



(12) PATENTANSØGNING

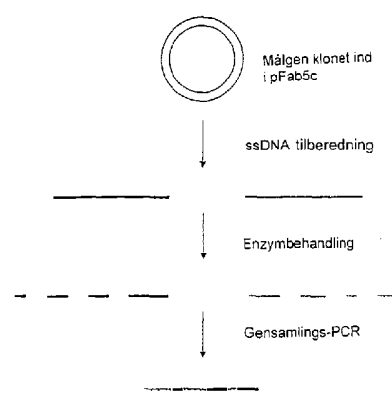
Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁷: C 12 N 15/10
- (21) Patentansøgning nr: PA 2003 00821
- (22) Indleveringsdag: 2003-06-03
- (24) Løbedag: 2001-12-12
- (41) Alm. tilgængelig: 2003-08-12
- (86) International ansøgning nr: PCT/EP01/14744
- (86) International indleveringsdag: 2001-12-12
- (85) Videreførelsesdag: 2003-06-03
- (30) Prioritet: 2000-12-12 GB 0030252.1 2000-12-12 US 09/734.801
- (71) Ansøger: Alligator Bioscience AB, Scheelevägen 19a, S-223 70 Lund, Sverige
- (72) Opfinder: Roland Carlsson, Stenaldersvägen 99, S-226 54 Lund, Sverige
Christina Furebring, Iliongrand 147, SE-224 72 Lund, Sverige
Ann-Christin Malmberg Hager, Jonkopingsgatan 83, S-252 50 Helsingborg, Sverige
Carl Borrebaeck, Attevägen 8 A, S-245 62 Hjarup, Sverige
- (74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

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

- (57) Sammen drag:
Opfindelsen angår en fremgangsmåde til frembringelse af en polynucleotidsekvens eller en population af sekvenser ud fra enkeltstrengede moderpolynucleotidsekvenser, der koder én eller flere proteinmotiver, hvilken fremgangsmåde omfatter trinnene, hvor man a) tilvejebringer enkeltstrenget DNA bestående af plus- og minusstrengene af moderpolynucleotidsekvenser; b) nedbryder de enkeltstrengede polynucleotidsekvenser med en exonuclease for at frembringe populationer med enkeltstrengede fragmenter; c) bringer de fragmenter, der er frembragt ud fra plusstrengene, i berøring med de fragmenter, der er frembragt ud fra minusstrengene, og tilsætter eventuelt primersekvenser, som annealer til 3'- og 5'-enderne af i det mindste ét af moderpolynucleotiderne under annealingsbetingelser; d) mangfoldiggør de fragmenter, som annealer til hinanden, for at frembringe i det mindste én polynucleotidsekvens, der koder én eller flere proteinmotiver, som har ændrede karakteristika sammenlignet med én eller flere af de proteinmotiver, der er kodet af moderpolynucleotiderne. Exonucleasen er fortrinsvis BAL 31.

FIGUR 1



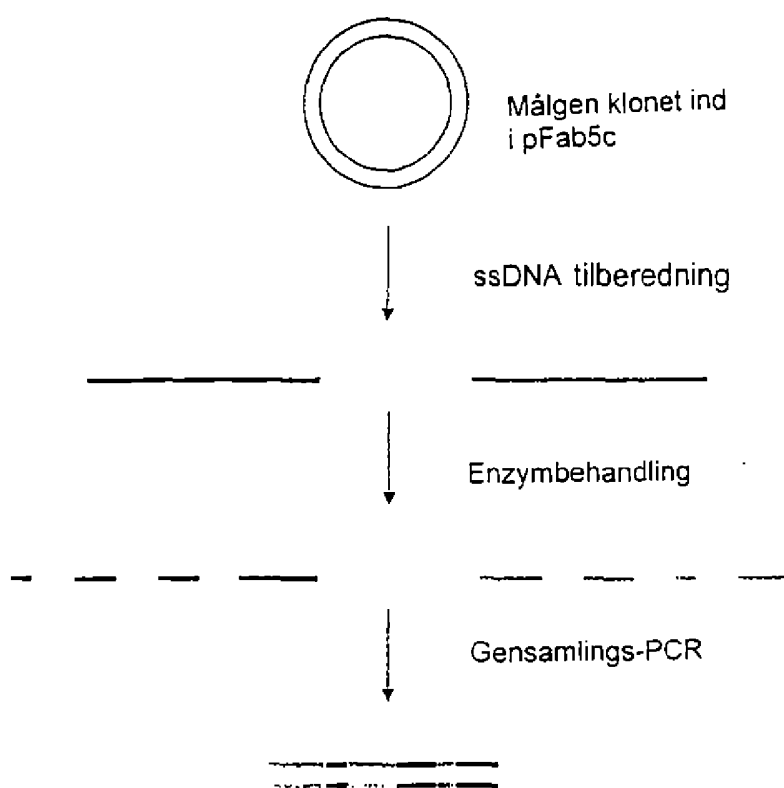
PATENTKRAV:

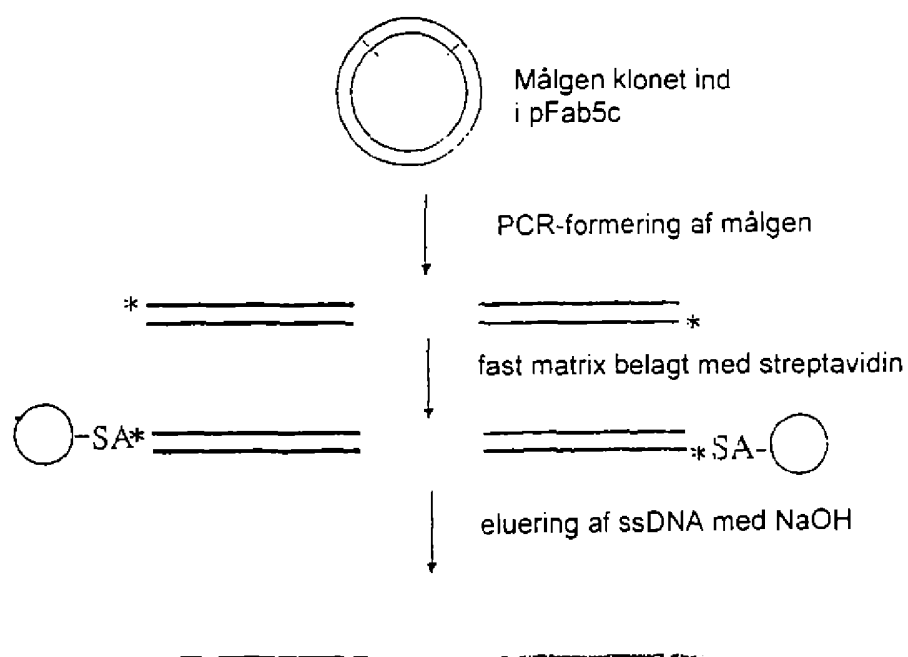
1. Fremgangsmåde til frembringelse af en polynucleotidsekvens eller en population af
sekvenser ud fra enkeltstrengede moderpolynucleotidsekvenser, der koder én eller fle-
5 re proteinmotiver, hvilken fremgangsmåde omfatter trinnene, hvor man
 - a) tilvejebringer enkeltstrengt DNA, som består af plus- og minusstreng af
moderpolynucleotidsekvenser;
 - 10 b) nedbryder de enkeltstrengede polynucleotidsekvenser med en exonuclease
for at frembringe populationer med enkeltstrengede fragmenter;
 - c) bringer de fragmenter, der er frembragt ud fra plusstrengene, i berøring med
fragmenter, der er frembragt ud fra minusstrengene, og tilsætter eventuelt pri-
15 mersekvenser, som annealer til 3'- og 5'-enderne af i det mindste ét af moder-
polynucleotiderne under annealingsbetingelser;
 - d) mangfoldiggør de fragmenter, som annealer til hinanden, for at frembringe i
det mindste én polynucleotidsekvens, der koder én eller flere proteinmotiver,
20 som har ændrede karakteristika sammenlignet med én eller flere proteinmo-
tiver, der er kodet af moderpolynucleotiderne.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvor exonucleasen vælges fra gruppen bestående af
BAL31, exonuclease I, exonuclease V, exonuclease VII, exonuclease T7 gen 6, bak-
25 teriofag lambda-exonuclease og exonuclease Rec J.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, hvor exonucleasen er BAL31.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 2 eller 3, hvorved en eller flere moderpolynucleo-
30 tidsekvenser er blevet underkastet en mutagenese.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved populationen af fragmenter frembragt i trin
b) underkastes mutagenese.
- 35 6. Fremgangsmåde ifølge krav 4 eller 5, hvorved mutagenesen er en fejltilbøjelig PCR.

7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 6, hvorved trin b) udføres for at frembringe en population af enkeltstrengede fragmenter med varierende længder.
- 5 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, hvorved trin b) reguleres for at frembringe en population af enkeltstrengede fragmenter med en gennemsnitlig længde på mere end omkring 50 nucleotider.
9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 8 og som yderligere omfatter det trin, hvor man udtrykker i det mindste en polynucleotidsekvens, der er frembragt i trin d), for at frembringe det kodede polypeptid.
- 10 10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, hvilken fremgangsmåde yderligere omfatter det trin, hvor man tester det kodede polypeptid for ønskede karakteristika.
- 15 11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 10, hvorved moderpolynucleotidsekvensen koder et antistof eller et fragment deraf.
12. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 10, hvorved moderpolynucleotidsekvensen koder et enzym.
- 20 13. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 10, hvorved moderpolynucleotidsekvensen poder et antigen.
- 25 14. Fremgangsmåde til fremstilling af en farmaceutisk sammensætning, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man efter identifikationen af et polynucleotid og/eller et kodet polypeptid med ønskede karakteristika ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 13 tilsætter polynucleotidet og/eller det kodede polypeptid til en farmaceutisk acceptabel bærer.
- 30 15. Fremgangsmåde som omfatter, at man efter identifikation af et polynucleotid og/eller et kodet polypeptid med ønskede karakteristika ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 13, anvender dette polynucleotid og/eller dette kodede polypeptid helt eller delvis inden for lægevidenskaben.

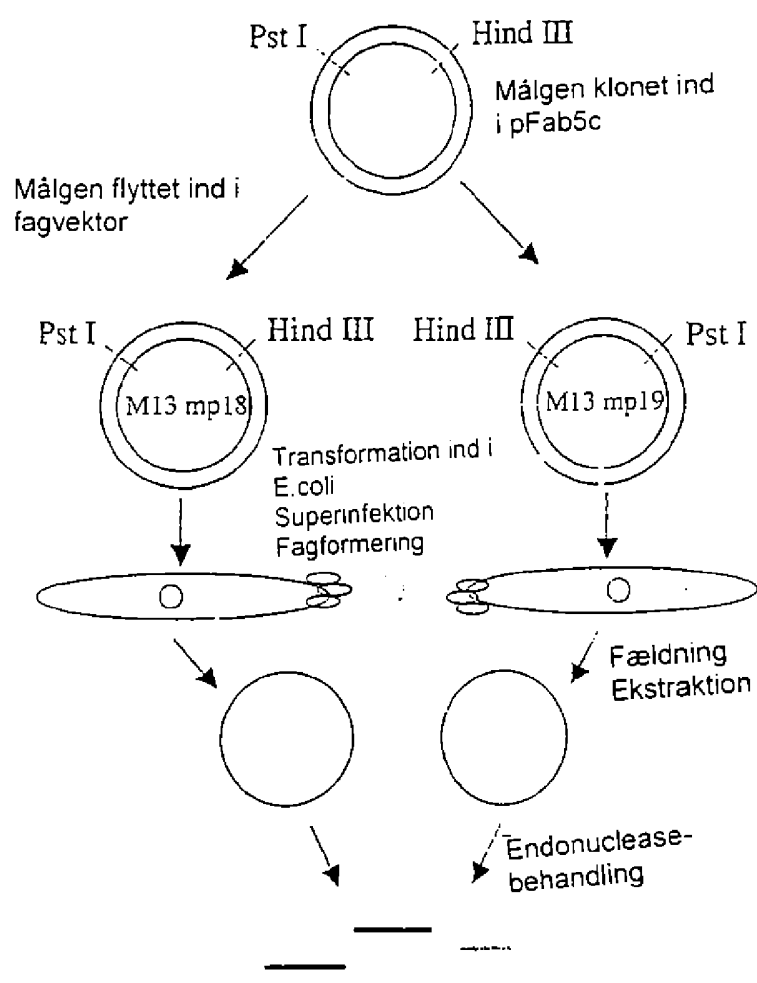
16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, hvorved anvendelsen inden for lægevidenskaben sker i behandlingen, terapien og/eller diagnosen af en sygdom.

17. Fremgangsmåde som omfatter, at man efter identifikation af et polynucleotid med
5 ønskede karakteristika ved en fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 13, anvender dette polynucleotid i detektionen og/eller formeringen af et målpoly-nucleotid i en prøve.

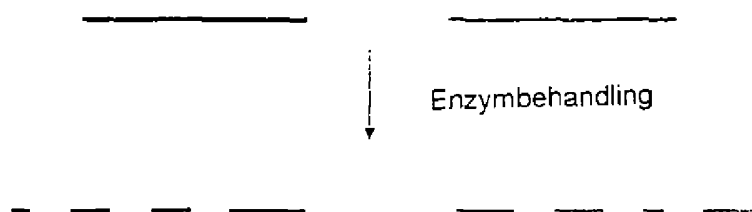
FIGUR 1

FIGUR 2

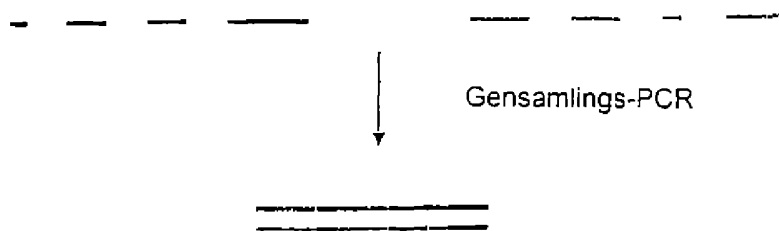
FIGUR 3



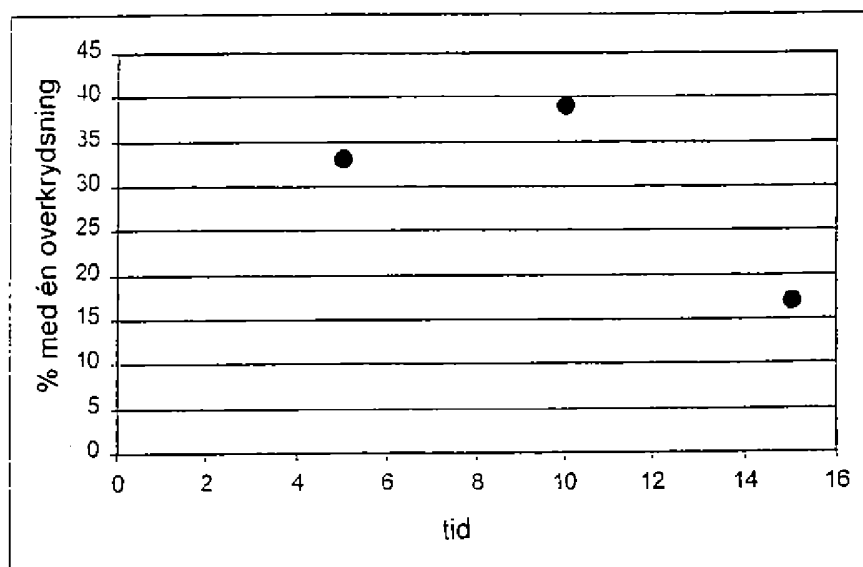
FIGUR 4



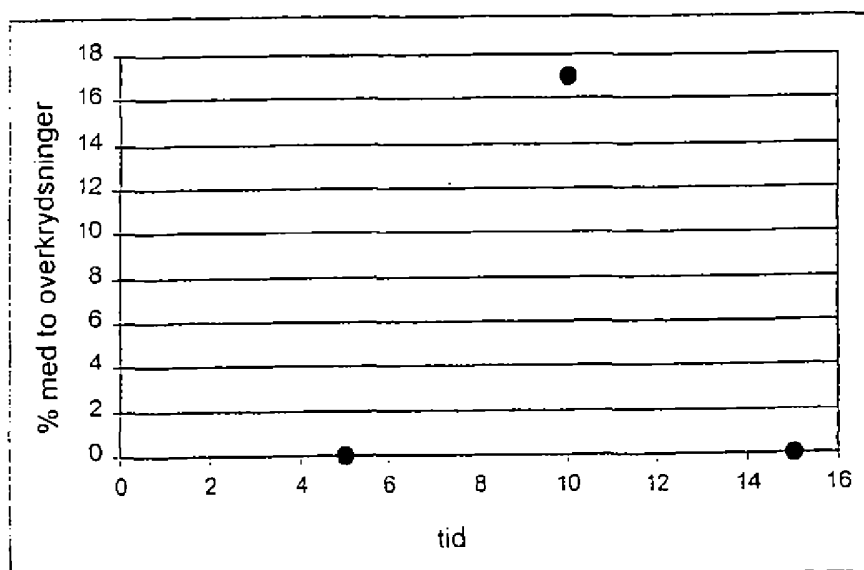
FIGUR 5



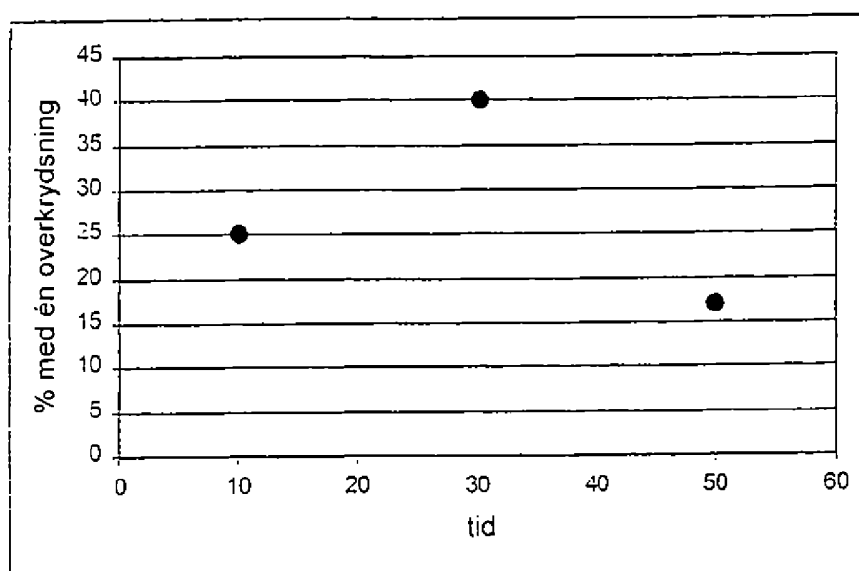
FIGUR 6



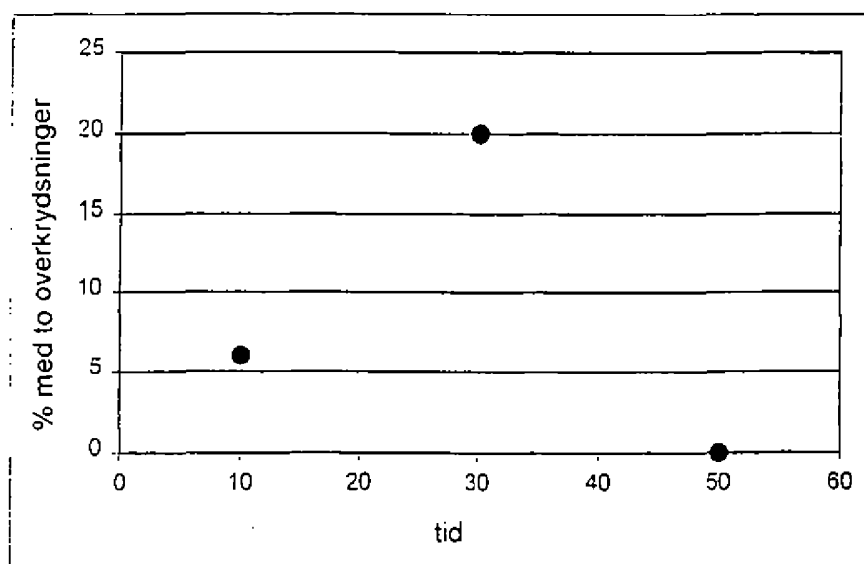
FIGUR 7



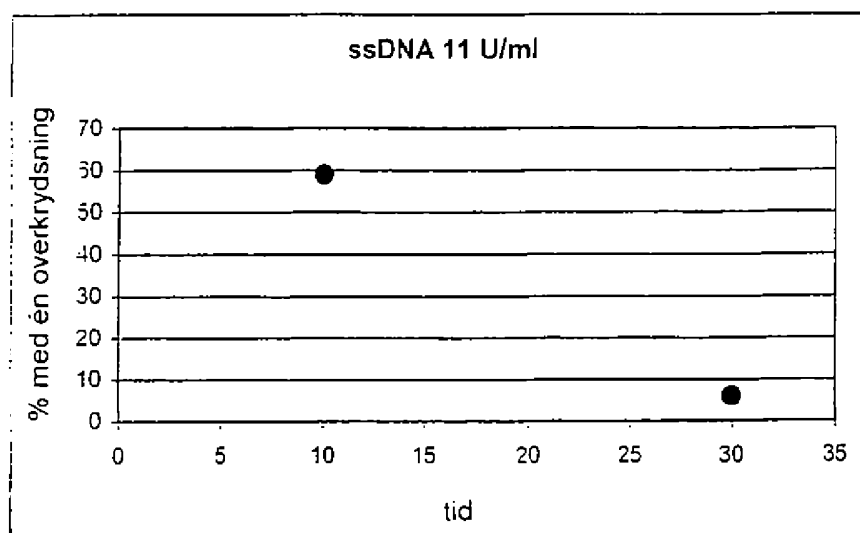
FIGUR 8



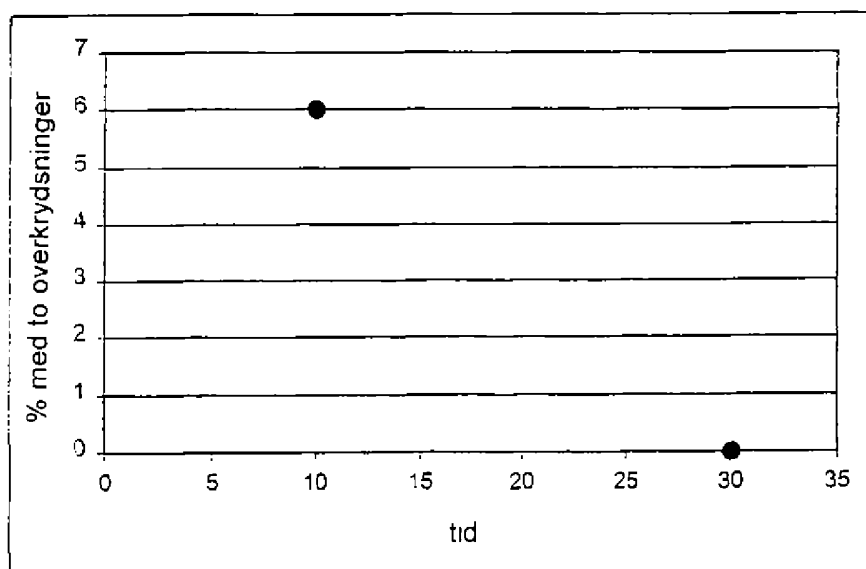
FIGUR 9



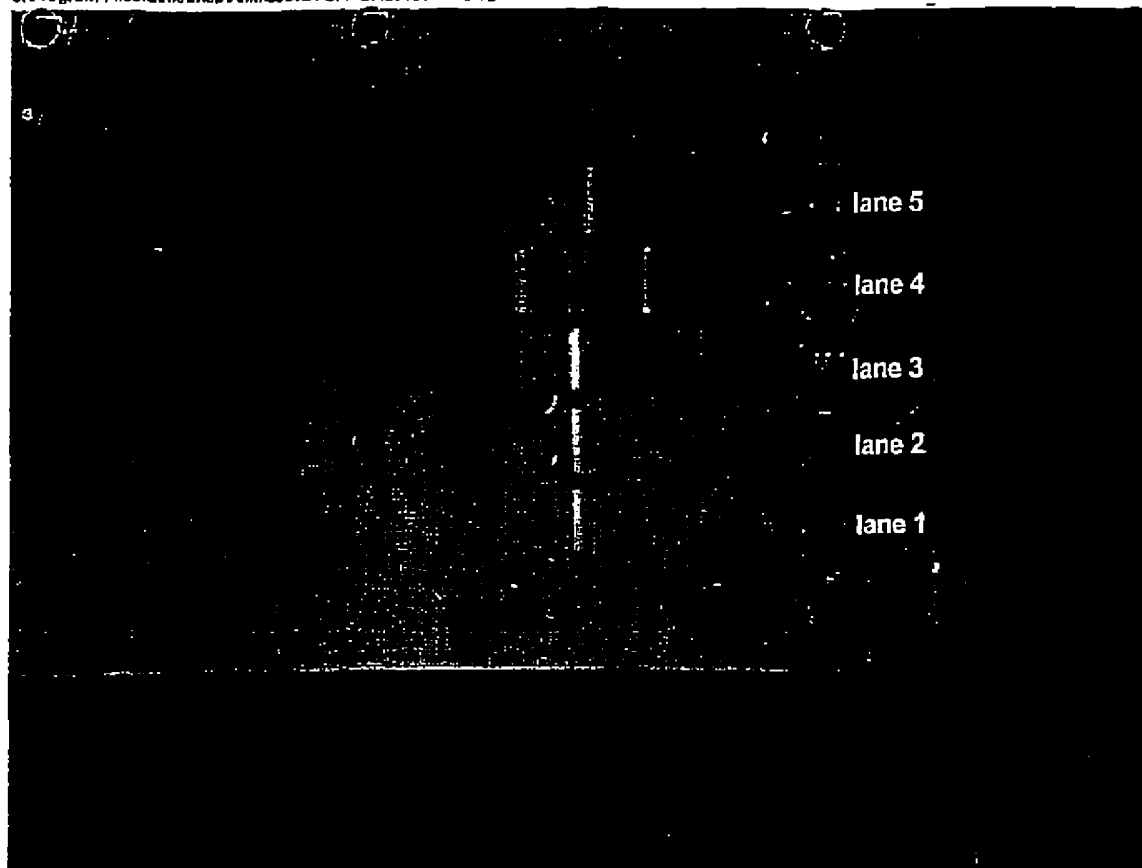
FIGUR 10



FIGUR 11



C:\Program Files\GeneSnap\AnkilssDNA GFP BAL010626KB.sgd

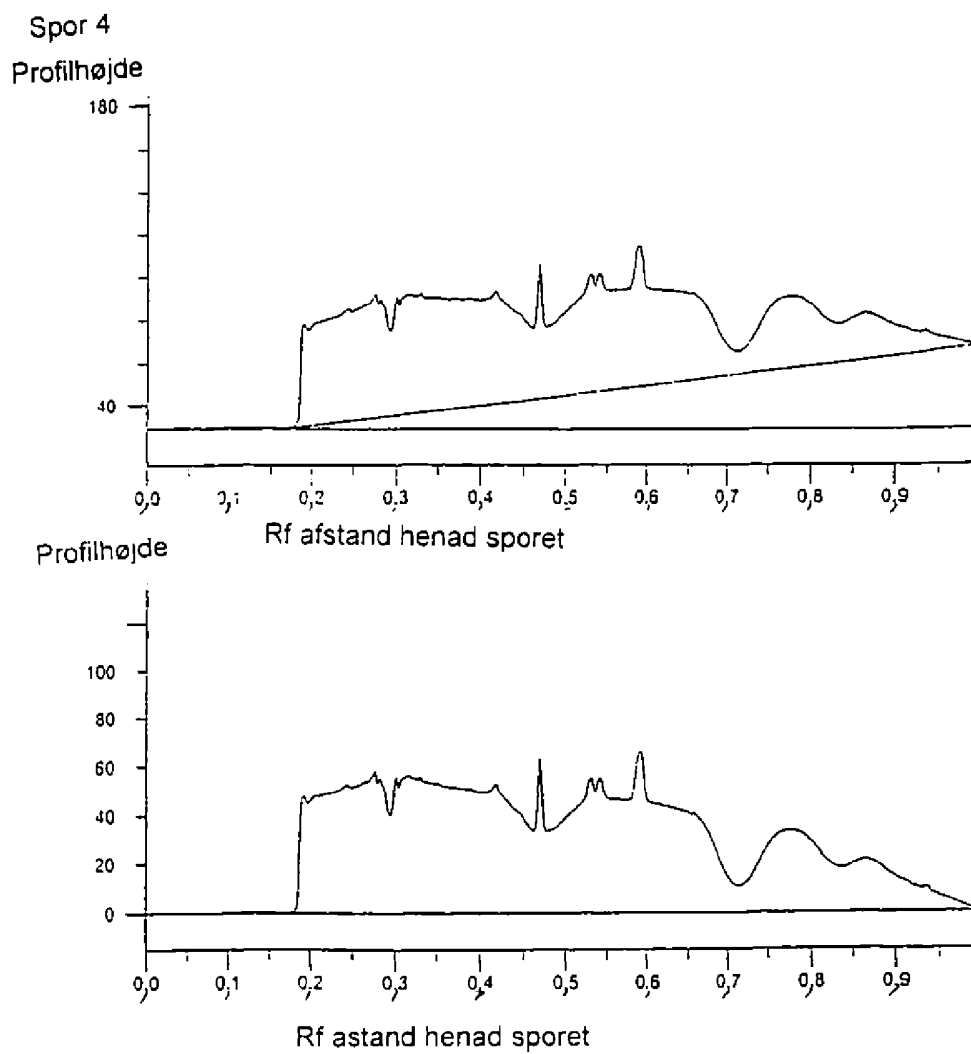


1000221298 - 008 Mats 12/03/01 01:31:58 PM B=0.00 C=1.21 G=1.00

(lane = bane)

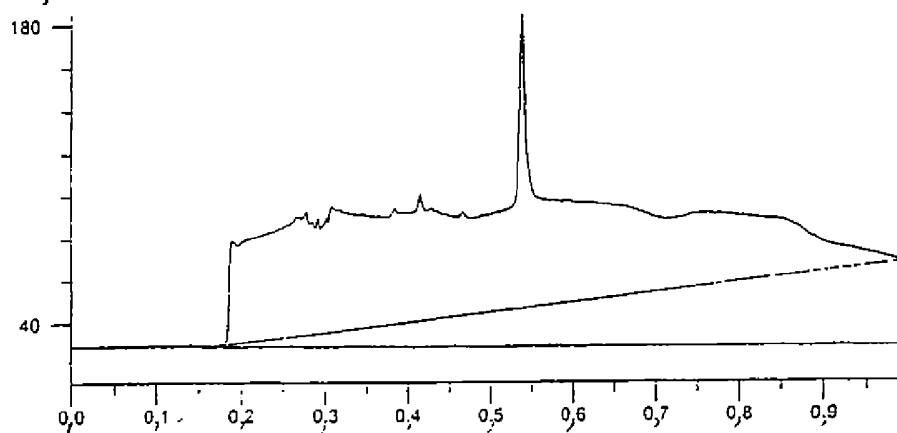
FIGUR 12

FIGUR 13



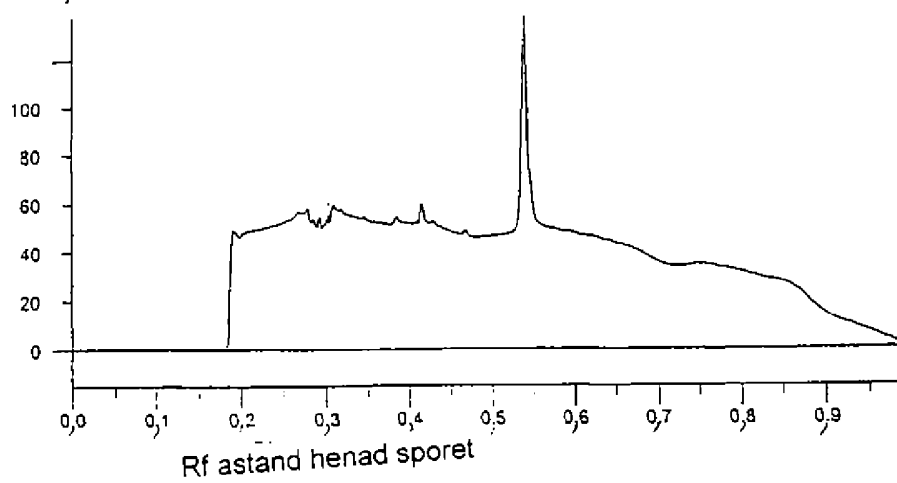
FIGUR 14

Spor 3
Profilhøjde



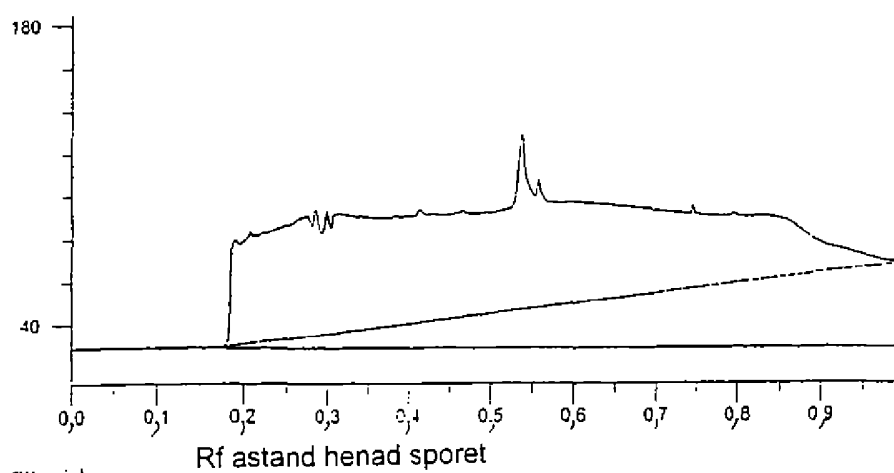
Profilhøjde

Rf afstand henad sporet

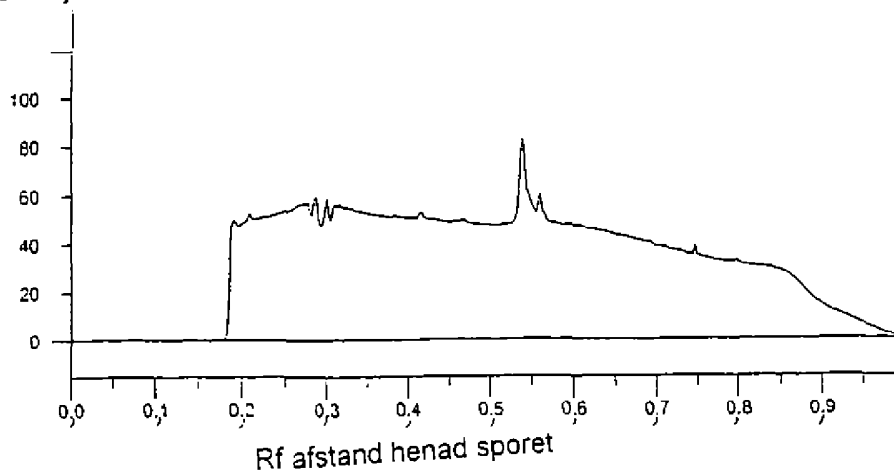


FIGUR 15

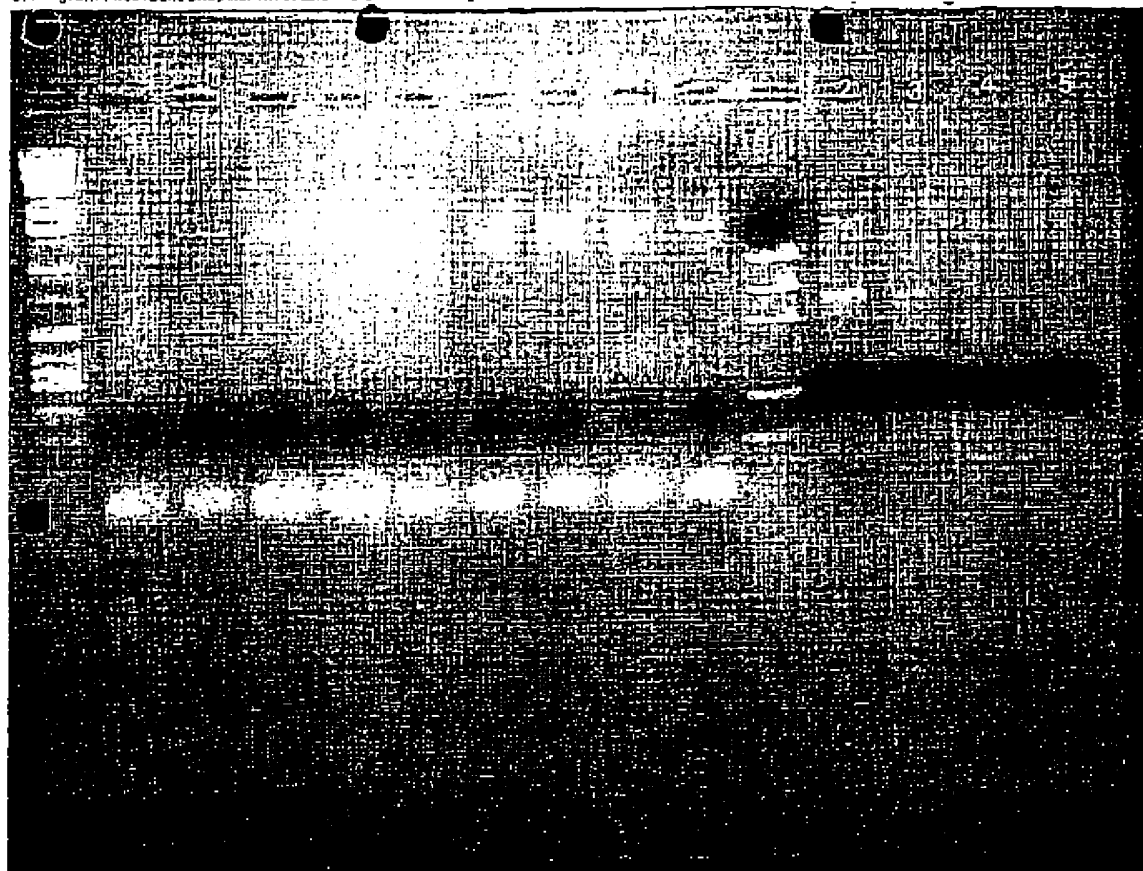
Spor 2
Profilhøjde



Profilhøjde



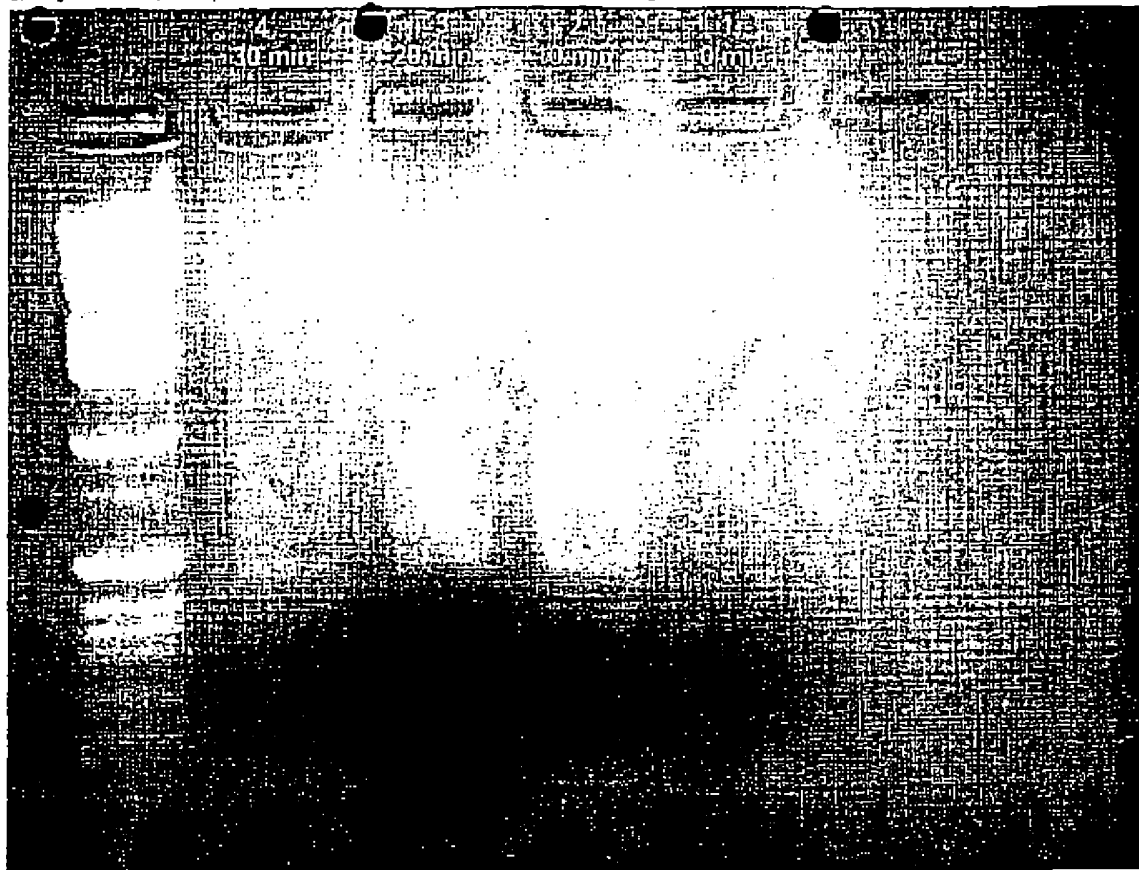
C:\Program Files\GeneSnap\kariniTet\ExpVII\stop1 011123.sgd



1006524342 Mats 11/23/01 02:05:42 PM B=0.00 C=1.00 G=1.00 I=0.100s

FIGUR 16

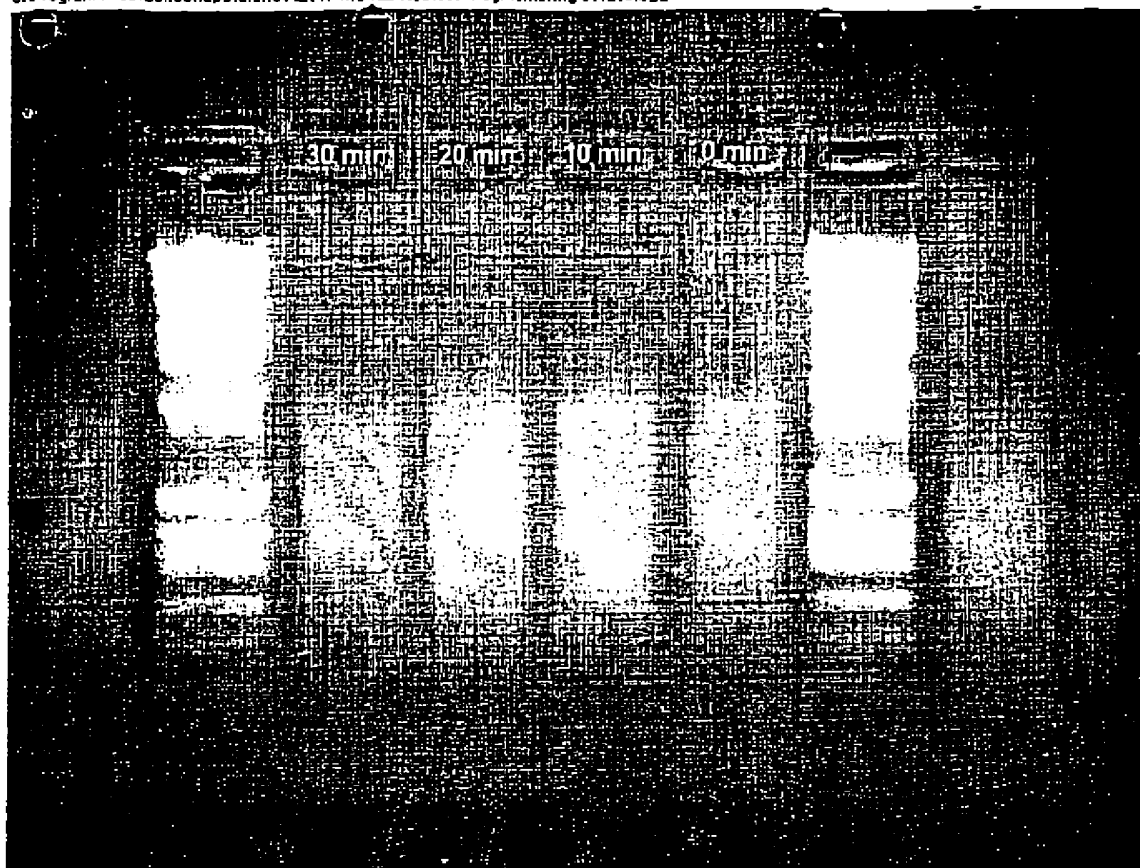
C:\Program Files\GeneSnap\Helena\AE11F\MC152 etc\RecJf fragmentering 011204.sgd



1007466523 Mats 12/04/01 11:48:48 AM B=0.00 C=1.00 G=1.00 I=0.12Gs

FIGUR 17

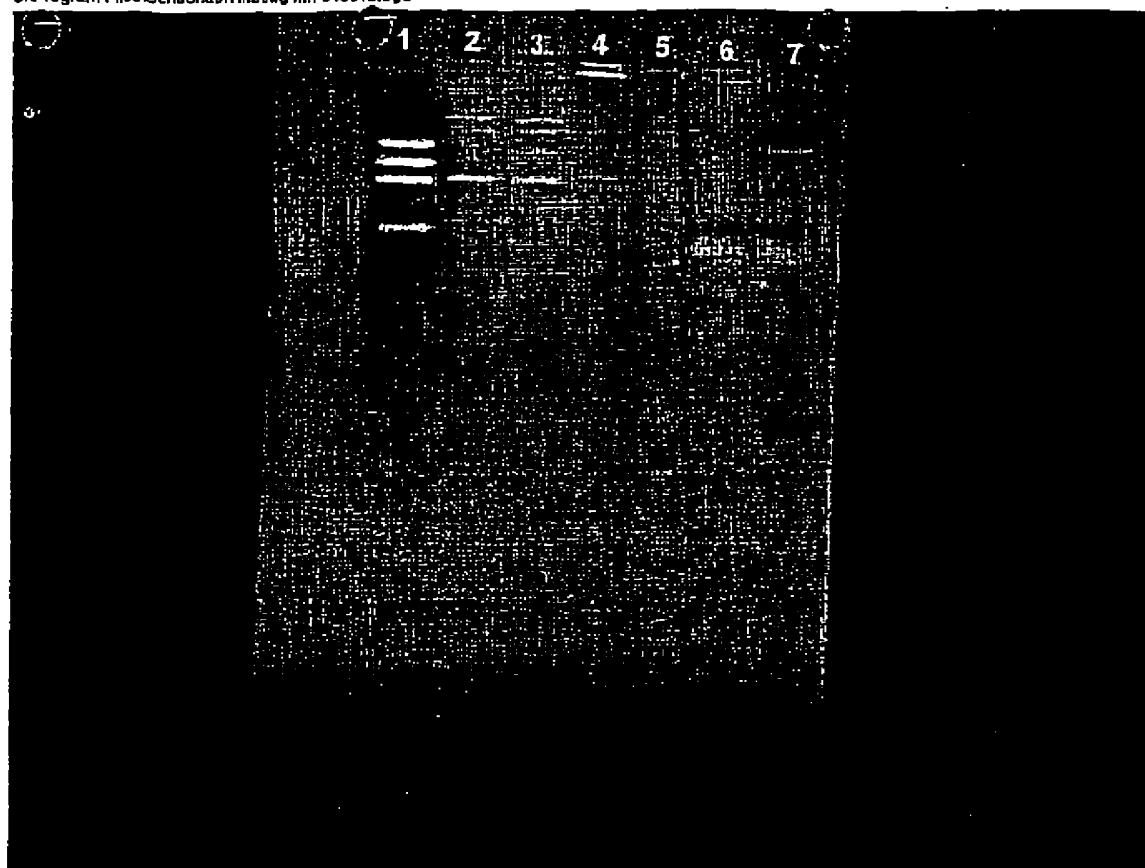
C:\Program Files\GeneSnap\GeneSnap11F.M0132 etc\RecJf fragmenting 011205.sdd



1007543454 Mats 12/05/01 09:10:54 AM B=0.00 C=1.00 G=1.00 I=0.120s

FIGUR 18

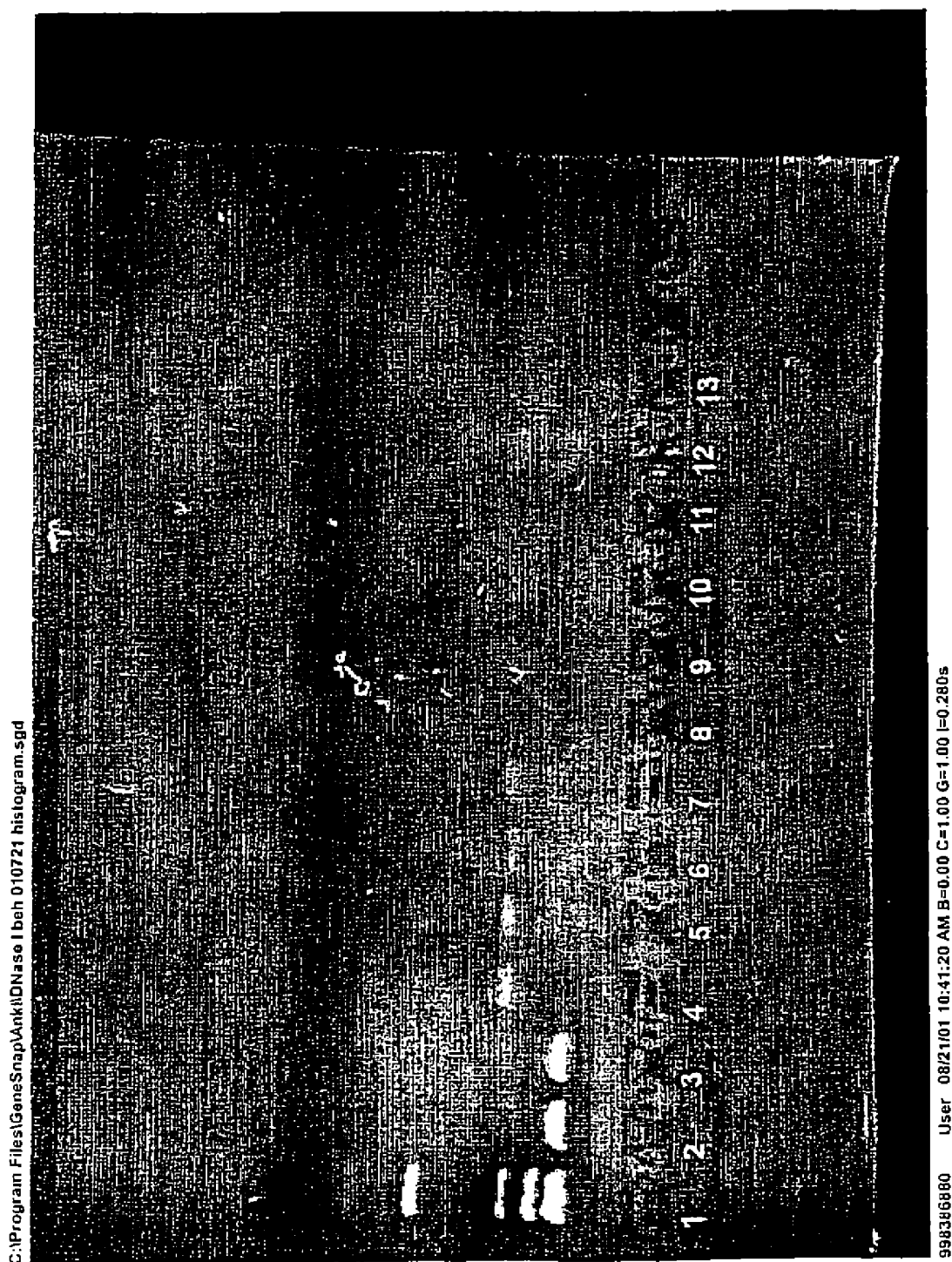
C:\Program Files\GeneSnap\Tina\Mg Mn 010912.sgd



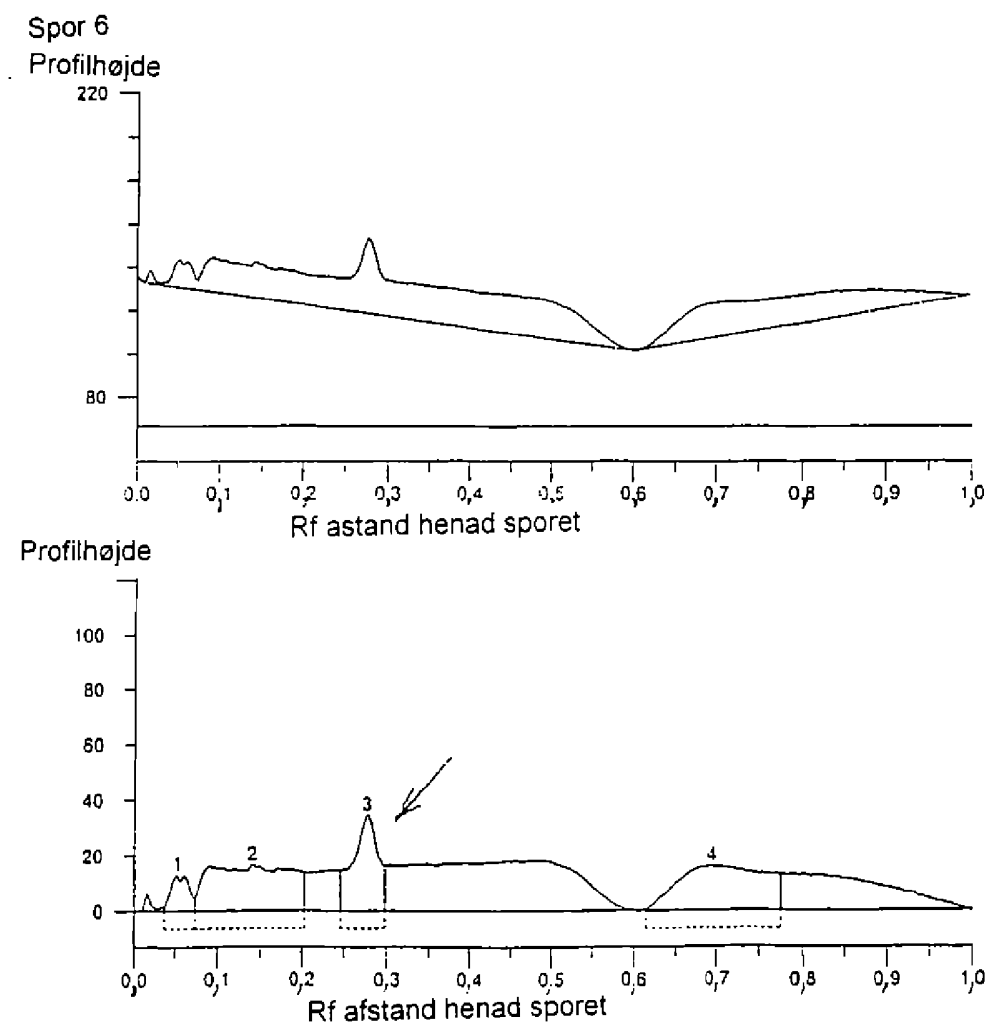
1000298690 User 09/12/01 01:44:50 PM B=0.00 C=1.00 G=1.00 I=1.360s

FIGUR 19

FIGUR 20



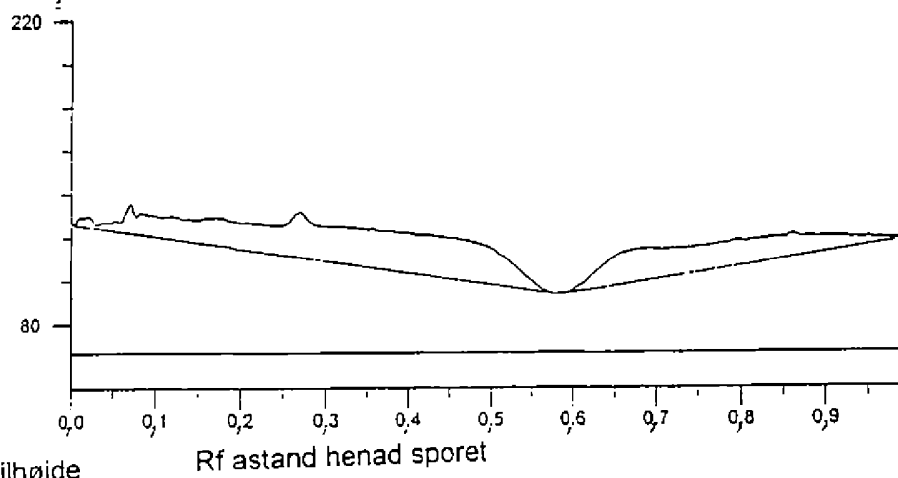
FIGUR 21



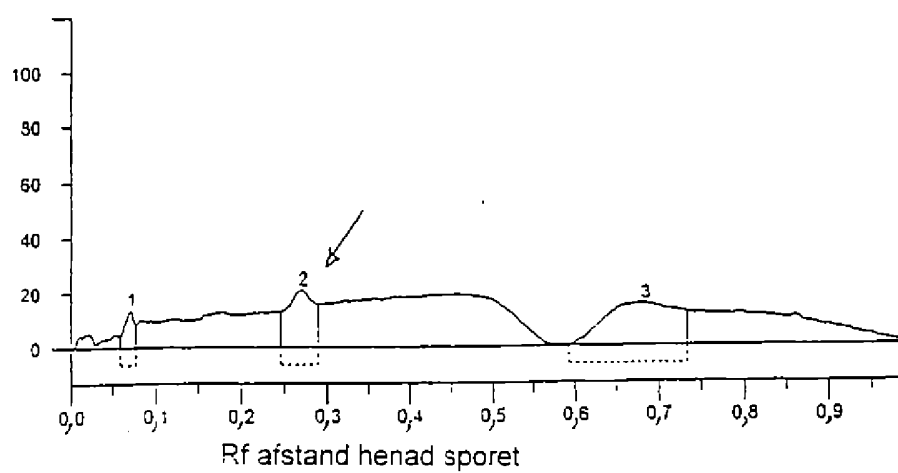
Spor 6			
Nr.	Molvægt	Højde	Rå vol.
1	0,00	13,300	5305,14
2	0,00	16,665	30111,09
3	0,00	34,741	18767,46
4	0,00	16,002	31320,35

FIGUR 22

Spør 12
Profilhøjde



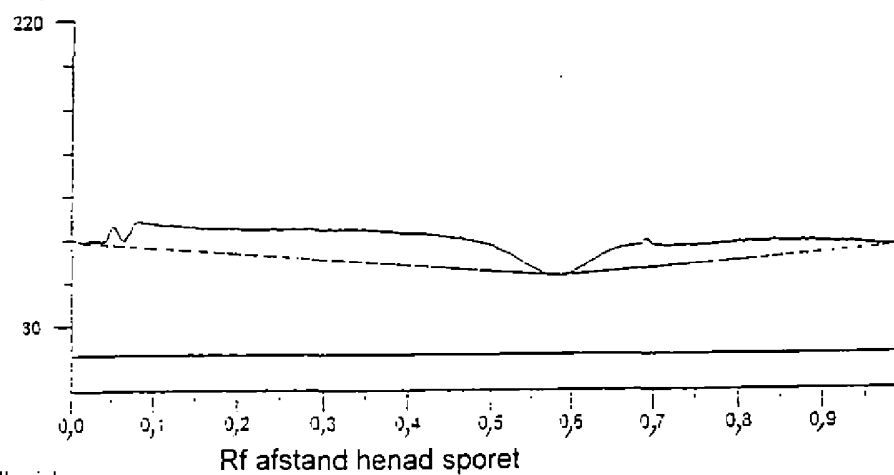
Profilhøjde



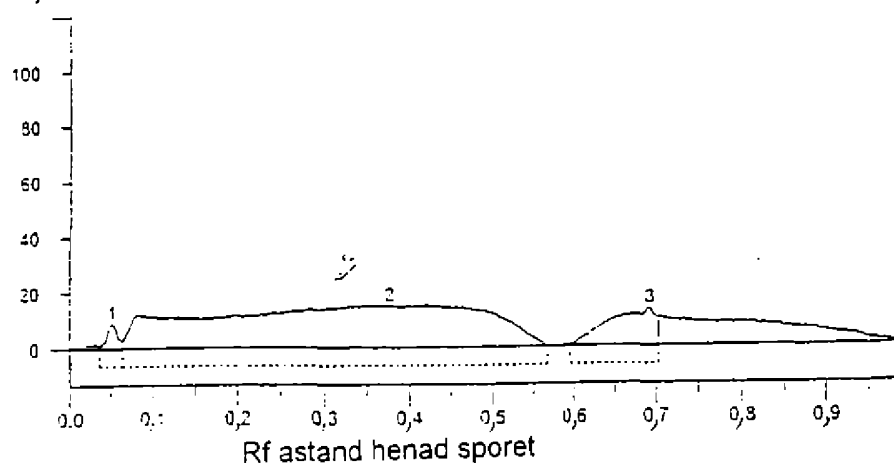
Spør 12			
Nr.	Molvægt	Højde	Rå vol.
1	0,00	13,346	2872,55
2	0,00	20,893	12279,14
3	0,00	15,181	25217,71

FIGUR 23

Spor 13
Profilhøjde



Profilhøjde



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

FIGUR 24

