

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

91887

2 (45) Patentti myönnetty
(51) Kv.1k.5-Bat.1k.105-Edelrat 25 08 1994

C 12N 15/76, 1/21 // (C 12N 1/21, C 12R 1:465)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	864071
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	08.10.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	08.10.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	11.04.87
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.05.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
10.10.85 DE 3536182 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Hoechst Aktiengesellschaft, 6230 Frankfurt am Main 80, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Koller, Klaus-Peter, Carl-Orff-Weg 12, 6232 Bad Soden am Taunus, BRD, (DE)
2. Riess, Günther Johannes, Loreleistrasse 59, 6230 Frankfurt am Main 80, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Promootorijärjestelmä streptomykeettavektoreita varten
Promotorsystem för streptomycetvektorer

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 3331860 (C 12N 15/00) Hoechst Aktiengesellschaft, EP A 105521 (C 12N 15/00) Takeda Chemical Industries Ltd., EP A 152830 (C 12N 15/00) The Green Cross Corp., EP A 187630 (C 12N 15/00) Smithkline Beckman Corp.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee kahden streptomykeetoissa aktiivisen promootorin järjestämistä oikeaan lukukehykseen, jolloin niihin liittyvä rakennegeeni ilmentyy vahvistetusti streptomykeetoissa. Keksintö koskee edelleen tämän promootorijärjestelmän sisältävää streptomykeetoissa aktiivista vektoria sekä sen käyttöä proteiinien tuottamiseen.

Uppfinningen avser ordnandet av två i streptomyceter aktiva promotorer i korrekt läsram, varigenom den tillhöriga strukturgenen exprimeras förstärkt i streptomyceter. Uppfinningen avser vidare en i detta promotorsystem ingående och i streptomyceter aktiv vektor samt användningen av denna vid produktionen av proteiner.

Promoottorijärjestelmä streptomykeettavektoreita varten

Keksintö koskee promoottorijärjestelmää, jossa promoottorit ovat tehokkaita streptomykeetoissa ja järjestettyinä peräkkäin tandemiin. Tällä "tandemjärjestelmällä" saavutetaan proteiiniekspression huomattava nousu. Keksintö koskee lisäksi vektoreita, jotka sisältävät tämän promoottorijärjestelmän, streptomykeettaisäntäkantoja, jotka sisältävät tällaisia vektoreita, ja niiden käyttöä proteiinien tuotantoon. Keksinnön edullisia suoritusmuotoja valaistaan tarkemmin jäljempänä tai ne määritellään patenttivaatimuksissa.

Streptomykeetoissa tehokkaiden promoottorien DNA-rakenteesta on vielä suhteellisen vähän tietoa. Nyt on havaittu, että järjestämällä kaksi streptomykeettapromoottoria tandemiin voidaan lisätä proteiiniekspressiota odottamattomissa määrin. Tällöin ei näiden kahden promoottorin tarvitse olla välittömästi peräkkäin, mihin liittyisi myös vaikeuksia tämän hetkisen vielä vähäisen näiden promoottorien DNA-rakennetta koskevan tiedon valossa. On siis riittävää, että promoottorit ovat tandemissa toisiinsa ja ilmennettävään rakennegeeniin nähden, jolloin näiden kahden promoottorin välissä voi olla lyhyempi tai pitempi DNA-segmentti. Tämän yhdistävän DNA-jakson edullinen koko on helppo määrittää yksinkertaisin esikokein, joissa voidaan käyttää esimerkiksi kemiallisesti syntetisoituja DNA-jaksoja soveltuvien kytkijöiden tai adaptorien muodossa.

Soveltuva, streptomykeetoissa tehokas promoottori voidaan ottaa talteen hybridiplasmidista pKAI 1, jota kuvataan DE-hakemusjulkaisussa 3 331 860. Tätä varten käsitellään 2,3 ke:n DNA-pala, jota valaistaan tarkemmin mainitun hakemusjulkaisun kuviossa 2, restriktioentsyymeillä SstI ja HincII, ja eristetään 650 emäsparin pituinen fragmentti. Tämä DNA-fragmentti sisältää α -amylaasi-inhibiittoria, "tendamistaattia", vastaavan rakennegeenin ja sii-

hen liittyvän promoottorin. Tämä DNA-sekvenssi sijaitsee 940 emäsparin pituisessa jaksossa, joka on entsyymien PstI ja BamHI restriktiokohtien välissä (DE-hakemusjulkaisun 3 331 860 kuvio 2).

5 Toinen promoottori, joka soveltuu keksinnön mukaiseen "tandemjärjestelmään", esiintyy kaupallisesti saatavassa plasmidissa pIJ 702 [E. Katz et al., J. Gen. Microbiol. 129 (1983) 2703 - 2714: D.A. Hopwood et al., Genetic Manipulations of Streptomyces, A Laboratory Manual, The
10 John Innes Foundation, Norwich, Englanti, 1985, s. 292]. Tätä varten pilkotaan plasmidi restriktioentsyymeillä SphI ja PstI, ja eristetään 350 emäsparin fragmentti. On myös mahdollista saattaa plasmidi reagoimaan restriktioentsyymien SphI ja BclI kanssa ja eristää 270 emäsparin DNA-
15 fragmentti. Tässä 270 emäsparin fragmentissa on mel-geenin, joka koodaa tyrosinaasiproteiinia, promoottori.

 Nämä DNA-fragmentit, jotka sisältävät mel-promoottorin, voidaan sitten - tandemissa - sijoittaa haluttuun ilmentymisvektoriin sillä tavalla, että ne sijaitsevat
20 ennen toista streptomykeetoissa tehokasta promoottoria tai tämän promoottorin ja rakennegeenin välissä.

 Keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa ei eristetä mel-promoottoria plasmidista pIJ 702, vaan sijoitetaan tähän plasmidiin rakennegeeni ja toinen promoottori - jälleen tandemissa. On tarkoituksenmukaista sijoittaa toinen promoottori ja rakennegeeni yhtenä yksikkönä
25 mel-promoottorin jälkeen eli käyttää siis esimerkiksi mainittua DNA-fragmenttia, joka sisältää tendamistaattirakennegeenin ja siihen liittyvän promoottorin. Tämä geenirakenne johtaa noin kymmenkertaiseksi kasvaneeseen α -amylasi-inhibiittorin, tendamistaatin, oikeaan ekspressioon ja erittymiseen.
30

 Käytettäessä plasmideja, joiden kopiokokumäärä solu kohden on suuri, voi proteiinien tuotanto laskea fermentoinnin kestäessä pitkään. Tällaisissa tapauksissa on
35

edullista käyttää vektoreita, joiden kopiolukumäärä on pienempi.

Vastaavasti kuin tämä vain esimerkkinä esitettävä geenirakenne voidaan myös muista streptomykeetoissa tehokkaista promootoreista muodostaa tällaisia "tandemjärjestelmiä" ja saattaa haluttu rakennegeeni ilmentymään.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavissa esimerkeissä.

Esimerkki 1

10 Plasmidin pKAI 1 DNA:sta (7 µg, DE-hakemusjulkaisu 3 331 860) eristetään elektroeluutiolla 650 emäsparin HincII-SstI-fragmentti. Tämän fragmentin sijaintia plasmidin pKAI 1 2,3 ke:n fragmentissa valaistaan kuviossa 1, jossa "SG" tarkoittaa α -amylaasi-inhibiittorirakennegeeniä. 650 emäsparin fragmentti sisältää rakennegeenin lisäksi kaikki Streptomyces lividans TK 24:ssa tapahtuvan ilmentymisen vaatimat säätelyalueet.

Kaupallinen E. coli -vektori pUC 19 [C. Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985) 103 - 119; New England Biolabs 1985/86 Catalog, s. 90/91; BRL, Bethesda Research Laboratories Catalogue & Reference Guide, 1985, s. 136/-137] pilkotaan kahdesti restriktioendonukleaaaseilla HincII ja SstI, ja ligatoidaan linearisoitu plasmidi edellä mainitun 650 emäsparin SstI-HincII-fragmentin kanssa. E. coli 20 JM 101:n transformoinnin jälkeen eristetään kloonit, jotka sisältävät yhdistelmäplasmidin, josta käytetään merkin-tää pKAI 650 ja joka sisältää rakenneosanaan 650 emäsparin fragmentin. Tämä plasmidi esitetään kuviossa 2 (ei oikeassa mittakaavassa), jossa P tarkoittaa promootorialuetta.

30 Eristetty plasmidin pKAI 650 DNA pilkotaan kahdesti restriktioendonukleaaaseilla SstI ja SphI tai SstI ja PstI, tehdään geelielektroforeesi ja elektroeluutio, ja eristetään noin 650 emäsparia sisältävä fragmentti.

Esimerkki 2

Plasmidi pIJ 702 (saatavissa John Innes Foundation'ista, Norwich, Englanti) pilkotaan restriktioendonukleaaseilla SstI ja SphI, ja eristetään 400 emäsparin SstI-SphI-fragmentti muusta vektori-DNA:sta agarosigeelielektroforeesilla. 1 µg eristettyä, puhdistettua vektori-DNA:ta ligatoidaan 0,3 µg:n kanssa pKAI 650:sta saatua 650 emäsparin SstI-SphI-fragmenttia (esimerkki 1), ja transformoidaan ligaatiotuotteella *Streptomyces lividans* TK 24 (saatavissa John Innes Foundation'ista) sinänsä tunnetulla tavalla. Haluttujen kloonien valikointi tehdään tiostreptoniresistenssin ja α-amylaasi-inhibiittorituotannon perusteella seuraavalla levykokeella:

Pesäkkeet peitetään 5 ml:lla vesiliuosta, joka sisältää 0,4 - 1,0 mg/ml pankreatiinia, ja inkuboidaan 1 tunti lämpötilassa 37 °C. Sitten liuos poistetaan ja korvataan 5 ml:lla 2-painoprosenttista tärkkelysagaria. 2 tunnin inkuboinnin (37 °C:ssa) jälkeen peitetään levyt 5 ml:lla jodi-kaliumjodidikehitysliuosta. Sinisen kehän ympäröivät pesäkkeet osoittavat, että kloonit syntetisoivat ja erittävät tendamistaattia.

Yhdistelmäplasmidi pAX 650, joka saa aikaan α-amylaasi-inhibiittorin, tendamistaatin, synteesin, esitetään kuviossa 3 (ei oikeassa mittakaavassa). P' tarkoittaa tässä pIJ 702:sta peräisin olevan mel-geenin promoottorialuetta.

Esimerkki 3 (vertailuesimerkki)

Menetellään muuten esimerkin 2 mukaisesti, mutta poistetaan plasmidista pIJ 702 650 emäsparin PstI-SstI -fragmentti ja ligatoidaan loppuosa plasmidista pKAI 650:sta saadun noin 650 emäsparin pituisen SstI-PstI-fragmentin kanssa. Siten saatu yhdistelmäplasmidi pAX 651 antaa α-amylaasi-inhibiittotestissä noin 10 kertaa pienemmän arvon kuin plasmidi pAX 650 (esimerkki 2).

Esimerkki 4

"Heilurivektori" pSW1 (EP-hakemusjulkaisu
0 158 201, kuva 26) pilkotaan osittain restriktioentsyymillä BclI, ja eristetään noin 1,6 ke:n pituinen lineaarinen fragmentti 0,4-%:isella agarosigeelillä tehdyn elektroforeesin jälkeen. Eristetty DNA-fragmentti uutetaan puskuroidulla fenoliliuoksella ja saostetaan etanolilla.

Siten puhdistetut DNA-fragmentit ligatoidaan pAX 650:sta saadun 1,81 ke:n BclI-fragmentin kanssa, joka sisältää täydellisen α -amylaasin-inhibiittorigeenin. Ligatiosella transformoidaan *S. lividans* TK 24. Tiostreptoniresistentit yhdistelmäkloonit tuottavat ja erittävät α -amylaasi-inhibiittoria, tendamistaattia, myös pitkien fermentointien kuluessa vakiosaannolla.

Patenttivaatimukset

1. Streptomykeetoissa aktiivinen promoottorijärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että streptomykeetoissa
5 aktiivinen promoottori sijaitsee tandemissa toisen streptomykeetoissa aktiivisen promoottorin jäljessä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen promoottorijärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että toinen näistä kahdesta promoottorista on peräisin 350 emäsparin pituisesta
10 plasmidin pIJ 702 PstI-SphI-fragmentista.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen promoottorijärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että toinen näistä kahdesta promoottorista on peräisin 270 emäsparin pituisesta plasmidin pIJ 702 BclI-SphI-fragmentista.

15 4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen promoottorijärjestelmä, t u n n e t t u siitä, että toinen promoottoreista on peräisin 650 emäsparin HincII-SstI-fragmentista, joka sijaitsee 0,94 ke:n Pst-BamHI-fragmentissa plasmidissa pKAI 1.

20 5. Streptomykeetoissa aktiivinen vektori, t u n - n e t t u siitä, että se sisältää yhden tai useamman edeltävän patenttivaatimuksen mukaisen promoottorijärjestelmän.

25 6. Streptomyces-sukuun kuuluva isäntäsolu, t u n - n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 5 mukaisen vektorin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on lajia *S. lividans*.

30 8. Menetelmä proteiinin valmistamiseksi, t u n - n e t t u siitä, että Streptomyces-suvun isäntäsolussa saatetaan ilmentymään vektori, joka sisältää tandemissa yhden tai useamman patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen promoottorijärjestelmän.

35 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on lajia *S. lividans*.

Patentkrav

1. I streptomyceter aktivt promotorsystem, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att en i streptomyceter aktiv
5 promotor är anordnad i tandem bakom en ytterligare i
streptomyceter aktiv promotor.

2. Promotorsystem enligt patentkravet 1, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att en av de båda promotorerna
härstammar från det 350 baspar långa PstI-SphI-fragmentet
10 i plasmiden pIJ 702.

3. Promotorsystem enligt patentkravet 2, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att en av de båda promotorerna
härstammar från det 270 baspar långa BclI-SphI-fragmentet
i plasmiden pIJ 702.

15 4. Promotorsystem enligt patentkravet 1, 2 eller 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att en av promotorerna
härstammar från det 650 baspar långa HincII-SstI-fragmen-
tet, som ligger inom det 0,94 kb stora PstI-BamHI-fragmen-
tet i plasmiden pKAI 1.

20 5. I streptomyceter aktiv vektor, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den innehåller ett promotorsys-
tem enligt ett eller flera av de föregående patentkraven.

6. Vårdcell tillhörande släktet Streptomyces,
k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller en vek-
25 tor enligt patentkravet 5.

7. Vårdcell enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den är av arten S. lividans.

8. Förfarande för framställning av ett protein,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man i en vårdcell av
30 släktet Streptomyces bringar en vektor innehållande ett
promotorsystem enligt något av patentkraven 1 - 4 till
expression.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att vårdcellen är av arten S. livi-
35 dans.

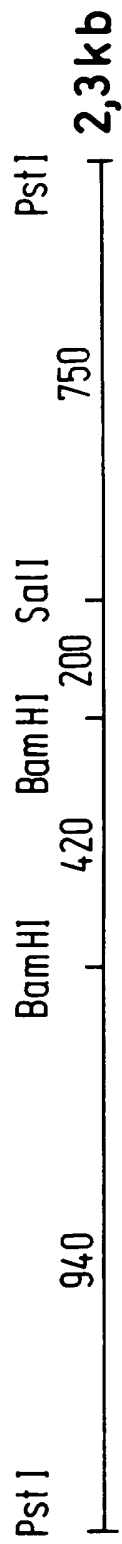


FIG.1

0,65 kb

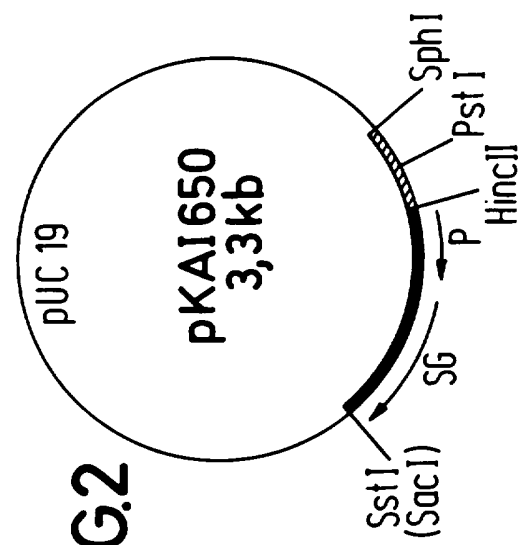
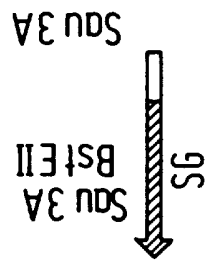


FIG.2

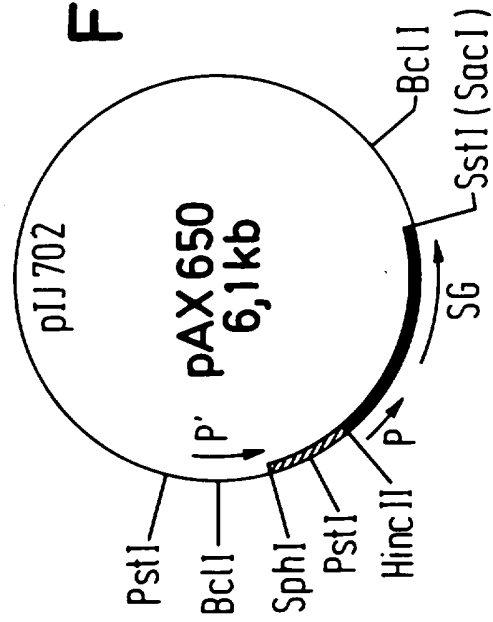


FIG.3