

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 935592 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 935592

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/81

C12N 15/15

C12N 1/19

C12N 1/19

C12R 1:865

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 13.12.1993

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 13.12.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 16.06.1994

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

15.12.1992 EP 92811005

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Novartis AG**, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

2 • **UCP Gen-Pharma AG**, Kraftstrasse 6 8044 Zürich, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Heim, Jutta**, Ramlinsburg, SVEITSI, (CH)

2 • **Hottiger, Thomas**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • **Pohlig, Gabriele**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

4 • **Fürst, Peter**, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä polypeptidien valmistamiseksi

Förfarande för framställning av polypeptider

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

4413 DSM
6273 DSM

4473 DSM
6275 DSM

6271 DSM
7190 DSM

6272 DSM

Menetelmä polypeptidien valmistamiseksi

Keksintö koskee yhdistelmä-DNA-tekniikan aluetta ja menetelmää polypeptidien tuottamiseksi geneettisesti muokattujen hiivasolujen avulla, jotka sisältävät mainittuja polypeptidejä koodittavia geenejä sisältäviä hybridivektoreita, mainittuja hybridivektoreita ja hiivasoluja, ja menetelmiä mainittujen vektoreiden ja hiivasolujen valmistamiseksi.

10

Vaikka geenitekniikassa jo tunnetaan lukuisia polypeptidien ekspressiosysteemejä prokaryoottisille ja eukaryoottisille isännille, tarvitaan jatkuvasti uusia systeemejä, jotka ovat edullisia tunnettuihin systeemeihin nähden.

15

Hyvin laajasti polypeptidien tuotantoon käytettyjä isäntiä ovat hiivat, esim. Saccharomyces cerevisiae, jota varten on olemassa erityyppisiä vektoreita.

20

● Integroituvat vektorit, jotka eivät sisällä itsenäisesti replikoituvaa sekvenssiä (ARS). Näillä vektoreilla on tavallisesti alhainen transformaatioaste ja ne johtavat yleensä yhden kopion integroitumiseen hiivagenomiin.

25

● Kromosomin ulkopuolisesti replikoituvat vektorit, jotka voidaan jakaa ryhmiin:

30

- Vektorit, jotka sisältävät itsenäisesti replikoituvia sekvenssejä (ars-vektorit). Nämä vektorit ovat yleensä läsnä suurina kopiomäärinä solussa, ne kuitenkin menetetään usein solun jakautumisen aikana.

- Vektorit, jotka sisältävät DNA-sekvenssin, joka toimii sentromeerinä solun jakautuessa (cen-vektorit). Nämä vektorit, hyvästä pysyvyydestään huolimatta, ovat läsnä vain muutamana kopiona solussa.

35

- Vektorit, jotka ovat peräisin luonnollisina esiintyvistä hiivaplasמידeista, esim. vektorit, jotka ovat peräisin kaksimikroni-tyyppisestä plasmidista (kaksimikroni-vektorit). Sellaiset kaksimikroni-peräiset plasmidit esiinty-

vät suurina kopiomäärinä, niiden pysyvyyden kuitenkin huonontuessa, kun heterologista DNA:ta liitetään.

- On useita mahdollisuuksia parantaa pysyvyyttä ja säädellä
 5 vektorin kopiolukua. Tämän päämäärän saavuttamiseksi on esitetty metallotioneiiniä koodittavan CUP1-geenin liittämistä vektoreihin (US-A-4 935 359; R.C.A. Henderson et al., Current Genetics 9 (1985), 133-138).
- 10 Metallotioneiinit (MT:t) ovat pieniä, runsaasti kysteiiniä sisältäviä, metalleja sitovia polypeptidejä, jotka ovat laajalle levinneitä eukaryoottien keskuudessa. S. cerevisiae sisältää normaalisti yhden MT-proteiinin, jota koodittaa CUP1-geeni. CUP1-lokuksen on osoitettu antavan
 15 kupariresistenssin hiivasoluille ja se sisältää esim. 10 tai useampia peräkkäisesti toistuvia kopioita CUP1-geenistä. Kupariresistenssi on riippuvainen yhdistelmästä, joka käsittää CUP1:n monistumisen ja CUP1:n transkriptionaalisen induktion, joka on seurausta ulkoisen kuparin
 20 lisäämisestä. cis-toiminen geenin yläpuolinen aktivaatiokohta (UAS_c), joka tarvitaan CUP1-geenin kupari-indusoituvan transkription edistämiseen, on identifioitu samoin kuin solutekijän sitoutuminen UAS_c:hen. Sitoutumistekijä on ACE1 (=CUP2) -geenin tuote, joka on välttämätön
 25 CUP1-geenin kupari-indusoituvalle transkriptiolle. ACE1-proteiini on transkriptionaalinen aktivaattori, joka sitoo kupari-ioneja muuttaen siten konformaatiotaan ja aktivoiden DNA:han sitoutuvan domeenin. ACE1-proteiinin konformaatiomuutos ja sen sitoutuminen UAS_c:hen mahdollis-
 30 taa mahdollisesti CUP1-geenin kopioitumisen. Tärkeä yksityiskohta CUP1-systeemissä on itsesäätely. Tämä riippuu CUP1-proteiinin (metallotioneiini) kyvystä sitoa itseensä kupari-ioneja. CUP1-proteiini näyttää siten ehkäisevän omaa biosynteesiään kompleksoimalla vapaita kupari-ioneja
 35 soluissa, mikä vuorostaan häiritsee ACE1-aktivaatiota.

Toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiokasetin liittäminen kaksimikroni-peräiseen plasmidiin johtaa yllättäen kaksimikroni-peräisen plasmidin lisääntyneeseen pysyvyyteen ja monistumiseen plasmidin lisääntyneen kopiolumun kautta kupari-ionien läsnäollessa. Tämä on yllättävää, koska kaksimikroni-peräinen plasmidi itsessään sisältää jo kaikki toiminnot, jotta se voi esiintyä monikopioisena kromosomin ulkopuolella. Plasmidin lisääntynyt kopioluku aiheuttaa usein plasmidissa myös

5
10
15

länäolevien heterologisten geenien parantuneen ilmentymisen. Yllättäen havaittiin, että heterologisen geenin ilmentymistä voidaan edelleen lisätä merkittävästi, jos alkuperäiset kromosomaaliset CUP1-geenit jaetaan useaan osaan, tai jos genomissa on läsnä vain yksi CUP1-geenikopio, jota ei voi monistaa.

Tämä keksintö koskee menetelmää polypeptidin tuottamiseksi, jossa menetelmässä viljellään monimutkaisessa kasvualustassa hiivakantaa, joka sisältää genomissaan ainoastaan yhden toiminnallisen CUP1-geenin, ja sisältää hiivan kaksimikroni-peräisen plasmidin, joka sisältää toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiokasetin, ja eristetään tuotettu polypeptidi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että kasvualustaan on lisätty CUP1-promoottorin indusoiva määrä kuparisuolaa.

20
25

Keksinnön mukaisessa edullisessa suoritusmuodossa polypeptidin ekspressiokasetti sisältää hiivapromoottorin toimivasti kytkettynä hiivan signaaliptidiä koodittavaan ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidiä koodittavaan toiseen DNA-sekvenssiin, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaalit.

30

35

Toisen DNA-sekvenssin koodittama polypeptidi voi olla homologinen tai heterologinen hiivalle. Keksinnön mukaisessa edullisessa suoritusmuodossa polypeptidi on heterolo-

ginen. Nämä heterologiset polypeptidit voidaan käsitellä edelleen, esim. glykosyloida. Käyttökelpoisia polypeptidejä ovat esimerkiksi entsyymit, joita voidaan käyttää ravintoaineiden tuottamiseen ja entsyymaattisten reaktioiden toteuttamiseen kemian alalla, tai polypeptidit, jotka ovat käyttökelpoisia ja arvokkaita ravintoaineina, tai ihmisten tai eläinten sairauksien hoitoon tai niiden estämiseen, esimerkiksi hormonit, polypeptidit, joilla on immunomodulatorisia, viruksia vastustavia ja tuumoria vastustavia ominaisuuksia, vasta-aineet, virusantigeenit, rokotteet, hyytymistekijät, entsyymi-inhibiittorit, elintarvikkeet ja vastaavat aineet.

Sellaisia heterologisia rakennegeenejä ovat esimerkiksi ne, jotka koodittavat hormoneja, kuten sekretiiniä, tymosiinia, relaksiinia, kalsitoniinia, luteinisoivaa hormonia, lisäkilpirauhashormonia, adrenokortikotropiinia, melanosyyttejä stimuloivaa hormonia, β -lipoproteiinia, urogastria tai insuliinia, kasvutekijöitä kuten epidermin kasvutekijää, insuliinin kaltaista kasvutekijää (IGF), esim. IGF-I:tä ja IGF-II:ta, syöttösolun kasvutekijää, hermon kasvutekijää, hermotukikudosperäisen hermosolun kasvutekijää tai transformoivaa kasvutekijää (TGF) kuten esim. $TGF\alpha$:aa tai $TGF\beta$:aa, esim. $TGF\beta 1$:tä, $\beta 2$:ta tai $\beta 3$:a, kasvuhormoneja kuten ihmisen tai naudan kasvuhormoneja, interleukiinia kuten interleukiini-1:tä tai interleukiini-2:ta, makrofagin vaellusta ehkäisevää tekijää (MIF), interferoneja kuten ihmisen α -interferonia, esimerkiksi interferoni- αA :ta, αB :tä, αD :tä tai αF :ää, β -interferonia, γ -interferonia tai hybridi-interferonia, esimerkiksi αA - αD - tai αB - αD -hybridi-interferonia, erityisesti hybridi-interferoni BDBB:tä, proteinaasi-inhibiittoreita kuten α_1 -antitrypsiiniä, SLPI:tä ja vastaavia inhibiittoreita, hepatiittivirusantigeenejä kuten hepatiitti B -viruksen pinta- tai ydinantigeeniä tai hepatiitti A -virusantigeeniä tai hepatiitti ei-A-ei-B -antigeeniä, plasminogeenin aktivaattoreita kuten ku-

dosplasminogeenin aktivaattoria tai urokinaasia, tuumorin nekroositekijää, somatostatiinia, renniiniä, β -endorfiinia, immunoglobuliineja kuten immunoglobuliini D:n, E:n tai G:n kevyt ja/tai raskasketjuja tai ihmisen-hiiren
 5 hybridi-immunoglobuliineja, immunoglobuliinia sitovia tekijöitä kuten immunoglobuliini E:tä sitovaa tekijää, esim. CD23 ja vastaavat, kalsitoniinia, ihmisen kalsitoniinin kaltaista peptidiä, veren hyytymistekijöitä kuten tekijä IX:tä tai VIIIC:tä, erytropoietiinia, egliiniä
 10 kuten egliini C:tä, desulfatohirudiinia kuten desulfatohirudiinimuunnos HV1:tä, HV2:ta tai PA:ta, ihmisen superoksididismutaasia, viruksen tymidiinikinaasia, β -laktaamaasia, glukoosi-isomeraasia. Edullisia geenejä ovat ne, jotka koodittavat ihmisen α -interferonia tai hybridi-interferonia,
 15 erityisesti hybridi-interferoni BDBB:tä ja edullisimmin desulfatohirudiinia.

Ilmauksen "desulfatohirudiini" on tarkoitettu käsittävän kaikki desulfatohirudiiniyhdisteet, joita on kuvailtu
 20 kirjallisuudessa, tai jotka on saatavissa transformoidusta mikro-organismikannasta, joka sisältää desulfatohirudiinia koodittavan DNA:n. Sellaista desulfatohirudiinia ovat esimerkiksi desulfatohirudiinimuunnokset HV1, HV2 ja HV3 (PA), samoin kuin muut hirudiiniproteiinit, joita M. Scharf et al., FEBS Lett. 255 (1989), 105-110 on kuvailut.
 25 Tulee ymmärtää, että ilmauksen "desulfatohirudiini" piiriin kuuluvat myös desulfatohirudiinijohdannaiset, joissa on desulfatohirudiiniaktiivisuutta (so. omaavat trombiinia ehkäisevän vaikutuksen). Sellaista johdannaisia ovat esimerkiksi C-päästä lyhennetyt desulfatohirudiinit, so. desulfatohirudiinit, joista puuttuu yhdestä seitsemään, edullisesti yhdestä neljään, aminohappoa C-päässä, ja hirudiinin muteiinit, jotka poikkeavat viimeksi mainituista siten, että niiden alkuperäisten aminohappojen tilalle on vaihdettu yksi tai useampi, esim. yhdestä
 35 viiteen, aminohappoa. Edullinen desulfatohirudiini on desulfatohirudiinimuunnos HV1.

- Sopivia keksinnön mukaisia hiivakantoja ovat Saccharomyces cerevisiae -kannat, jotka sisältävät endogeenisen kaksimikroni-plasmidin tai sellaiset kannat, jotka on parannettu sellaisesta endogeenisestä kaksimikroni-plasmidista (EP-340 170). Keksinnön mukaiset edulliset hiivakannat eivät sisällä endogeenistä kaksimikroni-plasmidia (niin sanotut "cir⁰-kannat"). Edulliset hiivakannat ovat yhden tai useamman proteaasin suhteen negatiivisia hiivakantoja, so. hiivakantoja, joilta puuttuvat erityisesti karboksipeptidaasien ysc α ja yscY proteolyyttiset aktiivisuudet ja valinnaisesti lisäksi proteaasien yscA ja/tai yscB aktiivisuudet (EP-341 215). Tämä keksinnön mukaiseen prosessiin sopivat hiivakannat eivät sisällä kuin yhden CUP1-geenin genomissa. Erityisen edullisista hiivakannoista puuttuu genomisen CUP1:n geenituoteaktiivisuus. Keksinnön mukaiset hiivakannat sisältävät valinnaisesti yhden tai useampia lisäkopioita kuten 1-3 kopiota kromosomaalisesta ACE1-geenistä.
- Transformoituja hiivakantoja viljellään käyttäen alalla tunnettuja menetelmiä. Keksinnön mukaisia transformoituja hiivakantoja viljellään siten nestemäisessä monipuolisessa kasvualustassa, joka sisältää aineosia, jotka ovat välttämättömiä hiivakannan eloonjäämiseen ja kasvuun, kuten assimiloituvia hiilen- ja typenlähteitä, epäorgaanisia suoloja, vitamiineja, kasvua edistäviä aineita kuten lisäaminohapot, lisäsokerit jne.
- Alalla tunnetaan vastaavia kompleksisia kasvualustoja, joita voidaan käyttää hiivan viljelemiseen. Sellaiset kasvualustat sisältävät esimerkiksi tryptonia, peptonia, lihauutteita, mallasuutteita, hiivauutteita, kaseiinin aminohappoja, maissinliotusvettä, soijapapujauhoa, heraa, herahydrolysaattia jne., ja erityisesti niiden seoksia, ja niitä on valinnaisesti lisäksi täydennetty sokereilla (esim. dekstroosi, glukoosi, sakkaroosi, galaktoosi jne.), vitamiineilla (esim. biotiini), yksittäisillä ami-

nohapoilla, epäorgaanisilla suoloilla (esimerkiksi natriumin, kaliumin, magnesiumin ja kalsiumin sulfaatit, kloridit, fosfaatit ja karbonaatit, lisäksi vastaavat hivenainesuolat kuten raudan, sinkin ja mangaanin suolat) ja vastaavilla yhdisteillä ottaen huomioon, että kaikkien edellä esitettyjen välttämättömien aineosien on oltava läsnä alustassa. Edullinen kasvualusta on kaupallisesti saatava YPD-alusta (hiivauute, peptoni, dekstroosi; yeast extract, peptone, dextrose; vrt. Methods Enzymol. 194, 13) täydennettynä valinnaisesti epäorgaanisilla suoloilla ja vitamiineilla.

Viljely suoritetaan käyttäen tavanomaista tekniikkaa. Viljelyolosuhteet kuten lämpötila, alustan pH ja fermentointiaika valitaan siten, että polypeptidiä muodostuu maksimaalisesti. Valittua hiivakantaa kasvatetaan edullisesti aerobisissa olosuhteissa pinnanalaisviljelmänä ravistellen tai sekoituksessa lämpötilassa noin 25°C-33°C, edullisesti noin 28°C, pH-arvossa 4-7, esimerkiksi pH:ssa suunnilleen 5-6, ja vähintään 1-3 päivän ajan, edullisesti 3-4 päivää siten, että tyydyttävät polypeptidisaannot saavutetaan. Viljely voidaan suorittaa joko panosprosessina, syötettynä panosprosessina, toistuvasti syötettynä panosprosessina tai jatkuvatoimisena.

Kasvualustaan lisätään CUP1-promoottorin indusoiva määrä kupari(II)-suolaa, erityisesti kuparisulfaattia. Optimaalinen kuparimäärä (määrä, jolla saadaan aikaan maksimaaliset polypeptiditiitterit) riippuu ennen kaikkea isäntäsolun geneettisestä taustasta, käytetyn ekspressiovektorin komponenteista ja kasvualustan koostumuksesta, ja ne voidaan määrittää laboratoriossa käyttäen rutiinitestejä, esim. "titraamalla" (määrittämällä polypeptiditiitteri HPLC:n avulla lisätyn kuparimäärän funktiona). T. Etcheverry (edellä, s. 324) on kuvaillut rutiinitestiä. Tämän keksinnön mukaiset hiivakannat ovat melko epäherkkiä korkeille kupari-ionipitoisuuksille, koska kupari-

ionin letaalipitoisuus on paljon korkeampi kuin se pitoisuus, jota tarvitaan optimituotantoon ja voidaan sen vuoksi helposti säätää. Jos CUP1-promoottoria halutaan käyttää pseudokonstitutiivisesti, kasvualustaan lisätään
 5 juuri siirrostushetkellä kuparisuolaa.

Polypeptidi voidaan eristää tavanomaisilla menetelmillä. Ensimmäinen vaihe esimerkiksi käsittää tavallisesti soluseinän hajottamisen ja solujäännösten poistamisen
 10 sentrifugoinnin avulla, tai erittyvien proteiinien ollessa kysymyksessä, solujen erottamisen kasvuliemestä sentrifugoimalla. Saatu supernatantti voidaan väkevöidä polypeptidin suhteen käsittelemällä polyetyleenimiinin kanssa tarkoituksella poistaa suurin osa ei-proteiinaineista, ja saostamalla proteiinit kyllästämällä liuos
 15 ammoniumsulfaatilla. Jos isännän proteiineja on läsnä, ne voidaan myös saostaa hapottamalla etikkahapolla (esimerkiksi 0,1 %, pH 4-5). Muita puhdistusvaiheita ovat esimerkiksi suolanpoisto, kromatografiset prosessit kuten
 20 ioninvaihtokromatografia, geelisuodatuskromatografia, jakokromatografia, HPLC, käänteisfaasi-HPLC ja vastaavat menetelmät. Seoksen sisältämien aineosien erottaminen saadaan aikaan myös dialyysin avulla, varauksen vaikutuksesta geelielektroforeesin avulla tai kantajattoman elektroforeesin avulla, molekyylipainoon perustuen sopivan
 25 Sephadex-kolonnin avulla, affiniteettikromatografian avulla, esimerkiksi vasta-aineiden kanssa, erityisesti monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa.

30 Desulfatohirudiinin ollessa kysymyksessä, käytetystä hiivakannasta, promoottorista ja signaali-peptidistä riippumatta, tuotettu desulfatohirudiini erittyy pääasiallisesti (so. enemmän kuin 90 %) kasvualustaan. Sentrifugoinnin jälkeen voidaan käyttää trombiinia, kytkettynä sopivaan
 35 kantajaan affiniteettikromatografiaa varten, hirudiinin erottamiseksi, samoin kuin muita prosesseja, jotka tunnetaan kirjallisuudesta. Desulfatohirudiinin tapauksessa

tarvitaan yleensä vain muutama puhdistusvaihe desulfato-hirudiinituotteen saamiseksi, joka on olennaisesti vapaa kontaminanteista.

- 5 Keksinnön mukaisia transformoituja hiivasoluja voidaan valmistaa yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla, joka käsittää vaiheet, joissa

10 - aikaansaadaan hiivan ekspressioplasmidi, joka sisältää toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiokasetin,

15 - transformoidaan hiivakanta, joka sisältää ainoastaan yhden toiminnallisen CUP1-geenin genomissa, mainitulla hiivan ekspressioplasmidilla ja valikoidaan transformoidut hiivasolut transformoitumattomista hiivasoluista.

Hiivan ekspressioplasmidit

- 20 Keksintö koskee hiivan kaksimikroni-peräistä plasmidia, joka sisältää toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiokasetin.

25 Toiminnallisia CUP1-geenejä on kloonattu ja karakterisoitu perusteellisesti, esim. Butt et al. Gene 27 (1984), 23-33. Ne sisältävät esim. hiivan CUP1-promoottorin (mukaan lukien CUP1 UAS) toimivasti kytkettynä metallotioneiniä koodittavaan DNA-sekvenssiin, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaalit.

30 Edullisimmin käytetään 1,3 kiloemästä (ke) sisältävää BamHI-fragmenttia, joka sisältää kokonaisen metallotioneiniä koodittavan geenin - CUP1:n - eristettynä plasmidista YEp3362xSst (Wright, C.F. et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 8489-8499.

Polypeptidin ekspressiokasetti sisältää esimerkiksi hiivan promoottorin toimivasti kytkettynä polypeptidiä koodittavaan DNA-sekvenssiin.

- 5 Edullisessa suoritusmuodossa polypeptidin ekspressiokasetti käsittää hiivan promoottorin toimivasti kytkettynä hiivan signaaliptidiä koodittavaan ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidiä koodittavaan toiseen DNA-sekvenssiin, ja
10 DNA-sekvenssin, joka koodittaa hiivan transkription lopetussignaaleja.

Edullisia polypeptidejä ovat edellä kuvaillut heterologiset polypeptidit.

- 15 Sopivia hiivapromoottoreita ovat esimerkiksi mitkä tahansa konstitutiiviset tai indusoituvat hiivapromoottorit, joita voidaan käyttää polypeptidien ilmentämiseen hiivan avulla monimutkaisissa alustoissa, esim. CUP1-promoottori, GAPDH- (mukaan lukien sen lyhennetyt konstitutiiviset
20 versiot, esim. GAPFL jne.), GAL1(10)-, PYK-, TPI-, ADH- ja PGK-promoottorit. Edullisia promoottoreita ovat konstitutiivinen GAPFL- ja erityisesti CUP1-promoottori. Nämä promoottorit ovat hyvin tunnettuja ja niitä voidaan tuottaa ja käyttää sinänsä tunnetuilla tavoilla.
25

- CUP1-promoottorin DNA-sekvenssi on esimerkiksi tunnettu julkaisusta T.R. Butt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 3332-3336. CUP1-promoottori voidaan siten saada
30 aikaan kemiallisen DNA-synteesin avulla tai eristää S. cerevisiaen genomisesta DNA:sta käyttäen sopivia DNA-koettimia, esim. polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla. Tämän keksinnön mukaisesti käytetty CUP1-promoottori sisältää transkription aloitussignaaleja ja geenin yläpuolisen aktivaatiosekvenssin (UAS_c), joka sijaitsee paikoissa -105 - -148 (CUP1:n transkription aloituskohtaan nähden; P. Fürst *et al.*, Cell 55 (1988) 705-717). UAS:n 5'-
35

puoleisia olemassa olevia restriktiokohtia käytetään edullisesti hyväksi, esim. CUP1-geenin -455-paikassa sijaitsevaa BamHI-kohtaa (T.R. Butt *et al.*, edellä), ja transkription aloitussignaalien 3'-puoleista restriktiokohtaa (esim. EcoRI-kohta), joka on keinotekoisesti liitetty kemiallisen synteessin kautta tai PCR:ssä käytetyn oligonukleotidin avulla. Tuloksena oleva restrikti fragmentti, esim. 0,4 kiloemästä (ke) sisältävä [Sau3A]/BamHI-EcoRI -fragmentti, erityisesti Sekvenssi 3:ssä kuvatu-
 10 vatun rakenteen sisältämä fragmentti, voidaan liittää hiivan signaalipeptidiä koodittavaan DNA-sekvenssiin.

Kirjallisuudessa on joitakin esimerkkejä, joissa käytetään indusoituvaa CUP1-promoottoria heterologisten protei-
 15 inien ilmentämiseen hiivan avulla (vrt. Butt *et al.*, Microbiol. Rev. 51 (1987), 351-364; T. Etcheverry, Methods. Enzymol. 185 (1990), 319-329; US-A-4 940 661). Kuvaillut menetelmät käsittävät transformoidun hiivakannan viljelyn, joka sisältää CUP1-ekspressiokasetin sisältävän ekspressiovektorin, hiivan minimaalialustoilla, jotka
 20 sisältävät kupari-ioneja. Kemiallisesti tunnetut (synteettiset) alustat valitaan, koska yleensä otaksutaan, että kompleksisten alustojen komponentit (proteiinit jne.) vuorovaikuttavat (muodostavat kompleksin) kupari-
 25 ionien kanssa estämällä siten ACE1-aktivaation. Saavutettu solutiheys (OD-arvo) ja sen seurauksena saatavat tiitterit ovat vastaavasti alhaiset. Viimeksi mainitut tulokset ovat toistaiseksi rajoittaneet CUP1-promoottorisysteemin laajalle levinnyttä käyttöä bioteknisessä tutkimuksessa ja tuotannossa.
 30

Sen jälkeen on yllättäen todettu, että vastoin kaikkia odotuksia kompleksisia hiiva-alustoja voidaan käyttää kuparilla indusoituvan CUP1-ekspressiokasetin yhteydessä
 35 ilman, että on havaittavissa haittavaikutusta ilmenemistason tai -tehoon. Sen lisäksi, kun CUP1-promoottoria käytetään pseudokonstitutiivisella tavalla, so. kasvu-

alustaan lisätään kuparia juuri siirrostushetkellä, polypeptidien erittymisen ohjaamiseksi hiivasta kasvualustaan, havaitaan yllättäen, että tämä promoottori on ylivoimainen voimakkaisiin konstitutiivisiin hiivapromoottoreihin nähden.

Käyttämällä CUP1-promoottorin sisältävää ekspressiosysteemiä, suppressiota ei esiinny samalla promoottorilla koko CUP1-geenissä samassa vektorissa tai sen avulla tuotetulla metallotioneiinillä.

Hiivan signaalipeptidiä koodittava DNA-sekvenssi ("signaalisekvenssi") on edullisesti peräisin hiivan geenistä, joka koodittaa tavallisesti erittyvää polypeptidiä. Hiivan signaalisekvenssejä ovat esimerkiksi hiivan invertaasin (SUC2), α -tekijän, feromonipeptidaasin (KEX1), "tapajatoksiinin" ja repressoituvan happaman fosfataasin (PHO5) geenien signaali- ja preprosekvenssit ja glukoamylaasin signaalisekvenssi Aspergillus awamorista. Rakenteisiin voidaan sisällyttää myös lisäsekvenssejä kuten pro- tai välisekvenssejä, jotka voivat sisältää spesifisiä prosessointisignaaleja, prekursorimolekyylien oikean prosessoinnin helpottamiseksi. Prosessointisignaalit sisältävät esimerkiksi Lys-Arg -tähteen, jonka hiivan endopeptidaasi tunnistaa, joka sijaitsee Golgin membraaneilla. Tämän keksinnön mukaisia edullisia signaalisekvenssejä ovat hiivan PHO5-geenin ja hiivan invertaasigeenin signaalisekvenssit.

Polypeptidiä, erityisesti heterologista polypeptidiä koodittava DNA-sekvenssi voidaan eristää esim. genomisesta DNA:sta, tai kaksijuosteinen DNA (ds cDNA) tuotetaan, joka on komplementaarinen vastaavan mRNA:n suhteen, tai polypeptidin aminohapposekvenssiä koodittava geeni tuotetaan kemiallisten tai entsymaattisten prosessien avulla sinänsä tunnetulla tavalla.

Hiivan transkription lopetussignaaleja sisältävä DNA-sekvenssi on edullisesti hiivageenin 3'-puolen viereinen sekvenssi, joka sisältää oikeat signaalit polyadenylaation lopetukselle. Edullinen geenin viereinen sekvenssi on
 5 hiivan PH05-geenin vierussekvenssi.

Hiivan promoottori, signaaliptidiä koodittava DNA-sekvenssi, polypeptidiä koodittava DNA-sekvenssi ja DNA-sekvenssi, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaali-
 10 lit, ovat toimivasti kytketyt toisiinsa, so. ne sijaitsevat vierekkäin tavalla, jolla niiden normaalit toiminnot säilyvät. Järjestys on sellainen, että hiivan promoottori saa aikaan signaali-sekvenssi-polypeptidigeeni-kompleksin oikean ilmentymisen, transkription lopetussig-
 15 naalit aiheuttavat transkription oikean lopetuksen ja polyadenylaatio- ja signaali-sekvenssi on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidigeeniin siten, että signaali-sekvenssin viimeinen kodoni on suoraan kytketty polypeptidigeenin ensimmäiseen kodoniin. Hiivan promoottori
 20 on edullisesti kytkettynä signaali-sekvenssiin mRNA:n pääaloituskohdan ja luonnollisena promoottorigeeniin kytketyn ATG:n välissä. Signaali-sekvenssi sisältää oman ATG:n translaation aloitukseen. Näiden sekvenssien liitoskohta voidaan saada aikaan esimerkiksi synteettisten oligonuk-
 25 leotidikytkijöiden avulla, jotka sisältävät endonukleasiin tunnistussekvenssin. Esimerkkejä vastaavista desulfatohirudiinin ekspressiokaseteista kuvaillaan EP-A-341
 215:ssä.

30 Polypeptidin ekspressiokasetin ja toiminnallisen CUP1-geenin lisäksi keksinnön mukaiset ekspressioplasmidit sisältävät DNA-osan, joka on lähtöisin kaksimikroni-DNA:sta, joka sisältää replikaation aloituskohdan, tai jos käytetään kaksimikroni-vapaata hiivakantaa, koko kaksimikroni-DNA:n. Jälkimmäinen plasmidityyppi on edullinen.
 35 Keksinnön mukaiset plasmidit sisältävät esimerkiksi täydellisen kaksimikroni-DNA:n keskeytymättömässä muodossa,

- so. kaksimikroni-DNA katkaistaan kerran restriktioendonukleasilla, lineaariseksi tehty DNA liitetään vektorin muihin komponentteihin ennen renkaan sulkemista. Restriktiokohta valitaan siten, että REP1-, REP2- ja FLP-geenien normaali toiminta ja kaksimikroni-DNA:n ORI-, STB-, IR1- ja IR2-kohdat, samoin kuin pienet "FLP:n tunnistuskohde" (FRT) -kohdat, jotka sijaitsevat lähellä kunkin käänteisen toistojakson (IR) keskiosaa, jossa FLP-rekombinaasi toimii, säilyvät. Restriktiokohta valitaan valinnaisesti siten, että myös kaksimikroni-DNA:n D-geeni säilyy intaktina. Sopivia restriktiokohtia ovat esimerkiksi tunnusomainen, D-geenin alueella sijaitseva PstI-kohta ja kaikkien mainittujen geenien ja kohtien ulkopuolella sijaitsevat tunnusomaiset HpaI- ja SnaBI-kohdat. On kuitenkin vastaavasti mahdollista liittää ekspressiokasetti ja lisäkomponentit (vrt. jäljempänä) eri (kuten esimerkiksi kahteen) restriktiokohtiin, erityisesti edellä mainittuihin kohtiin kaksimikroni-DNA:n alueella.
- Kyseinen plasmidijohdannainen voi käsittää vain kaksi käänteisesti toistuvaa FRT-kohtaa tai ylimääräisenä kolmannen FRT-kohdan. Edellisen kaltaista plasmidia nimitetään tämän jälkeen "symmetriseksi kaksimikronityyppiseksi hybridivektoriksi". Jälkimmäistä plasmidityyppiä nimitetään tämän jälkeen "symmetriseksi kaksimikronityyppiseksi disintegraatiovektoriksi", vaikkei se olekaan oikea symmetrinen plasmidi vaan muodostaa symmetrisen kaksimikronityyppisen hybridivektorin sillä transformoidussa hiivasolussa.
- Keksinnön mukainen symmetrinen kaksimikronityyppinen hybridivektori ei edullisesti sisällä bakteerien tai virusten DNA-sekvenssejä, so. bakteerigenomista, plasmidista tai viruksesta saatua DNA:ta. Keksinnön mukainen kaksimikronityyppinen disintegraatiovektori voi kuitenkin sisältää prokaryoottista alkuperää olevia DNA-sekvenssejä kahden suoraan toistuvan FRT-kohdan välissä, jotka leika-

taan vektorista transformoidussa hiivasolussa, jossa symmetrinen kaksimikronityyppinen hybridivektori muodostuu disintegraatiovektorista. Nämä DNA-sekvenssit ovat bakteerisekvenssejä kuten jäljempänä on kuvailtu, ja voivat antaa vektorille olennaisia rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia, tai niiden toimintana voi olla vain täyttää kaksi aluetta epäsymmetrisen kaksimikronityyppisen plasmidijohdannaisen tai "epäsymmetrisen" disintegraatiovektorin kahden käänteisesti toistuvan FRT-kohdan välissä, symmetrisen kaksimikronityyppisen hybridivektorin tai symmetrisen disintegraatiovektorin konstruoimiseksi.

Kaksimikronityyppisessä hybridivektorissa, joka tämän keksinnön mukaisessa merkityksessä on symmetrinen tai disintegraatiovektorissa, joka muodostaa sellaisen symmetrisen kaksimikronityyppisen hybridivektorin, kahden käänteisesti toistuvan FRT-kohdan välissä sijaitsevien alueiden pituuksien suhde on lähtien noin 1:1-tasolta noin 5:4-tasoon, so. suurempi alue on noin 20 %:iin saakka suurempi kuin pienempi alue.

Edullisessa keksinnön mukaisessa suoritusmuodossa kahdella alueella kaksimikroni-DNA:n rengasmuodon käänteisesti toistuvien FRT-kohtien välissä on suunnilleen samat pituudet.

Keksinnön mukaiset ekspressioplasmidit sisältävät edullisesti yhden tai useamman, erityisesti yhden tai kaksi valikoivan geneettisen markkerin hiivalle, ja sellaisen markkerin ja (lukuun ottamatta symmetrisiä kaksimikronityyppisiä hybridivektoreita) replikaation aloituskohdan bakteeri-isännille, erityisesti Escherichia colille.

Mitä tulee hiivan valikoitaviin geenimarkkereihin, voidaan käyttää mitä tahansa merkkigeeniä, joka helpottaa transformanttien valikointia merkkigeenin fenotyyppisen

ilmentymisen perusteella. Sopivia markkereita hiivalle ovat esimerkiksi ne, jotka ilmentävät antibioottiresistenssin tai, auktrofisten hiivamutanttien tapauksessa geenit, jotka korjaavat isännän puutteita. Vastaavat geenit antavat resistenssin esimerkiksi antibiooteille G418, hygromysiini tai bleomysiini, tai tekevät auktrofisen hiivamutantin prototrofiseksi, esimerkiksi URA3-, LEU2-, LYS2-, HIS3- tai TRP1-geenit.

- 10 Koska ekspressioplasmidien monistaminen suoritetaan sopivasti prokaryootissa kuten E. colissa, prokaryootin, esim. E. colin geneettinen markkeri ja prokaryootin, esim. E. colin replikaation aloituskohta, sisällytetään edullisesti. Nämä voidaan saada vastaavista prokaryootisista plasmideista, esimerkiksi E. colin plasmideista, kuten esim. pBR322- tai pUC-plasmideista, esimerkiksi pUC18 tai pUC19, jotka sisältävät prokaryootin, esim. E. colin, sekä replikaation aloituskohdan että geneettisen markkerin, joka antaa resistenssin antibiooteille kuten ampisilliinille.

Polypeptidieksspressiokasetin, replikaation aloituskohdan (-kohtien) ja geneettisen markkerin (markkereiden) lisäksi keksinnön mukaiset ekspressiovektorit sisältävät valinnaisesti lisäekspressiokasetteja, kuten esimerkiksi 1-3 muuta polypeptidieksspressiokasettia ja/tai yhden lisäksi tulevan transkriptionaalisen aktivaatorieksspressiokasetin ACE1. Lisänä olevat polypeptidieksspressiokasetit (-kasetti) ovat keskenään samanlaiset tai erilaiset, ja samanlaiset tai erilaiset kuin vektorissa jo läsnä oleva polypeptidieksspressiokasetti, ja kukin sisältää hiivapromoottorin toimivasti kytkettynä signaaliptidiä koodittamaan ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidiä koodittamaan toiseen DNA-sekvenssiin, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaali. Sopiva hiivapromoottori sellaisessa polypeptidilisäekspressiokasetissa on esimer-

kiksi mikä tahansa konstitutiivinen tai indusoituva hiivapromoottori, jota voidaan käyttää polypeptidin ilmentämiseen hiivalla kompleksisilla alustoilla kuten edellä on kuvailtu. Sopivia signaalsekvenssejä ja transkription lopetussignaaleja ovat ne, joita edellä on kuvailtu.

ACE1-ekspressiolisäkasetti sisältää omat transkriptionaaliset ja translationaaliset aloitus- ja lopetussignaalit, tai se on transkriptionaalisesti säädelty konstitutiivisen tai indusoituvan hiivapromoottorin avulla, joka on eri kuin ACE1-promoottori, kuten CUP1-promoottori tai konstitutiivinen (lyhennetty) GAPDH (esim. GAPFL) -promoottori. Sopiva ACE1-ekspressiokasetti on esimerkiksi se, jonka S. cerevisiaen genomisen 1,7 ke EcoRV-fragmentti sisältää (vrt. P. Fürst et al. (1988) Cell 55, 705-717). Fragmentin sisältämä alkuperäinen ACE1-promoottori voidaan korvata toisella hiivapromoottorilla, esimerkiksi CUP1-promoottorilla, tavanomaisilla keinoilla ja menetelmillä. Polypeptidi- ja/tai ACE-ekspressiolisäkasettien kopiointisuunta ei ole ratkaiseva ja se voi olla sama tai vastakkainen kopiointisuuntaan nähden, joka polypeptidi-ekspressiokasetilla jo on läsnä keksinnön mukaisissa vektoreissa.

Keksintö koskee myös menetelmää edellä määriteltujen uusien ekspressiovektoreiden valmistamiseksi. Keksinnön mukaiset ekspressiovektorit valmistetaan alalla tunnetuilla menetelmillä esimerkiksi kytkemällä polypeptidin ekspressiokasetti, CUP1-geeni, hiivalle ja valinnaisesti bakteeri-isännille tarkoitettavia geneettisiä markkereita sisältävät DNA-fragmentit, hiivalle ja valinnaisesti bakteeri-isännälle tarkoitettut replikaation aloituskohdat ja valinnaisesti lisäksi tulevat polypeptidin ja/tai ACE1:n ekspressiokasetit ennalta määrätystä järjestyksessä käyttäen tavanomaisia kemiallisia tai biologisia in vitro -synteesimenetelmiä. Plasmidit konstruoidaan ja valmistetaan ensisijaisesti käyttäen yhdistelmä-DNA-tekniikkaa. Valmistusta varten yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla sopi-

vat DNA-fragmentit ligoidaan in vitro tavanomaisella tavalla. Ligaatioseos transformoidaan sen jälkeen sopivaan prokaryoottiseen tai eukaryoottiseen isäntään riippuen käytettyjen säätelyelementtien laadusta, ja halutun vektorin sisältävä transformantti valikoidaan tavanomaisten menettelyjen mukaisesti. Plasmideja voidaan lisätä transformoitujen isäntien avulla ja eristää tavanomaisella tavalla. Isännän valinta riippuu vektorin sisältämisestä säätelysekvensseistä. Koska keksinnön mukaiset ekspressiovektorit ensisijaisesti sisältävät prokaryoteissa, esim. E. colissa, toiminnallisia säätelysekvenssejä, prokaryoottinen isäntä, esim. E. coli, on edullinen vektorin konstruoimiseksi ja lisäämiseksi.

15 Transformoidut hiivakannat

Keksintö koskee lisäksi hiivakantaa, joka ei sisällä useampia kuin yhden toiminnallisen CUP1-geenin genomissa, ja sisältää hiivan hybridiplasmidin, joka käsittää polypeptidin ekspressiokasetin ja toiminnallisen CUP1-geenin, ja menetelmää sen tuottamiseksi.

Hiivan transformointi keksinnön mukaisilla hybridiplasmi-
deilla voidaan suorittaa alalla tunnetuilla menetelmillä.

25 Edullisia hiivakantoja ovat ne, jotka edellä on määritelty, erityisesti S. cerevisiae -kannat, jotka on parannettu endogeenisestä kaksimikroniplasmidista ("cir⁰-kannat") ja jotka ovat yhden tai useamman hiivaproteaasin suhteen negatiivisia (vajaatoimisia), kuten esimerkiksi karboksi-
30 peptidaasien ysc α ja yscY suhteen. Muista edullisista hiivakannoista puuttuu genominen CUP1-geenituoteaktiivisuus. Menetelmiä sellaisten hiivakantojen tuottamiseksi kuvaillaan esimerkiksi EP-patenttihakemuksissa 340 170 ja
35 341 215. Hiivakannat, joista puuttuu genominen CUP1-geenituoteaktiivisuus, tai jotka sisältävät vain yhden toiminnallisen CUP1-geenin genomissa, ovat tunnettuja tai

niitä voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi paikkakohdennetun mutatoinnin avulla tai jakamalla geeni useaan osaan tai geenin vaihtomutaation avulla [vrt. H. Rudolph *et al.*, *Gene* **36** (1985) 87-95]. Koska

5 kromosomaalisen CUP1-geenin sekvenssi on tunnettu, viimeksi mainittu voidaan tehdä vajaatoimiseksi insertion, substituution tai deletion avulla käyttäen hyväksi hyvin tunnettua paikkakohdennetun mutatoinnin menetelmää [lähemmin esimerkiksi, M.J. Zoller ja M. Smith (1983) *Methods Enzymol.* **100**, 468], joka käsittää sopivasti suunnitellun mutageenisen oligodeoksinukleotidialukkeen valmistamisen. Genominen CUP1-geeni voidaan vaihtoehtoisesti

10 korvata vieraalla DNA:lla tai mainittu vieras DNA voidaan liittää CUP1-geenin sopivaan restriktiokohtaan. Esimerkiksi, valmistettaessa hiivamutantti, joka on vajaatoiminen kromosomaalisten CUP1-geenien suhteen, vieras DNA

15 liitetään CUP1-geenissä esiintyvään sopivaan restriktiokohtaan. Siinä tapauksessa, jossa käytetty hiivakanta sisältää vajaatoimisen kromosomaalisen geenin, joka koodittaa aminohapon tai puriinin (esim. urasiilin) biosynteesin entsyymiä, vastaava intakti geeni (kuten esim. URA3) voidaan liittää kromosomaalisiin CUP1-geeneihin

20 aikaansaamalla siten prototrofia auksotrofisessa hiivakannassa ja muuttamalla samalla kertaa genotyyppi CUP1:stä cup1:ksi. Geenivaihtomutaatiomenetelmät tai kohdennetun mutatoinnin menetelmät ovat alalla yleisesti käytettyjä ja ehdottoman toistettavia.

Käytössä oleva lisämenetelmä geneettiseltä taustaltaan

30 haluttujen hiivakantojen luomiseksi, joilla esimerkiksi CUP1-geenit ovat useassa osassa ja/tai, jotka ovat vajaatoimisia tiettyjen proteaasien suhteen, käsittää sopivien hiivakantojen meioottisen risteytyksen ja sitä seuraavan

35 tetradianalyysin. Diploidisoluihin peräisin olevat tetradit eritellään geneettisten vakiomenetelmien mukaisesti. Sattumanvarainen tetradin neljän itiön seulonta mahdollistaa sopivien mutanttien konstruoinnin seuraavissa ris-

teytyksissä. Sattumanvaraista itiöanalyysiä voidaan myös käyttää vaihtoehtoisena systeeminä.

Hiivakantoja, jotka sisältävät 1-3 lisäkopiota ACE1-geeniä, voidaan myös valmistaa tavanomaiseen tapaan. ACE1-geeni(t) voidaan esimerkiksi liittää sopivaan restriktiokohtaan (-kohtiin) kromosomaalisessa geenissä (-geeneissä), jotka antavat antibioottiresistenssin, tai geen(e)issä, jotka osallistuvat aminohapposynteesiin tai puriini- tai pyrimidiiniemässynteesiin, mikä tekee sellaisen ACE1-geenin lisäkopian (kopioiden) sisältävät hiivakannat herkiksi antibiooteille ja vastaavasti auksotrofisiksi vastaavan aminohapon, puriini- tai pyrimidiiniemäksen suhteen.

Seuraavassa kokeellisessa osassa kuvaillaan erilaisia keksinnön mukaisia suoritusmuotoja viitaten oheen liitettyihin piirroksiin, joissa:

Kuvio 1 on kaaviokuva plasmidista pHE112R.

Kuvio 2 on kaaviokuva plasmidista pPFY56.

Kuvio 3 on kaaviokuva plasmidista pHE111.

Kuvio 4 on kaaviokuva plasmidista pMK18.

Kuvio 5 on kaaviokuva plasmidista pMK19.

Kuvio 6 on kaaviokuva plasmidista pMK26.

Kuvio 7 on kaaviokuva plasmidista pMK27.

Kuvioissa käytetään seuraavia lyhenteitä:
 term = PH05 transkription terminaattori;
 p CUP1p:ssä, GAPFLp:ssä ja ACE1p:ssä = promoottori.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä eikä niitä ole tarkoitettu sitä rajoittamaan.

Kannat ja plasmidit

5

E. coli DH5 α F': Escherichia coli K12F'endA1 hsdR17(r^m+) supE44 thi1 recA1 pyrA relA1 PHI80lacZdelM15 del(lacZYA-argF)U169; Hanahan D. (1983), Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166:57
10 (Bethesda Research Laboratories).

S. cerevisiae H449: Saccharomyces cerevisiae MAT α , ura3 Δ 15, leu2-3, leu2-112, prb1, cps1, [cir⁰]. DSM 4413; 18. helmikuuta, 1988.

15

S. cerevisiae HT462/TH3:MAT α , cup1::URA3, kex1, prc1, leu2-3, leu2-212; DSM 7190; 22. heinäkuuta, 1992.

S. cerevisiae kanta 55.6B; MAT α , his3, leu2, trp1, ura3-20 52, cup1::URA3; vrt. Thiele, D.J. et al., Science 231 (1986), 854-856.

Plasmidi YEp3362xSst: Wright, C.F. et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 8489-8499.

25

Plasmidi pDP34:EP-A-340 170, kuviossa 3; Hiiva-E. coli -sukkulavektori, jossa ampisilliiniresistenssimarkkeri E. coli:lle ja URA3 ja dLEU2 hiivan valikoivat markkerit. Plasmidi sisältää täydellisen 2-mikronisekvenssin A-muodossa ja on REP1-, REP2- ja FLP-positiivinen. DSM 4473; 30 14. maaliskuuta, 1988.

Plasmidi pJDB207/GAPFL-YHIR: Hiivaplasmidi desulfatohirudiinimuunnelma HV1:n ilmentämiseksi hiivan glyseraldehydi-35 di-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAPDH)-geenin lyhyen, konstitutiivisen promoottorin ohjauksessa. Desulfatohirudii-

nin kooditussekvenssi käsittää edullisia hiivakodoneja;
vrt. EP-A-340 170.

Plasmidi pTZ18R: pUC18:sta saatu plasmidi sisältää M13
5 replikaation aloituskohdan, joten se voi tulla yksijuos-
teiseksi ja pakkautua M13-faagin päihin M13-auttajafaagin
avulla. Mead D.A., Szczesna-Skorupa E., Kemper B., Sin-
gle-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile
tandem promoter system for cloning and protein enginee-
10 ring. Protein Engineering 1 (1986), 67-74 (Pharmacia).

Plasmidi pFBY2: Tämä plasmidi on konstruoitu liittämällä
166 ep AluI-fragmentti, joka sisältää FRT-kohdan S. cere-
visiaen kaksimikroniplasmidista pTZ18R:n HindIII- ja Eco-
15 RI-kohtien välissä ja kokonaisen kaksimikroniplasmidin
katkaistuna XbaI:llä, pTZ18R:n tunnusomaiseen XbaI-koh-
taan. DSM 6271; 14. joulukuuta, 1990.

Plasmidi pFBY4: Tämä plasmidi sisältää 1,1 ke XbaI-frag-
20 mentin, joka sisältää koko URA3-geenin S. cerevisiaesta,
kloonattuna pTZ18R:n tunnusomaiseen XbaI-kohtaan. Tämä
plasmidi toimii sopivana URA:n sisältävänä 1,1 ke XbaI-
fragmenttilähteenä. DSM 6272; 14. joulukuuta, 1990.

25 Plasmidi pFBY5: pFBY5 on peräisin suuresta plasmidista,
joka sisältää kokonaan S. cerevisiaen kaksimikroniplasmi-
din sekä S. cerevisiaen URA3- ja Leu2-geenit pUC18 bak-
teerivektorissa. Tämän vektorin tunnusomaiseen SalI-koh-
taan liitetään 1,1 kep SalI-fragmentti, joka sisältää
30 ekspressiokasetin, joka käsittää promoottorin, joka on
peräisin S. cerevisiaen GAPDH-geenistä, kytkettynä PH05-
signaalisekvenssiin, joka vuorostaan on kytketty synteet-
tiseen hirudiinia koodittavaan DNA-fragmenttiin, jota
seuraa PH05-terminaattori. DSM 6273; 14. joulukuuta,
35 1990.

Plasmidi pFBY29: Tämä plasmidi sisältää 2 kep BamHI/SalI-fragmentin, joka sisältää LEU2-geenin. Fragmentti on liitetty pTZ18R:n BamHI- ja SalI-kohtien väliin. pFBY29 toimii 2,0 kep fragmentin lähteenä, joka sisältää LEU2:n.

5 DSM 6275; 14. joulukuuta 1990.

Kaikki DNA-manipulaatiot suoritetaan - ellei toisin ole mainittu - vakiotoimintaohjeiden mukaisesti (esim. Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).

10 Esimerkki 1 Plasmidin pHE112R konstruointi. 2-mikroni-plasmidi, joka sisältää GAPFLp-hirudiinin ekspressiokasetin ja täyden CUP1-geenin

Plasmidin pysyvyyden tehostamiseksi ja plasmidin kopioluvun lisäämiseksi, 1,3 ke fragmentti, joka sisälsi täyspitkän CUP1-geenin, liitettiin plasmidiin pDP34/GAPFL-YHIR, plasmidiin, joka on suunniteltu desulfatohirudiinimuunnelman HV1 ilmentämiseen hiivan glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAPDH) -geenin lyhyen konstitutiivisen promoottorin (GAPFLp) ohjauksessa.

25 pDP34/GAPFL-YHIR:n konstruoimiseksi pDP34:ää käytetään lähtöplasmidina. pDP34 (vrt. EP-A-340 170, sen kuviossa 3) on hiiva-E. coli -sukkulavektori, joka sisältää ampisilliiniresistenssimarkkerin E. colille ja URA3 ja dLEU2 hiivan valikoitavat markkerit. Se sisältää täydellisen 2-mikronisekvenssin A-muodossa ja on REP1-, REP2- ja FLP-positiivinen. Plasmidi pDP34 pilkotaan BamHI:llä. Restriktiokohdan tarttuvut päät täytetään reaktiossa Klenowin DNA-polymeraasin kanssa (Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982). DNA katkaistaan edelleen SalI:llä ja 11,8 ke vektorifragmentti eristetään preparatiivisella 0,6 %:isella agaroosigeelil-

lä. DNA otetaan talteen elektroeluoimalla ja saostetaan etanolilla.

Plasmidi pJDB207/GAPFL-YHIR (vrt. EP-A-340 170) pilkotaan
 5 HindIII:lla. Tarttuvat päät muutetaan tasapäiksi Klenowin
 DNA-polymeraasin avulla. DNA saostetaan etanolilla ja
 pilkotaan edelleen SalI:llä. 1,1 ke SalI-(HindIII)/tasa-
 pääfragmentti sisältää täydellisen ekspressiokasetin,
 joka käsittää pBR322-sekvenssit, GAPFL-promoottorin,
 10 PHO5-signaalisekvenssin kytkettynä oikeassa lukukehykses-
 sä desulfatohirudiinin kooditussekvenssiin ja PHO5 trans-
 kriptio lopetusfragmentin. 1,1 ke fragmentti eristetään
 preparatiivisella 0,8 %:isella agarosigeelillä, otetaan
 talteen geelistä elektroeluoinnin avulla ja puhdistetaan
 15 DE52-ioninvaihtokromatografian ja etanolisaostuksen avul-
 la.

0,2 pmoolia 1,1 ke fragmenttia ja 0,1 pmoolia 11,8 ke
 fragmenttia ligoidaan 10 µl:ssa liuosta, joka sisältää 60
 20 mM Tris-HCl:a pH 7,5, 10 mM MgCl₂:a, 5 mM DTT:a, 3,5 mM
 ATP:tä ja 400 yksikköä T4 DNA -ligaasia, 16 tunnin ajan
 15°C:ssa. Yhden mikrolitran erä käytetään transformoitaes-
 sa *E. coli* HB101 Ca²⁺ -soluja. 5 transformoitua, ampisil-
 liiniresistenttiä pesäkettä analysoidaan. Plasmidi-DNA
 25 pilkotaan BamHI:llä ja SalI/BamHI:llä. Yksi oikeat rest-
 riktiofragmentit sisältävä kloonin valikoidaan ja sitä
 nimitetään tunnuksella pDP34/GAPFL-YHIR (yksityiskohdista
 EP-A-340 170:ssä).

30 1,3 ke BamHI-fragmentti, joka sisältää täyden metallo-
 tioneiiniä koodittavan geenin - CUP1:n -, eristetään
 plasmidista YEp3362xSst (Wright, C.F. et al., Nucleic
 Acids Res. 14 (1986), 8489-8499). YEp3362xSst pilkotaan
BamHI:llä, 1,3 ke fragmentti eristetään, puhdistetaan ja
 35 ligoidaan BamHI:llä katkaistun pUC19:n kanssa. Tuloksena
 oleva plasmidi on nimeltään pHE105. 1311 ep BamHI-frag-
 mentti, joka sisältää CUP1-promoottorin, CUP1-kooditetun

metallotioneiinin avoimen lukukehyksen (ORF) ja CUP1-terminaattorin, esitetään Sekvenssi 1:ssä.

pHE105 pilkotaan BamHI:llä, 1,3 ke CUP1:n sisältävä fragmentti eristetään ja tarttuvat päät muutetaan tasaisiksi Klenowin DNA-polymeraasilla. pDP34/GAPFL-YHIR pilkotaan SnaBI:llä, leikattu plasmidi puhdistetaan ja tasapäätt defosforyloidaan käsittelemällä alkalisella fosfataasilla. CUP1:n sisältävä 1,3 ke [BamHI]/tasapääfragmentti
 10 liitetään SnaBI:llä katkaistuun pDP/GAPFL-YHIR:iin. E. coli transformoidaan tuloksena saadulla plasmidilla pHE112R. pHE112R:stä testataan metallotioneiinin ORF:n orientaatio pilkkomalla KpnI:llä. Metallotioneiinin ORF sijaitsee pHE112R:ssä päinvastaisessa orientaatiossa
 15 GAPFL-hirudiinin ekspressiokasetin suhteen. pHE112R esitetään kuviossa 1.

Esimerkki 2: Plasmidin pFBY56 konstruointi. Hybridigeeni, joka sisältää CUP1-promoottorin, PH05-ohjaussekvenssin ja synteettisen hirudiinigeenin
 20

Jotta saataisiin aikaan indusoituva, korkea-asteinen ilmentyminen eritetystä desulfatohirudiinista, DNA-sekvenssit, jotka koodittavat hirudiinia ja PH05-ohjaussekvenssiä, yhdistetään ja asetetaan kuparilla indusoituvan CUP1-promoottorin ohjaukseen. Synteettinen hirudiinigeeni yhdistettynä PH05-ohjaussekvenssiin eristetään plasmidista pDP34/GAPFL-YHIR (edellä) 0,5 ke EcoRI-fragmenttina, joka sisältää myös PH05 transkription lopetussekvenssit.

30 CUP1-promoottori (T.R. Butt et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3332-3336) kloonataan S. cerevisiaen genomisesta DNA:sta polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla käyttäen Perkin Elmerin PCR-pakkausta ja seuraavaa kahta
 35 oligonukleotidia alukkeina:

5'-GGATCCATTACCGACATTTGGGCGCTAT

Sekvenssi 5

5'-GAATTCACAGTTTGTCTTTCTTAATATCTA

Sekvenssi 6

100 ng hiivan genomista DNA:ta (eristetty hiivakannasta H449) inkuboidaan 0,1 ml:ssa liuosta, joka sisältää 2,5 yksikköä Taq DNA -polymeraasia, 0,02 mM kutakin aluketta ja 0,2 mM dATP:a, dCTP:a, TTP:a ja dGTP:a 10 mM Tris pH 8,3 -puskurissa, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂. Reaktiota inkuboidaan 30 sykliä: 30 sekuntia 92°C:ssa, 1 min. 42°C:ssa ja 72°C:ssa 1 min.

10

0,4 ke CUP1-promoottorifragmentti, eristämisen, puhdistamisen ja BamHI:llä ja EcoRI:llä pilkonnan jälkeen, liitetään BamHI:llä ja EcoRI:llä pilkottuun pBR322:een.

Tuloksena saatu plasmidi pBR322-CUP1 pilkotaan EcoRI:llä.

15

4,4 ke vektori, joka sisältää CUP1-promoottorin, eristetään, puhdistetaan ja ligoidaan 0,5 ke hirudiinifragmentin kanssa. *E. coli* HB101 transformoidaan tuloksena saadulla plasmidilla pPFY53. pPFY53:sta testataan hirudiinifragmentin oikea orientaatio pilkkomalla SalI:llä.

20

1082 ep BamHI/SalI-fragmentti, joka sisältää CUP1-promoottorin, PHO5-ohjaussekvenssin, hirudiinigeenin ja PHO5-terminaattorin, esitetään Sekvenssi 3:ssä.

CUP1-hirudiiniekspressiokasetti eristetään pPFY53:sta 1,1 ke SalI-fragmenttina. Tämä fragmentti liitetään sitten SalI:llä lineaariseksi tehtyyn pDP34:ään (edellä). *E. coli* HB101 transformoidaan tuloksena saadulla plasmidilla pPFY56. Transformoitu *E. coli* -kanta merkitään tunnuksella *E. coli*/PFY56. pPFY56 esitetään kuviossa 2.

30

Esimerkki 3: Plasmidin pHE111 konstruointi. 2-mikroni-plasmidi, joka sisältää CUP1p-hirudiinin ekspressiokasetin ja täyspitkän CUP1-geenin

35

pPFY56 pilkotaan SnaBI:llä, leikattu plasmidi puhdistetaan ja tasaiset päät defosforyloidaan käsittelemällä alkalisella fosfataasilla. 1,3 ke [BamHI]tasapääfragment-

ti, joka sisältää CUP1:n (esimerkki 1) liitetään SnaBI-
 11ä leikattuun pPFY56:een. E. coli HB101 transformoidaan
 tuloksena saadulla plasmidilla pHE111. pHE111-plasmidista
 testataan metallotioneiinin ORF:n orientaatio pilkkomalla
 5 KpnI:llä. Metallotioneiinin ORF sijaitsee pHE111:ssa myö-
 täpäiväisessä orientaatioissa CUP1-hirudiinin ekspressio-
 kasetin suhteen. pHE111 esitetään kuviossa 3.

10 Esimerkki 4: *Saccharomyces cerevisiae* -kannan TR1456
konstruointi

Saccharomyces cerevisiae -kanta TR1456 konstruoidaan ku-
 ten EP-A-341 215:ssä on esitetty. Lähtien *Saccharomyces*
*cerevisiae*n kannasta H449, kaksi karboksipeptidaasia ysc α
 15 ja yscY poistetaan kahdessa peräkkäisessä koesarjassa
 kannasta H449 saattamalla niitä koodittavat geenit KEX1
 ja vastaavasti PRC1 useaan osaan. Ensin ositetaan ysc α :aa
 koodittava KEX1-geeni. Tätä tarkoitusta varten kanta H449
 transformoidaan KEX1-geeniä koodittavalla DNA-fragmentil-
 20 la, koko URA3-geenin ollessa liitettynä KEX1:tä kooditta-
 van alueen keskellä. Uraasilin suhteen prototrofiset
 transformantit valikoidaan ja niistä testataan ysc α -ak-
 tiivisuuden puuttuminen. Sen jälkeen KEX1-lokukseen lii-
 tetty URA3-geeni jaetaan osiin transformoimalla plasmi-
 25 dilla, joka sisältää URA3-geenin useassa osassa olevan
 version ura3 Δ 5 (EP-A-341 215). ura3-auksotrofiset trans-
 formantit valikoidaan ja jaetaan seuraavassa vaiheessa
 osiin endogeenisen PRC1-geenin osalta, joka koodittaa
 karboksipeptidaasi yscY:tä. Koe suoritetaan täysin analo-
 30 gisesti kuin on kuvailtu KEX1:n osituksessa. Tuloksena
 saatu H449-kannan isogeeninen johdannainen saa tunnuksen
 TR1456 ja sillä on seuraava genotyyppi:

TR1456 = MATa, leu2-3, 112, ura3, prb1, kex1::ura3,
 35 prc1::ura3, [cir⁰]

Esimerkki 5: *Saccharomyces cerevisiae*-kannan TR1456 kupariresistentin isogeenisen johdannaisen konstruointi

Saccharomyces cerevisiae kanta TR1456 on - muiden labora-
 5 toriohiivakantojen tavoin - kanta, joka on verrattain
 resistentti kuparin lisäykselle alustaan. Tämä resistens-
 si johtuu kromosomaalisen DNA:n 2 ke osan läsnäolosta,
 joka sisältää 2 kopiota CUP1-geenistä järjestettyinä pe-
 räkkäin (Hamer, D. et al., Science 228 (1985), 685-690).
 10 Suurten kuparimäärien ollessa läsnä alustassa saadaan
 vielä enemmän vastustuskykyisiä johdannaisia, mikä johtuu
 edellä mainitun 2 ke CUP1:n sisältävän kromosomaalisen
 DNA-osan toistosta peräkkäin. Voimakkaasti resistentin
 johdannaisen konstruoinniseksi *S. cerevisiae* TR1456 siir-
 15 rostetaan synteettiseen minimaalialustaan kuten esimer-
 kissä 6 on esitetty, joka sisältää lisäksi 1,2 mM kupari-
 sulfaattia. Viljelmää kasvatetaan 8 päivää 30°C:ssa ja 180
 rpm. Viljelämä maljataan sitten synteettiselle minimaali-
 alustalle ilman kuparilisäystä sopivassa tiheydessä eril-
 20 lispesäkkeiden saamiseksi. Valikoitujen erillispesäkkei-
 den DNA preparoidaan, pilkotaan EcoRI:llä, erotetaan aga-
 roosigeeleillä ja siitä analysoidaan CUP1-lokuksen läsnä-
 olo ja pituus Southern-blottauksella. Koeolosuhteet ovat
 Hamerin et al. mukaiset [edellä]. Yksi pesäke, jonka
 25 elektroforeettinen liikkuvuus CUP1-lokuksen osalta on
 siirtynyt, mikä osoittaa vähintään 10 CUP1-lokuskopion
 läsnäolon, valikoidaan ja nimetään *S. cerevisiae* TR1631
 -kannaksi.

30 Esimerkki 6: *S. cerevisiae* -kannan 55.6B (cup1::URA3)
 risteyttäminen *S. cerevisiae* -kannan TR1456 kanssa ja
 itiöanalyysi kupariherkkyyden suhteen

S. cerevisiae -kanta 55.6B (MATa his3 leu2 trp1 ura3-52,
 35 cup1::URA3; vrt. Thiele, D.J. et al., Science 231 (1986),
 854-856), josta puuttuu CUP1-lokus, risteytetään TR1456
 (MATa leu2-3,212, ura3Δ5, kex1, prb1, prc1) -kannan kans-

sa, joka sisältää suunnilleen 3 CUP1-lokuskopiota (so. 6 kopiota peräkkäin järjestyneestä CUP1-geenistä). Tästä risteytyksestä eristetään diploidit heterotsygoottiset solut, joiden genotyyppi on *cup1::URA3/CUP1*. Diploidisista soluista peräisin olevat tetradit eritellään geneettisten vakiomenetelmien mukaisesti [Methods in Yeast Genetics 1986 (Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B., edit) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.]. Jokaisen tetradin neljän itiön jälkeläisistä testataan niiden kyky kasvaa YPD-agarmaljoilla (10 g hiivauutetta, 20 g peptonia, 20 g glukosia ja 25 g agaria litraa kohti kahdesti tislattua vettä), jotka sisältävät lisäksi joko 0 μ M, 250 μ M, 500 μ M tai 1 mM kuparisulfaattia. Itiöt, jotka perivät intaktin CUP1-geenin, tuottavat jälkeläisiä, jotka kasvavat voimakkaasti kupariagarilla, kun taas itiöt, jotka perivät useassa osassa olevan *cup1::URA3*-geenin, tuottavat jälkeläisiä, jotka kasvavat heikosti kupariagarilla. Usean kokonaisen tetradin kahden kupariherkän itiön jälkeläisistä testataan niiden kyky pariutua TR1456-kannan kanssa. Pariutumistyyppiltään sopivan itiön jälkeläiset risteytetään TR1456:n kanssa ja diploidit heterotsygoottiset solut, joiden genotyyppi on *cup1::URA3/CUP1*, eristetään tästä risteytyksestä. Diploidisoluista peräisin olevat tetradit eritellään ja itiöiden herkkyyys kuparisulfaatille testataan kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 50:stä kokonaisesta tetradista saatujen kupariherkkien pesäkkeiden kasvu SD-agarilla testataan (6,7 g Bacto Yeast Nitrogen Base'a ilman aminohappoja, 20 g glukosia ja 25 g agaria vesilitraa kohti) ja SD-agarilla, johon on lisätty 200 μ M leusiinia. Pesäkkeet, jotka eivät kasva SD-maljoilla, mutta jotka kasvavat 200 μ M leusiinilla täydennetyllä SD-agarilla, ovat genotyyppiltään *cup1::URA3, HIS3, TRP1, leu2-3, 212* ja valitaan jatkotyöskentelyyn.

Esimerkki 7: Varmistettujen cup1::URA3-mutanttien luokittelu koskien lisävajavuutta proteaasi yscY:n ja proteaasi ysc α :n suhteen

5 S. cerevisiae cup1::URA3 -mutantit, jotka on saatu kuten
esimerkin 6 mukaisesti on esitetty, luokitellaan edelleen
proteaasivajavuuden perusteella, joita KEX1- ja PRC1-geenit
koodittavat. KEX1-geenin suhteen vajaat pesäkkeet
10 identifioidaan niiden alentuneen kyvyn perusteella erit-
tää α -tekijää. EP-A-341 215:n esimerkistä 1 voidaan löy-
tää yksityiskohtainen kuvaus menetelmästä, jota käytetään
erottamaan toisistaan pesäkkeet, jotka sisältävät villi-
tyypin KEX1-geenin, pesäkkeistä, jotka ovat kex1-geenin
suhteen mutatoituja. PRC1-geenivajaat pesäkkeet identifi-
15 oidaan biokemiallisen testin avulla, jossa mitataan PRC1-
geenituotteen proteolyyttistä aktiivisuutta, nimittäin
proteaasi yscY:n aktiivisuutta. Tätä testiä on kuvailtu
EP 341 215:ssä. Erillinen pesäke, jonka genotyyppi on
cup1::URA3, kex1, prc1, leu2-3,212, poimitaan ja sitä ni-
20 mitetään Saccharomyces cerevisiae HT462/TH3:ksi.

Esimerkki 8: Kantojen TR1456, TR1631 ja HT462/TH3 trans-
formointi plasmideilla pDP34/GAPFL-YHIR, pHE111, pHE112R
ja pPFY56

25 Plasmidit pPFY56, pDP34/GAPFL-YHIR, pHE111 ja pHE112R
siirretään isäntäkantoihin TR1456, TR1631 ja HT462 käyt-
tään transformaatio-ohjeistoa, jota Hinnen et al. on ku-
vaillut (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 1929).
30 Menetelmän lisäyksityiskohtia kuvaillaan EP-A-341
215:ssä. Transformoidut hiivakannat valikoidaan hiivan
minimaalialustoilla, joihin on lisätty optimipitoisuus
(kanta TR1456, 1631) tai suboptimipitoisuus (kanta HT462)
leusiinia. Yksittäiset transformoidut hiivakloonit eris-
35 tetään ja niitä nimitetään seuraavasti:

Saccharomyces cerevisiae TR1456/pDP34/GAPFL-YHIR

Saccharomyces cerevisiae TR1456/pPFY56

Saccharomyces cerevisiae HT462/pdp34/GAPFL-YHIR

Saccharomyces cerevisiae HT462/pPFY56

Saccharomyces cerevisiae HT462/pHE111

5 Saccharomyces cerevisiae HT462/pHE112R

Saccharomyces cerevisiae TR1631/pdp34/GAPFL-YHIR

Saccharomyces cerevisiae TR1631/pPFY56

10 Esimerkki 9: Desulfatohirudiinituotanto kannalla HT462, joka on transformoitu plasmidilla pDP34/GAPFL-YHIR tai pPFY56 tai pHE111 tai pHE112R ja viljelty ravistelupulloissa kompleksisella alustalla

15 Saccharomyces cerevisiaen soluja HT462/pDP34/GAPFL-YHIR tai HT462/pPFY56 tai HT462/pHE111 tai HT462/pHE112R kasvatetaan kutakin tyyppiä kahtena peräkkäisenä esiviljelynä 20 ml:ssa synteettistä alustaa, joiden koostumus on (g/l):

20	Difcon hiivatyyppialusta	
	(ilman aminohappoja)	6,7
	L-asparagiini	10
	L-histidiini	1
	glukoosi	20
25	L-leusiini	0,02

Alustan pH säädetään 5,8:aan. Ensimmäistä esiviljelmää kasvatetaan 60 tuntia 28°C:ssa ja 180 rpm. Toiseen esiviljelmään siirrostetaan 2 % (tilavuus/tilavuus) ensimmäisestä esiviljelmästä ja inkuboidaan 24 tuntia 28°C:ssa ja 180 rpm. Pääviljelmän alusta sisältää (g/l):

	peptoni	5
	hiivauute	10
35	glukoosi	20
	sakkaroosi	40
	ammoniumsulfaatti	3

	kaliumdivetyfosfaatti	2
	magnesiumsulfaattiheptahydraatti	0,5
	natriumkloridi	0,1
	kalsiumkloridi	0,1
5	biotiini	10^{-5}

Pääviljelmä (100 ml alustaa) siirrostetaan tiheydessä noin 10^6 solua/ml ja inkuboidaan 72 tuntia 28°C:ssa ja 180 rpm. Välittömästi siirrostamisen jälkeen steriiliä kuparisulfaattia lisätään haluttuina pitoisuuksina. Fermentoinnin lopussa otetaan viljelyeränäytteitä, solut poistetaan sentrifugoimalla ja kasvuston supernatantista analysoidaan desulfatohirudiini kuten EP-A-340 170:ssä on kuvailtu. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa 1.

Taulukko 1: Desulfatohirudiinituotanto kannalla HT462, joka on transformoitu monikopioplas-
mideilla, jotka joko sisältävät (plasmidit pHE111 ja pHE112R) tai joista puuttuu (plasmidit
pDP34/GAPFL-YHIR ja pPFY56) toiminnallinen kopio hiivan metallotioneiini (CUP1) -geenistä.

Desulfatohirudiinieritys (mg/l)

plasmidi	Kuparisulfaattipitoisuus (μM)													
	0	20	50	100	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	10000
pDP34-GAPFL-YHIR	75	73	73	66	41	8	0	0	0	0	0	0	0	0
pPFY56	99	103	104	107	34	3	0	0	0	0	0	0	0	0
pHE112R	80	72	109	115	137	150	168	184	191	177	160	137	132	110
pHE111	12	e.m.	e.m.	e.m.	182	228	271	261	240	222	202	179	160	90

Esimerkki 10: Plasmidien pHE111 ja pHE112R mittoottinen pysyvyys kantojen HT462/pHE111 ja HT462/pHE112R kasvatuksen aikana kompleksisella alustalla, johon on lisätty erilaisia kuparipitoisuuksia

5

Saccharomyces cerevisiae HT462/pHE111 - ja Saccharomyces cerevisiae HT462/pHE112R -soluja kasvatetaan kahtena peräkkäisenä esiviljelmänä 20 ml:ssa synteettistä alustaa kuten esimerkissä 9 on kuvailtu. Ne siirretään sen jälkeen kompleksiselle alustalle kuten esimerkissä 9 on kuvailtu solujen lähtötiheydessä noin 10^6 solua/ml. 72 tunnin inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa ja 180 rpm. viljelmät laimennetaan steriilillä NaCl-liuoksella (9 g/l vettä) ja sopiva tilavuus maljataan YPD-agarille (10 g hiivauutetta, 10 g peptonia, 20 g glukoosia, 30 agaria 1 l:ssa vettä). Saadut pesäkkeet toistomaljataan YPD-agarille, johon on lisätty 2 mM kuparisulfaattia. Plasmidin sisältävistä soluista peräisin olevat pesäkkeet kykenevät kasvamaan tällä substraatilla, kun taas plasmidin menettäneistä soluista peräisin olevat pesäkkeet kuolevat. Plasmidin sisältävien solujen osuus voidaan sen vuoksi laskea vertailemalla pesäkkeiden lukumäärää agarilla, joka sisältää tai ei sisällä 2 mM kuparisulfaattia. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa 2:

25

Taulukko 2: Plasmidien pHE111 ja pHE112R mittoottinen pysyvyys valintapaineen puuttuessa (ei kuparisulfaattia) tai sen läsnäollessa (20-4000 μ M kuparisulfaattia)

30

Plasmidin sisältäviä soluja (%)

	Kuparisulfaattia alustassa (μ M)						
	Kanta/plasmidi	0	20	100	500	1000	2000 4000
35	HT462/pHE111	47	54	65	89	96	e.m. 100
	HT462/pHE112R	95	e.m.	94	e.m.	100	100 100

Esimerkki 11: Desulfatohirudiinituotanto kannoilla TR1456 ja TR1631, jotka on transformoitu plasmideilla pDP34/GAPFL-YHIR tai pPFY56 ja kasvatettu ravistelupulloissa kompleksisella alustalla

5

Saccharomyces cerevisiae TR1456 - soluja (jotka sisältävät suunnilleen kuusi kromosomaalista CUP1-geenikopiota) tai Saccharomyces cerevisiae TR1631 -soluja (jotka sisältävät suunnilleen 20 CUP1-kopiota), transformoidaan kuten edellä on kuvailtu plasmideilla pPFY56 tai pDP34/GAPFL-YHIR. Myös kanta HT462/TH3 transformoidaan pHE111:lla. Kutakin transformoitua kantaa kasvatetaan kahtena peräkkäisenä esiviljelmänä minimaalialustassa, jota seuraa pääviljely kompleksisessa alustassa kuten esimerkissä 9 on kuvailtu. Välittömästi pääviljelmän siirrostamisen jälkeen steriiliä kuparisulfaattia lisätään halutuissa pitoisuuksissa. Fermentoinnin lopussa otetaan viljelmänäyte-eriä, solut poistetaan sentrifugoimalla ja kasvuston supernatantista analysoidaan desulfatohirudiini (kuten EP-A-340 170:ssä on esitetty). Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa 3:

Taulukko 3: Transformoidun TR1631-kannan vertaaminen transformoituun TR1456-kantaan

25

Desulfatohirudiinia (mg/l)

	Kanta/plasmidi	Kuparisulfaattipitoisuus (mM)				
		0	0,5	1	2	4
30	TR1631/pPFY56	0	0,5	1	2	4
	TR1631/pDP34/GAPFL-YHIR	105	e.m.	e.m.	e.m.	e.m.
	TR1456/pPFY56	5	184	239	87	39
	TR1456/pDP34/GAPFL/YHIR	109	e.m.	e.m.	e.m.	e.m.
	HT462/pHE111	12	182	228	271	261

35

Tulokset osoittavat CUP1-YHIR (mutta ei GAPFL-YHIR) -kasetin heikomman tuoton, kun hiivan metallotioneiiniproteiinia ilmennetään liikaa useista kromosomaalisista koproioista (TR1631). Pääinvastaisesti, hiivan metallotioneiinin ilmentäminen monikopioisesta plasmidista (kuten kannassa HT462/pHE111) lisää hirudiinin saantoa. Vaikka CUP1:n integroituminen ekspressioplasmidiin tuottaa korkeampia hirudiinisaantoja, CUP1:n yli-ilmentäminen kromosomista itse asiassa alentaa tiittereitä.

10

Ekspressioplasmidiin integroituneesta CUP1:n kopiosta on tuloksena myös paljon laajempi kuparipitoisuusalue, jossa hyvä tuottavuus voidaan saada aikaan (taulukot 1 ja 3).

15 Esimerkki 12: pFBY23:n konstruointi

2 µg pFBY2:ta hydrolysoidaan (katkaistaan) loppuun FspI:llä CA-puskurissa (20 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani; 7 mM MgCl₂; 5 mM ditiotreitoli; 100 mM KCl; HCl:llä pH 7,5:een). Restriktioendonukleaasi inaktivoidaan kuumentamalla 65°C:ssa 10 minuuttia. Tilavuus kaksinkertaistetaan lisäämällä vettä ja DNA-fragmentit tasapäistetään yhdellä yksiköllä T4-polymeraasia, kun läsnä on 0,05 mM kutakin yhdisteistä dATP, dCTP, dGTP ja dTTP, 30 min. ajan 37°C:ssa. Entsyymi lämpöinaktivoidaan 65°C:ssa 10 min. kulussa. Etanolisaostuksen jälkeen DNA katkaistaan uudelleen HindIII:lla ja EcoRI:llä. Nämä fragmentit erotetaan 2 %:isella LGT-geelillä (matalassa lämpötilassa geelilytyvä agarooosi) TAE-puskurissa (40 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani; 2 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo (dinatriumsuola), etikkahapolla pH 7,6:een). 170 ep ja 523 ep fragmentit leikataan irti ja DNA:t puhdistetaan ElutipD[®]-kromatografian avulla.

35 2 µg pTZ18R:ää hydrolysoidaan loppuun EcoRI:llä ja HindIII:lla CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 2,8 kep vyöhyke

leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD[®]-kromatografian avulla.

Suunnilleen 20 ng kutakin valmistettua fragmenttia ligoidaan yhdessä 10 pmoolin kanssa fosforyloimatonta BamHI-linkkeriä, jonka sekvenssi on GGGATCCC, ja 1 mM kanssa ATP:tä ja ligaatiopuskuria, 0,5 yksiköllä T4-ligaasia 3 tunnin kuluessa huoneen lämpötilassa.

Tätä ligaatioseosta käytetään transformoitaessa 40 µl kompetentteja E. coli DH5αF' -soluja ja maljataan 2YT-maljoille (16 g tryptonia; 10 g hiivauutetta; 10 g NaCl:a litraa kohti H₂O:ta), jotka sisältävät ampisilliiniä, Xgal:a ja IPTG:tä. pFBY23:n varmistamiseksi valkoisia pesäkkeitä poimitaan 16 tunnin inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa ja miniseulotaan käyttäen EcoRI/HindIII-kaksoispilkontaa oikean insertin läsnäolon varmistamiseksi ja HindIII/BamHI-kaksoispilkontaa BamHI-linkkerin osoittamiseksi aikaisemmassa FspI-kohdassa.

20

Esimerkki 13: pFBY24:n konstruointi

2 µg pFBY23:a hydrolysoidaan loppuun HindIII:lla ja EcoRI:llä CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 701 ep vyöhyke leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD-kromatografian avulla.

2 µg pFBY2:ta hydrolysoidaan loppuun HindIII:lla ja PstI:llä CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 3,8 kep fragmentti leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD-kromatografian avulla.

2 µg pFBY2:ta hydrolysoidaan loppuun PstI:llä ja XbaI:llä CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 1,95 kep fragmentti leika-

taan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD-kromatografian avulla.

2 μ g pFBY2:ta hydrolysoidaan loppuun XbaI:llä ja EcoRI:llä CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 2,9 kep fragmentti leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD-kromatografian avulla.

Suunnilleen 20 ng kutakin valmistettua fragmenttia ligoidaan yhdessä, kun läsnä on 1 mM ATP:tä ja ligaatiopuskuria, 0,5 yksiköllä T4-ligaasia 3 tunnin kuluessa huoneen lämpötilassa.

Tätä ligaatioseosta käytetään transformoitaessa 40 μ l kompetentteja E. coli DH5 α F' -soluja ja maljataan 2YT-maljoille, jotka sisältävät ampisilliiniä, Xgal:a ja IPTG:tä. 16 tunnin inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa valkoisia pesäkkeitä poimitaan ja miniseulotaan käyttäen HindIII-I/EcoRI-, ja PstI/XbaI-kaksoispilkontoja oikeiden inserttien läsnäolon varmistamiseksi ja BamHI:tä uuden BamHI-kohdan läsnäolon osoittamiseksi.

pFBY24 on identtinen pFBY2:n kanssa plasmidien pTZ18R ja 2 μ täydellisten sekvenssien ollessa suoraan toistuvien FRT-kohtien erottamat, lukuun ottamatta BamHI-kohdan insertiota FspI-kohtaan FLP-geenin 3'-päässä.

Esimerkki 14: pFBY74:n konstruointi

2 μ g pFBY29:ää hydrolysoidaan loppuun BamHI:llä CA-puskurissa. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 2,0 kep vyöhyke leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD[®]-kromatografian avulla.

2 μ g pFBY24:ää hydrolysoidaan loppuun BamHI:llä CA-puskurissa. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan 500 yksiköllä BAP:tä BAP-puskurissa (50 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani;

50 mM NaCl; HCl:llä pH 8,0:aan) 65°C:ssa 30 min. kuluessa vektorin itseligaation estämiseksi. Nämä fragmentit erotetaan 0,8 %:isella LGT-geelillä TAE-puskurissa. 9,3 kepvyöhyke leikataan irti ja DNA puhdistetaan ElutipD⁺-kromatografian avulla.

Suunnilleen 20 ng valmistettuja fragmentteja ligoidaan yhdessä, kun läsnä on 1 mM ATP:tä ja ligaatiopuskuria, 0,5 yksiköllä T4-ligaasia 3 tunnin kuluessa huoneen lämpötilassa.

Tätä ligaatioseosta käytetään transformoitaessa 40 µl kompetentteja *E. coli* DH5αF' -soluja ja maljataan 2YT-maljoille, jotka sisältävät ampisilliiniä, Xgal:a ja IPTG:tä. 16 tunnin inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa valkoisia pesäkkeitä poimitaan ja miniseulotaan käyttäen BamHI- ja SalI/XbaI-kaksoispilkontoja oikeiden inserttien läsnäolon ja orientaation varmistamiseksi. LEU2-geeni on samassa orientaatioissa kuin pFBY74:n ampR.

20 pFBY74 on symmetrinen, LEU2:n sisältämä kaksimikroniplasmidi, joka menettää bakteeriset sekvenssit hiivassa.

Esimerkki 15: Plasmidien pMK18 ja pMK19 konstruointi:
25 Kaksi symmetristä 2-mikroniplasmidia, jotka menettävät bakteerisekvenssit hiivassa ja sisältävät GAPFLp-hirudii-
nin ekspressiokasetin ja CUP1-geenin

2 µg plasmidia pFBY4 katkaistaan EcoRI:llä. Saatu DNA-fragmentti ajetaan preparatiivisella 0,8 %:isella agarosegeelillä, leikataan irti ja puhdistetaan ElutipD⁺-kromatografian avulla (Schleicher und Schüll, Dassel, Saksa). Fragmentti tehdään seuraavaksi tasapäiseksi 1 yksiköllä T4-polymeraasia, kun läsnä on 0,05 mM kutakin dATP, dCTP, dGTP ja dTTP, 30 min. kuluessa 37°C:ssa. Poly-
35 meraasi lämpöinaktivoidaan 65°C:ssa 10 min. kuluessa.

Suunnilleen 30 ng fragmenttia ligoidaan yhdessä 0,4 pmoolin kanssa fosforyloimatonta SalI-linkkeriä, jolla on sekvenssi GGTCGACC, ja 1 mM kanssa ATP:tä, 0,5 yksiköllä T4-ligaasia 3 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Ligaatioseosta käytetään transformoitaessa kompetentteja *E. coli* DH5 α F' -soluja (Hanahan, D.: J. Mol. Biol. 166 (1983), 557, ja solut maljataan LB-alustalle, joka sisältää ampisilliiniä. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet poimitaan ja analysoidaan katkaisemalla niiden plasmidi-DNA SalI:llä SalI-linkkerin osoittamiseksi aikaisemmassa EcoRI-kohdassa. Saatua plasmidia nimitetään pMK2:ksi.

2 μ g pMK2:ta katkaistaan BamHI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan 500 yksiköllä BAP:tä (naudan alkalinen fosfa-taasi) BAP-puskurissa 65°C:ssa 30 min. kuluessa. Fragmentti ajetaan preparatiivisella 0,8 %:isella agarosigeelillä, leikataan irti ja puhdistetaan ElutipD[®]-kromatografian avulla. Fragmentti tehdään sen jälkeen tasapäiseksi kuten edellä on kuvailtu. 2 μ g FBY5:ttä katkaistaan SalI:llä. 1,1 ke fragmentti, joka sisältää GAPFLp-hirudiinin ekspressiokasetin erotetaan 0,8 %:isella agarosigeelillä, puhdistetaan ja tasapäistetään T4-polymeraasin avulla kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 22 ng kutakin valmistetuista fragnmenteista ligoidaan yhdessä ja ligatioseos transformoidaan kompetentteihin DH5 α F'-soluihin kuten edellä on kuvailtu. Ampisilliiniresistenttejä pesäkkeitä poimitaan ja analysoidaan käyttäen PstI:tä oikean insertin läsnäolon varmistamiseksi ja orientaation määrittämiseksi. Muodostettuja plasmideja nimitetään tunnuksilla pMK12 ja pMK13. pMK12 sisältää GAPFLp-hirudiinin ekspressiokasetin käänteisessä orientaatioissa verrattaessa URA3-geeniin, kun taas pMK13 sisältää vastaavat geenit samassa orientaatioissa.

2 μ g pFBY74:ää katkaistaan SnaBI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan BAP:llä ja saatu DNA-fragmentti puhdistetaan 0,8 %:isella agarosigeelillä ja ElutipD[®]-kromatografialla

kuten edellä on kuvailtu. 2 μ g pMK12:ta katkaistaan SalI:llä. 2,3 ke fragmentti, joka sisältää GAPFLp-hirudiini-ekspressiokasetin ja URA3-geenin, geelipuhdistetaan ja tasapäistetään kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 20
 5 ng kumpaakin, katkaistua pFBY74:ää ja pMK12-fragmenttia ligoidaan yhdessä ja transformoidaan kompetentteihin E. coli DH5 α F' -soluihin kuten edellä on kuvailtu. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet analysoidaan katkaisemalla plasmidi-DNA SalI:llä ja NcoI:llä oikean insertin varmistamiseksi ja orientaation määrittämiseksi. Kaksi plasmidia saadaan, pMK14 ja pMK15. Ero näiden kahden plasmidin välillä on siinä, että ensin mainitussa GAPFLp-hirudiini-ekspressiokasetilla on käänteinen ja jälkimmäisellä sama orientaatio verrattaessa LEU2-geeniin.

15

2 μ g pMK14:sta katkaistaan SalI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan BAP:llä ja DNA-fragmentti geelipuhdistetaan kuten edellä on kuvailtu. Fragmentti tehdään sen jälkeen tasapäiseksi T4-polymeraasin avulla. 2 μ g pHE105:ttä
 20 (esimerkki 1) katkaistaan KpnI:llä. 940 ep fragmentti, joka sisältää CUP1-geenin oma promoottori mukaanlukien, erotetaan 1 %:isella agarosigeelillä, puhdistetaan ja tehdään tasapäiseksi T4-polymeraasin avulla kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 20 ng kutakin valmistettua fragmenttia ligoidaan yhdessä T4-ligaasin avulla kuten on
 25 kuvailtu. Ligaatioseosta käytetään DH5 α F'-solujen transformointiin. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet poimitaan ja niiden plasmidi-DNA analysoidaan käyttäen BamHI:tä oikean insertin läsnäolon ja orientaation varmistamiseksi. Saatuja plasmideja nimitetään tunnuksilla pMK18 ja
 30 pMK19 (kuviot 4 ja 5). Ero näiden kahden välillä on siinä, että ensin mainitussa CUP1-geenillä on sama orientaatio ja jälkimmäisessä käänteinen orientaatio verrattaessa GAPFLp-hirudiinin ekspressiokasettiin.

35

Esimerkki 16: Plasmidien pMK26 ja pMK27 konstruointi:
Kaksi symmetristä 2-mikroniplasmidia, jotka menettävät
bakteerisekvenssit hiivassa ja sisältävät CUP1-hirudiinin
ekspressiokasetin ja CUP1-geenin

5

2 µg pMK2:ta (esimerkki 15) katkaistaan BamHI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan 500 yksiköllä BAP:tä (naudan alkalinen fosfataasi) BAP-puskurissa 65°C:ssa 30 min. kuluessa. Fragmentti ajetaan preparatiivisella 0,8

10 %:isella agarosigeelillä, leikataan irti ja puhdistetaan ElutipD-kromatografialla (Schleicher und Schüll, Dassel, Saksa). Fragmentti tehdään sen jälkeen tasapäiseksi 1 yksiköllä T4-polymeraasia, kun läsnä on 0,05 mM kutakin ryhmästä dATP, dCTP, dGTP ja dTTP 30 min. ajan 37°C:ssa.
 15 Polymeraasi lämpöinaktivoidaan 65°C:ssa 10 min. ajan.

2 µg pPFY53:a (esimerkki 2) katkaistaan SalI:llä. 1,3 ke fragmentti, joka sisältää CUP1-hirudiini-ekspressiokasetin, erotetaan 0,8 %:isella agarosigeelillä, puhdistetaan ja tehdään tasapäiseksi T4-polymeraasin avulla kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 20 ng kutakin valmistettua fragmenttia ligoidaan yhdessä, kun läsnä on 1 mM ATP:tä, 0,5 yksiköllä T4-ligaasia 3 tunnin kuluessa huoneenlämpötilassa. Ligaatioseosta käytetään transformoitaessa kompetentteja E. coli DH5αF' -soluja (Hanahan, D.: J. Mol. biol. 166 (1983), 557) ja solut maljataan LB-alustalle, joka sisältää ampisilliiniä. Ampisilliini-resistentit pesäkkeet poimitaan ja analysoidaan käyttäen XbaI:tä oikean insertin läsnäolon varmistamiseksi ja
 25 orientaation määrittämiseksi. Muodostettuja plasmideja nimitetään tunnuksilla pMK3/1 ja pMK3/2. pMK3/1 sisältää CUP1p-hirudiini-ekspressiokasetin samassa orientaatioissa verrattaessa URA3-geeniin, kun taas pMK3/2 sisältää vastaavat geenit käänteisessä orientaatioissa.
 30

35

2 µg pFBY74:ää katkaistaan SnaBI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan BAP:llä ja saatu DNA-fragmentti puhdistetaan

0,8 %:isella agarosigeelillä ja ElutipD-kromatografiolla kuten edellä on kuvailtu. 2 µg pMK3/2:ta katkaistaan SalI:llä. 2,6 ke fragmentti, joka sisältää CUP1p-hirudiini-ekspressiokasetin ja URA3-geenin, geelipuhdistetaan ja

5 tasapäistetään kuten edellä on kuvailtu. Suunnilleen 20 ng kumpaakin, katkaistua pFBY74:ää ja pMK3/2-fragmenttia ligoidaan yhdessä ja transformoidaan kompetentteihin E. coli DH5αF' -soluihin kuten edellä on kuvailtu. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet analysoidaan katkaisemalla

10 plasmidi-DNA SalI:llä ja NcoI:llä oikean insertin varmistamiseksi ja orientaation määrittämiseksi. Kaksi plasmidia saadaan, pMK5x1 ja pMK5x2. Ero näiden kahden plasmidin välillä on siinä, että ensin mainitussa CUP1p-hirudiini-ekspressiokasetilla on käänteinen ja jälkimmäisellä

15 sama orientaatio verrattaessa LEU2-geeniin.

2 µg pMK5x1:tä katkaistaan SalI:llä. 5'-fosfaattiryhmät poistetaan BAP:llä ja DNA-fragmentti geelipuhdistetaan kuten edellä on kuvailtu. Fragmentti tehdään sen jälkeen

20 tasapäiseksi T4-polymeraasin avulla. 2 µg pHE105:ttä (esimerkki 1) katkaistaan KpnI:llä. 940 bp fragmentti, joka sisältää CUP1-geenin oma promoottori mukaanlukien, erotetaan 1 %:isella agarosigeelillä, puhdistetaan ja tehdään tasapäiseksi T4-polymeraasin avulla kuten edellä

25 on kuvailtu. Suunnilleen 20 ng kutakin valmistettua fragmenttia ligoidaan yhdessä T4-ligaasin avulla kuten on kuvailtu. Ligaatioseosta käytetään transformoitaessa E. coli DH5αF' -soluja. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet poimitaan ja niiden plasmidi-DNA analysoidaan käyttäen

30 BamHI:tä oikean insertin läsnäolon ja orientaation varmistamiseksi. Saatuja plasmideja nimitetään tunnuksilla pMK26 ja pMK27 (kuviot 6 ja 7). Ero näiden kahden plasmidin välillä on siinä, että ensin mainitussa CUP1-geenillä on sama orientaatio ja jälkimmäisellä käänteinen orientaatio verrattaessa CUP1-hirudiini-ekspressiokasettiin.

35

Mikro-organismien tallettaminen

Seuraavat mikro-organismikannat talletettiin the Deutsche
 Sammlung von Mikroorganismen'iin (DSM), Mascheroder Weg
 5 1b, D-3300 Braunschweig (talletusnumerot ja talletuspäi-
 vämäärät esitetty):

	<u>Saccharomyces cerevisiae</u> H449	DSM 4413	18.2.1988
	<u>Saccharomyces cerevisiae</u> HT462/TH3	DSM 7190	22.7.1992
10	<u>E. coli</u> JM109/pDP34	DSM 4473	14.3.1988
	<u>E. coli</u> DH5 α F'/pFBY2	DSM 6271	14.12.1990
	<u>E. coli</u> DH5 α F'/pFBY4	DSM 6272	14.12.1990
	<u>E. coli</u> DH5 α F'/pFBY5	DSM 6273	14.12.1990
	<u>E. coli</u> DH5 α F'/pFBY29	DSM 6275	14.12.1990

15

Sekvenssiluettelo

(1) Yleistiedot:

5 (i) Hakijat

- (A) Nimi: CIBA-GEIGY AG
- (B) Katuosoite: Klybeckstr. 141
- (C) Kaupunki: Basel
- (E) Maa: Sveitsi
- 10 (F) Postinumero: 4002
- (G) Puhelin: +41 61 69 11 11
- (H) Telefax: + 41 61 696 79 76
- (I) Telex: 962 991

- 15 (A) Nimi: UCP Gen-Pharma AG
- (B) Katuosoite: Kraftstrasse 6
- (C) Kaupunki: Zürich
- (E) Maa: Sveitsi
- (F) Postinumero: 8044

20

(ii) Keksinnön nimitys: Menetelmä peptidien valmistamiseksi

(iii) Sekvenssien lukumäärä: 6

25

(2) Informaatio Sekvenssille n:o: 1:

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 1318 emäsparia
- 30 (B) Tyyppi: nukleiinihappo
- (C) Juosteisuus: yksinkertainen
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: DNA (genominen)

35

(ix) Yksityiskohdat:

- (A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus

(B) Sijainti: 1..6

(C) Muu tieto: /toiminto="BamHI-linkkeri"

(ix) Yksityiskohdat:

5 (A) Nimi/Selitys: promoottori

(B) Sijainti: 7..460

(C) Muu tieto: /standardi_nimi="CUP1-promoottori"

(ix) Yksityiskohdat:

10 (A) Nimi/Selitys: CDS

(B) Sijainti: 461..646

(C) Muu tieto: /tuote="metallotioneiini"

(ix) Yksityiskohdat:

15 (A) Nimi/Selitys: terminaattori

(B) Sijainti: 647..1312

(C) Muu tieto: /standardi_nimi="CUP1 transkription
terminaattorisekvenssi"

20 (ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus

(B) Sijainti: 1313..1318

(C) Muu tieto: /toiminto="BamHI-linkkeri"

25 (xi) Sekvenssikuvaus: Sekvenssi n:o 1:

GGATCCCAT TACCGACATT TGGGCGCTAT ACGTGCATAT GTTCATGTAT GTATCTGTAT	60
TTAAACACT TTTGTATTAT TTTTCCTCAT ATATGTGTAT AGGTTTATAC GGATGATTTA	120
ATTATTACTT CACCACCCTT TATTTCAAGC TGATATCTTA GCCTTGTTAC TAGTTAGAAA	180
AAGACATTTT TGCTGTCAGT CACTGTCAAG AGATTCTTTT GCTGGCATT CTTCTAGAAG	240
CAAAAAGAGC GATGCGTCTT TTCCGCGGAA CCGTTCCAGC AAAAAAGACT ACCAACGCAA	300
TATGGATTGT CAGAATCATA TAAAAGAGAA GCAAATAACT CCTTGTCTTG TATCAATTGC	360

ATTATAATAT CTTCTTGTTA GTGCAATATC ATATAGAAGT CATCGAAATA GATATTAAGA	420
AAAACAAACT GTACAATCAA TCAATCAATC ATCACATAAA ATG TTC AGC GAA TTA	475
Met Phe Ser Glu Leu	
1 5	
ATT AAC TTC CAA AAT GAA GGT CAT GAG TGC CAA TGC CAA TGT GGT AGC	523
Ile Asn Phe Gln Asn Glu Gly His Glu Cys Gln Cys Gln Cys Gly Ser	
10 15 20	
TGC AAA AAT AAT GAA CAA TGC CAA AAA TCA TGT AGC TGC CCA ACG GGG	571
Cys Lys Asn Asn Glu Gln Cys Gln Lys Ser Cys Ser Cys Pro Thr Gly	
25 30 35	
TGT AAC AGC GAC GAC AAA TGC CCC TGC GGT AAC AAG TCT GAA GAA ACC	619
Cys Asn Ser Asp Asp Lys Cys Pro Cys Gly Asn Lys Ser Glu Glu Thr	
40 45 50	
AAG AAG TCA TGC TGC TCT GGG AAA TGAAACCGCG GGTCTTTAAT ATATTCATCT	673
Lys Lys Ser Cys Cys Ser Gly Lys	
55 60	
AACTATTTGC TGTTTTTAAT TTTTAAAAGG AGAAGGAAGT TTAATCGACG ATTCTACTCA	733
GTTTGAGTAC ACTTATGTAT TTTGTTTAGA TACTTTGTTA ATTTATAGGT ATACGTTAAT	793
AATTAAGAAA AGGAAATAAA GTATCTCCAT ATGTCGCCCC AAGAATAAAA TATTATTACC	853
AAATTCTAGT TTGCCTAACT TACAACTCTG TATAGAATCC CCAGATTTTCG AATAAAAAAA	913
AAAAAAAAG CTATTCATGG TACCCGCTGC TGAAAACCTA TCTCCGATAC CTGCCTCTAT	973
TGATACGAAC GACATTCCTT TAATTGCTAA CGATTTAAAA TTACTGGAAA CGCAAGCAAA	1033
ATTGATAAAT ATTCTGCAAG GTGTTCCCTT CTAATTGCCA GTAAATTTAA CCAAATTGA	1093

AAGTCTGATA GAAACCTTGA CTATGGGCGT GAGTAATACA GTAGACTTAT ATTTTCATGA 1153
 CAACGAAGTC AGAAAAGAAT GGAAAGACAC TTAAATTTT ATCAATACCA TTGTTTATAC 1213
 AAATTTTTTC CTTTTTGTTT AAAACGAATC CTCTTTGTCC ATGGCAGTTC AACATTCTTC 1273
 TAACAACAAT AAGACCTCGA ACTCTGAAAG ATGTGCAAAG GATCC 1318

(2) Informaatio Sekvenssille n:o: 2:

10

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 61 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

15

(ii) Molekyyllityyppi: proteiini

(xi) Sekvenssikuvaus: Sekvenssi n:o 2:

Met	Phe	Ser	Glu	Leu	Ile	Asn	Phe	Gln	Asn	Glu	Gly	His	Glu	Cys	Gln
1				5					10					15	
Cys	Gln	Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Asn	Asn	Glu	Gln	Cys	Gln	Lys	Ser	Cys
			20					25					30		
Ser	Cys	Pro	Thr	Gly	Cys	Asn	Ser	Asp	Asp	Lys	Cys	Pro	Cys	Gly	Asn
		35					40					45			
Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Ser	Cys	Cys	Ser	Gly	Lys			
	50					55					60				

(2) Informaatio Sekvenssille n:o: 3:

35 (i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 1082 emäsparia
- (B) Tyyppi: nukleiinihappo

(C) Juosteisuus: yksinkertainen

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: DNA (genominen)

5

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus

(B) Sijainti: 1..6

(C) Muu tieto: /toiminto="BamHI-linkkeri"

10

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: promoottori

(B) Sijainti: 7..432

(C) Muu tieto: /standardi_nimi="CUP1-promoottori"

15

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus

(B) Sijainti: 433..441

(C) Muu tieto: /toiminto="EcoRI-linkkeri"

20

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: sig_peptidi

(B) Sijainti: 442..492

(C) Muu tieto: /standardi_nimi="PH05-signaalisek-
venssi"

25

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: valmis_peptidi

(B) Sijainti: 493..690

30

(C) Muu tieto: /tuote="desulfatohirudiini"/standar-
di_nimi="HV1"

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: terminaattori

35

(B) Sijainti: 691..1068

(C) Muu tieto: /standardi_nimi="PH05-terminaattori"

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus

(B) Sijainti: 1069..1082

(C) Muu tieto: /toiminto="SalI-linkkeri"

5

(ix) Yksityiskohdat:

(A) Nimi/Selitys: CDS

(B) Sijainti: 442..690

(C) Muu tieto: /tuote="primääritranskripti"

10

```

GGATCCCAT TACCGACATT TGGGCGCTAT ACGTGCATAT GTTCATGTAT GTATCTGTAT      60

TTAAAACACT TTTGTATTAT TTTTCCTCAT ATATGTGTAT AGGTTTATAC GGATGATTTA      120

ATTATTACTT CACCACCCTT TATTTAGGC TGATATCTTA GCCTTGTTAC TAGTTAGAAA      180

AAGACATTTT TGCTGTCAGT CACTGTCAAG AGATTCTTTT GCTGGCATT CTCTAGAAG      240

CAAAAAGAGC GATGCGTCTT TTCCGCTGAA CCGTCCAGC AAAAAAGACT ACCAACGCAA      300

TATGGATTGT CAGAATCATA TAAAAGAGAA GCAAATAACT CCTTGTCTTG TATCAATTGC      360

ATTATAATAT CTCTTGTTA GTGCAATATC ATATAGAAGT CATCGAAATA GATATTAAGA      420

AAAACAAACT GTGAATTCAA A ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA      471
                Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu
                -17      -15                        -10

GCC GCT TCT TTG GCC AAT GCA GTT GTT TAC ACC GAC TGT ACC GAA TCT      519
Ala Ala Ser Leu Ala Asn Ala Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser
                -5                        1                        5

GGT CAA AAC TTG TGT TTG TGT GAA GGT TCT AAC GTT TGT GGT CAA GGT      567
Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly
                10                        15                        20                        25

AAC AAG TGT ATC TTG GGT TCT GAC GGT GAA AAG AAC CAA TGT GTT ACC      615
Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr
                30                        35                        40

```

GGT GAA GGT ACC CCA AAG CCA CAA TCT CAC AAC GAC GGT GAC TTC GAA	663
Gly Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu	
45 50 55	
GAA ATC CCA GAA GAA TAC TTG CAA TAGGATCCTG GTACGTTCTT CAAGGTGCTC	717
Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln	
60 65	
GTGTCTACAC CGAAAAATTC CAATGTTCTA ACGACACCTA CGTCAGATAC GTCATTAACG	777
ATGCTGTTGT TCCAATTGAA ACCTGTTCCA CTGGTCCAGG GTTCTCTTGT GAAATCAATG	837
ACTTCTACGA CTATGCTGAA AAGAGAGTAG CCGGTACTGA CTTCTTAAAG GTCTGTAACG	897
TCAGCAGCGT CAGTAACTCT ACTGAATTGA CCTTCTACTG GGACTGGAAC ACTACTCATT	957
ACAACGCCAG TCTATTGAGA CAATAGTTTT GTATACTAA ATAATATTGG AACTAAATA	1017
CGAATACCCA AATTTTTTAT CTAAATTTTG CCGAAAGATT AAAATCTGCA GCCAAGCTGG	1077
TCGAC	1082

25

(2) Informaatio Sekvenssille n:o: 4

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- 30 (A) Pituus: 82 aminohappoa
 (B) Tyyppi: aminohappo
 (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: aminohappo

35

(xi) Sekvenssikuvaus: Sekvenssi n:o 4:

20

(A) Pituus: 28 emäsparia
(B) Tyyppi: nukleiinihappo
(C) Juosteisuus: yksinkertainen
(D) Topologia: lineaarinen

(ix) Yksityiskohdat:

30

- (A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus
(B) Sijainti: 1..28
(C) Muu tieto: /toiminto="aluke PCR:ään"

35

GGATCCATTA CCGACATTTG GGCGCTAT

(2) Informaatio Sekvenssille n:o: 6

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 30 emäsparia
- 5 (B) Tyyppi: nukleinihappo
- (C) Juosteisuus: yksinkertainen
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: DNA (genominen)

10

(ix) Yksityiskohdat:

- (A) Nimi/Selitys: sekal_ominaisuus
- (B) Sijainti: 1..30
- (C) Muu tieto: /toiminto="aluke PCR:ään"

15

(xi) Sekvenssikuvaus: Sekvenssi n:o 6

GAATTCACAG TTTGTTTTTC TTAATATCTA

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä polypeptidin tuottamiseksi, jossa menetelmässä hiivakantaa viljellään kompleksisessa kasvualustassa, **tunnettu** siitä, että kanta sisältää genomissaan vain yhden toiminnallisen CUP1-geenin, ja sisältää hiivan kaksimikroni-peräisen plasmidin, joka sisältää toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiokasetin, ja tuotettu polypeptidi eristetään; jolloin kasvualustaan lisätään CUP1-promoottorin indusoiva määrä kuparisuolaa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polypeptidin ekspressiokasetti käsittää hiivapromoottorin, joka on toimivasti kytketty hiivan signaaliptidiä koodittavaan ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidiä koodittavaan toiseen DNA-sekvenssiin, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaalit.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että promoottori on hiivan CUP1-promoottori tai hiivan GAPFL-promoottori.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on heterologinen polypeptidi.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on desulfatohirudiini.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on desulfatohirudiinin muunnelma HV1.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hiivakanta on Saccharomyces cerevisiae.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hiivakanta on yhden tai useamman proteaasin suhteen vajavainen.
- 5 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hiivakannalta puuttuu CUP1-geenituoteaktiivisuus.
- 10 10. Hiivan kaksimikroni-peräinen hybridiplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää toiminnallisen CUP1-geenin ja polypeptidin ekspressiopaksetin.
- 15 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen hiivaplasmiidi, **tunnettu** siitä, että polypeptidin ekspressiokasetti koostuu hiivapromoottorista toimivasti kytkettynä hiivan signaali-
leptidiä koodittavaan ensimmäiseen DNA-sekvenssiin, joka on kytketty oikeassa lukukehyksessä polypeptidiä koodittavaan toiseen DNA-sekvenssiin, ja DNA-sekvenssin, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaali-
20
12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmiidi, **tunnettu** siitä, että promoottori on GAPFL tai hiivan CUP1-promoottori; signaali-
leptidiä koodittava DNA-sekvenssi on hiivan invertaasin, α -tekijän, feromonipeptidaasin
25 (KEX1), "tappajatoksiinin" tai repressoituvan happamen fosfataasin (PHO5) geenin signaali- ja preprosekvenssi tai Aspergillus awamorin glukoamylaasin signaalisekvenssi; ja DNA-sekvenssi, joka sisältää hiivan transkription lopetussignaali-
30 sekvenssi, joka sisältää oikeat signaalit transkription lopetukselle ja polyadenylaatiolle.
13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmiidi, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on desulfatohirudiini.
- 35 14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmiidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää 1082 ep BamHI/SalI-fragmen-

tin, joka sisältää CUP1-promoottorin, PH05-ohjaussekvenssin, hirudiinigeenin ja PH05-terminaattorin, esitettynä Sekvenssi 3:ssa; tai patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää 1311 ep Bam-HI-fragmentin, joka sisältää CUP1-promoottorin, CUP1:n kooditusalueen ja CUP1-terminaattorin, esitettynä Sekvenssi 1:ssä.

15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää täydellisen kaksimikroni-DNA:n.

16. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmidi, **tunnettu** siitä, että se on symmetrinen ja siitä puuttuvat bakteerisekvenssit.

17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää 1-3 lisäksi tulevaa polypeptidin ekspressiokasettia.

18. Patenttivaatimuksen 11 mukainen hiivaplasmidi, **tunnettu** siitä, että se sisältää yhden lisäksi tulevan transkriptionaalisen ACE1-aktivaattorin ekspressiokasetin.

19. Hiivakanta, **tunnettu** siitä, että se sisältää vain yhden toiminnallisen CUP1-geenin genomissa ja käsittää hiivan hybridiplasmidin, joka sisältää polypeptidin ekspressiokasetin ja toiminnallisen CUP1-geenin.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen hiivakanta, **tunnettu** siitä, että siltä puuttuu genomisen CUP1-geenin tuoteaktiivisuus.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen hiivakanta, **tunnettu** siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 11 mukaisen hiivaplasmidin.

Figure 1 /7

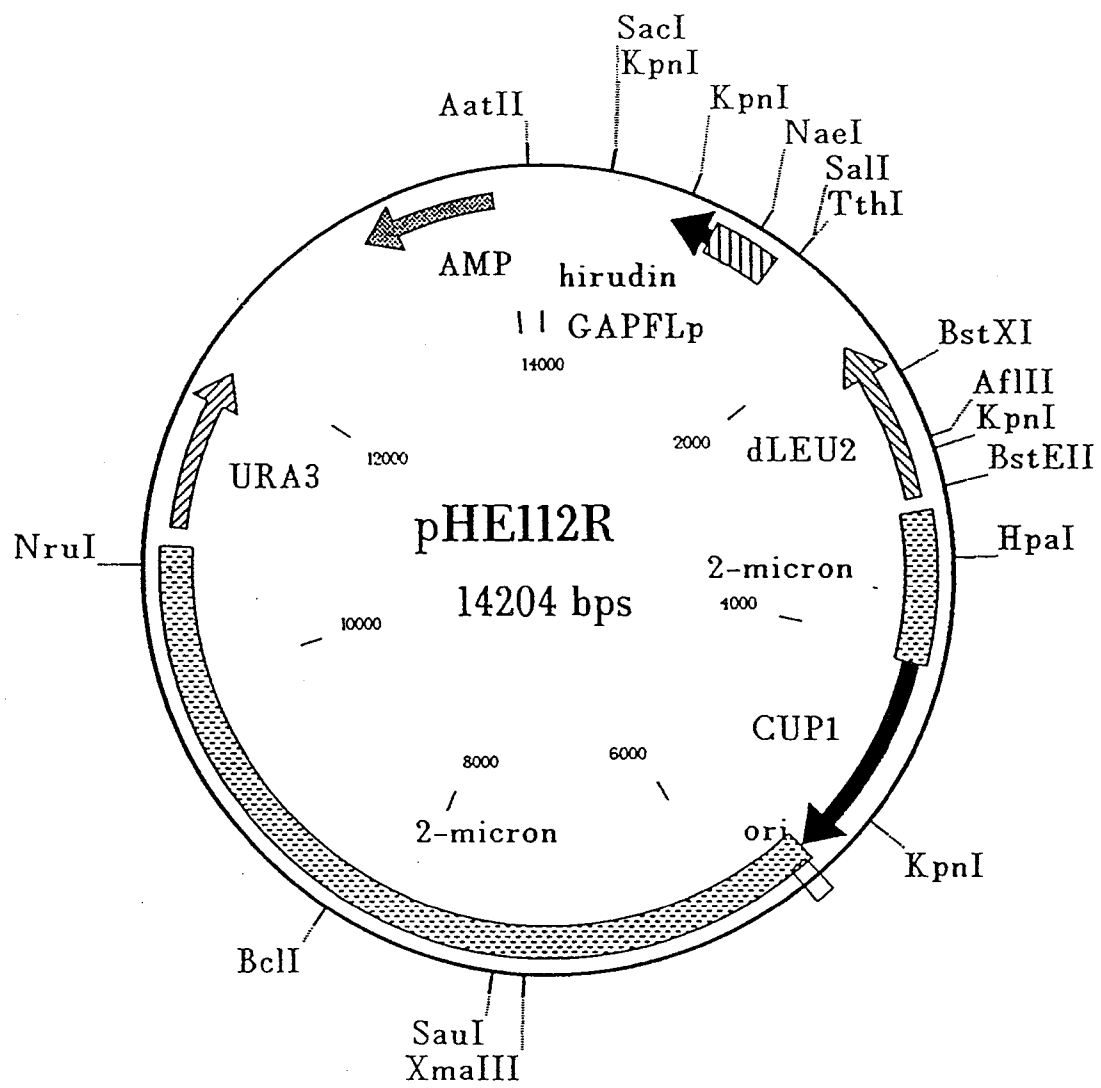


Figure 2/7

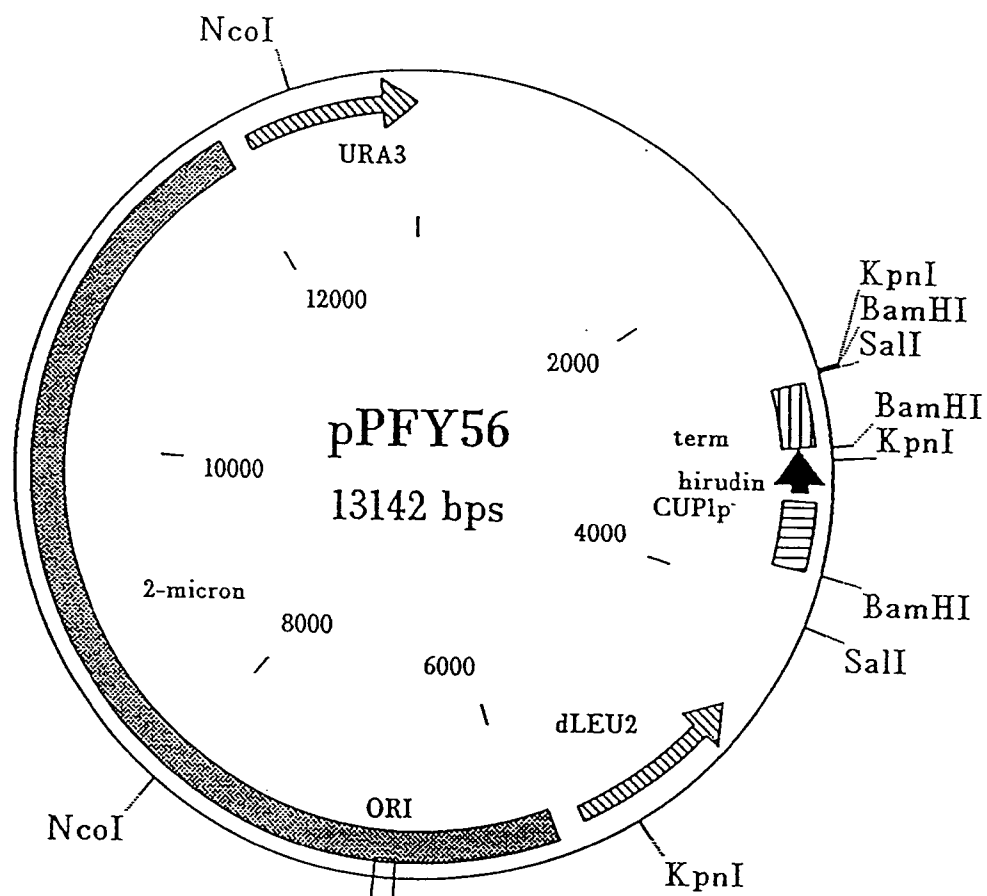


Figure 3 /7

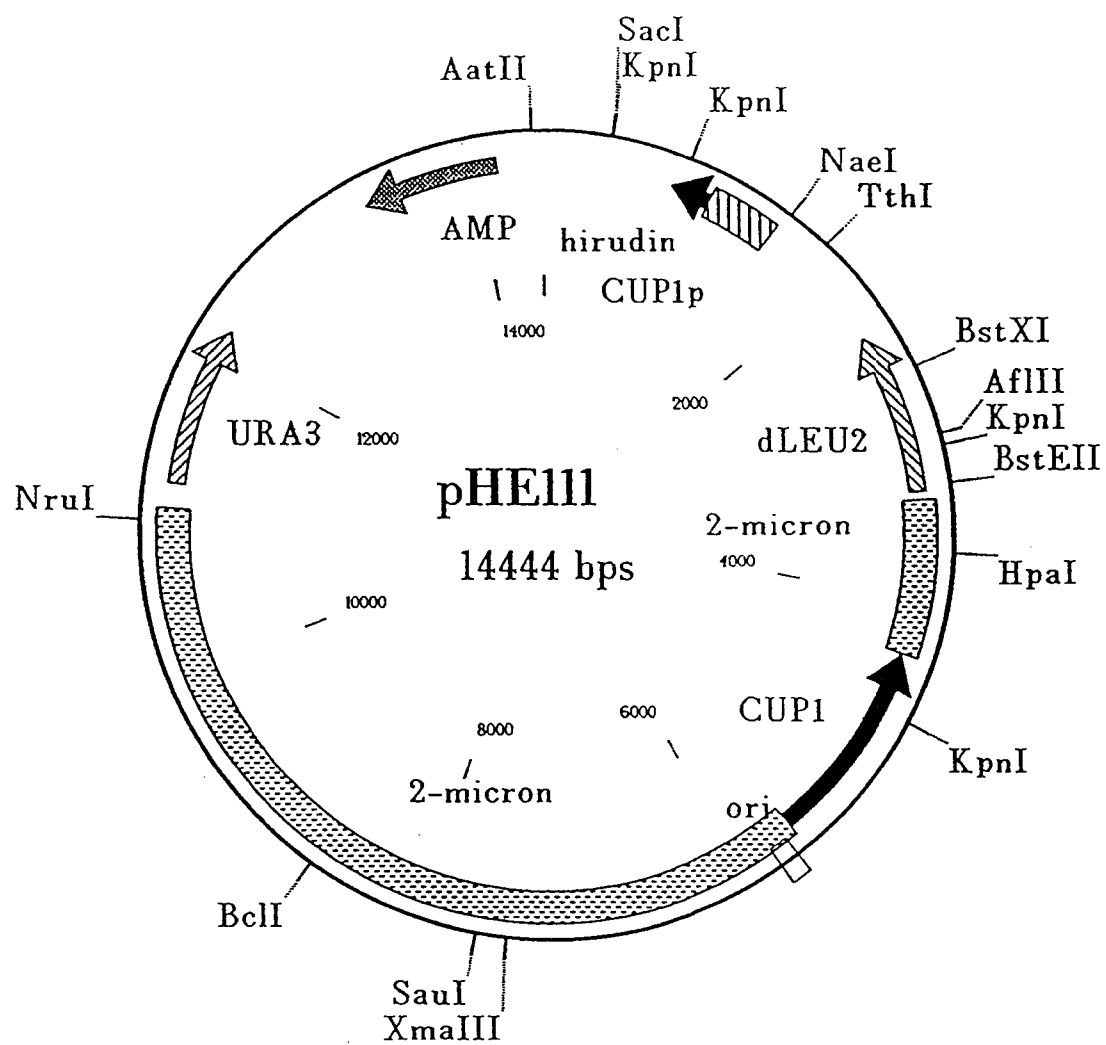


Figure 4/7

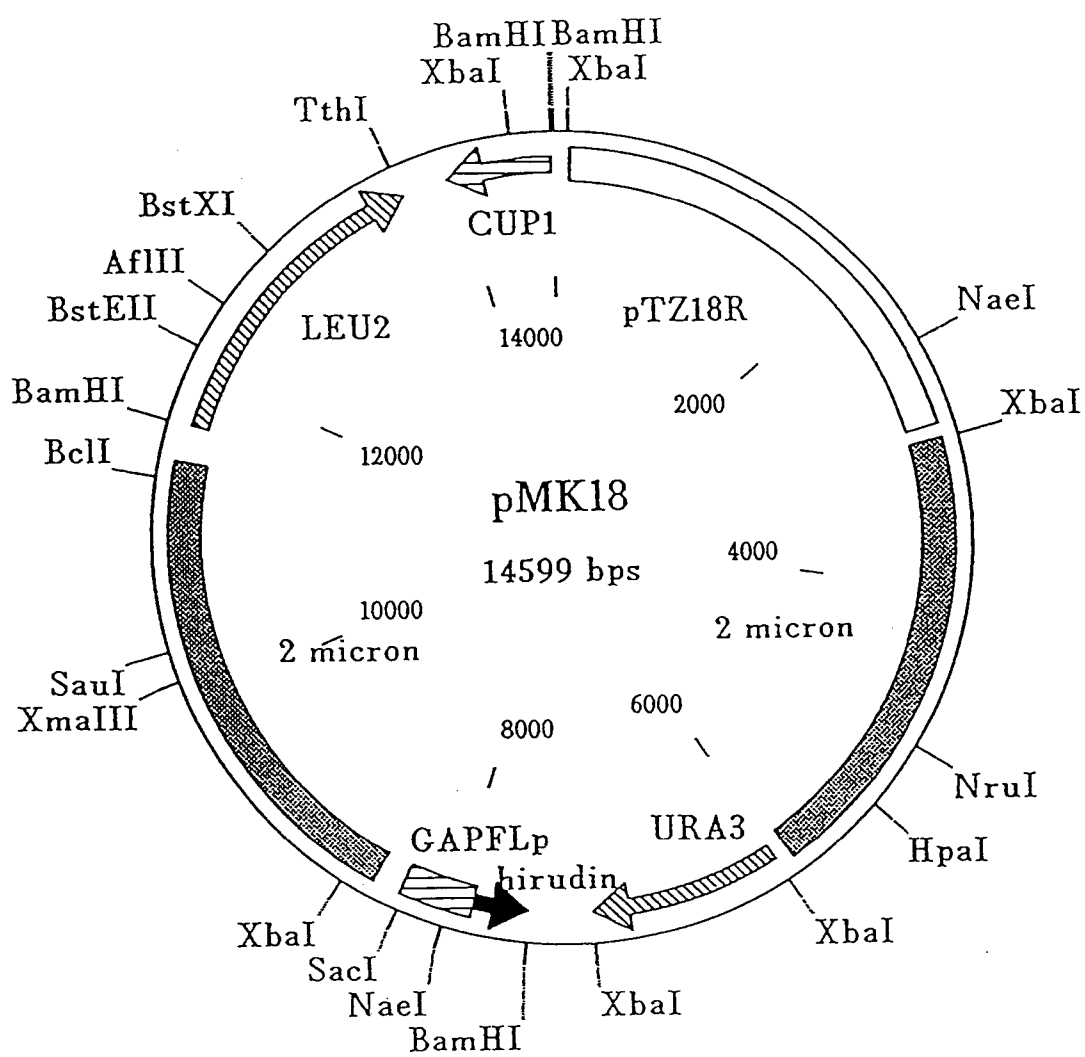


Figure 5 /7

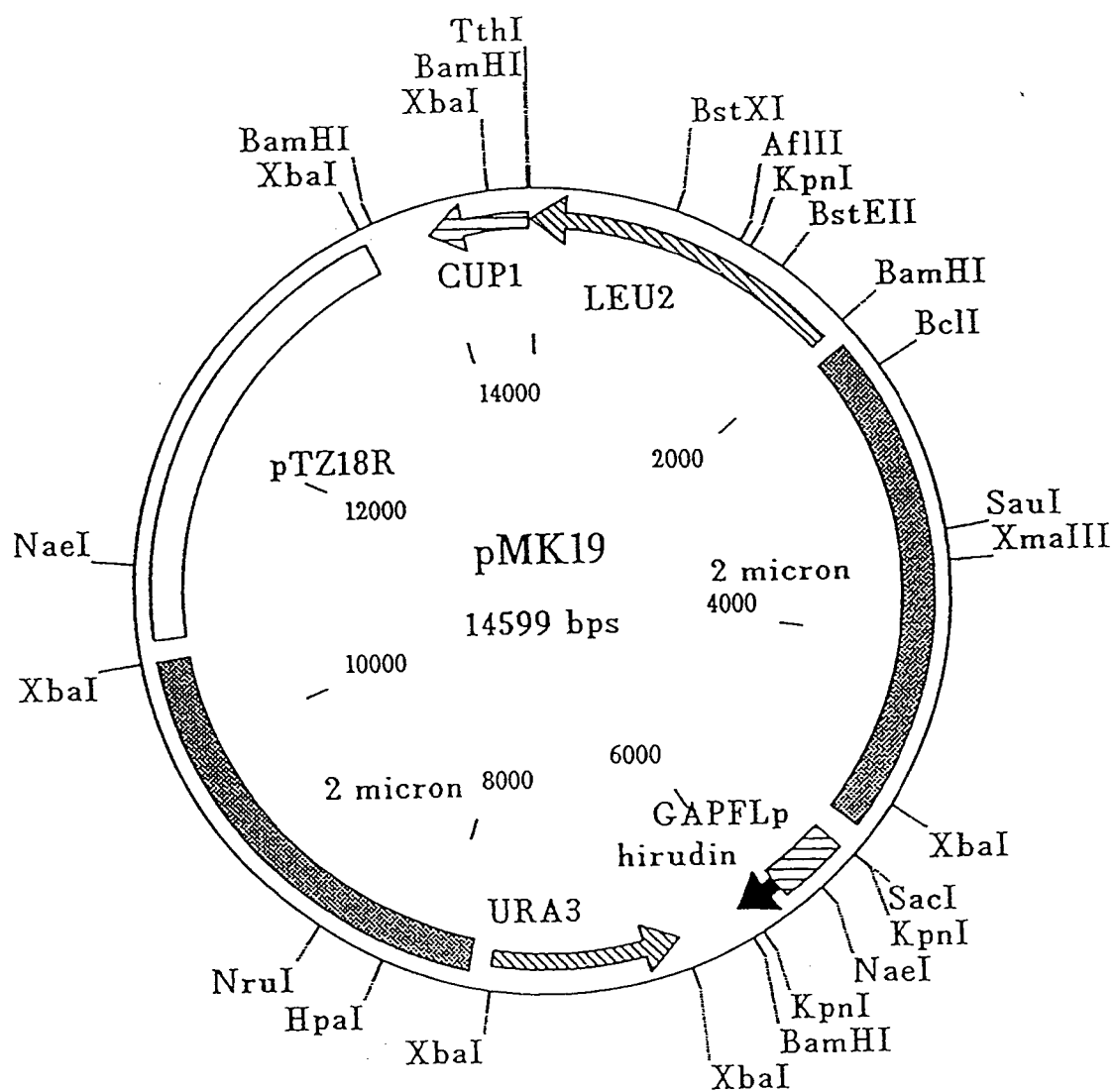


Figure 6/7

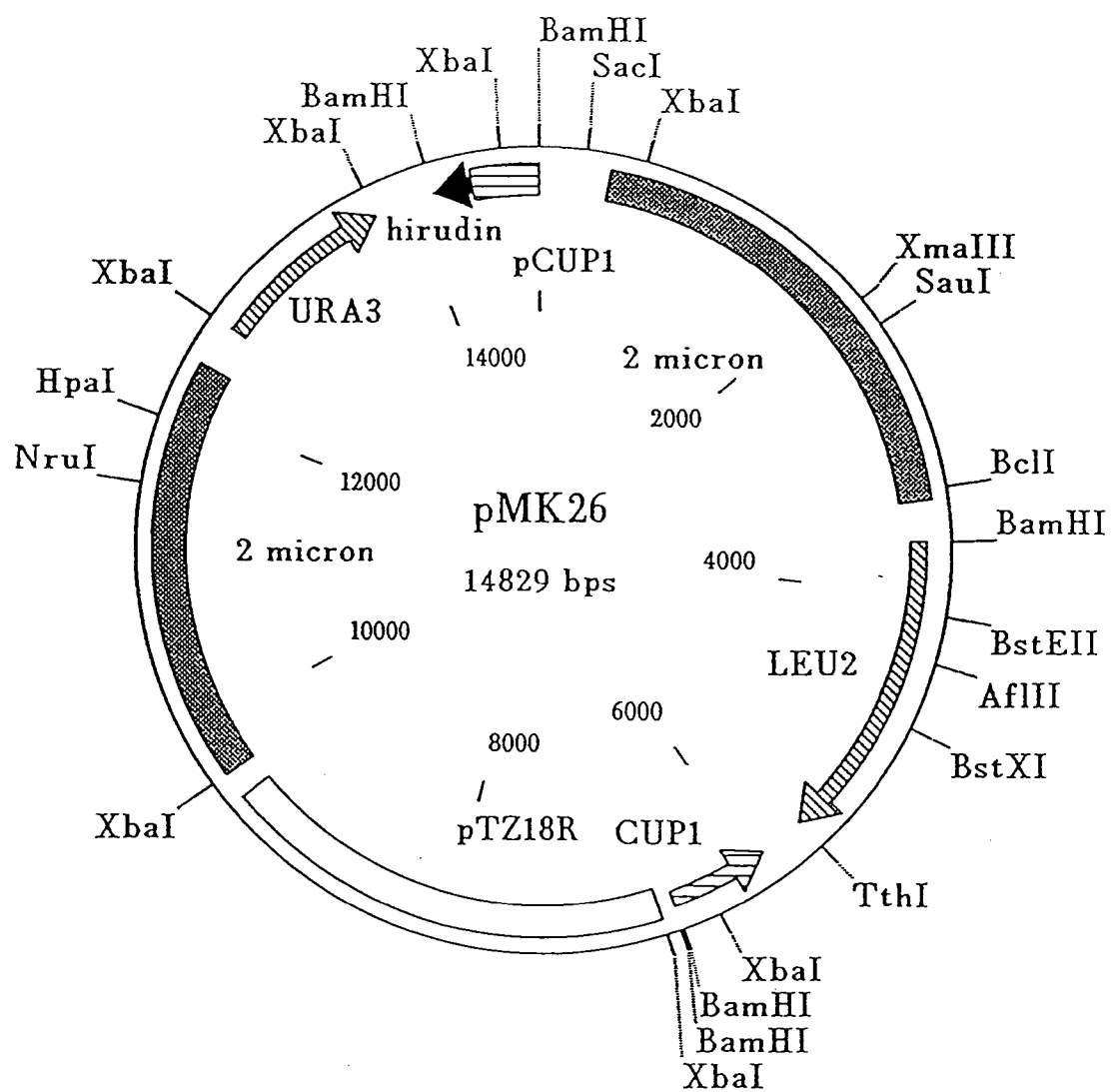


Figure 7/7

