 12 N 15/80, C 12 N 1/15, C 12 P 21/02			
II. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimum documentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
Int.Cl. ⁵	C 12 N		
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III. ☐ MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK (Opmerkingen op aanvullingsblad)			
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK (Opmerkingen op aanvullingsblad)			

BE 9100903
SN 19878

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per 10/06/92. De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door de Octrooiraad gegarandeerd. De gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

EPO FORM P-040

Algemene informatie over dit aanhangsel is gepubliceerd in de 'Official Journal' van het Europees Octrooibureau nr 12/82 ev

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN

Verslag betreffende het onderzoek van het internationale type
opgesteld krachtens artikel 21 § 9 van de Belgische wet op de
uitvindingsoctrooien van 28 maart 1984

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE 7071 BE	
Belgische nationale aanvraag nr. 9100903		Datum van indiening 1 oktober 1991	
		Ingeroepen voorrangsdatum	
Aanvrager (Naam) DSM N.V.			
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 12 mei 1992		Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 19878 BE	
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)			
Volgens de internationale octrooiclassificatie (CIB) of terzelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB Int.Cl. ⁵ C 12 N 15/80, C 12 N 1/15, C 12 P 21/02			
II. ONDERZOChte GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK			
Onderzochte minimum documentatie			
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen		
Int.Cl. ⁵	C 12 N		
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen			
III. ☐ MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK (Opmerkingen op aanvullingsblad)			
IV. ☐ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK (Opmerkingen op aanvullingsblad)			

BE 9100903
SN 19878

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per de juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door de Octrooiraad gegarandeerd. De gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP-A-0439997	07-08-91	AU-A- 6846090	01-08-91
