C 12 N 15 Ans.nr.: 2212/82
Indleveret: 17 maj 1982
Løbedag: 17 maj 1982
Alm. tilgængelig: 07 jan 1983
Prioritet: 18 maj 1981 US 264306
07 dec 1981 US 328174
11 jan 1982 US 338397
*GENENTECH INC.; South San Francisco, US.
Opfinder: Herman Albert De *Boer; US.
Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman–Bang & Boutard

Mikrobiel hybrid promotor/operator, replicerbart udtrykkelsesmedium indeholdende denne og E.coli stamme transformeret med udtrykkelsesmediet

SAMMENDRAG

2212-82

Mikrobielle hybride promotor/operator-systemer, som er i stand til at dirigere E. coli DNA-afhængig RNA-polymerase-transcription, omfatter en promotor/operator-sekvens, som kan derepresseres ved induktion og udviser en første signalstyrke, og operativt anbragt oven for denne, et fragment bestående af -35 overensstemmelsessekvensen og det 5'-flankerende område af en anden promotor med en større signalstyrke, hvilke sekvenser er kovalent forbundet mellem ca. den nævnte -35 overensstemmelsessekvens og Pribnow-kassen af den nævnte promotor/operator-sekvens.

Til fremstilling af de hybride promotor/operatorer spaltes en første E. coli DNA-afhængig RNA-polymerase-samvirkende promotor indeholdende en operator, som er i stand til at derepresseres ved induktion, med et restriktionsenzym ved et punkt mellem ca. dens Pribnow-kasse-sekvens og -35 overensstemmelsessekvens. En anden E. coli DNA-afhængig RNA-

polymerase-samvirkende promotor med en større signalstyrke end den første spaltes på lignende måde. I foretrukne udførelsesformer ligger spaltningsområderne mellem ca. nucleotidbaseparrene -10 og -35. De spaltede DNA-sekvenser ligeres derpå ved kendte metoder. Restriktionsstederne udvælges eller konstrueres fortrinsvis således, at den resulterende hybride promotor/operator vil have et DNA-område mellem dens Pribnow-kasse-sekvens og -35 overensstemmelses-sekvens, som er tilnærmelsesvis af samme længde som de tilsvarende områder i udgangspromotorerne.

De hybride promotor/operatorer anvendes i replicerbare udtrykkelsesmedier, operabelt forbundet med nucleotider, der koder for translationsstarten, og med strukturgenet, der koder for aminosyresekvensen af et ønsket heterologt polypeptid.

Mikroorganismer, som ved kendte metoder er transformeret med replicerbare udtrykkelsesmedier indeholdende de her omhandlede hybride promotor/operator-systemer, kan opdyrkes til niveauer passende for industriel produktion af polypeptidet med promotor/operatoren i represseret tilstand. Efter at der er opnået i hovedsagen fuld vækst, tilføres en induktor fra en ydre kilde, og i overensstemmelse hermed derepresseres operatoren, og der sker højeffektiv udtrykkelse af den heterologe indsats. På denne måde dræbes cellerne aldrig tidligt i det tilfælde, at det producerede heterologe polypeptid er dødeligt for cellen, og endvidere giver cellekulturen maksimal produktion af det heterologe polypeptid som følge af, at den er i eller nær ved dens maksimale vækststilstand.