



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323038

(13) B1

(51) Int Cl.

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
C07K 14/545 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19943914	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1992.04.15 PCT/CA92/00161
(22)	Inng.dag	1994.10.14	(85)	Videreføringsdag	1994.10.14
(24)	Løpedag	1992.04.15	(30)	Prioritet	Ingen
(41)	Alm.tilgj	1994.12.09			
(45)	Meddelt	2006.12.27			
(73)	Innehaver	Sembiosys Genetics Inc , Bay #110, 2985-23rd Avenue North East, ABT1Y7L3 CALGARY, CA			
(72)	Oppfinner	Maurice M Moloney, 34 Edgebrook Cove NW, ABT3A5N5 CALGARY, CA			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS , Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å oppnå ekspresjon av et peptid av interesse i frø, fusjonspolypeptid fremstilt ifølge fremgangsmåten, kimær DNA-konstruksjon som koder for fusjonspolypeptidet, ekspresjonskasset som omfatter den kimære DNA-sekvensen, samt plantecelle som omfatter nevnte ekspresjonskasset.			
(56)	Anførte publikasjoner	D1) EMBL Nucleic Acid Sequence Database, Accession No. X62353, 1992, release 31, A. thaliana gene for oleosin D2) G. J. H. Van Rooijen, Plant Molecular Biology, vol. 18, no. 6, 1992, s. 1177-1179 D3) C. Batchelder et al., J. Exp. Bot., Suppl., vol. 42, no. 238, 1991, s. 47 D4) Lee & Huang, Plant. Phys., vol. 96, 1991, s. 1395-1397 D5) W. S. Lee et al., PNAS USA, vol. 88, 1991, s. 6181-6185			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåter og blandinger for anvendelse deri er beskrevet for å uttrykke et polypeptid av interesse i en frøcelle som et fusjonsprotein med et oljelegemeprotein. På denne måte oppsøker fusjonsproteinet olje-legemene i en frøcelle. Oljelegemet blir lett adskilt fra annet cellemateriale etter lysing av frøcellen, f.eks. ved anvendelse av oljelegemets fordelings/overflateegenskaper. Fusjonsproteinet kan isoleres f.eks. ved affinitetskromatografi ved anvendelse av antistoffer rettet mot olje-legemeproteinet. Om ønsket, kan polypeptidet av interesse gjenvinnes ved behandling av fusjonsproteinet med f.eks. en protease som er i stand til å gjenkjenne et proteolytisk gjenkjenningssted i olje-legeme-proteinet nær til N-terminus av polypeptidet av interesse.

Denne oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for å oppnå ekspresjon av et peptid av interesse i frø, fusjonspolypeptid fremstilt ifølge fremgangsmåten, kimær DNA-konstruksjon som koder for fusjonspolypeptidet, ekspresjonskassett som omfatter den kimære DNA-sekvensen, samt plantecelle som omfatter nevnte ekspresjonskassett.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for rekombinant fremstilling av et protein av interesse, og som lett blir rensset fra vertscellekomponenter. Det er gitt eksempler på fremgangsmåten ved ekspresjon av proteinet av interesse i planter, særlig frø, som et kimært peptid omfattende et olje-legeme-protein og proteinet av interesse.

Flere forskjellige proteiner er blitt uttrykt i planter. Selv om det er blitt vist at det vanligvis er greit å oppnå ekspresjon av fremmede proteiner i planter, er det imidlertid noen begrensninger forbundet med å oppnå rensede proteiner fra denne kilde. Disse begrensninger omfatter det rensetrinn som er nødvendig for å oppnå rent protein i alt vesentlig fritt for planteavledede materialer, og den nedbrytning som kan foregå i ekstrakter fremstilt under renseprosessen når de fremstilte rekombinante proteiner er i kontakt med vandige buffere.

Oljefrøbærende planter som soyabønner, rapsfrø, solsikke og flere andre plantearter slik som mais, gulrot osv., lagrer triglycerider i frøene. I planten virker disse triglycerider som energikilde for et spirende frø og den påfølgende kimplante. Triglyceridene blir bredt anvendt som vegetabiliske oljer i matvarer og ved tilberedning av mat, og også for noen industrielle anvendelser.

Triglyceridene er ikke blandbare med vann og skiller seg ved å flyte opp på overflaten av vandige løsninger, eller ved å danne små dråper eller liposomer som en suspensjon i den vandige fase. Slike dråper vil naturligvis løpe sammen dersom de ikke stabiliseres med et modifisert overflatesjikt. Denne sammenløping kan føre til en suspensjon av smådråper av vilkårlige størrelser. I frø, når triglycerid blir lagret, er oljedråpene i virkeligheten innkapslede lipid- eller oljelegemer vanligvis med jevn størrelse. Assosiert til overflaten av disse olje-legemer er en halv enhetsmembran besatt med flere proteiner, vanligvis referert til som olje-legeme-proteiner.

Minst én gruppe av olje-legemeproteiner har noen egenskaper som er godt konserverert mellom artene. Det refereres til denne gruppe at olje-legemeproteiner som et "oleosin". De hydrofile N- og C-termini av disse proteiner synes å være ganske avvikende, mens den lipofile indre region (sentralkjernen) synes å være godt konserverert mellom artene. Oleosinene er sterkt assosiert til olje-legemene; denne sterke assosiasjon til olje-legemene kan hovedsakelig skyldes den lipofile karakter av denne sentralkjerne. Det er derfor av interesse å bestemme hvorvidt olje-legemeproteiner som oleosiner kan være anvendelige i en fremgangsmåte for fremstilling av rekombinante proteiner ved å tilveiebringe en måte til separasjon av de rekombinante proteiner fra planteavledede materialer.

Fremstillingen av fremmede (rekombinante) peptider i planter er blitt undersøkt ved å bruke flere forskjellige tilnærminger omfattende transkripsjonsfusjoner som anvender en kraftig konstitutiv plantepromotor (f.eks. fra blomkålmosaikkvirus--Sijmons et al. (1990) *Bio/Technology*, 8:217-221) og kodingen av et fremmed protein; transkripsjonsfusjoner med organspesifikke sekvenser (Radke et al. (1988) *Theoret. Appl. Genet.*, 75:685-694); og translasjonsfusjoner som krever påfølgende spalting av et rekombinant protein (Vander Kerkove et al. (1989) *Bio/Technology*, 7:929-932). Fremmede proteiner som er blitt uttrykt i planteceller omfatter aktive proteiner fra bakterier (Fraley et al. (1983) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 80:4803-4807), dyr (Misra og Gedamu (1989) *Theor. Appl. Genet.*, 78:161-168), sopp og andre plantearter (Fraley et al. (1983) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 80:4803-4807).

Noen proteiner, vanligvis integrasjonsmarkører, er blitt uttrykt på en vevsspesifikk måte, innbefattet noen i frø (Sen Gupta-Gopalan et al. (1985) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 82:3320-3324); Radke et al. (1988) *Theor. Appl. Genet.*, 75:685-694). Disse rapporter har konsentrert seg spesifikt om anvendelsen av frø-lagringsproteinpromotorer som et middel til å avlede frø-spesifikk ekspresjon. Ved å anvende et slikt system har Vanderkerkove et al. (1989) *Bio/Technol.*, 7:929-932, uttrykt et høyverdi peptid (leu-enkephalin) i frø av *Arabidopsis thaliana* og *Brassica napus*. Utbyttet av dette peptid var ganske lavt, men demonstrerer at det er godt mulig å uttrykke et animalsk peptidhormon i plantevev. Maisoleosin er blitt uttrykt i frøolje-legemer i *Brassica napus* transformert med et maisoleosingen. Genet ble

uttrykt under kontroll av regulatoriske elementer fra et Brassica gen som koder for napin, et viktig frølagringsprotein. Den temporale regulering og vevsspesifisitet av ekspresjonen ble rapportert å være korrekt for en napingenpromotor/terminator. Se, Lee et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) (1991) 88:6181-6185.

De små oljedråper som frembringes i frø, synes alle å være av lignende størrelse, hvilket viser at de er stabilisert (Huang A.H.C. (1985) i Modern Meths. Plant Analysis, Vol. 1:145-151 Springer-Verlag, Berlin). Ved nærmere undersøkelse er det blitt funnet at disse ikke er enkle små olje-dråper, men heller olje-legemer omgitt av en membran. Disse olje-legemer er gitt forskjellige navn av elektronmikroskopister, oleosomer, lipidlegemer og sferosomer (Gurr MI. (1980) i The Biochemistry of Plants, 4:205-248, Acad. Press, Orlando, Fla). Olje-legemene hos noen få arter er blitt studert, og den generelle konklusjon er at de er innkapslet av en uvanlig "halv-enhets"-membran omfattende ikke et klassisk lipid-dobbeltsjikt, men heller et enkelt amfofilt sjikt med hydrofobe grupper på innsiden og hydrofile grupper på utsiden (Huang A.H.C. (1985) i Modern Meths. Plant Analysis, Vol. 1:145-151 Springer-Verlag, Berlin).

Analyse av innholdet av lipidlegemer har vist at i tillegg til triglycerid- og membranmateriale, er det også flere polypeptider/proteiner bundet til overflaten eller lumen av olje-legemet (Bowman-Vance og Huang (1987) J. Biol. Chem., 262:11275-11279, Murphy et al. (1989) Biochem. J., 258:285-293, Taylor et al. (1990) Planta, 181:18-26). Olje-legemeproteiner er blitt identifisert i et bredt område av taksonomisk forskjellige arter (Moreau et al. 1980) Plant Physiol., 65:1176-1180; Qu et al. (1986) Biochem. J., 235:57-65) og er blitt vist å være unikt lokalisert i olje-legemer og ikke funnet i organeller i vegetativt vev. I Brassica napus (rapsfrø) er det minst tre polypeptider bundet til olje-legemene i frø under utvikling (Taylor et al. (1990), Planta, 181:18-26). Antallet og størrelsen av olje-legemebundede proteiner kan variere fra art til art. I mais finnes det f.eks. to immunologisk adskilte polypeptidgrupper i olje-legemer (Bowman-Vance og Huang (1988) J. Biol. Chem., 263:1476-1481). Det er blitt vist at oleosiner omfatter regioner med alternerende hydrofilisitet, hydrofobisitet og hydrofilisitet (Bowman-Vance og Huang (1987) J. Biol. Chem., 262:11275-11279). Det er blitt oppnådd aminosyresekvensene av oleosiner fra mais, rapsfrø og gulrot. Se hhv. Qu og Huang (1990) J. Biol. Chem., 265:2238-

2243, Hatzopoulos et al. (1990) *Plant Cell*, 2:457-467. I et oljefrø slik som rapsfrø kan oleosin omfatte mellom 8% (Taylor et al. (1990) *Planta*, 181:18-26) og 20% (Murphy et al. (1989) *Biochem. J.*, 258:285-293) av totalt frøprotein. Et slikt nivå er sammenlignbart med det som finnes for mange frølagringsproteiner.

5 Gener som koder for olje-legemeproteiner er blitt rapportert for mais (*Zea mais*, Bowman-Vance og Huang (1987) *J. Biol. Chem.*, 262:11275-11279; og Qu og Huang (1990) *J. Biol. Chem.*, 265:2238-2243), gulrot (Hatzopoulos et al. (1990) *Plant Cell*, 2:457-467), *Arabidopsis* (EMBL Nucleic Acid Sequence Database, tilgangsnr. X62353, 1992, release 31), var Rooijen, *Plant Mol. Biol.*, 1992, 18, s. 1177-1179, rapsfrø (Batchelder et al., *J. Exp. Bot. Suppl.*) og *Brassica* (Lee og Huang, *Plant Physiol.*, 1991, 96: s. 1395-1397. Lee et al. (PNAS USA, 1991, 88: s. 6181-6185) beskriver ekspresjon av naturlig maisolesin i rapsfrø.

Det tilveiebringes fremgangsmåter og blandinger for fremstilling av peptider som lett kan renses fra vertspoteiner. Fremgangsmåten omfatter trinn for fremstilling av et kimært DNA-konstrukt som omfatter en sekvens som koder for en olje-legeme spesifikk sekvens omfattende kodesekvensen for et frø-spesifikt olje-legemeproteinen, eller en sekvens som koder for minst en porsjon av den hydrofobe kjerne av et olje-legemeprotein, og en kodesekvens for et peptid av interesse, hvorifra det kan fremstilles en ekspresjonskassetten som inneholder det kimære DNA-konstrukt; transformering av en vertscelle med ekspresjonskassetten under genomiske integreringsbetingelser; og dyrking av den resulterende transgene plante til å frembringe frø, hvori polypeptidet av interesse er uttrykt som et fusjonsprotein med oleosinet.

Polypeptidet av interesse kan renses ved isolering av olje-legemer fra cellene i frøet, og sprengning av oljelegemene slik at fusjonsproteinet blir frigjort. Olje-legemeproteinet blir deretter lett adskilt fra andre proteiner og planteavledet materiale ved fase-separasjon. Eventuelt kan det lokaliseres et spaltingssted i det minst ett før N-terminus og etter C-terminus i polypeptidet av interesse, hvilket tillater fusjonspolypeptidet å bli spaltet og adskilt ved fase-separasjon i sine komponentpeptider. Produksjonssystemet sørger således for målsøking av det kimære peptid ved sin olje-legemeproteinfunksjonalitet til olje-legemene, som i sin tur tillater hurtig rensing av polypeptidet av interesse. Dette produksjonssystem finner

5

10

15

20

25

30

T

hvor

- aa²⁵ kan være en hvilken som helst aminosyre;
- aa²⁶ er en nøytral alifatisk aminosyre;
- aa³¹ er en nøytral ikke-substituert alifatisk aminosyre på fra 3-6 karbonatomer;
- aa³³ er en nøytral ikke-substituert alifatisk aminosyre på fra 3-6 karbonatomer;
- 5 aa³⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre på fra 3-5 karbonatomer;
- aa³⁷ er en nøytral ikke-substituert aminosyre;
- aa³⁹ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁴¹ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- aa⁴⁴ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- 10 aa⁴⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller en oksy-substituert aminosyre;
- aa⁴⁷ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁵¹ er glycin, leucin, alanin, valin eller isoleucin;
- aa⁵³ er alanin, glycin, valin, leucin, isoleucin eller treonin;
- aa⁵⁹ er en nøytral alifatisk eller aromatisk ikke-substituert aminosyre;
- 15 aa⁷² er treonin, alanin eller leucin;
- aa⁷³ er valin, leucin eller treonin;
- aa⁷⁴ er alanin eller glycin;
- aa⁷⁵ er leucin eller treonin;
- aa⁷⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller tio-substituert aminosyre;
- 20 aa⁷⁷ er isoleucin, alanin eller valin;
- aa⁷⁸ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁸³ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- aa⁸⁴ er glycin;
- aa⁸⁵ er glycin eller alanin;
- 25 aa⁸⁶ er fenylalanin eller leucin;
- aa⁸⁹ er alanin, treonin eller glycin;
- aa⁹⁰ er alanin eller glycin;
- aa⁹² er en nøytral alifatisk aminosyre med en oksy-substitusjon;
- aa⁹³ er valin eller serin;
- 30 aa⁹⁴ er fenylalanin eller leucin;
- aa⁹⁶ er en nøytral alifatisk tio-substituert aminosyre eller en nøytral aromatisk heterocyklisk aminosyre;

aa⁹⁷ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller tio-substituert aminosyre;

aa⁹⁸ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre eller en aromatisk oksy-substituert aminosyre;

aa⁹⁹ kan være en hvilken som helst aminosyre;

5 aa¹⁰⁰ er en oksy-substituert aminosyre, enten alifatisk eller aromatisk;

aa¹⁰¹ er en nøytral ikke-substituert alifatisk eller aromatisk aminosyre, fusjonert til;

b) et andre peptid med den forutsetning at nevnte andre peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

10 Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et fusjonspolypeptid fremstilt ifølge fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse i stand til å oppsøke et olje-legeme, kjennetegnet ved at det omfatter:

(a) et første peptid omfattende en del av et olje-legemeprotein som er tilstrekkelig til at fusjonspolypeptidet kan oppsøke et olje-legeme; og

15 (b) et andre peptid med det unntak at nevnte andre peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

Fusjonspolypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse kan foretrukket være et hvor det første peptidet omfatter:

(a) den følgende aminosyresekvens:

20

M-M-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-
 S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
 S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
 I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
 25 L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K-Y-
 A-T-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-
 S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-
 E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T; eller

30 (b) et peptid som har konservative aminosyresubstitusjoner av aminosyre-sekvensen i (a).

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dessuten en kimær DNA-konstruksjon omfattende:

(a) en første DNA-sekvens som koder en tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein som er gjør fusjonspolypeptidet i stand til å oppsøke et olje-legeme; og

5 (b) en andre DNA-sekvens som koder et peptid med det unntak at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer enn videre en ekspresjonskassett omfattende :

som komponenter, i transkripsjonsretningen:

10 - en regulator DNA-sekvens omfattende en tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartsetet av et gen uttrykt i frø for å tilveiebringe ekspresjon av en DNA-sekvens i frø;

- en kimær DNA-sekvens som koder et fusjonspolypeptid og omfatter (a) en første DNA-sekvens som koder en tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein for å
15 tilveiebringe oppsøking av fusjonspolypeptidet til olje-legemet, nevnte første DNA-sekvens inkluderer minst ett restriksjonssete, og (b) en andre DNA-sekvens som koder et peptid med unntak av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein; og

- en translasjons- og transkripsjonstermineringsregion;
20 hvor nevnte komponenter er operativt forbundet og uttrykkes av nevnte kimære DNA-sekvens regulert av nevnte regulator-DNA-sekvens.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer foretrukket en ekspresjonskassett omfattende:

- et olje-legemeprotein (OBP : oil body protein) gen som inkluderer en
25 tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartstedet for å tilveiebringe ekspresjon av nevnte gen i en frøcelle og som inkluderer minst ett restriksjonssete mellom umiddelbart 5' til kodonet for det initierende metioninet og 5' til translasjonsstoppsignalet av nevnte OBP-gen, og

- en DNA-sekvens innskudd i nevnte restriksjonssete i leseramme med nevnte
30 OBP-gen, hvor nevnte DNA-sekvens koder et peptid som er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dessuten i en foretrukket utførelse en ekspresjonskassett omfattende:

en første DNA-sekvens som koder for et peptid under forutsetning av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-
5 legemeprotein, innskutt i leseramme i et olje-legemeprotein (OBP) -gen som inkluderer en tilstrekkelig del av regulatorregionen 5' til translasjonsstartsetet av nevnte OBP-gen for å tilveiebringe ekspresjon av nevnte gen i frø, hvor nevnte sekvens er innskutt ved et sete i nevnte gen slik at det uttrykkes under nevnte regulatorregion.

10 I enda et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en plantecelle kjennetegnet ved at den omfatter ekspresjonskassetten i henhold til foreliggende oppfinnelse.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer enn videre en fremgangsmåte til å oppnå ekspresjon av et peptid av interesse i frø, kjennetegnet ved at

15 fremgangsmåten omfatter:

transformering av en vertsplantecelle med en ekspresjonskassett under genomiske integrasjonsbetingelser, hvor nevnte ekspresjonskassett omfatter som komponenter, i transkripsjonsretningen, en første DNA-sekvens omfattende en tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartsetet av et gen uttrykt i frø for å
20 oppnå ekspresjon av en DNA-sekvens i frø; en andre DNA-sekvens som koder en tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein for å tilveiebringe oppsøking av peptidet av interesse til et olje-legeme, nevnte andre DNA-sekvens inkluderer minst ett naturlig eller syntetisk restriksjonssete inn i hvilket er innskutt i leseramme en tredje DNA-sekvens som koder et peptid av interesse med det unntak at nevnte peptid er
25 forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein; og en translasjons- og transkripsjonstermineringsregion, hvor nevnte komponenter er operativt forbundet, og ekspresjon av nevnte andre DNA-sekvens er regulert av nevnte første DNA-sekvens for å oppnå ekspresjon i frø.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også i en foretrukket utførelse en
30 fremgangsmåte for å oppnå et rensert peptid av interesse, kjennetegnet ved at nevnte fremgangsmåte omfatter:

transformering av en vertsplantecelle med en DNA-konstruksjon under genomiske integrasjonsbetingelser, hvor nevnte DNA-konstruksjon omfatter en første DNA-sekvens som koder for et peptid av interesse, under forutsetning av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-
 5 legemeprotein, innskutt i leseramme inn i olje-legemeprotein (OBP) -genet som inkluderer en tilstrekkelig del av regulatorregionen 5' til translasjonsstartsetet av nevnte OBP-gen for å oppnå ekspresjon av nevnte gen i frø, hvor nevnte sekvens er innskutt i et sted i nevnte gen slik at ekspresjon av nevnte DNA-sekvens kontrolleres av nevnte regulatorregion, hvor nevnte DNA-konstruksjon blir integrert inn i genomet
 10 av nevnte plantecelle;

dyrking av nevnte plante for å produsere frø, hvor nevnte peptid av interesse uttrykkes som et fusjonsprotein med ekspresjonsproduktet av nevnte OBP-gen;

isolering av olje-legemer fra cellene av nevnte frø,

ødelegging av nevnte olje-legemer, hvor nevnte fusjonsprotein blir frigjort; og

15 rensing av nevnte peptid av interesse.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Fig. 1A viser nukleotidsekvensen og den avledede aminosyresekvens (17
 20 kDa protein) for et olje-legemeproteingen (oleosin) fra *Arabidopsis thaliana*. Understreket er de direkte gjentakelser (R1 og R2) og den omvendte gjentakelse (T), et CACA, TATA, TAAT og polyadenyleringssignaler. Intronsekvensen er trykket med små bokstavtyper, og et antatt ABA-bindingssted er angitt med fete typer.

Fig. 1B viser en sammenligning av sekvensene i olje-legeme 16 Kd protein fra
 25 gulrot, et 18 Kd og et 16 Kd olje-legemeprotein fra mais og et 17 Kd olje-legemeprotein fra *Arabidopsis thaliana* som viser konserverte og avvikende regioner av proteinene; aminosyresekvensene er innrettet for å vise konserveringen av sekvensen i den sentrale region av proteinene.

Fig. 2 viser konstrukter anvendt for fusjon av olje-legemeproteingener med
 30 gener som koder for fremmede peptider. IA er en C-terminal fusjon av et ønsket peptid til OBP; IB er en N-terminal fusjon av et ønsket peptid til OBP; II er en indre fusjon av et ønsket peptid innenfor OBP; og III er en inter-dimer translasjonsfusjon

av ønsket peptid innelukket mellom to i alt vesentlig fullstendige olje-legemeprotein-målsøkingsekvenser. I den øvre del av figuren (A) er vist DNA-konstruktene anvendt for translasjonsfusjoner av ønskede peptider til olje-legemeproteiner. I den nedre del av figuren (B) er vist konfigurasjonene av genproduktene, vist på den øvre del av translasjonen og avgivelsen til olje-legemene. Nøkkelen til figuren er som følger: boks skravert nedenfra til venstre - oppover mot høyre representerer en OBP-promotor eller annen frøspesifikk promotor; boks skravert nedenfra til høyre - oppover mot venstre representerer en ønsket peptidkodende sekvens; åpen boks representerer en olje-legeme-proteinkodende sekvens eller syntetisk målsøking sekvens basert på OBP-konserverte motiver; vertikalt og horisontalt skravert boks representerer en genterminator inneholdende et polyadenyleringssignal; skravert sirkel representerer et proteasegjenkjenningsmotiv; koretrekkerlinje representerer en naturlig C- eller N-terminal av OBP.

Fig. 3 viser et detaljert arrangement for konstruksjon av en C-terminal fusjon.

Vist i arrangementet er en sekvens som koder for et kollagenasegjenkjenningsmotiv, som en linker ved fusjonen av et typisk olje-legeme-proteingen og et fusjonspeptid, som skal sammenkobles her ved anvendelse av et NcoI, for kloning og ekspresjon i planter.

Fig. 4 viser skjematisk fremgangsmåten for konstruksjon av fusjonspeptidvektorer, deres innføring i planter og påfølgende ekstraksjon og analyse av det ønskede rekombinante peptid.

Fig. 5 viser en skjematisk fremstilling av konstruksjonen av pCJOBPILT. Boksen med den brutte linje representerer en oleosinpromotor; boksen skravert ovenfra til venstre - nedover mot høyre representerer en oleosinkodende sekvens; den horisontalt og vertikalt skraverte boks representerer et intron; den stiplede boks representerer en 3' ikke-translatert sekvens; og boksen skravert grovere ovenfra til venstre - nedover mot høyre representerer en interleukin-1- β -sekvens utstyrt med en sekvens som koder for et proteasespaltesete (faktor Xa eller thrombin umiddelbart oppstrøms).

Fig. 6 viser design av oligonukleotid GVR11. Figur 6A representerer den 3'-kodende sekvens for *A. thaliana* oleosinet, translasjonelt sammensmeltet med sekvensen som koder for faktor Xa/IL-1- β , etterfulgt av et TAA-stopp-kodon. For

ytterligere kloningsformål er inkludert et PvuI og Sall restriksjonsenzymgjenkjenningssete. Dannelsen av et PvuI-restriksjonssete resulterte i den ytterligere kodesekvens for et alanin (ala). Understreket er restriksjonsenzymgjenkjenningsssekvensene. Overstreket er *A. thaliana* oleosin-sekvensene og faktor Xa-gjenkjenningsssekvensen. Det aktuelle spaltested er angitt med en (*). I figur 6B er vist sekvensen for GVR11. For å lage en fusjon med *A. thaliana*-oleosinet, må primeren GVR11 være en sekvens som er komplementær til toppstrengen.

Figur 7 viser nukleotidsekvensen for OBPILT. Understreket er den sekvens som koder for IL-1- β ; den sekvens som koder for faktor Xa gjenkjenningsssetet er angitt med fete typer. Nopalinsyntaseterminatorsekvensen er angitt med små bokstavtyper.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes fremgangsmåter og blandinger for fremstilling av peptider som lett kan renses. Den aktuelle fremgangsmåte omfatter trinn for fremstilling av en ekspresjonskassett inneholdende DNA-sekvenser som koder for en tilstrekkelig del av en olje-legemespesifikk sekvens, slik som et oleosin, for å tilveiebringe målsøking til et olje-legeme og peptidet av interesse; transformering av ekspresjonskassetten inn i en plantecellevert; generering av en transgen plante og dyrking av denne for å frembringe frø, hvori det kimære protein blir uttrykt og translokalisert til olje-legemene. Det kimære peptid omfatter peptidet av interesse og et olje-legemeprotein som f.eks. et oleosin. Peptidet av interesse er vanligvis et fremmed peptid som normalt ikke blir uttrykt i frø eller funnet på olje-legemet. Anvendelsen av et olje-legemeprotein som bærer eller målsøkingmiddel tilveiebringer en enkel mekanisme for å oppnå rensing av det fremmede protein. Det kimære protein blir separert bort fra hovedmengden av cellulært protein i et enkelt trinn (som f.eks. sentrifugering eller flotasjon); proteinet er også beskyttet fra nedbrytning under ekstraksjonen, ettersom separasjonen også fjerner ikke-spesifikke proteaser fra kontakt med olje-legemene. Det gen som koder for det fremmede peptid kan være avledet fra en hvilken som helst kilde, inklusive planter, bakterier, sopp eller dyr. Helst bør det kimære peptid inneholde sekvenser som tillater avspalting av peptidet

av interesse fra oleosinet. Fremgangsmåten kan anvendes til å uttrykke flere forskjellige peptider som deretter lett kan renses.

Målsøking av et fremmed, rekombinant protein til olje-legemet innebærer flere fordeler, innbefattet følgende. Proteinene kan skilles fra hovedmengden av celleinnholdet etter cellyse ved sentrifugering. Olje-legemefraksjonen vil flyte på overflaten av ekstraktet. Proteinene kan eventuelt tilveiebringes med en peptidlinker inneholdende et proteasegjennkjenningssete. Dette tillater frigjøring av peptidet fra olje-legemet. Proteinene kan innføres i et rekombinant polypeptid på en slik måte at det er innenfor en lipofilt bevart region. Dette fører til internalisering av det rekombinante peptid i olje-legemet, hvilket beskytter det mot proteaseangrep.

Ekspresjonskassetten vil vanligvis omfatte i 5'-3'-retningen av transkripsjonen, en transkripsjons- og translasjonsregulerende region som har evne til ekspresjon i frø under utvikling, kjennetegnet ved promotoren og oppstrømsregioner i forbindelse med et olje-legemeprotein, som vil tilveiebringe ekspresjon av det kimære protein i frø, en DNA-sekvens som koder for et kimært peptid omfattende en aminosyresekvens for å tilveiebringe et olje-legememålsøkingmiddel og et protein av interesse, og en transkripsjons- og translasjonstermineringsregion som er funksjonelle i planter. Ett eller flere introner kan også være tilstede.

Den olje-legemespesifikke sekvens finner analogi i fragmenter av olje-legemeproteiner, særlig oleosiner. Den olje-legemespesifikke sekvens kan være den samme som den for en sekvens oppnåelig fra et olje-legemeprotein, eller som har tilstrekkelig homologi til å tilveiebringe den ønskede målsøking av et protein av interesse til et olje-legeme. Ved "oppnåelig" menes en aminosyresekvens som kan være naturlig, syntetisk eller en kombinasjon, tilstrekkelig lik en naturlig olje-legemeproteinaminosyresekvens til å gi den ønskede målsøking. Av særlig interesse er det sentrale hydrofobe domenet i olje-legemeproteiner som synes å være svært godt bevart blant forskjellige plantearter, og fragmenter derav og homologe sekvenser på aminosyrenivå.

Den avledede aminosyresekvens for et *Arabidopsis thaliana* olje-legemeprotein er som følger:

10	20
M-M-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-	
30	40
S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-	
50	60
S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-	
70	80
I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-	
90	100
L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K*Y-	
110	120
A-T-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-	
130	140
S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-	
150	
E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T	

Aminosyrene fra ca. 25-101 omfatter det sentrale hydrofobe domenet.

Av særlig interesse som et målsøkingmiddel for noen anvendelser er olje-
legemespesifikke sekvenser eller fragmenter derav med følgende formel som sørger

5 for målsøking til et olje-legeme:

pp¹- aa²⁵- aa²⁶- V - V- T - L- aa³¹- P-
A A A T

aa³⁴- G- G- aa³⁶- L- L- aa³⁹- L- aa⁴¹-
M

G - I - aa⁴⁴- L- aa⁴⁶- aa⁴⁷- T - L - I -
S L S V V

aa⁵¹- L- aa⁵³- V- A- T- P- L - aa⁵⁹- L -
V V

L - F- S- P- V - L- V- P- A- A - L - aa⁷³-
I I L I

aa⁷⁴ - aa⁷⁵ - aa⁷⁶ - aa⁷⁷ - aa⁷⁸ - G- F- L-

G
S - S- aa⁸⁷ - G- $\begin{matrix} L \\ V \\ I \end{matrix}$ - aa⁸⁹ - aa⁹⁰ - $\begin{matrix} L \\ I \end{matrix}$ - S -
T I T

aa⁹³ aa⁹⁴ - $\begin{matrix} S \\ T \end{matrix}$ - aa⁹⁶ - aa⁹⁷ - aa⁹⁸ - aa⁹⁹ -

aa¹⁰⁰ - aa¹⁰¹ - pp²

hvor:

PP¹ og PP² er de samme eller forskjellige, og kan være de samme som eller forskjellige fra et naturlig olje-legemeprotein, vanligvis forskjellige; de kan være
5 hydrogenatomer, og angi den terminale del av det angitte polypeptid eller kan være polypeptider som har en total på opptil 1000 aminosyrer, mer vanligvis opp til ca. 500 aminosyrer, og kan ha en total på så få som 1 aminosyre, eller kan individuelt eller separat være polypeptider med fra 1-100 aminosyrer, mer vanligvis fra ca. 1-75 aminosyrer, nærmere bestemt fra ca. 5-50 aminosyrer; disse polypeptider vil ha
10 spesifikke anvendelser til å modifisere en særlig beskrevet sekvens for et forutbestemt formål;

aa²⁵ kan være en hvilken som helst aminosyre, særlig en nøytral alifatisk aminosyre, vanligvis med 3-6 karbonatomer, nærmere bestemt leucin eller alanin;

aa²⁶ er en nøytral alifatisk aminosyre, særlig alanin eller en
15 hydroksysubstituert aminosyre med fra 3-4 karbonatomer, særlig treonin eller en basisk aminosyre med fra 5-6 karbonatomer, særlig lysin;

aa³¹ er en nøytral usubstituert alifatisk aminosyre med fra 3-6 karbonatomer, særlig alanin, valin eller leucin eller en aromatisk usubstituert aminosyre, særlig fenyalanin;

20 aa³³ er en nøytral usubstituert alifatisk aminosyre med fra 3-6 karbonatomer, særlig alanin, valin eller leucin eller en oksy-substituert alifatisk aminosyre, særlig treonin;

aa³⁶ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre med fra 3-5 karbonatomer, særlig leucin eller en nøytral alifatisk oksy-substituert aminosyre med fra 3-4 karbonatomer, særlig treonin eller serin;

aa³⁷ er en nøytral usubstituert aminosyre, særlig leucin eller en tio-substituert aminosyre, særlig metionin;

aa³⁹ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre, særlig valin eller en aromatisk usubstituert aminosyre, særlig fenylalanin;

aa⁴¹ er en nøytral alifatisk usubstituert eller oksysubstituert aminosyre, særlig alanin, leucin eller serin;

aa⁴⁴ er en nøytral alifatisk usubstituert eller oksysubstituert aminosyre, særlig alanin, isoleucin eller treonin;

aa⁴⁶ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre eller en oksy-substituert aminosyre, særlig alanin, valin eller treonin;

aa⁴⁷ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre, særlig glycin eller alanin;

aa⁵⁹ er en nøytral alifatisk eller aromatisk usubstituert aminosyre, særlig leucin eller fenylalanin;

aa⁷⁶ er en nøytral alifatisk usubstituert eller tio-substituert aminosyre, særlig alanin, leucin eller metionin;

aa⁷⁸ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre, særlig alanin eller en nøytral alifatisk aminosyre som har en tio- eller ren oksy-substitusjon, særlig metionin eller treonin;

aa⁸³ er en nøytral alifatisk usubstituert eller oksysubstituert aminosyre, særlig glycin, serin eller treonin;

aa⁹² er en nøytral alifatisk aminosyre med en oksy-substitusjon, særlig serin eller treonin;

aa⁹⁶ er en nøytral alifatisk tio-substituert aminosyre eller en nøytral aromatisk heterocyklisk aminosyre, særlig tryptofan;

aa⁹⁷ er en nøytral alifatisk usubstituert eller tio-substituert aminosyre, særlig valin, leucin, isoleucin eller metionin,

aa⁹⁸ er en nøytral alifatisk usubstituert aminosyre eller en aromatisk oksysubstituert aminosyre, særlig alanin, leucin eller tyrosin;

aa⁹⁹ kan være en hvilken som helst aminosyre;

aa¹⁰⁰ er en oksy-substituert aminosyre, enten alifatisk eller aromatisk, særlig tyrosin eller treonin;

aa¹⁰¹ er en nøytral usubstituert alifatisk eller aromatisk aminosyre, særlig alanin, leucin eller fenylalanin.

5 Av særlig interesse som en kilde for DNA som koder for sekvenser som er i stand til å tilveiebringe målsøking til et olje-legemeprotein, er olje-legemeproteingener oppnåelige fra *Arabidopsis* eller *Brassica napus* som sørger for ekspresjon av proteinet av interesse i frø (se Taylor et al. (1990) *Planta*, 181:18-26).

De nødvendige regioner og aminosyresekvenser for å tilveiebringe målsøkingevne
10 til olje-legemet synes å være den svært hydrofobe sentrale region av olje-legemeproteiner.

For å identifisere andre olje-legemeproteingener som har de ønskede egenskaper, hvor et olje-legemeprotein er blitt eller er isolert, kan proteinet sekvenseres delvis, slik at en probe kan utformes for å identifisere mRNA. En slik
15 probe er særlig verdifull dersom den er utformet for målsøking av den kodende region i det sentrale hydrofobe domene som er svært godt konservert hos flere forskjellige plantearter. Følgelig kan en DNA eller RNA-probe for denne regionen være særlig anvendelig for å identifisere kodesekvenser for olje-legemeproteiner fra andre plantearter. For ytterligere å øke konsentrasjonen av mRNA kan det
20 fremstilles cDNA, og dette cDNA subtraheres med mRNA eller cDNA fra celler som ikke frembringer oljelegemer. Det resterende cDNA kan deretter anvendes for probing av genomet for komplementære sekvenser, ved anvendelse av et hensiktsmessig bibliotek fremstilt fra planteceller. Sekvenser som hybridiserer cDNA under stringente betingelser kan deretter isoleres.

25 I noen tilfeller som beskrevet ovenfor, ved anvendelse av en olje-legemeproteingenprobe (bevart region), kan det anvendes en probe direkte for screening av et cDNA-genomisk bibliotek og identifisering av sekvenser som hybridiserer til proben. Isoleringen kan også gjennomføres ved en standard immunologisk screeningteknikk av et frø-spesifikt cDNA-ekspresjonsbibliotek. Det kan lett
30 oppnås antistoffer for olje-legemeproteiner ved anvendelse av rensefremgangsmåten og antistoff-fremstillingsprotokollen beskrevet av Taylor et al. (*Planta*, (1990) 181, 18-26). Screening av cDNA-ekspresjonsbibliotek ved

anvendelse av antistoffer blir gjennomført i alt vesentlig ved anvendelse av teknikkene til Huynh et al. (1985, i DNA Cloning, Vol. 1, A Practical Approach, redaktør D.M. Glover, IRL Press, pp. 49-78). Bekreftelse av sekvens blir lettet ved den høye konservering som finnes i den sentrale hydrofobe region (se fig. 1). DNA-sekvensering ved fremgangsmåten ifølge Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1977) 74:5463-5467) eller Maxam og Gilbert (1980, Meth. Enzymol., (1980) 65:497-560) kan gjennomføres på alle antatte kloner og gjennomførte homologiundersøkelser. Homologi av sekvenser som koder for det sentrale hydrofobe domenet er vanligvis $\geq 70\%$, både på aminosyre- og nukleotidnivå mellom forskjellige arter. Dersom et antistoff er tilgjengelig, kan det også gjennomføres bekreftelse av sekvensidentitet ved hybridvalgs- og translasjonseksperimenter fra frø mRNA-preparater som beskrevet av Sambrook et al. (Molecular Cloning, (1990) 2nd utgave, Cold Spring Harbor Press, pp. 8-49 til 8-51).

cDNA-kloner laget fra frø kan screenes ved anvendelse av cDNA-prober laget fra de bevarte koderegioner fra hvilket som helst tilgjengelig olje-legemeproteingen (f.eks. Bowman-Vance og Huang (J. Biol. Chem., (1987) 262:11275-11279). Det utvelges kloner som har mer intens hybridisering med frø DNA sammenlignet med kimplante cDNA. Screeningen blir gjentatt for å identifisere et bestemt cDNA assosiert med olje-legemer i frø under utvikling, ved anvendelse av direkte antistoffscreening eller hybridvalg og translasjon. mRNA komplementært til det spesifikke cDNA er fraværende i annet vev som er testet. cDNA anvendes deretter for screening av et genombibliotek, og det velges ut et fragment som hybridiserer til det aktuelle cDNA.

For å oppnå ekspresjon av det kimære gen i frø kan det anvendes en transkripsjons-initieringsregulatorisk region og en translasjons-initieringsregulatorisk region av ikke-translaterte 5'-sekvenser, "ribosombindingssteder", ansvarlige for binding av mRNA til ribosomer og translasjonsinitiering som kan oppnås fra hvilket som helst gen fortrinnsvis uttrykt i frø. Eksempler på slike gener omfatter frølagringsproteiner som f.eks. fra napin (Josefsson et al., J. Biol. Chem., (1987) 262:12196-12201; Scofield S.R. og Crouch M.L. J. Biol. Chem. (1987) 262:12202-12208). Fortrinnsvis kan regionen oppnås fra et olje-legemeprotein (olje-legemeproteiner fra Arabidopsis, gulrot (Hatzopoulos et al., *supra*) eller mais (Huang

et al. 1987 og 1990 *supra*). Denne regionen omfatter vanligvis minst 100 bp 5' til translasjonsstarten av kodesekvensen for det strukturelle gen, opp til 2,5 kb 5' til den samme translasjonsstart. Det foretrekkes at alle av de transkripsjons- og translasjonsfunksjonelle elementer i initieringskontrollregionen er avledet fra eller er oppnåelige fra det samme gen. Ved "oppnåelig" menes en DNA-sekvens som er tilstrekkelig lik den for en naturlig sekvens til å tilveiebringe den ønskede spesifisitet for transkripsjon av DNA-sekvensen som koder for det kimære protein. Den inkluderer naturlige og syntetiske sekvenser, og kan være en kombinasjon av syntetiske og naturlige sekvenser.

Transkripsjonsnivået bør være tilstrekkelig til å gi en mengde av RNA som er i stand til å resultere i et modifisert frø. Ved "modifisert frø" menes frø som har en påvisbart forskjellig fenotype fra et frø av en ikke-transformert plante av den samme art, f.eks. en som ikke har den aktuelle ekspresjonskassett i sitt genom. Forskjellige forandringer i fenotype er av interesse. Disse forandringer omfatter overekspressjon av olje-legemeprotein eller OBP-akkumulering på olje-legemet eller i cytoplasmaet av det resulterende kimære protein.

Polypeptidet av interesse kan være et hvilket som helst protein og omfatter f.eks. et enzym, en antikoagulant, et neuropeptid, et hormon, eller adhesiv forløper. Eksempler på proteiner omfatter interleukin-1- β , antikoagulanten Hirudin, enzymet β -glukuronidase eller et enkelt-kjedet antistoff omfattende en translasjonsfusjon av V_H - eller V_L -kjedene av et immunoglobulin. DNA-sekvensen som koder for polypeptidet av interesse kan være syntetisk, naturlig avledet, eller kombinasjoner derav. Avhengig av karakteren eller kilden for det DNA som koder for polypeptidet av interesse, kan det være ønskelig å syntetisere DNA-sekvensen med planteforetrukne kodoner. De planteforetrukne kodoner kan bestemmes ut i fra kodonene med høyest frekvens i proteinene uttrykt i størst mengde i de særlige plantearter av interesse som vertsplante.

Den termineringsregion som anvendes, vil først og fremst være én som er beleilig, siden i mange tilfeller termineringsregioner synes å være relativt utbyttbare.

Termineringsregionen kan være naturlig med transkripsjonsinitieringsregionen, kan være naturlig med den DNA-sekvens som koder for polypeptidet av interesse, eller kan være avledet fra en annen kilde. Beleilige termineringsregioner er tilgjengelige

fra Ti-plasmidet av *A. tumefaciens*, som f.eks. oktopinsyntase- og nopalin-syntasetermineringsregionene.

Ligering av DNA-sekvensen som koder for målsøkingsekvensen til genet som koder for peptidet av interesse, kan foregå på forskjellige måter omfattende terminale fusjoner, interne fusjoner, og polymere fusjoner. I alle tilfeller utføres fusjonene slik at de ikke avbryter leserammen for olje-legemeproteinet og slik at de unngår eventuelle translasjonsstoppsignaler i eller nær sammenføyningene. De forskjellige typer av terminale og interne fusjoner er vist i fig. 2 sammen med en fremstilling av deres konfigurasjoner *in vivo*.

I alle de beskrevne tilfeller ville ligeringen av det gen som koder for peptidet fortrinnsvis inkludere en linker som koder for et proteasemålmotiv. Dette ville tillate frigjøring av peptidet etter ekstraksjon som et fusjonsprotein. Potensielle spalteseter som kunne anvendes er gjenkjenningsmotiver for trombin (leu-val-pro-arg-gly) (Fujikawa et al., Biochemistry (1972) 11:4892-4899), for faktor Xa (phe-glu-gly-arg-aa.) (Nagai et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, (1985) 82:7252-7255) eller kollagenase (pro-leu-gly-pro) (Scholtissek og Grosse Gene (1988) 62:55-64).

Ved hensiktsmessige manipuleringer, som f.eks. restriksjon, tilbaketegging eller fylling i overheng for å tilveiebringe butte ender, ligering av linkere, eller lignende, kan det tilveiebringes komplementære ender av fragmentene for sammenføyning og ligering. Ved utførelse av de forskjellige trinn anvendes kloning for å oppformere DNA-mengden og tillate analyse av DNA for å sikre at operasjonene har foregått på korrekt måte. En rekke forskjellige kloningsvektorer er tilgjengelige, hvor kloningsvektoren omfatter et replikasjonssystem funksjonelt i *E. coli*, og en markør som tillater utvelgelse av de transformerte celler. Illustrerende vektorer omfatter pBR332, pUC-serien, M13mp-serien, pACYC184, osv..

Sekvensen kan således innsettes i vektoren i et hensiktsmessig restriksjonssete(r), det resulterende plasmid anvendes til transformering av *E. coli*-verten, *E. coli* dyrkes i et hensiktsmessig næringsmedium og cellene høstes og lyses og plasmidet gjenvinnes. Analysen kan involvere sekvensanalyse, restriksjonsanalyse, elektroforese eller lignende. Etter hver manipulering kan DNA-sekvensen som skal anvendes i den endelige konstruksjon begrenses og sammenføyas med den neste

sekvens, hvor hver av de partielle konstruksjoner kan klones i de samme eller forskjellige plasmider.

Flere teknikker er tilgjengelige for innføring av DNA i en plantecellevert. F.eks. kan de kimære DNA-konstruksjoner innføres i vertsceller oppnådd fra to-
 5 frøbladede planter, som f.eks. tobakk, og oljeholdige arter, som f.eks. Brassica napus ved anvendelse av standard Agrobacterium vektorer ved en transformasjonsprotokoll som f.eks. den som er beskrevet av Moloney et al., Plant Cell Rep., (1989) 8:238-242 eller Hinchey et al. Bio/Technol., (1988) 6:915-922; eller andre teknikker kjent for fagfolk på dette området. F.eks. har anvendelsen av T-
 10 DNA for transformasjon av planteceller fått betydelig oppmerksomhet og er rikelig beskrevet i EPA serie nr. 120, 516; Hoekema, I: The Binary Plant Vector System. Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, 1985, kapittel V, Knauf, et al., Genetic Analysis of Host Range Expression by Agrobacterium, I: Molecular Genetics of the Bacteria, Plant interaction, Puhler, A. redaktør, Springer-Verlag, NY, 1983, p. 245,
 15 og An et al., EMBO J. (1985), 4:277-284. Eksplantater kan dyrkes beleilig med *A. tumefaciens* eller *A. rhizogenes* for å tillate overføring av transkripsjonskonstruktet til plantecellene. Etter transformasjon ved anvendelse av Agrobakterier blir plantecellene dispergert i et hensiktsmessig selektivt medium for seleksjon, dyrket til kallus, skudd blir dyrket og småplanter regenerert fra kallus ved dyrking i
 20 rotingsmedium. Agrobacterium-verten vil inneholde et plasmid som har de vir-gener som er nødvendige for overføring av T-DNA til plantecellene og kan eller kan ikke ha T-DNA. For injeksjon og elektroporasjon (se nedenfor) kan desarmerte Ti-plasmider (som mangler tumorgenene, særlig T-DNA-regionen) innføres i plantecellen.

Anvendelsen av ikke-Agrobacterium-teknikk tillater anvendelse av
 25 konstruktene beskrevet heri til å oppnå transformasjon og ekspresjon i en rekke forskjellige én-frøbladede og to-frøbladede planter. Disse teknikker er særlig anvendelige for arter som er vanskelig å behandle i et Agrobacterium-transformasjonssystem. Andre teknikker for genoverføring omfatter biolistikk (Sanford, Trends in Biotech. (1988) 6:299-302), elektroporasjon (Fromm et al. (1985) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 82:5824-5828; Riggs og Bates (1986), Proc.
 30 Nat'l. Acad. Sci. (USA) 83 5602-5606 eller PEG-mediert DNA-opptak (Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet., 199:169-177).

Som vertscelle kan det anvendes celler fra hvilken som helst av flere frøbærende planter, hvori cellene er avledet fra plantedeler som f.eks. stengel, blad, rot, eller frø eller reproduksjonsstrukturer ifølge arten. Cellene kan være isolerte celler eller plantedeler, f.eks. bladskiver. I en spesifikk anvendelse, som f.eks. for Brassica napus, vil vertscellene vanligvis være avledet fra frøbladede stilker som beskrevet av Moloney et al. Plant Cell Rep., (1989) 8:238-242). Andre eksempler som anvender kommersielle oljefrø omfatter transformasjon av frøblad i soyabønneeksplantater (Hinchee et al. Biotechnology, (1988) 6:915-922) og transformasjon av bomullsstilker (Umbeck et al. Biotechnology, (1981) 5:263-266).

Etter transformasjon blir cellene, f.eks. som bladskiver, dyrket i selektivt medium. Når skuddene begynner å komme frem, blir de skåret ut og plassert på rotingsmedium. Etter at det har dannet seg tilstrekkelige røtter, blir plantene overført til jord. Antatte transformerte planter blir deretter testet for tilstedeværelse av en markør. Southern blotting blir gjennomført på genomisk DNA ved anvendelse av en hensiktsmessig probe, f.eks. et A. thaliana oleosingen, for å vise at det har foregått integrering av de ønskede sekvenser i vertscellegenomet.

Ekspresjonskassetten vil normalt bli sammenføyet med en markør for seleksjon i planteceller. Markøren kan beileilgis være motstand mot et herbicid, særlig et antibiotikum, som f.eks. kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, kloramfenikol e.l.. Den særlig anvendte markør vil være én som vil tillate seleksjon av transformerte celler sammenlignet med celler som mangler det DNA som er blitt innført.

Fusjonspeptidet i ekspresjonskassetten konstruert som beskrevet ovenfor, uttrykker seg i alle fall fortrinnsvis i frø under utvikling. Følgelig blir transformerte planter dyrket ifølge vanlig måte tillatt å sette frø. Se f.eks. McCormick et al. Plant Cell Reports (1986) 5:81-84. Northern blotting kan utføres ved anvendelse av en hensiktsmessig genprobe med RNA isolert fra vev, hvori transkripsjon er ventet å forekomme, slik som et frøembryo. Størrelsen av transkriptene kan deretter sammenlignes med den antatte størrelse for fusjonsproteintranskriptet.

Olje-legemeproteiner blir deretter isolert fra frøet, og analyser gjennomført for å bestemme at fusjonspeptidet er blitt uttrykt. Analysene kan f.eks. være ved PAGE. Fusjonspeptidet kan påvises ved anvendelse av et antistoff mot oleo-

sindelen av fusjonspeptidet. Størrelsen av det oppnådde fusjonspeptid kan deretter sammenlignes med den antatte størrelse av fusjonsproteinet.

To eller flere generasjoner av transgene planter kan dyrkes, og enten bestøves med den samme transformerte stamme eller forskjellige stammer, hvilket
5 identifiserer det resulterende hybrid som har de ønskede fenotypiske egenskaper, for å sikre at den aktuelle fenotypiske egenskap blir stabilt opprettholdt og arvet, og deretter kan frøene høstes for isolering av peptidet av interesse eller for anvendelse til å gi frø med den nye fenotypiske egenskap.

Det ønskede protein kan ekstraheres fra frø som er homo- eller heterozygote
10 for den innførte egenskap, ved flere forskjellige teknikker, omfattende anvendelse av et vandig, bufret ekstraksjonsmedium og en måte til oppmaling, nedbrytning, pulverisering eller på annen måte sprengning av cellene i frøene. De ekstraherte frø kan deretter adskilles (f.eks. ved sentrifugering eller sedimentering av grøten) i tre fraksjoner: et sediment eller en uløselig pellet, en vandig supernatant, og et
15 ovenpåflytende "skum" omfattende frølagringslipid og olje-legemer. Disse olje-legemer inneholder både naturlige olje-legemeproteiner og kimære olje-legemeproteiner, sistnevnte inneholdende det fremmede peptid. Olje-legemene blir skilt fra de vannløselige proteiner og slemmet opp igjen i vandig buffer.

Dersom en linker omfattende et proteasegjenkjenningssmotiv er blitt inkludert i
20 ekspresjonskassetten, blir det tilsatt til resuspensjonsbufferen en protease spesifikk for gjenkjenningssmotivet fremstilt ved tranlasjon av linkersekvensen. Dette frigjør det nødvendige peptid til den vandige fase. Et andre sentrifugeringstrinn vil nu gjenflottere de bearbeidede olje-legemer med sine tilknyttede proteiner og etterlate en vandig løsning av det nødvendige peptid. Det ønskede peptid kan felles ut,
25 modifiseres kjemisk eller lyofiliseres ifølge dets egenskaper og ønskede anvendelser.

I visse anvendelser behøver det ikke være nødvendig å fjerne det kimære protein fra olje-legemeproteinet. En slik anvendelse ville omfatte tilfeller hvor fusjonspeptidet inkluderer et enzym som er tolerant mot N- eller C-terminale fusjoner
30 og beholder sin aktivitet; slike enzymer kunne anvendes uten ytterligere spalting og rensing. Det kimære enzym-OBP ville bringes i kontakt med substrat som et fusjonsprotein. Det er også mulig om ønsket å rense enzym OBP-fusjonsproteinet

ved anvendelse av en immunoaffinitetskolonne omfattende et immobilisert høytiterantistoff mot OBP (se, f.eks. Taylor et al., (1990) supra).

Andre anvendelser for den foreliggende oppfinnelse er som følger. Olje-legemeproteiner omfatter en høy prosentandel av totalt frøprotein, således er det mulig å anrike frøet for visse ønskelige egenskaper som f.eks. høyt lysin, høyt metionin, o.l., ganske enkelt ved å gjøre fusjonsproteinet rikt på aminosyrene av interesse. Det som kunne finne anvendelse av særlig interesse er modifikasjon av korn og kornprodukter som anvendes enten direkte eller indirekte som næringskilder for mennesker og husdyr, innbefattet kveg og fjærfe. Det kan være mulig å innbefatte som fusjonspeptid et enzym som kan assistere ved påfølgende bearbeiding av oljen eller melet ved konvensjonell knusing og ekstraksjon av oljefrø, f.eks. inklusjon av et termostabilt lipidmodifiserende enzym som ville holde seg aktivt ved de forhøyede knusetemperaturer som anvendes til frøbearbeiding, og således addere verdi til det ekstraherte triglycerid- eller proteinprodukt. Andre anvendelser av fusjonsproteinet er å innbefatte anvendelse til å forbedre avlingens agronomiske sunnhet. F.eks. kunne et insekticidprotein eller en del av et immunoglobulin spesifikt for et jordbruksskadedyr som f.eks. en soppcellevegg eller -membran, kobles til olje-legemeproteinet og således redusere angrep på frøet av et bestemt planteskadedyr.

Følgende eksempler tilbys som illustrasjon.

EKSPERIMENTELT

Eksempel 1

Ekspresjon av terminale fusjoner av fremmede peptider med olje-legemeproteiner

A. C-terminale fusjoner

En genomisk klon av et olje-legemeproteingen inneholdende minst 100 bp 5' til translasjonsstarten blir klonet inn i en plasmid bærer som har evne til replikasjon i en egnet bakterievert (f.eks. pUC eller pBR322 i *E. coli*). Et restriksjonssete er plassert i regionen som koder for den hydrofile C-terminale del av genet. I et 19 kDa

OBP vil denne region typisk strekke seg fra kodonene 125 til enden av klonen. Det ideelle restriksjonssetet er unikt, men dette er ikke absolutt essensielt. Dersom intet beleilig restriksjonssete er plassert i denne reigon, kan det innføres ett ved den sete-
 5 rette mutagenesefremgangsmåte til Kunkel, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, (1985) 82:488-492. Den eneste betydelige begrensning for innføringen av dette setet er at det må plasseres 5' til translasjonsstoppsignalet for OBP-klonen.

Med denne muterte klon på plass kan det fremstilles en syntetisk oligonukleotidadapter som inneholder kodesekvens for et proteasegjenkjenningssete som f.eks. Pro-Leu-Gly-Pro eller en multimer derav. Dette er gjenkjenningssetet for
 10 proteasekollagenase. Adapteren ville bli syntetisert på en slik måte at den vil gi: et 4-base overheng på 5'-enden forlikelig med restriksjonssetet i 3'-enden av OBP-klonen, et 4-base overheng på 3'-enden av adapteren for å lette ligering til kodesekvensen for det fremmede peptid og om nødvendig ytterligere baser for å sikre at det ikke blir noe rammeskift i overføringen mellom OBP-kodesekvensen,
 15 proteasegjenkjenningssetet og kodesekvensen for det fremmede peptid. Et typisk arrangement for en slik fusjon er vist i fig. 3. Eksemplet vist her anvender et eksisterende Xho1-sete nær stoppkodonet for et gulrot OBP (Hatzopoulos et al. Plant Cell, (1990) 2:457-467). Dette blir spaltet og kan ligeres med en adapter konstruert fra de to beskrevne oligonukleotider. Denne adapter vil danne et perfekt
 20 Xho1-overheng i en ende, og vil ikke sprengte translasjonsrammen. Den andre ende danner et Nco1 overheng som er vilkårlig valgt (en hvilken som helst seks-base-kutter vil være tilstrekkelig), men som omslutter en ATG fra det ønskede fremmede peptid.

Det endelige ligeringsprodukt vil inneholde et nesten komplett OBP-gen, kodesekvens for kollagenase-gjenkjenningsmotiv og koderegionen for det ønskede
 25 peptid, alle i en enkel leseramme. Dette tredelte fragment blir klonet inn i et Agrobacterium binært plasmid (Bevan Nucl. Acid Res., (1984) 12:8711-8721) et slikt som finner bred anvendelse til overføring av fremmed DNA til planter (Fraley et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, (1983) 80:4803-4807) og dette anvendes til
 30 transformering av oljefrøplanter som f.eks. rapsfrø ved anvendelse av fremgangsmåten til Moloney et al., Plant Cell Rep., (1989) 8:238-242) eller en lignende fremgangsmåte. Transgene planter kan gjenvinnes fra dette

transformeringseksperiment, og disse blir dyrket til blomstring. Deretter setter plantene frø ved selvbefruktning.

Frøene får nå modenhet (60-80 dager) og blir deretter høstet og malt i vandig ekstraksjonsbuffer (Taylor et al., Planta, (1990) 181:18-26). Vellingen blir
 5 sentrifugert ved 5000 xg i 20 min. og vil gi et overflateskum. Dette skum blir igjen gjenvunnet og slemmet opp ved kraftig rysting i en kollagenaseassaybuffer (Scholtissek og Grosse, Gene (1988) 62:55-64). Fem enheter av kollagenase blir tilsatt, og suspensjonen inkubert under omristing i 4 timer. Etter denne tid blir
 10 suspensjonen igjen sentrifugert ved 5000 xg i 20 min. Overflateskummet fjernes og proteininnholdet i den vandige fasen analysert ved SDS-polyakrylamidgel-elektroforese. Dersom det finnes et bånd av om lag størrelsen av det nødvendige peptid, kan proteinet utfelles ved anvendelse av ammoniumsulfat, konsentreres ved anvendelse av ultrafiltrering eller lyofiliseres.

15 B. N-terminale fusjoner

Den hydrofile N-terminale ende av olje-legemeproteiner tillater fusjonen av peptider til N-terminalen, mens det fremdeles garanteres at det fremmede peptid ville bli beholdt på den ytre overflate av olje-legemet. Konfigurasjonen av slike fusjoner er vist i fig. 2IB.

20 Denne konfigurasjonen kan konstrueres fra lignende utgangsmateriale som anvendt for C-terminale fusjoner, men krever identifikasjon av et beleilig restriksjonssete i nærheten av translasjonsstarten for olje-legemeproteingenet. Et beleilig sete kan dannes i mange olje-legemeproteingener uten noen forandring i kodesekvensen, ved innføring av en enkelt baseforandring bare 5' til den første
 25 'ATG'. I olje-legemeproteiner så langt studert vil den andre aminosyre være alanin som har et kodon som begynner med en "G". Rammen for sekvensen er vist nedenfor:

A-C overgang her gir NcoI-sete

↓

3' . . . TC TCA ACA ATG GCA . . . gulrot OBP

3' . . . CG GCA GCA ATG GCG . . . mais 18KDa OBP

En enkelt baseforandring i adeninet før 'ATG' ville gi i begge tilfeller . . .

CCATGG . . . som er et Nco1-sete. Modifikasjon av denne base ved anvendelse av den seterettete mutageneseprotokoll til Kunkel (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, (1985) 82:488-492) vil således fremstille denne klon for anvendelse under forutsetning av ingen andre Nco1-seter i sekvensen.

Kodesekvensen for det fremmede peptid kan kreve fremstilling som vil tillate dets ligering direkte inn i Nco1-setet. Dette kan typisk kreve en enkel eller to-base-modifikasjon ved seterettet mutagenese (Kunkel, 1985, supra) for å generere et Nco1-sete omkring translasjonsstarten for det fremmede peptid. Dette peptid blir deretter skåret ut fra sin kloningsbærer ved anvendelse av Nco1 og et andre enzym som kutter i nærheten av målet translasjonsstopp. Ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor kan det igjen innføres et andre beleilig sete ved seterettet mutagenese. Det er blitt antydnet av Qu og Huang (1990, supra) at det N-terminale metionin kunne fjernes under bearbeiding av proteinet *in vivo*, og at alaninet umiddelbart nedstrøms for dette kunne acyleres. For å ta vare på denne mulighet kan det være nødvendig å beholde Met-Ala-sekvensen i den N-terminale ende av proteinet. Dette kan lett oppnås ved anvendelse av forskjellige strategier som innfører et beleilig restriksjonssete i kodesekvensen i eller etter Ala-kodonet. Ved sete-rettet mutagenese kunne sekvensene f.eks. modifiseres som følger:

3' . . . TC TCA ACA ATG GCA GAA CGA GGC ACT TAT
muterer til

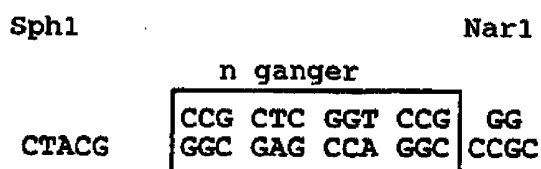
NarI

3' . . . TC TCA ACA ATG GCA TGC CGA GGC GCC TAT

SphI

Denne forandring av et enkelt kodon ville innføre et Sph1-sete i kodesekvensen. En andre forandring som kunne innføres under den samme mutageneserunde ville omdanne to baser i kodon 6 til å gi GGC GCC, et Nar1-sete.

Dette muterte gen kunne så åpnes med Sph1 og Nar1 under dannelse av et rettet kloningkutt som ville eliminere tre kodoner. Inn i dette setet kunne det innføres en adapter inneholdende et 3' overheng med sekvensen CATG ... (forlikelig med Sph1) og et GC 5' overheng i den motsatte ende. Den presise sekvens for denne adapter er vist nedenfor:



Denne adapter ville gjendanne både Sph1 og Nar1 restriksjonssetene som kunne anvendes for diagnostiske formål. Sph1-setet kunne nu anvendes til å åpne plasmidet og kloner i rammen et DNA-fragment omsluttende sekvensen for et anvendelig peptid. Orienteringen av kloningen kunne deretter analyseres ved å kutte i et hvilket som helst asymmetrisk plassert sete og Nar1 i plasmidet.

De resulterende konstruksjoner fra disse N-terminale fusjoner ville være typiske for eksemplene IB i figur 2. De ville inneholde en OBP-promotorsekvens, en i-rammefusjonen i de første få kodoner av OBP-genet av en høyverdi-peptidkodende sekvens med sitt eget ATG som startsignal om nødvendig, og resten av OBP-genet og terminatoren.

Dette modifiserte gen blir innført i et binært Agrobacterium plasmid (Bevan, (1984), supra) og mobilisert inn i Agrobacterium. Transformasjoner blir gjennomført som beskrevet ovenfor. Gjenvinning av høyverdipeptidet fra frø blir gjennomført som beskrevet for "C-terminale fusjoner".

C. Interne translasjonsfusjoner

En tredje type fusjon involverer plassering av en høyverdi-peptidkodende sekvens internt til kodesekvensen for OBP. Denne type fusjon krever den samme strategi som i N-terminale fusjoner, men kan bare være funksjonell med modifikasjoner i regioner med lav konservering, ettersom det blir antatt at regioner med høy bevaring i disse OBP-er er essensielle for målsøking av det modne protein.

Hovedforskjellen i denne type fusjon er nødvendigheten av flankering av kollagenasegjenkjenningssteder for avgivelse av proteient. Dette betyr at istedenfor standard kollagenase linker/adaptersystemer så langt beskrevet, er det nødvendig å ha en linker med følgende form:



De kohesive ender 1 og 2 ville bli anvendt til å klonе adapteren inn i en OPB-klon på rettett måte. Det nestede restriksjonssete blir deretter anvendt til innføring av kodesekvensen for høyverdipeptidet, flankert av hensiktsmessige restriksjonssteder eller linkere. Orienteringen kontrolleres ved anvendelse av et asymmetrisk plassert restriksjonssete i kodesekvensen for høyverdipeptidet og ett av de to restriksjonssteder som flankerer kodesekvensen for kollagenasegjenkjenningssmotivet.

Mobilisering av disse konstruksjoner til *Agrobacterium*-plasmider og deretter til planter er identisk med den tidligere beskrevne fremgangsmåten. Gjenvinning av høyverdiproteinet fra frøene av transgene planter er noe forskjellig, ved at etter at olje-legemene er blitt isolert og vasket kan det være nødvendig å delipidere olje-legemene for å få adgang til kollagenasegjenkjenningsstedene som kunne være gjemt på innsiden av olje-legemet i lipidfasen. Dette trinn kan redusere visse fordeler ved anvendelse av olje-legemeproteiner som bærere, men kan på den annen side være svært beleilig for proteinsekvenser som er labile i vandig medium eller i plantecytoplasma.

D. Inter-dimere translasjonsfusjoner

Det er mulig å danne en konstruksjon, hvori hele kodesekvensen for OBP blir gjentatt. Et dimert protein fremstilt fra denne konstruksjon kan fremdeles inneholde alle de nødvendige faktorer for målsøking av OBP til olje-legemet. En slik konstruksjon ville inneholde en promotorregion, en hel eller nesten fullstendig åpen leseramme for et OBP, men utelukke translasjonsstoppen, og deretter en fullstendig åpen leseramme for et andre OBP, denne gang utstyrt med et translasjons"stopp" og en terminatorregion.

Ved konstruksjonen av dette kimære gen blir det enten funnet eller dannet et par av ulike restriksjonsseter i sammenknytningsregionen for de to kopier. Disse seter anvendes til å muliggjøre innføring av en linker slik som det er beskrevet ovenfor for interne translasjonsfusjoner. Linkeren inneholder ikke bare sett av kollagenasegjenkjenningsmotiver, men også et indre restriksjonssete, hvori det kan nestes en sekvens som koder for et høyverdiprotein. Formen av denne konstruksjonen er vist i fig. 2 III. Mobilisering av denne konstruksjon til Agrobacterium og deretter til planter er nøyaktig som ovenfor. Gjenvinning av høyverdiproteinet fra frø av de transformerte planter ville bli gjennomført ved anvendelse av den samme fremgangsmåte som beskrevet for C-terminale fusjoner ovenfor.

Eksempel 2

Strategi for kloning og ekspresjon av Interleukin-1- β (IL-1- β) som en fusion med oleosiner i planter

A. Kloning og sekvensering av et Arabidopsis thaliana oleosingen

Et Brassica napus oleosingen (Murphy et al, (1991) Biochim Biophys Acta 1088: 86-94) ble anvendt til screening av et genomisk bibliotek av A. thaliana (cv. Columbia) i EMBLA3A (Stratagene). Screeningen resulterte i isolering av et EMBLA3A-klon (λ 2.1) inneholdende et 15 kb genomisk fragment fra A. thaliana. Oleosinet ble kartlagt innenfor et 6,6 kb KpnI-innskudd, innenfor dette 15 kb fragment (fig. 5). Et 1,8 kb NcoI/KpnI-fragment inneholdende oleosingenet ble

endefylt og subklonet i Smal-setet av RFM13mp19. 1,8 kb-innskuddet ble spaltet med hensiktsmessige restriksjonsenzymmer og subklonet i M13mp19 for sekvensering. 1800 bp-sekvensen av *A. thaliana* oleosingenet er presentert i fig. 1a.

Alle kloningsfremgangsmåtene ble utført ifølge Sambrook et al., (1989) (Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

B. Design av et oligonukleotid som koder for IL-1- β

IL-1- β består av 9 aminosyrer (aa); val-gln-gly-glu-glu-ser-asn-asp-lys (Antoni et al., (1986) J. Immunol. 137:3201-3204). Proteasefaktoren Xa kan spalte en proteinsekvens som inneholder aa-sekvensen ile-glu-gly-arg. Spaltingen finner sted etter aminosyren arg. Basert på disse sekvenser ble det utformet et oligonukleotid (GVR11, fig. 5), som i tillegg til IL-1- β -kodesekvensen inneholder kodesekvensen for faktor Xa-spaltstedet, og 18 nukleotider av 3'-koderegionen av *A. thaliana* oleosinet (baseposisjon 742-759). IL-1- β -kodesekvensen ble utformet ved anvendelse av optimal kodonanvendelse for *B. napus* og *A. thaliana* oleosinet (tabell 1).

Tabell 1

Kodonanvendelse av *A. thaliana*¹ og *B. napus* oleosin²

TTT	phe	F	5	TCT	ser	S	8	TAT	tyr	Y	6	TCT	cys	C	-
TTC	phe	F	3	TCC	ser	S	10	TAC	tyr	Y	11	TGC	cys	C	-
TTA	leu	L	-	TCC	ser	S	2	TAA	OCH	Z	-	TGA	OPA	z	-
TTG	leu	L	4	TGA	ser	S	-	TAG	AMB	Z	-	TGG	trp	w	2
CTT	leu	L	10	CCT	pro	p	3	CAT	his	H	4	CGT	arg	R	6
CTC	leu	L	11	CCC	pro	p	1	CAC	his	H	6	CGC	arg	R	-
CTA	leu	L	-	CCA	pro	p	4	CAA	gln	Q	4	CGA	arg	R	1
CTA	leu	L	6	CCG	pro	p	2	CAG	gln	Q	17	CGG	arg	R	-
ATT	ile	I	7	ACT	thr	T	11	AAT	asn	N	-	AGT	ser	S	5
ATC	ile	I	13	ACC	thr	T	14	AAC	asn	N	1	AGC	ser	S	3
ATA	ile	I	3	ACA	thr	Y	7	AAA	lys	K	5	AGA	arg	R	5
ATG	met	M	11	ACG	thr	T	5	AAG	lys	K	10	AGG	arg	R	3
GTT	val	V	11	GCT	ala	A	17	GAT	asp	D	8	GGT	gly	G	0
GTC	val	V	9	GCC	ala	A	2	GAC	asp	D	19	GGC	gly	G	9
GTA	val	V	-	GCA	ala	A	10	GAA	glu	E	2	GGA	gly	G	14
GTG	val	V	-	GCG	ala	A	2	GAG	gly	E	2	GGG	gly	G	5

¹ Se figur 1A.

² Lee og Huang (1991) Plant Physical 96: 1395-1397.

C. Dannelse av en *A. thaliana* oleosin-IL-1- β -fusjon

Basert på sekvensen:

5' CACACCAGGAACTCTCTGGTAAGC 3'

5 (baseposisjon: -838 til -814), ble oligonukleotid GVR10

5' CACTGCAGGAACTCTCTGGTAAGC 3'

utformet. GVR10 inneholder et PstI-restriksjonssete (understreket) for å lette
 10 kloningen. Polymerasekjedereaksjonen (PCR) ble anvendt til oppformering av
 regionen mellom GVR10 og GVR11. Reaksjonsblandingen inneholdt: 16 μ l dNTPs
 (1,25 mM), 10 μ l 10X PCR-buffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM
 MgCl₂, 0,1% (v/v) gelatin), 5 μ l GVR11 (20 μ M), 1 μ l Taq DNA-polymerase (1 u/ μ l)
 og 64 μ l H₂O. Reaksjonen ble utført i 30 cykler. Hver syklus bestod av 1 min.
 15 denaturering ved 92°C, 1 min. avherding ved 45°C og 3 min. forlengelse ved 72°C.
 PCR-reaksjonen ga et enkelt fragment med 1652 nukleotider.

D. Kloning av *A. thaliana* oleosin-IL-1- β (OBPIL) fusjonen

En 5' Sall-nopalinsyntase (nos) terminator-EcoRI 3'-sekvens ble isolert fra
 20 pBI121 (Clontech laboratories) og klonet inn i Sal/EcoRI-setene av pUC19.
 Plasmidet ble kalt pTerm. 1652 bp-fragmentet (beskrevet i C.) ble isolert og spaltet
 med restriksjonsenzymene PstI og Sall. Dette fragment ble klonet i pTerm. Det
 resulterende plasmid ble kalt pUCOBPILT (fig. 5). Dette plasmid ble spaltet med
 EcoRI og PstI og resulterte i den spaltede pUC19-vektor og EcoRI-*A. thaliana*
 25 oleosin-IL-1- β - nos -PstI fusjonen PstI (OBPILT). Den komplette sekvens av
 OBPILT er vist i fig. 7. OBPILT ble subklonet i EcoRI/PstI-setene av pBluescript+.
 Dette plasmid (pBIOBPILT) ble spaltet med PstI og HindIII, og PstI-OBPILT-HindIII-
 fragmentet ble subklonet i et binært *Agrobacterium*plasmid (Bin 19) (Bevan, M.,
 (1984) Nucl. Acid. Res. 12: 8711-8721) inneholdende en seleksjonsmarkør
 30 (neomycinfosfotransferase og PstI-HindIII unike seter. Det resulterende plasmid ble
 kalt pCGOBPILT. En skematisk fremstilling av kloningsfremgangsmåten er vist i fig.
 5. For beskrivelser av forskjellige binære plasmider, se, pGA642 eller 645; An et al.

(1985) EMBO. J. 4 277-288 eller pCGN1558 eller 1559; MacBride og Summerfeldt (1990) Plant. Molec. Biol. 14 269-276.

F.Transformering av pCJOBPILT til Agrobacteriumstammen EHA101

5 En enkelt EHA101 koloni (Hood et al., (1986) J. Bact. 168:1291-1301) ble
anvendt til å inokulere 5 ml av LB+100 µg/ml kanamycin. Denne kultur ble dyrket i
48 timer ved 28°C. Denne 5 ml kultur ble anvendt til inokulering av 500 ml av
LB+100 µg/ml kanamycin. Denne kultur ble dyrket ved 28°C inntil kulturen nådde en
tetthet på OD₆₀₀=0,5 (ca. 4 timer). Cellene ble deretter spunnet ned (10 min., 5000
10 x g) og slemmet opp igjen i 500 ml sterilt H₂O (gjentatt 2x). Cellene ble spunnet
igjen og resuspendert i 3 ml sterilt H₂O inneholdende 10% glycerol. 40 µl av cellene
ble allkvotert i Eppendorf rør, og enten anvendt direkte for elektroporasjon, eller
lagret ved -80°C for fremtidig anvendelse. Elektroporasjon ble utført ifølge Bower et
al., Nucl. Acid. Res. (1988) 16 6127-6145. Pulsgeneratoren var satt på en
15 kondensator på 25 µF, 2,5 kV og 200 ohm i parallell med prøvekommeret.

G.Transformering av Nicotiana tabacum (tobakk) med pCJOBPILT

Det EHA 101-holdige pCJOBPILT ble anvendt til transformering av skiver av
tobakkblad. Åtte til ti centimeter lange tobakkblader ble tatt fra drivhusdyrkede
20 planter, sterilisert i 70% etanol i 20 sekunder og deretter i 10% blekevæske (som
f.eks. Javex) i 8 min.. Bladene ble deretter skylt 6 ganger med sterilt vann.
Bladkantene, samt midtstilken ble skåret ut fra bladene, og de gjenværende blad ble
oppdelt i 5x7 mm firkanter eller skiver med en diameter på 5 mm. Ca. 30 bladskiver
ble oppsamlet og plassert i en liten petriskål. Agrobacterium-løsningen ble deretter
25 helt over tobakk-skivene, og inkubering foretatt i 9 min.. Bladskivene ble deretter
blottet på sterilt Whatman filterpapir og plassert med den abaksiale side ned, på
medium I (MS, 3% sukrose og 2 mg/l 2,4-D). Ko-dyrking foregikk i de følgende 48
timer. På dette punkt ble bladskivene overført til seleksjonsmedium (MD, 3%
sukrose, 2,5 mg/l Ba, 0,1 mg/l NAA, 500 mg/l karbenicillin, og 100 mg/l kanamycin)
30 hvor de ble holdt i de neste 3-4 uker. Når skuddene begynte å komme frem ble de
skåret av og plassert i rotingsmedium (MS, 3% sukrose, 0,1 mg/l NAA, 500 mg/l-

karbenicillin, og 50 mg/l kanamycin). Etter at det hadde dannet seg tilstrekkelige røtter, ble tobakksplantene overført til jord.

H. Transformasjon av *B. napus* med pCJOBPILT

Transformasjonen av *B. napus* ble utført ifølge Moloney et al., (1989) PlanCell Rep, 8:238-242, hvilken beskrivelse er inkorporert heri ved referanse.

Transformasjonsfremgangsmåte

Enkeltkolonier av *Agrobacterium tumefaciens* stamme EHA 101

inneholdende det binære plasmid ble dyrket over natten ved 28°C i AB medium. En 50 µl prøve av denne suspensjon ble dyrket over natten ved 28°C i 5 ml av MG/L substrat supplementert med hensiktsmessige antibiotika. Denne bakterie-suspensjon ble pelletert ved sentrifugering i 15 min. ved 10.000 x g, og deretter slemmet opp igjen i 10 ml av MS medium inneholdende 3% sukrose og ved pH 5,8. En tynn film av denne suspensjon ble anvendt til å dekke bunnen av en 5 cm petri-skål. Individuelle utskårne kotyledoner ble tatt fra platene beskrevet ovenfor, og den kappede overflate av deres petioler ble dykket ned i denne bakteriesuspensjon i et par sekunder. De ble umiddelbart returnert til de samme MS-platene hvorfra de var blitt tatt. Kotyledonene ble kodyrket med *Agrobacterium* i 72 timer. Ingen fødersjikt ble anvendt.

Etter ko-dyrking ble kotyledonene overført til regenereringsmedium omfattende MS-medium supplementert med 20 µM benzyladenin, 3% sukrose, 0,7% fytagar, pH 5,8 og 500 mg/l karbenicillin (Pyopen, Ayerst) og 15 mg/l kanamycinsulfat (Boehringer-Mannheim). Igjen ble petiolene omhyggelig innbedded i agaren til en dybde av 2 mm. Utplantingstettheten ble holdt på 10 eksplantater pr. plate. Høyere tettheter reduserer regenerasjonshyppigheten.

Seleksjon og planteregenerering

Eksplantatene ble holdt på regenereringsmedium under lys- og temperaturbetingelser spesifisert ovenfor i 2-3 uker. I løpet av denne tid kom det til syne mange skudd på over halvparten av eksplantatene med relativt liten callus-dannelse. Noen av disse skudd undergår bleking etter den fjerde dyrkingsuke. De

gjenværende grønne skudd ble subdyrket på skuddforlengelsesmedium som var det samme som regenerasjonsmedium minus benzyladeninet. Én eller to uker på dette medium tillot etablering av apikal dominans fra de dannede skuddklynger. De således dannede skudd ble overført til "rotings"-medium inneholdende MS medium, 3% sukrose, 2 mg/l indolsmørsyre, 0,7% fytagar og 500 mg/l karbenicillin. Intet kanamycin ble anvendt på dette trinn, ettersom det ble funnet at det foregikk raskere rotetablering uten seleksjonsmidlet, mens svært få "fluktilfeller" i virkeligheten lykkedes i å rote seg etter de to seleksjonsrunder på regenererings- og skuddforlengelsesmedium.

I. Stabil integrering av OBPILT i tobakk- og *B. napus*-genomene

Antatt transformerte planter ble testet for neomycin-fosfotransferaseaktivitet. Genomisk DNA fra planter som viste denne aktivitet ble isolert. Southern blotting ble gjennomført for å demonstrere at sekvensene mellom T-DNA-grensene (OBPILT og neomycin-fosfotransferase-gen) ble stabilt integrert inn i genomene av *B. napus* og tobakk. Tobakk Southern ble probet med *A. thaliana* oleosingenet, og neomycin-fosfotransferasegenet. *B. napus* Southern ble probet med neomycin-fosfotransferasegenet.

J. Ekspresjon av oleosin-IL-1- β -fusjonen i tobakksplanter

RNA ble isolert fra embryo under utvikling oppnådd fra transformerte og ikke-transformerte planter. Northern blotting ble utført ved anvendelse av *A. thaliana*-oleosinet som genprobe. I alle de testede transformerte planter kunne det påvises et 850 nt transkript. Størrelsen av disse transkripter tilsvarer den forventede størrelse av oleosin-IL-1- β mRNA. Disse transkripter kunne ikke påvises i de ikke-transformerte planter.

K. Akkumulering av oleosin-IL-1- β -proteinet

Olje-legemeproteiner ble isolert fra transformerte tobakksfrø (Holbrook et al., (1991) Plant Physical 979:1051-1058. PAGE ble gjennomført, og proteinet ble overført fra gelen til PVDF-membraner. Et antistoff som ble fremstilt mot et 22 kDa oleosin av *B. napus*, ble anvendt til påvisning av oleosin-IL-1- β -fusjonen i

tobakksfrøene. Dette antistoff gjenkjenner alle hovedoleosinene i *B. napus* og *A. thaliana*. Dessuten vil dette antistoff gjenkjenne tobakk-oleosinene. Tobakk-oleosiner har størrelser som er forskjellige fra *A. thaliana*- og *B. napus*-oleosinene. I de transformerte tobakksfrø kunne anti-22 kDa antistoffet gjenkjenne et 20 kDa-protein, som ikke var tilstede i det ikke-transformerte tobakksfrø. Den forutsette størrelse av oleosin-IL-1- β -fusjonen er 20,1 kDa. Et sammendrag av resultatene er vist i tabell 2.

Ved å uttrykke et peptid av interesse konjugert til et olje-legemeprotein, eller en tilstrekkelig del derav for å greie å komme frem til olje-legemene, kan peptidet av interesse lett bli rensset slik at det er i alt vesentlig fritt for andre cellekomponenter. Fusjonsproteinet kan spaltes etter rensing, eller kan anvendes uten spalting. De aktuelle fremgangsmåter og blandinger gir en rask, enkel fremgangsmåte til rensing av et polypeptid av interesse.

Alle publikasjoner og patentsøknader nevnt i denne beskrivelse er inkorporert heri ved referanse i den samme utstrekning som om hver enkelt publikasjon eller patentsøknad spesifikt og individuelt var angitt å være inkorporert ved referanse.

Tabell 2

Sammendrag av ekspressionsresultater¹

	Stabil integrering Southern Blotting	Ekspresjon av Oleosin-IL-1b Northern Blotting	Påvisning av 20kDa-protein Western Blotting
B. napus: ikke transformert	-	NT	NT
transformant # 12	+	NT	NT
Tobakk:			
ikke transformert	-	+	+
transformant A	+	+	+
transformant B	+	+	+
transformant C	+	+	+
transformant L	+	+	+

¹ Stabil integrering, bestemt som beskrevet i I, supra. Ekspresjon av oleosin-IL-1-b-fusjonen som beskrevet i J, supra. Påvisning av et antatt oleosin -IL-1-b-fusjonsprotein var som beskrevet i K, supra. NT=Ikke testet.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å oppnå ekspresjon av et peptid av interesse i frø, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter:

5 transformering av en vertsplantecelle med en ekspresjonskassett under genomiske integrasjonsbetingelser, hvor nevnte ekspresjonskassett omfatter som komponenter, i transkripsjonsretningen, en første DNA-sekvens omfattende en tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartsetet av et gen uttrykt i frø for å oppnå ekspresjon av en DNA-sekvens i frø; en andre DNA-sekvens som koder en
10 tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein for å tilveiebringe oppsøking av peptidet av interesse til et olje-legeme, nevnte andre DNA-sekvens inkluderer minst ett naturlig eller syntetisk restriksjonssete inn i hvilket er innskutt i leseramme en tredje DNA-sekvens som koder et peptid av interesse med det unntak at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein; og en
15 translasjons- og transkripsjonstermineringsregion, hvor nevnte komponenter er operativt forbundet, og ekspresjon av nevnte andre DNA-sekvens er regulert av nevnte første DNA-sekvens for å oppnå ekspresjon i frø.

2. Fremgangsmåte i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst én
20 av nevnte regulator og nevnte første DNA-sekvens kommer fra *Arabidopsis thaliana*.

3. Fremgangsmåte for å oppnå ekspresjon av et peptid av interesse i frø ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fremgangsmåte omfatter:

25 transformering av en vertsplantecelle med en DNA-konstruksjon under genomiske integrasjonsbetingelser, hvor nevnte DNA-konstruksjon omfatter en første DNA-sekvens som koder for et peptid av interesse med det unntak at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein innskutt i leseramme inn et olje-legemeprotein (OBP) -gen som inkluderer en tilstrekkelig del av regulatorregionen 5' til translasjonsstartsetet av nevnte OBP-gen
30 for å tilveiebringe ekspresjon av nevnte gen i frø, hvor nevnte sekvens er innskutt ved et sete i nevnte gen slik at det uttrykkes under nevnte regulatorregion, hvor nevnte DNA-konstruksjon blir integrert inn i genomet av nevnte plantecelle; og

dyrke nevnte plante for å produsere frø, hvor nevnte polypeptid av interesse uttrykkes som et fusjonsprotein med ekspresjonsproduktet av nevnte OBP-gen.

4. Fremgangsmåte i henhold til krav 3, karakterisert ved at den ytterligere omfatter:

isolering av nevnte fusjonsprotein fra olje-legemer i celler av nevnte frø.

5. Fremgangsmåte i henhold til krav 4, karakterisert ved at nevnte isolering omfatter:

lyse av celler av nevnte frø for å frigjøre nevnte olje-legemer; og ødelegging av nevnte olje-legemer hvor nevnte fusjonsprotein blir frigjort.

6. Fremgangsmåte i henhold til krav 5, karakterisert ved at nevnte isolering videre omfatter:

å kontakte nevnte fusjonsprotein med en protease i stand til å gjenkjenne et proteasegjenkjennelsessete i nevnte fusjonsprotein lokalisert før N-terminalen av nevnte peptid av interesse.

7. Fremgangsmåte i henhold til krav 6, karakterisert ved at ytterligere omfatter:

før nevnte kontakting bindes nevnte fusjonsprotein til en fast fase omfattende et antistoff i stand til å binde til ekspresjonsproduktet av nevnte OBP-gen.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til å oppnå et rensset peptid av interesse, karakterisert ved at nevnte fremgangsmåte omfatter:

transformering av en vertsplantecelle med en DNA-konstruksjon under genomiske integrasjonsbetingelser, hvor nevnte DNA-konstruksjon omfatter en første DNA-sekvens som koder for et peptid av interesse, under forutsetning av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein, innskutt i leseramme inn i olje-legemeprotein (OBP) -genet som inkluderer en tilstrekkelig del av regulatorregionen 5' til translasjonsstartsetet av nevnte OBP-gen for å oppnå ekspresjon av nevnte gen i frø, hvor nevnte sekvens er

innskutt i et sted i nevnte gen slik at ekspresjon av nevnte DNA-sekvens kontrolleres av nevnte regulatorregion, hvor nevnte DNA-konstruksjon blir integrert inn i genomet av nevnte plantecelle;

dyrking av nevnte plante for å produsere frø, hvor nevnte peptid av interesse
5 uttrykkes som et fusjonsprotein med ekspresjonsproduktet av nevnte OBP-gen;

isolering av olje-legemer fra cellene av nevnte frø,

ødelegging av nevnte olje-legemer, hvor nevnte fusjonsprotein blir frigjort; og

rensing av nevnte peptid av interesse.

10 9. Fremgangsmåte i henhold til krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte peptid av interesse er forskjellig fra et peptid som kodes av et plantegenom.

10. Fremgangsmåte i henhold til krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte peptid av interesse er forskjellig fra et peptid naturlig tilstede i et olje-legeme.

15

11. Fremgangsmåte i henhold til krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte isolering omfatter:

å oppsamle en olje-legemefraksjon, etterfulgt av lyse av cellene fra nevnte
frø.

20

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for å oppnå et peptid av interesse i et olje-legeme, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fremgangsmåte omfatter :

ekspresjon av nevnte peptid i frø som et fusjonspolypeptid med en
tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein for å oppnå oppsøking av nevnte

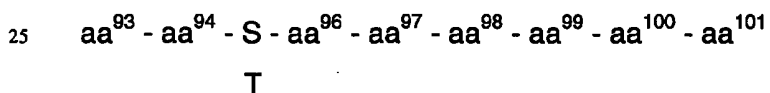
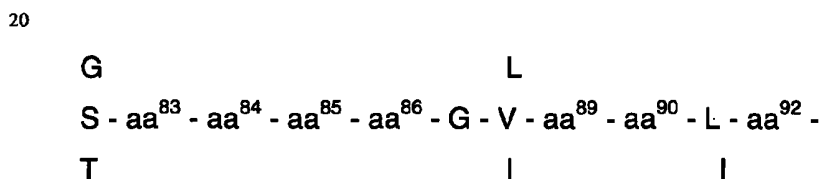
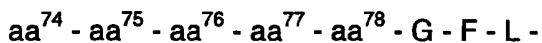
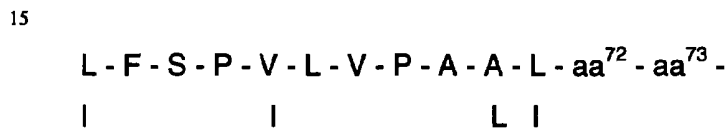
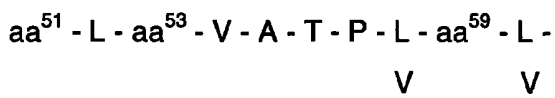
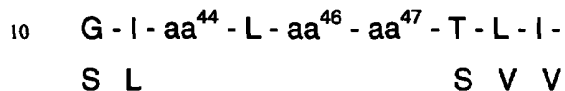
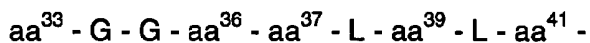
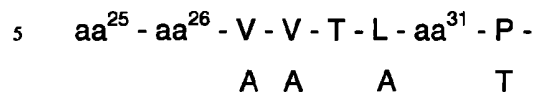
25 fusjonspolypeptid av nevnte olje-legeme, med det unntak at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

13. Fremgangsmåte i henhold til krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fusjonspolypeptid er et fusjonspolypeptid i henhold til et hvilket som helst av kravene

30 14-21.

14. Fusjonspolypeptid fremstilt ifølge fremgangsmåten i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i stand til å målsøke et olje-legeme, omfattende:

a) et første peptid fra et olje-legemeprotein med formelen



hvor

aa²⁵ kan være en hvilken som helst aminosyre;

30 aa²⁶ er en nøytral alifatisk aminosyre;

aa³¹ er en nøytral ikke-substituert alifatisk aminosyre på fra 3-6 karbonatomer;

aa³³ er en nøytral ikke-substituert alifatisk aminosyre på fra 3-6 karbonatomer;

- aa³⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre på fra 3-5 karbonatomer;
- aa³⁷ er en nøytral ikke-substituert aminosyre;
- aa³⁹ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁴¹ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- 5 aa⁴⁴ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- aa⁴⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller en oksy-substituert aminosyre;
- aa⁴⁷ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁵¹ er glycin, leucin, alanin, valin eller isoleucin;
- aa⁵³ er alanin, glycin, valin, leucin, isoleucin eller treonin;
- 10 aa⁵⁹ er en nøytral alifatisk eller aromatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁷² er treonin, alanin eller leucin;
- aa⁷³ er valin, leucin eller treonin;
- aa⁷⁴ er alanin eller glycin;
- aa⁷⁵ er leucin eller treonin;
- 15 aa⁷⁶ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller tio-substituert aminosyre;
- aa⁷⁷ er isoleucin, alanin eller valin;
- aa⁷⁸ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre;
- aa⁸³ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller oksy-substituert aminosyre;
- aa⁸⁴ er glycin;
- 20 aa⁸⁵ er glycin eller alanin;
- aa⁸⁶ er fenylalanin eller leucin;
- aa⁸⁹ er alanin, treonin eller glycin;
- aa⁹⁰ er alanin eller glycin;
- aa⁹² er en nøytral alifatisk aminosyre med en oksy-substitusjon;
- 25 aa⁹³ er valin eller serin;
- aa⁹⁴ er fenylalanin eller leucin;
- aa⁹⁶ er en nøytral alifatisk tio-substituert aminosyre eller en nøytral aromatisk heterocyklisk aminosyre;
- aa⁹⁷ er en nøytral alifatisk ikke-substituert eller tio-substituert aminosyre;
- 30 aa⁹⁸ er en nøytral alifatisk ikke-substituert aminosyre eller en aromatisk oksy-substituert aminosyre;
- aa⁹⁹ kan være en hvilken som helst aminosyre;

aa¹⁰⁰ er en oksy-substituert aminosyre, enten alifatisk eller aromatisk;

aa¹⁰¹ er en nøytral ikke-substituert alifatisk eller aromatisk aminosyre, fusjonert til;

b) et andre peptid med den forutsetning at nevnte andre peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

15. Polypeptid i henhold til krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte andre peptid inkluderer aminosyresekvensen av interleukin-1-β:

V - Q - G - E - E - S - N - D - K.

16. Polypeptid i henhold til krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte andre peptid omfatter en antigen-aminosyresekvens for å tilveiebringe et immunogen.

17. Fusjonspolypeptid fremstilt ifølge fremgangsmåten ifølge krav 1, i stand til å oppsøke et olje-legeme, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:

(a) et første peptid omfattende en del av et olje-legemeprotein som er tilstrekkelig til at fusjonspolypeptidet kan oppsøke et olje-legeme; og

(b) et andre peptid med det unntak at nevnte andre peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

18. Fusjonspolypeptid i henhold til krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at det første peptidet omfatter i det minste den hydrofobe delen av olje-legemeproteinet.

19. Fusjonsprotein i henhold til krav 17 eller 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at olje-legemeproteinet i del (a) er oleosin.

20. Fusjonsprotein i henhold til krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte første peptid omfatter minst tolv påfølgende aminosyrer inkludert i den følgende aminosyresekvens:

A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-

S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
 I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
 L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K-Y-
 A.

5

21. Fusjonspolypeptid i henhold til et hvilket som helst av kravene 17 til 20, karakterisert ved at det første peptidet omfatter:

(a) den følgende aminosyresekvens:

10 M-M-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-
 S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
 S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
 I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
 L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-KY-
 15 A-T-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-
 S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-
 E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T; eller

20

(b) et peptid som har konservative aminosyresubstitusjoner av aminosyresekvensen i (a).

22. Kimær DNA-konstruksjon som koder et fusjonspolypeptid, karakterisert ved at den omfatter:

(a) en første DNA-sekvens som koder en tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein som er gjør fusjonspolypeptidet i stand til å oppsøke et olje-legeme; og

(b) en andre DNA-sekvens som koder et peptid med det unntak at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

23. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til krav 22, karakterisert ved at den første DNA-sekvensen koder for minst den hydrofobe delen av olje-legemeproteinet.

30

24. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til krav 22 eller 23, k a r a k t e r i s e r t v
e d at olje-legemeproteinet i del (a) er oleosin.

25. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til krav 22, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
5 den første DNA-sekvensen koder for minst tolv påfølgende aminosyrer inkludert i
den følgende aminosyresekvensen:

A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
10 I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K-Y-
A.

26. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til kravene 21, 22 eller 23,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den første DNA-sekvensen koder:
(a) den følgende aminosyresekvensen:

M-M-G-R-D-R-D-Q-Y-Q-M-S-G-R-G-S-D-Y-S-K-
S-R-Q-I-A-K-A-A-T-A-V-T-A-G-G-S-L-L-V-L-
20 S-S-L-T-L-V-G-T-V-I-A-L-T-V-A-T-P-L-L-V-
I-F-S-P-I-L-V-P-A-L-I-T-V-A-L-L-I-T-G-F-
L-S-S-G-G-F-G-I-A-A-I-T-V-F-S-W-I-Y-K-Y-
A-T-G-E-H-P-Q-G-S-D-K-L-D-S-A-R-M-K-L-G-
S-K-A-Q-D-L-K-D-R-A-Q-Y-Y-G-Q-Q-H-T-G-G-
25 E-H-D-R-D-R-T-R-G-G-Q-H-T-T; eller

(b) et peptid som har konservative aminosyresubstitusjoner i aminosyre-
sekvensen i (a).

27. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til et hvilket som helst av kravene 22 til
30 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter:

vektor-DNA inneholdende minst en regulatorsekvens operativt forbundet med nevnte kimære DNA-sekvens som er i stand til å dirigere replikasjon av nevnte kimære DNA i en vertscelle.

5 28. DNA-konstruksjon i henhold til krav 27, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte regulatorsekvens er ytterligere i stand til å dirigere ekspresjon av nevnte kimære DNA i en vertscelle.

29. Kimær DNA-konstruksjon i henhold til et hvilket som helst av kravene 22 til
10 26, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte DNA er cDNA.

30. Ekspresjonskassett, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:
som komponenter i transkripsjonsretningen:

- en regulator-DNA-sekvens omfattende en tilstrekkelig del av regionen 5' til
15 translasjonsstartsetet til et gen uttrykt i frø for å tilveiebringe ekspresjon av en DNA-sekvens i frø;
- en kimær DNA-sekvens som koder et fusjonspolypeptid og omfatter (a) en første DNA-sekvens som koder en tilstrekkelig del av et olje-legemeprotein for å tilveiebringe oppsøking av fusjonspolypeptidet til olje-legemet, nevnte første DNA-
20 sekvens inkluderer minst ett restriksjonssete, og (b) en andre DNA-sekvens som koder et peptid med unntak av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein; og
- en translasjons- og transkripsjonstermineringsregion;
hvor nevnte komponenter er operativt forbundet og uttrykkes av nevnte kimære
25 DNA-sekvens regulert av nevnte regulator-DNA-sekvens.

31. Ekspresjonskassett i henhold til krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte regulator-DNA-sekvens er fra et gen uttrykt i et korn eller kornslagfrøcelle.

30 32. Ekspresjonskassett i henhold til krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst én av nevnte regulator-DNA-sekvens og nevnte første DNA-sekvens kommer fra genomet av *Arabidopsis thaliana*.

33. Ekspresjonskassett ifølge krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

som komponenter i transkripsjonsretningen:

- en regulator-DNA-sekvens omfattende en tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartsetet av et gen uttrykt i frø for å tilveiebringe ekspresjon av en DNA-sekvens i frø;
 - en kimær DNA-konstruksjon i henhold til et hvilket som helst av kravene 22 til 29; og
 - en translasjons- og transkripsjonstermineringsregion;
- hvor nevnte komponenter operativt er bundet og uttrykt av nevnte kimære DNA-sekvens og er regulert av nevnte regulator-DNA-sekvens.

34. Ekspresjonskassett ifølge krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

- et olje-legemeprotein (OBP) -gen som inkluderer en tilstrekkelig del av regionen 5' til translasjonsstartsetet for å tilveiebringe ekspresjon av nevnte gen i en frøcelle og som inkluderer minst ett restriksjonssete mellom umiddelbart 5' til kodonet for det initierende metioninet og 5' til translasjonsstoppsignalet av nevnte OBP-gen, og
- en DNA-sekvens innskudd i nevnte restriksjonssete i leseramme med nevnte OBP-gen, hvor nevnte DNA-sekvens koder et peptid som er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein.

35. Ekspresjonskassett i henhold til krav 34, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte restriksjonssete er et syntetisk restriksjonssete.

36. Ekspresjonskassett i henhold til krav 34, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter en oligonukleotidadapter som koder for et protease-gjenkjennelsessete innskutt i nevnte restriksjonssete.

37. Ekspresjonskasset i henhold til krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte protease er kollagenase.

38. Ekspresjonskasset ifølge krav 30, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den
5 omfatter:

en første DNA-sekvens som koder et peptid under forutsetning av at nevnte peptid er forskjellig fra en del av et naturlig forekommende olje-legemeprotein, innskutt i leseramme i et olje-legemeprotein (OBP) -gen som inkluderer en tilstrekkelig del av regulatorregionen 5' til translasjonsstartsetet av nevnte OBP-gen
10 for å tilveiebringe ekspresjon av nevnte gen i frø, hvor nevnte sekvens er innskutt ved et sete i nevnte gen slik at det uttrykkes under nevnte regulatorregion.

39. Ekspresjonskasset i henhold til krav 38, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ytterligere omfatter en andre DNA-sekvens som koder et protease-
15 gjenkjennelsessete 5' til nevnte første DNA-sekvens, hvor nevnte andre DNA-sekvens er i leseramme med nevnte første DNA-sekvens og nevnte OBP-gen.

40. Plantecelle, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter:
en ekspresjonskasset i henhold til et hvilket som helst av kravene 30 til 39.

NcoI

-867 CCATGGCTATACCCAACTCTGGTCAACACAGGAACCTCTCTGGTAAGCTAGCTCCACTCCCGAGAAACAACCGCGCCAAATTC
 -777 COGAATGCTGACCTGAACACGGAACATCATCTGTCGGTCTTGGCGGATGCGCGGAAOATGGGTAGCTTGGGCTTGAGGACGAGAC
 -687 CCGAATCGAGTCTGTGTAAGGTTGTTCATTGGGATTTGTATACGGAGATTGGTCTGAGAGGTTGAGGGAAGGACAAATGGGTTTG

R1

-597 GCTCTGGAGAAAGAGAGTGCGGGCTTTAGAGAGAGAAATTGAGAGGTTTAGAGAGAGATGCCGCGCGGATGACGGGAGGAGAGACGACGAGG

R2 R1 R2

-507 ACCTGCATTATCAAAGCAGIGACGTGGTAAAIITGGAACTTTTAAGAGGCAGATAGAIITATTATTGTATCCATTTCATTCTGTTTC
 -417 TAGAATGTCGCGGAACAAAIITTAAGAACTAAATCTTAAATTTTCTAATTTGTGTCCTAATAGTGGATATGTGGCGGTATAGAAGGAAT
 -327 CTATTGAAGGCCAAACCCATACCTACCTGACGAGCCCAAGGTTTCGTTTATGTTTCGGTTCGATGCCAACGCCACATTCCTGAGCTA

I

-237 GGCAAAACAACGCTGCTTTGAATAGACTCCTCTCGTTAAACACATGCAGCGGCTGCATGGTGACGCCATTAAACACGTGGCCTACAATT
 -147 GCATGATGCTCTCCATTGACACGCTGACTTCTCGTCTCCTTTCTTAATATATCTAACAAACACTCCTCTTCCAAATATATACACATC

M A D T A R G T H H D

-57 TTTTGTATCAATCTCTCATTTCAAATACTCTCATTTCTCTAGTAACAAGAAACAAAATGGCGGATACAGCTAGAGGAACCCATCACCAT
 I I G R D Q Y P M M G R D R D Q Y Q M S G R G S D Y S K S R
 34 ATCATCGGCAGAGACCAAGTACCCGATGATGGCGCGAGACCGAGACCAGTACCAGATGTCCGGACGAGGATCTGACTACTCCAAAGTCTAGG
 Q I A K A A T A V T A G G S L L V L S S L T L V G T V A A L
 124 CAGATTGCTAAGCTGCAACTGCTGTACAGCTGGTGGTCCCTCTCTCTCTCCAGCCCTTACCCTTGTGTGGAACCTGTATAGCTTTG
 T V A T P L L V I F S P I L V P A L I T V A L L I T G F L S

214 ACTGTTGCAACACCTCTGCTCGTTATCTTTCAGCCCCAATCCCTTGTCCCGCTCTCATCACAGTTGCACCTCCTCATCACCGGTTTCTTTCC
 S G G F G I A A I T V F S W I Y X

304 TCTGGAGGGTTTGGCATTGGCGCTATAACCGTTTCTCTTGGATTACAAgtaagcacacatttatcatcttacttcataattttgtgca
 394 atatgtgcatgctgttgagccagtagctttggatcaatttttggcgaataacaaatgtacaaatagaaatgcaaatcttagg
 484 gaacatttgggttaactaaatcacgaaatttgacctagcttagctgtgtgtatcatctatataggtataaatgcttggtatga

574 tacctattgattgtgaatagTACGCAACGGGAGAGCACCCACAGGATCAGACAAAGTTGGACAGTGCAGGATGAAGTTGGGAAGCAAA
 A Q D ; L D R A Q U U G Q Q J T G G E J D R D R T R G G Q H
 664 GCTCAGGATCTGAAAGACAGAGCTCAGTACTACGGACAGCAACATACCTGGTGGGGAACATGACCGTGACCGTACTCGTGGTGGCCAGCAC

T T *

754 ACTACTTAAGTTACCCCACTGATGTCATCGTTCATAGTCCCAATACTCCAATGTCCGGGAGTTAGTTTATGAGGAATAAAGTGTTTAGANT

KpnI

844 TTGATCAGGGGGAGATAATAAAAGCCGAGTTTGAATCTTTTGTATTATAAGTAATGTTTATGTGTTTCTATATATGTTGTCAAAATGGTACC

FIG. 1A.

1/8

LAVVTLLPVGGTLLFLAGITLVGTLIGLAVATPFLLEL
 FSPVLVPAALTIGLAVTGFLGSGAFGLTGLSSLSWVLS-YF
 LTVATLFPGLGLLLVSGIALTSVVGLAVATPVFLIF
 SPVLVPAALLIGTAVMGFLTSGALGGLGSLTCLAN-TA
 LKAATAATTGGSMLVLSGLILAGTVIALIVATPVLLVI
 FSPVLVPAALALALMAAGFVTSGLGVAALS VFSWMYK-YL
 AKAAATAVTAGSLLVLLSLTLVGTVIALTVATPVLVI
 FSPILVPALITVALLITGFLSSGGFGIAAITVFSWIYK*YL

MAERGTYAHQVQVHPQQTANQPGGVKS
 LIPKNSPSTSQV
 MADRRSGIYGGAHATYQQQQGGGPRPMGEQVKKG
 MLHDKGPTASQA
 RGGGGYGDLOLORGGMHGEAA
 QQQKQCAMMTA
 MMGRDRDQYOMS
 GRGSDYSKSRQI

gulrot 19KDa
 Mais 18KDa
 Mais 16KDa
 Arab. 17KDa

2/8

Sentralt hydrofob
 domene

N-terminalt hydrofilt
 domene

*=Intron-spleisested

RQASQRVPDQIELAKKRAQMAAYAGQKTKEVGDTIQSKAAQADTTATTGRDTRSTARDTSRT
 RQAFQRTPDYVEEARRRMAEAAAQAGHKTAQAGQAIQGRAQEAGTGGGAGRASS
 TGKHPPGADQLDHAKARLASKARDIKDAAQHRIDQAGGS
 LIEHPQGSCLKDSARMKLGSKAQDLKDRAGYQGQHTGWEHRRDRTRGGQHTT

C-terminalt amfipatisk
 domene

FIG. 1B.

3/8

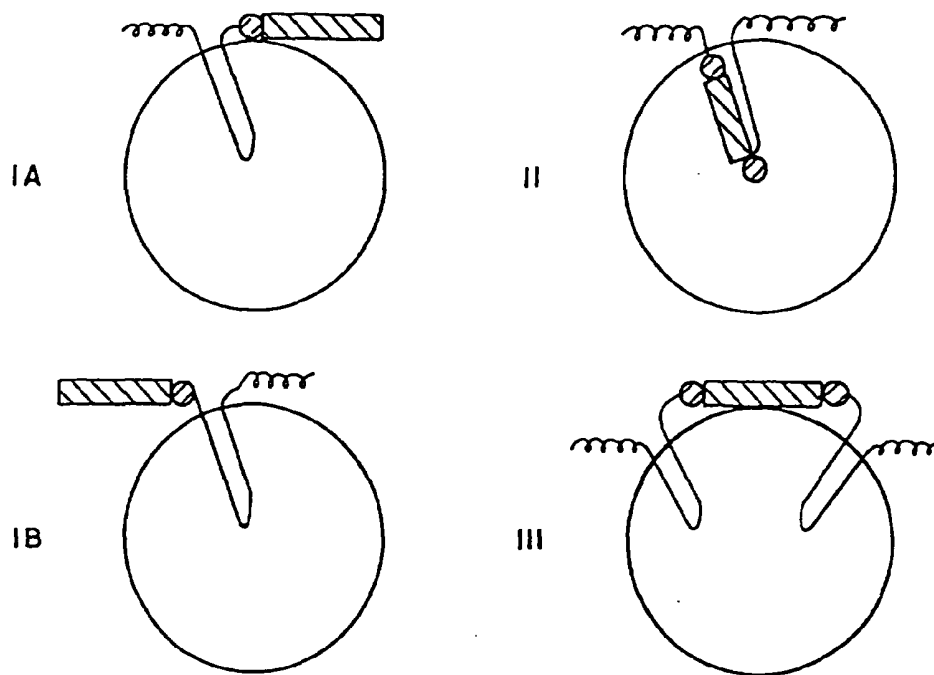
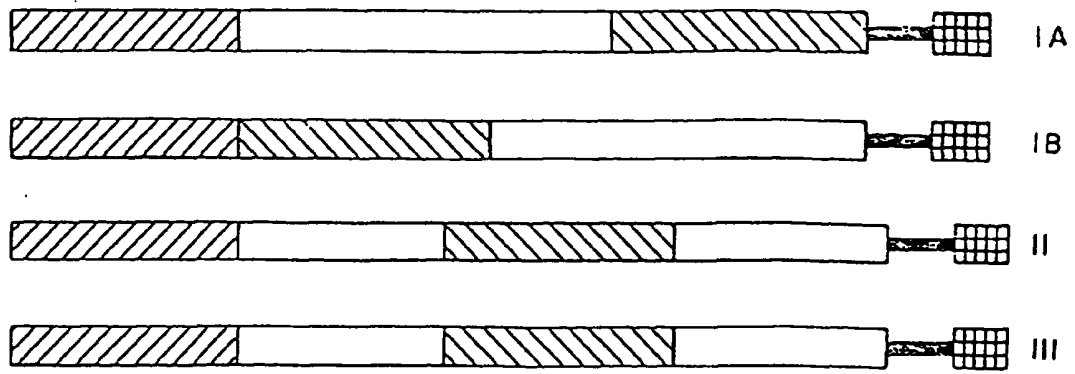


FIG. 2.

Xho I

....AGC ACT GCT CGA GAC ACT TCA AGG ACT....Gulrot OBP
 (see Hatzopoulos et
 Ser Thr Ala Arg Asp Thr Ser Arg Thr.... al. 1990)

	Xho I		n ganger		Nco I
3'..AGC ACT GC		TCGA	CCG CTC GGT CCG	GC	
TCG TGA CGAGCT			GGC GAG CCA GGC	CGGTAC	

Pro Leu Gly Pro

Kollagenasegjenkjenningsmotiv

FIG. 3.

5/8

Konstruer fusjonsgen ved anvendelse av protease
(f.eks. kollagenase) mål motivkodende linkere,
klon i E. coli forlikelig plasmid



Innsett konstrukt i bredt vertsområde replikoninneholdende
T-DNA-grenser (dvs. Agrobacterium binærvektor)



Transformer plante-celler ved anvendelse av blad, stengel,
frøbladede eller bladstilkexplantater



Regenerer transgene planter



La dem sette frø



Mal frøene i vandig ekstraksjonsbuffer
(Taylor et al, 1990)



Sentrifuger eller på annen måte separer olje-legemene



Suspender vaskede olje-legemer i kollagenaseassaybuffer
og tilsett 5 enheter renset kollagenase



Sentrifuger for å skille ut restolje-legemer



Isoler frigjort peptid fra proteasebehandling ved
ammoniumsulfatutfelling, kolonnekromatografi osv.



Gjennomfør biologisk analyse av frigjort rekombinant peptid

FIG. 4.

6/8

-  Oleosinpromotor
-  Oleosinkodende sekvens
-  Intron
-  3'ikke-translatert sekvens
-  II-1- β -sekvens

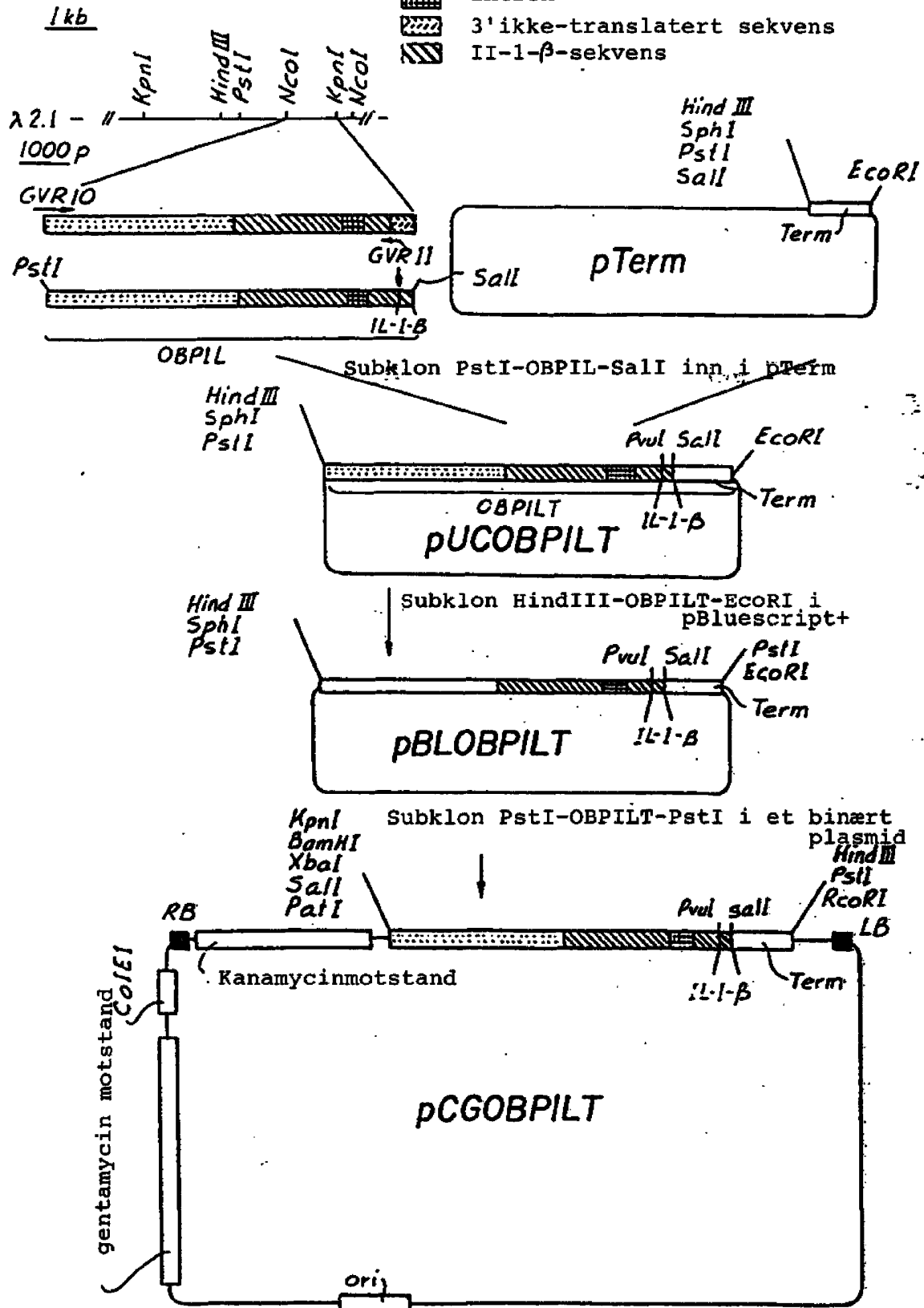


FIG. 5.

7/8

INTERLEUKIN 1- β gvr11 (71-mer)

a) A. thaliana oleosin Faktor Xa

gly gly gln his thr thr ala ile glu gly arg val gln
gly glu glu ser asn asp lys OCH val asp

GGT GGC CAG CAC ACT ACT GCT ATC GAA GGG AGA GTT CAG

PvuI

GGA GAA GAA TCT AAC GAC AAG TAA GTC GAC GG
Sali

b) 3'CCA CCG GTC GTG TGA TGA CGC TAG CTT CCC TCT CAA GTC
[.....
CCT CTT CTT AGA TTG CTG TTC ATT CAG CTG CC 5'
.....]

FIG. 6.

8/8

PstI

CACTGCAGGAAGCTCTCTGGTAA^gCTAGCTCCACTCCCCAGAAACAACCGGCGCCAAATTGCC
GGAATTGCT
GACCTGAAGACGGAACATCATCGTCGGGTCCTTGGGCGATTGCGGCGGAAGATGGGTCAGCT
TGGGCTTGAG
GACGAGACCCGAATCGAGTCTGTTGAAAGGTTGTTTCATTGGGATTGTATACGGAGATTGGTC
GTCGAGAGG
TTTGAGGGAAAGGACAAATGGGTTTGGCTCTGGAGAAAGAGAGTGCGGCTTTAGAGAGAGAA
TTGAGAGGTT
TAGAGAGAGATGCGGCGGCGATGACGGGAGGAGAGACGACGAGGACCTGCATTATCAAAGCA
GTGACGTGGT
GAAATTTGGAACTTTAAAGAGGCAGATAGATTTATTATTGTATCCATTTTCTTCATTGTTC
TAGAATGTCG
CGGAACAAATTTTAAACTAAATCCTAAATTTTCTAATTTTGTGCGCAATAGTGGATATGT
GGGCCGTATA
GAAGGAATCTATTGAAGGCCCAAACCCATACTGACGAGCCCAAAGGTCGTTTTGCGTTTTA
TGTTTCGGTT
CGATGCCAACGCCACATTCTGAGCTAGGCAAAAACAAACGTGTCTTTGAATAGACTCCTCT
CGTTAACACA
TGCAGCGGCTGCATGGTGACGCCATTAACACGTGGCCTACAATTGCATGATGTCTCCATTGA
CACGTGACTT
CTCGTCTCCTTTCTTAATATATCTAACAAACACTCCTACCTCTTCCAAATATATACACATC
TTTTTGATCA
ATCTCTCATTCAAATCTCATTCTCTCTAGTAAACAAGAACAAAAAATGGCGGATACAGCT
AGAGGAACCC
ATCACGATATCATCGGCAGAGACCAGTACCCGATGATGGGCCGAGACCGAGACCAGTACCAG
ATGTCCGGAC
GAGGATCTGACTACTCCAAGTCTAGGCAGATTGCTAAAGCTGCAACTGCTGTACAGCTGGT
GGTTCCCTCC
TTGTTCTCTCCAGCCTTACCCTTGTTGGAAGTGTATAGCTTTGACTGTTGCAACACCTCTG
CTCGTTATCT
TCAGCCCAATCCTTGTCGGGCTCTCATCACAGTTGCACTCCTCATCACCGGTTTTCTTTCC
TCTGGAGGGT
TTGGCATTGCCGCTATAACCGTTTTCTCTTGGATTTACAAGTAAGCACACATTTATCATCTT
ACTTCATAAT
TTTGTGCAATATGTGCATGCATGTGTTGAGCCAGTAGCTTTGGATCAATTTTTTTGGTCGAA
TAACAAATGT
AACAAATAAGAAATTGCAAATCTAGGGAACATTTGGTTAACTAAATACGAAATTTGACCTAG
CTAGCTTGAA
TGTGTCTGTGTATATCATCTATATAGGTAAAATGCTTGGTATGATACCTATTGATTGTGAAT
AGGTACGCAA
CGGGAGAGCACCCACAGGGATCAGACAAGTTGGACAGTGCAAGGATGAAGTTGGGAAGCAAA
GCTCAGGATC
TGAAAGACAGAGCTCAGTACTACGGACAGCAACATACTGGTTGGGAACATGACCGTGACCGT
ACTCGTGGTG
GCCAGCACACTACTGCGATCGAAGGGAGAGTTCAGGGAGAAGAATCTAACGACAAGTAAGTC
GACTCTAG
ACGGATCTCCCgatcggttcaaacatttggcaataaagtttcttaagattgaatcctgttgcc
ggtccttgca
tgattatcatataatttctgttgaattacgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatg
acgttattta
tgagatgggtttttatgattagagtcccgcaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaa
atatagcgcg
caaactaggataaattatcgcgcgcggtgtcatctatgttactagatcGGAATTC

EcoRI

FIG. 7.