



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323853**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19990025	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.05.01 PCT/US98/08906
(22)	Inng.dag	1999.01.04	(85)	Videreføringsdag	1999.01.04
(24)	Løpedag	1998.05.01	(30)	Prioritet	1997.05.01, US, 847218
(41)	Alm.tilgj	1999.03.01			
(45)	Meddelt	2007.07.16			
(73)	Innehaver	Icos Corp, 22021 20th Avenue South East, WA98021 BOTHELL, US			
(72)	Oppfinner	Daniell S. Allison, Seattle, WA, US			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Renset og isolert hamster-EF-1α-transkripsjonsregulatorisk DNA, kìmært polynukleotid omfattende dette, vertceller og plasmid omfattende disse og fremgangsmåte for økning av transkripsjon av et gen av interesse i en vertcelle		
(56)	Anførte publikasjoner	J. Biochem, vol. 106, 1989 side 560-563 av Hayashi et al. US 5266491		
(57)	Sammendrag			

Regulatoriske DNA-sekvenser avledet fra hamster-EF-1 α -genet. Ekspresjonskonstruksjoner som omfatter det regulatoriske DNA, vertceller transformert eller transfektert med det regulatoriske DNA og fremgangsmåter for økning av gentranskripsjon ved benyttelse av det regulatoriske DNA, er også beskrevet. Ekspresjonskonstruksjoner som omfatter det regulatoriske DNA operativt bundet til spesifikke gensekvenser, er dessuten også beskrevet.

Oppfinnelsens bakgrunn

Transkripsjon av ethvert gitt eukaryotisk gen utføres av ett av tre RNA-polymeraseenzymer som hver for seg virker på et spesielt undersett av gener. Mens transkripsjon av store, ribosomale RNA utføres av RNA-polymeraseI, og små, ribosomale RNA og tRNA transkriberes av RNA-polymeraseIII, transkriberes proteinkodende DNA-sekvenser og de fleste små, nukleære RNA, av RNA-polymeraseII. For hver genotype fordrer transkripsjon interaksjon av den passende polymerase med genets promotorsekvenser og dannelse av et stabilt transkripsjonsinitieringskompleks. Transkripsjon fra enhver av de tre polymeraser fordrer generelt også interaksjon av noen bindingsfaktorer med promotorsekvensen og gjenkjennelse av bindingsfaktoren ved hjelp av en andre faktor som derved tillater polymeraseinteraksjon med gensekvensen. Selv om denne mekanisme er det minimale krav for transkripsjon med RNA-polymeraseI og -III, er prosessen som fører til transkripsjon med RNA-polymeraseII, mer intrikat.

Antakeligvis på grunn av den enorme rekke av gensekvenser transkribert av RNA-polymeraseII og det faktum at reguleringsmønstrene for disse gener er ytterst variable innen den samme celle og fra celle til celle, påvirkes transkripsjon av RNA-polymeraseII av binding av et stort antall transkripsjonsfaktorer i initieringskomplekset i tillegg til interaksjonene av andre bindingsproteiner med regulatoriske DNA-sekvenser andre enn promotoren. Disse andre bindingsproteiner kan tjene til å aktivere transkripsjon utover et grunnivå, eller hemme transkripsjon fullstendig. Repressorbinding kan også bli betraktet som et middel for å forhindre aktivering på bakgrunn av observasjoner av at basal transkripsjon i høyere eukaryoter vanligvis er meget lav. Aktivering er på den annen side vanligvis den siste respons på et fysiologisk signal og krever enten fjerning av repressorbindingsproteiner eller endring av kromatinstruktur for å tillate dannelse av aktivt transkripsjonsinitieringskompleks.

Kjernen i transkripsjonskompleksdannelse og en forutsetning for basalnivåer av genekspressjon, er promotorsekvensen betegnet "TATA"-boksen som er lokalisert oppstrøms

fra polymeraseII-transkripsjonsstartsetet. TATA-boksen er bindingssetet for en ubikvitær transkripsjonsfaktor betegnet TFIID, men som nevnt blir transkripsjon fra promotorsekvensen i de fleste gener sterkt påvirket av ytterligere regulator-

5 iske DNA-sekvenser som enten kan forhøye eller hemme gentranskripsjon. DNA-elementer av denne type, befinner seg i variable posisjoner med hensyn til kodingssekvenser i et gen og med hensyn til TATA-boksen. Disse ytterligere transkripsjonsregulatoriske elementer virker ofte på en vevs- eller celle-

10 spesifikk måte.

For ekspressjon av rekombinante proteiner er det spesielt viktig å utvelge regulatoriske DNA som inkluderer promotor-TATA-sekvensen og ytterligere regulatoriske elementer som er forenlige med vertscellens transkripsjonsmaskineri. Av denne årsak er regulatorisk DNA som er endogent for

15 den valgte vertscelle, vanligvis foretrukket. Alternativt har det vært meget vellykket å anvende regulatorisk DNA avledet fra virusgenomsekvenser i betraktning av det generelt brede vertsområde av virus og den demonstrerte aktivitet av regulatorisk virus-DNA i forskjellige celletyper. Vel kjente og rutinemessig anvendte, regulatoriske virus-DNA for rekombinant

20 proteinekspressjon, inkluderer f.eks. den SV40-tidlige genpromotor/enhancer [Dijkema, et al., EMBO J., 4:761 (1985)], Rous sarkomavirus langt, terminalt gjentakelses-DNA [Gorman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79:6777 (1982b)], bovine papillomavirusfragmenter [Sarver et al., Mo. Cell. Biol.

25 1:486 (1981)] og humane cytomegaloviruspromotor/enhancer-elementer [Boshart et al., Cell 41:521 (1985)]. Til tross for det brede området av celletyper hvor de regulatoriske virus-DNA er blitt vist å være funksjonelle, er det mulig at ikke-

30 viruspromotor/enhancer-DNA-elementer eksisterer som tillater forhøyet transkripsjon av rekombinante proteiner i spesifikke cellelinjer, gjennom mer effektiv anvendelse av vertscellens transkripsjonsmaskineri.

35 Det foreligger således et behov i teknikken for å identifisere promotor/enhancer-regulatoriske DNA-sekvenser som funksjonerer i homologe og heterologe celletyper for å øke rekombinant proteinekspressjon og tilveiebringe et høyt utbytte av et ønsket proteinprodukt. Spesielt viktig er beho-

vet for å identifisere et slikt promotor/enhancer-regulatorisk DNA som kan benyttes mest effektivt i pattedyrceller for å øke produksjon in vitro av rekombinante proteiner som er glykosylerte på en måte beslektet med glykosyleringsmønstre som resulterer fra proteinekspresjon in vivo. Proteiner uttrykt på denne måte, og administrert terapeutisk eller profylaktisk, har mindre sannsynlighet for å være antigenet og større sannsynlighet for å være fysiologisk aktive. Regulatoriske DNA-sekvenser av denne type kan også innføres i vertsceller for å øke ekspresjon av gener som er endogent for vertscellen eller gener som tidligere er innført i genomet ved hjelp av velkjente og rutinemessig anvendte teknikker.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår rensede og isolerte polynukleotider avledet fra hamsterceller som regulerer gentranskripsjon. Polynukleotidene omfatter regulatoriske DNA-sekvenser 5' for translaterede områder av kinesisk hamsterovariante EF-1 α -genet. Det foretrukne DNA ifølge oppfinnelsen er betegnet CHEF1-regulatorisk DNA og inkluderer ca. 3,7 kb DNA som strekker seg fra et SpeI-restriksjonssete til det initierende metionin(ATG)-kodon av EF-1 α -proteinet. Polynukleotider mindre enn 3,7 kb er også omfattet av oppfinnelsen, så lenge som de mindre polynukleotidfragmenter er i stand til å øke transkripsjon av et operativt bundet gen. Aktive fragmenter av DNA ifølge foreliggende oppfinnelse, definert ved kapasiteten til å regulere (dvs. forhøye) gentranskripsjon, kan lett identifiseres ved hjelp av velkjente og rutinemessig utførte delesjonsstudier. Regulatorisk DNA ifølge oppfinnelsen inkluderer polynukleotider isolert fra naturlige kilder, slik som dyrkede celler, så vel som polynukleotider produsert ved en enzymatisk eller ren kjemisk syntese. I en utførelsesform tilveiebringer således foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av CHEF1-DNA fra et genombibliotek. Alternativt kan DNA konstrueres ved enzymatisk syntese ved f.eks. anvendelse av polymerasekjedereaksjon (PCR) eller ren kjemisk syntese, hvori enkle nukleotider tilføres suksessivt eller overlappende nukleotider hybridiseres og liggeres. DNA-sekvensen av den mest foretrukne utførelsesform er vist i

SEK.ID. NR. 1. Oppfinnelsen omfatter videre DNA-sekvenser som hybridiserer under stringente betingelser til DNA vist i SEK.ID. NR.1. Stringente betingelser inkluderer vask ved ca. 65 °C i en buffer inneholdende ca. 2 x SSC og ca. 0,1 % SDS eller ved ekvivalente betingelser.

Oppfinnelsen angår dessuten plasmid-DNA omfattende CHEF1-regulatoriske polynukleotider. Plasmider ifølge oppfinnelsen kan også inkludere DNA-sekvenser som koder for et protein av interesse eller et RNA-produkt av interesse, operativt bundet til CHEF1-polynukleotidsekvensene. Oppfinnelsen omfatter videre vertsceller transformert, transfektert og/eller elektroporert med polynukleotider eller plasmider ifølge oppfinnelsen. Plasmid-DNA ifølge oppfinnelsen kan være integrert i genomet til vertscellen eller kan eksistere i cellen i en lukket, sirkulær plasmidform. Foretrukne plasmider ifølge oppfinnelsen som er spesielt egnede for innføring av ønskede DNA-sekvenser, inkluderer plasmider pDEF14 og pDEF2. Bakterievevertsceller transformert med pDEF14 og pDEF2 ble hhv. deponert 9. april 1997 og 4. mars 1997, hos the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, og hhv. tildelt aksjonsnr. 98389 og 98343.

Oppfinnelsen angår også lineært, vektor-DNA omfattende CHEF1-polynukleotider. Vektorer ifølge oppfinnelsen kan oppnås fra viruskilder eller kan syntetiseres in vitro. Oppfinnelsen omfatter videre vertsceller transfektert eller elektroporert med de lineære vektorsekvenser. DNA av denne type er spesielt anvendelig for ekspresjon av heterologe gen-sekvenser operativt bundet til CHEF1-DNA-sekvensene eller for setedirrigert homolog rekombinasjon hvori CHEF1-sekvenser kan innføres i genomet til en vertscelle for å modulere ekspresjon av en operativt bundet sekvens.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten kimære, rekombinante DNA-molekyler, hvori CHEF1-DNA er operativt bundet til (dvs. fremmer transkripsjon av) gensekvenser som koder for et ønsket proteinprodukt. Kimære molekyler er generelt de som omfatter domener som ikke vanligvis finnes i forbindelse med en villtypeomgivelse; med foreliggende oppfinnelse kan et kimært DNA omfatte en del av, eller hele, det CHEF1-regulato-

riske DNA i forbindelse med en DNA-sekvens annen enn genet som koder for hamster-EF-1 α -protein. Proteinprodukter kodet for av de kimære molekyler, inkluderer fysiologisk aktive proteiner, deler eller subenheter av aktive proteiner, så vel som markør- eller rapportørproteiner. Polynukleotidsekvensen som koder for proteinproduktet, kan være avledet fra komplementært DNA (cDNA), genomisk DNA, syntetisk DNA eller DNA avledet fra kombinasjoner av molekyler av disse typer. Proteinprodukter kan være endogene (dvs. vanligvis funnet i CHO-genomet uten at det er innført DNA ved transformasjon, transfeksjon eller lignende) for kinesisk hamsterovarie(CHO)celler. Proteinprodukter kan dessuten være innkodet av eksogene kilder, der en eksogen kilde er en annen enn genomet i en CHO-celle, inkludert f.eks. et syntetisert DNA. Foretrukne kimære molekyler ifølge oppfinnelsen inkluderer de hvori CHEF1-DNA er operativt bundet til DNA som koder for: (i) den tunge kjede av anti-ICAM3-antistoff ICM3, (ii) den lette kjede av ICM3, (iii) den tunge kjede av anti-CD11/CD18-antistoff hu23F2G, (iv) den lette kjede av hu23F2G, (v) kitinase, (vi) blodplateaktiverende faktor-acetylhydrolase (PAF-AH) og (vii) makrofagavledet kjemokin (MDC). Bakterievevsceller transformert med plasmid-DNA omfattende de kimære molekyler, ble deponert 1. april 1997 hos American Type Culture Collection og gitt aksjonsnummeret, hhv. (i) 98381, (ii) 98382, (iii) 98383, (iv) 98384, (v) 98385, (vi) 98386 og (vii) 98387.

Oppfinnelsen angår dessuten vevsceller transformert eller transfektert med CHEF1-DNA ifølge oppfinnelsen. Foretrukne vevsceller ifølge oppfinnelsen er avledet fra kinesiske hamstere (*Cricetulus griseus*) hvori det CHEF1-regulatoriske DNA vil forventes å tilveiebringe høye nivåer av proteinekspressjon. Oppfinnelsen omfatter imidlertid andre celletyper avledet fra alternative arter, inkludert f.eks. armeniske hamstere (*Cricetulus migratoris*) eller syriske (gull) hamstere (*Mesocricetus auratus*), så vel som cellypene avledet fra dyr fra andre slekter. Celler kan oppnås fra lunge, ovarie, peritoneum, muskel, pankreas, nyre, melanom eller somatiske kilder, så vel som fra helt foster eller helt embryo. Vevsceller ifølge oppfinnelsen oppført ovenfor,

så vel som andre celletyper, f.eks. myelomcellelinjer hvori det CHEF1-regulatoriske DNA vil forventes å tilveiebringe høye transkripsjonsnivåer, kan oppnås fra the American Type Culture Collection eller alternativt dyrket direkte fra dyrekilder.

Rekombinante molekyler ifølge oppfinnelsen som inkluderer CHEF1-regulatorisk DNA, vil tilveiebringe økte nivåer av mRNA-ekspressjon av de operabelt bundne, heterologe (dvs. ikke vanligvis funnet i vertsgenomet der det ikke er innført polynukleotider ved transfeksjon, transformasjon eller lignende) polynukleotider. Avhengig av beskaffenheten av polynukleotidet bundet til CHEF1-polynukleotidsekvensene, ville økt transkripsjon til sist føre til forhøyede nivåer av polypeptider, eller økte mengder av forskjellige RNA-typer i de tilfeller hvor det bundne polynukleotid f.eks. koder for tRNA, ribosomalt RNA, lite nukleært RNA og lignende. RNA-typer kan også inkludere anti-sens-RNA komplementært med mRNA transkribert fra en endogen eller eksogen gensekvens. Økt polypeptidtranslasjon ville nødvendigvis avhenge av at passende translasjonssignaler var til stede i mRNA.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten fremgangsmåter for innføyelse av CHEF1-DNA i spesifikke seter i genomisk DNA fra vertsceller for å øke transkripsjonsnivåer av en endogen gensekvens. Homolog rekombinasjon kan benyttes for å innføre hele, eller en del av, CHEF1-DNA. I vertsceller modifisert på denne måte, er CHEF1-DNA operabelt bundet til kodende DNA-sekvenser. Se f.eks. PCT-søknad nr. WO 94/12650; PCT-søknad nr. WO 92/20808; og PCT nr. WO 91/09955. Oppfinnelsen omfatter nødvendigvis endrede genomiske DNA-sekvenser hvori det CHEF1-regulatoriske DNA er blitt innføyd.

Oppfinnelsen omfatter alternativt vertsceller hvori eksogent DNA er innføyd ved siden av og i en operativ posisjon med hensyn til CHEF1-DNA til stede i genomet. Vertsceller av denne type inkluderer CHO-celler og den innføyde sekvens erstatter enten EF-1 α -kodende DNA eller innføydes mellom CHEF1-regulatorisk DNA og EF-1 α -kodende DNA. Oppfinnelsen omfatter også vertsceller foruten CHO-celler, hvori CHEF1-DNA tidligere er blitt innføyd i genomet og ytterligere DNA innføydes deretter i en operativt bundet posisjon.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten fremgangsmåter for økning av transkripsjon av et ønsket gen, omfattende at det i en vertscelle innføres et polynukleotid som omfatter en hamster-EF-1 α -regulatorisk sekvens, på en slik måte at den

5 regulatoriske sekvens integreres i det genomiske DNA hos verten i en operativt bundet posisjon med hensyn til det ønskede gen. Oppfinnelsen omfatter videre en fremgangsmåte for økning av transkripsjon av et ønsket gen, omfattende at det i en

10 vertscelle innføres et polynukleotid som omfatter en hamster-EF-1 α -regulatorisk sekvens og en målsekvens, idet målsekvensen er konstruert på en måte som tillater integrasjon av de regulatoriske sekvenser i en posisjon operativt bundet til det ønskede gen som koder for et annet protein enn EF-1 α . Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen inkluderer midler for å

15 øke transkripsjon av gener som er endogene for CHO-celler, så vel som midler for å øke transkripsjon av gener som er ekso-gene for CHO-celler.

Rekombinante molekyler ifølge oppfinnelsen kan anvendes for produksjon av transgene dyr hvori kimært, rekombinant DNA, inkludert CHEF1-DNA operativt bundet til en DNA-sekvens av interesse, innføres i utviklende kimceller eller somatiske celler fra et dyr. Kimære, rekombinante molekyler kan f.eks. innføres ved mikroinjeksjon, og når den utføres uten

20 anvendelse av kimceller, kan cellene i dyret alle inkludere det rekombinante DNA ifølge oppfinnelsen. Alternativt kan kimært, rekombinant DNA ifølge oppfinnelsen innføres i celler fra et embryo, og mange forskjellige celler i det resulterende dyr, kan inkludere DNA ifølge oppfinnelsen.

CHEF1-DNA er også anvendelig for identifikasjon av

30 nært beslektede regulatoriske DNA-sekvenser som kan gi økt genekspresjon over og utover, det som tillates av CHEF1. Kunnskap om CHEF1-DNA-sekvenser, tillater likeledes konstruksjon av syntetiske DNA, enten fra de novo-syntese eller enkle eller multiple modifikasjoner av CHEF1-sekvenser, idet de resulterende syntetiske DNA har sekvenser som er lignende

35 CHEF1, men i stand til å fremme høyere nivåer av gentranskripsjon.

Oppfinnelsen vedrører dermed et rensset og isolert hamster-EF-1 α -transkripsjonsregulatorisk DNA, kjennetegnet ved at det er valgt fra:

- a) et DNA som omfatter nukleinsyresekvensen ifølge
5 SEK.ID. NR.1,
- b) et DNA som omfatter en del av en nukleinsyresekvens ifølge SEK.ID. NR.1 som er i stand til å fremme transkripsjon av et gen som er operativt bundet til det regulatoriske DNA,
- 10 c) et DNA som omfatter fra omtrent nukleotid 2114 til omtrent nukleotid 3656 i polynukleotidet ifølge SEK.ID. NR.1,
- d) en hamster-EF-1 α -regulatorisk DNA-sekvens på 11,7 kb i plasmid pDEF14 (ATCC-aksesjonsnummer 98398),
- e) et DNA som omfatter nukleinsyresekvensen ifølge
15 SEK.ID. NR.28,
- f) en hamster-regulatorisk DNA-sekvens som hybridiserer med DNA ifølge SEK.ID. NR.1 ved betingelser som inkluderer en siste vask ved 65°C i en buffer inneholdende 2XSSC og 0,1 % SDS eller
- 20 g) et DNA som omfatter omtrent 1,56 kb 5' i forhold til ATG-startkodon i SEK.ID. NR.1.

Den angår også en vertscelle som omfatter DNA ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at dette DNA ikke er opererbart bundet til EF-1 α -kodende sekvenser, en vektor som omfatter DNA
25 ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at dette DNA ikke er opererbart bundet til EF-1 α -kodende sekvenser og en vertscelle, kjennetegnet ved at den er transformert eller transfektert med vektoren ifølge oppfinnelsen.

I tillegg gjelder oppfinnelsen et kimært polynukleotid, kjennetegnet ved at det omfatter hamster-EF-1 α -regulatorisk DNA ifølge oppfinnelsen, opererbart bundet til en proteinkodende DNA-sekvens, der nevnte proteinkodende DNA-sekvens koder for et annet protein enn hamster-EF-1 α , en vertscelle, kjennetegnet ved at den er transformert eller
35 transfektert med kimært polynukleotid ifølge oppfinnelsen og et ekspresjonsplasmid, kjennetegnet ved at det omfatter det kimære polynukleotidet ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen gjelder også et plasmid, kjennetegnet ved at det er pDEF2 (ATCC-aksesjonsnummer 98343), pDEF14 (ATCC-aksesjonsnummer 98398), pDEF1./ICM3H.2 (ATCC-aksesjonsnummer 98381), pNEF1/ICM3L.3 (ATCC-aksesjonsnummer 5 98382), pDEF1/P2GH.1 (ATCC-aksesjonsnummer 98383), pNEF1/F2GL.1 (ATCC-aksesjonsnummer 98384), pDEF1/CTN.1 (ATCC-aksesjonsnummer 98385), pDEF2/HPH.4 (ATCC-aksesjonsnummer 98386) og pDEF10/MDC.1 (ATCC-aksesjonsnummer 98387) og en vertscelle transformert med disse plasmidene.

10 Oppfinnelsen gjelder i tillegg en fremgangsmåte for økning av transkripsjon av et gen av interesse i en vertscelle, kjennetegnet ved at den omfatter integrasjon av et DNA som omfatter hamster-EF-1 α -regulatorisk DNA i genomisk DNA i vertscellen i en posisjon opererbart bundet til genet av 15 interesse.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse er illustrert ved hjelp av de følgende eksempler. Eksempel 1 beskriver kloning av hamster-EF-1 α -genet og det beslektede CHEF1-regulatoriske DNA. Eksempel 2 angår subkloning og sekvensanalyse av den CHEF1-regulatoriske sekvens. Eksempel 3 viser karakterisering av CHEF1-promotorpolynukleotidet og eksempel 4 gir en beskrivelse av hvordan forskjellige ekspresjonsvektorer som inkluderte CHEF1-DNA, ble konstruert. Eksempel 5 beskriver tansfeksjonsanalyse benyttet for å bestemme effektiviteten av det CHEF1-regulatoriske DNA. Eksempel 6 beskriver i detalj en sammenligning mellom ekspresjonsnivåer for rekombinant protein, enten ved anvendelse av det CHEF1-regulatoriske DNA eller cytomegalovirus(CMV)-promotoren. Eksempel 7 er en undersøkelse som viser forskjeller i regulatorisk kapasitet av CHEF1-DNA med forskjellige lengder.

Eksempel 1

Kloning av CHEF1

Et kinesisk hamsterovarie-genomisk DNA-bibliotek (CHO-K1) (Stratagene, La Jolla, CA) ble screenet med cDNA som koder for humant EF-1 α , i et forsøk på å isolere en hamster-homolog til det humane EF-1 α -gen.

CHO-K1-biblioteket, en partiell Sau3A-spaltning i lambda FIXII-kloningsvektor, ble anskaffet fra Stratagene (La Jolla, CA) i vertscellestammer XL-1-Blu MRA og XL1-Blu MRA (P2). Vertscellene ble preparert i overensstemmelse med produsentens foreslåtte protokoll med de følgende modifikasjoner.

Kort beskrevet ble celler fra glycerolkolonier streket på LB-plater som ikke inneholdt antibiotika. Enkle kolonier ble utvalgt for inokulering av flytende LB-medium og dyrket til sen log-fase og en OD₆₀₀ på ca. 0,9. Ved dette punkt ble cellene enten lagret i overensstemmelse med fabrikantens foreslåtte protokoll eller anvendt umiddelbart som beskrevet nedenfor.

Ved preparering av kulturer for utspredning ble enkeltkolonier utplukket fra plater preparert som beskrevet ovenfor, anvendt for inokulering og cellene ble dyrket i 50 ml LB-medium supplert med 0,5 ml 1 M MgSO₄ og 1 ml 10 %

maltose i deionisert vann. Etter dyrkning over natten ved 30 °C ble cellene innhøstet ved sentrifugering i en bordsentrifuge (2 000 rpm i 5 min ved romtemperatur) og resuspendert i 10 MgSO₄ ved en OD₆₀₀ på 0,5.

5 Lambda-fag, levert av produsenten, ble fortynnet i SM-buffer (preparert til 1 liter stamløsning inneholdende 5,8 g NaCl, 2,0 g MgSO₄·H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 og 5 ml 2% [vekt/volum] gelatin) i et område fra 10 til 10⁵ ganger, og 2 µl av hver fortynning ble tilsatt til 400 µl
10 vertsceller i 10 mM MgSO₄ (OD₆₀₀ ≈ 0,5). Den resulterende blanding ble inkubert i 15 min ved 37 °C for å tillate binding av fag til cellene, toppagar (0,75 % LBM-agarose ved 48 °C) ble tilsatt og hver blanding ble utstedt in duplo på LBM-agaroseplater. Resultatene indikerte et titer på 3 x 10⁶
15 plakkdannende enheter (pfu)/µl fagløsning.

 Friske vertsceller ble preparert som beskrevet ovenfor, før screening av biblioteket. Ca. 50 000 fag-pfu ble tilsatt til 600 µl vertsceller (ved OD₆₀₀ ≈ 0,5) med 6,5 ml 0,75 % LBM-agarose ved 48 °C. Blandingen ble utspredd på
20 agaroseplater som deretter ble inkubert i ca. 8 t ved 37 °C. Platene ble deretter avkjølt i 5 t ved 4 °C for å forhindre at toppagarosen klebet seg til overlagen av nitrocellulose. Membraner, BA-85, 0,45 µm porestørrelse, (S + S, Keene, NH) ble plassert over platene og overføringen ble fortsatt i
25 2 min. Membranene ble fjernet fra platene og det overførte DNA ble denaturert i 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH i 2 min. Filteret ble nøytralisert i 5 min i 1,5 M NaCl/1,0 M Tris-HCl (pH 8,0), blottet på Whatman 3-MM papir og bakt under vakuum ved 80 °C i ca. 1,5 til 2 t.

30 En human EF-1α-cDNA-sekvens [Uetsuki et al., J. Biol. Chem. 264:5791-5798 (1989)], tidligere vist å være 95 % identisk med kodingsområdet i CHO-EF-1α [Hayashi et al., J. Biochem. 106:560-563, 1989], ble anvendt som en probe for bibliotekscreening og preparat som beskrevet nedenfor. Den
35 1,4 kb humane EF-1α-probe stammet fra plasmid M0107, en pRc/CMV(Invitrogen, San Diego, CA)-vektor inneholdende humant EF-1α innføyd i et EcoRI-sete. For først å bekrefte at plasmid M0107 inneholdt det forventede humane cDNA, ble innføyd DNA sekvensert med 3'- og 5'-vektorprimere.

94-17 AGGCACAGTCGAGGCTGATC (SEK.ID. NR. 2)

94-18 TTCCAGGGTCAAGGAAGGCA (SEK.ID. NR. 3)

5 De første 263 bp av innføyelsen viste mer enn 90 %
identitet med den publiserte, humane EF-1 α -kodingssekvens,
og selv om sekvensen i 3'-enden var vanskelig å bestemme nøy-
aktig, kunne små strekninger oppstilles på linje med den for-
ventede sekvens. Kombinert indikerte disse oppstillinger
10 plasmidet der den ønskede sekvens var innkodet.

Hele den humane innføyelse ble fjernet fra plasmid
ved EcoRI-spaltning og et cDNA-bånd på 1,4 kb ble gelrenset
to ganger ved anvendelse av QIAGEN QIAquick gelekstraksjons-
sett i overensstemmelse med produsentens foreslåtte proto-
15 koll. DNA ble eluert i 50 μ l TE, den resulterende løsning ble
konsentrert i en mikrokon-10 (Amicon, Beverly, MA) til 25 μ l,
og en aliquot ble merket med 32 P- α -dTTP og 32 P- α -dCTP ved an-
vendelse av et Boehringer Mannheim Random Primed DNA-merk-
ingssett i overensstemmelse med produsentens foreslåtte pro-
20 tokoll. Merket probe ble rensset ved anvendelse av en G50-
spinnkolonne for å fjerne uinkorporerte nukleotider og sam-
menligning mellom rensset probe og aliquoten før sentrifuge-
ring viste 46 % inkorporering av den radioaktive markør med
telling på 5×10^5 cpm/min/ μ l.

25 Nitrocellulosemembranene preparert som beskrevet
ovenfor, ble probet som følger. Det ble preparert en prehy-
bridisering/hybridiseringsstambufferløsning som inkluderte
22,5 ml 20 X SSC, 30,0 ml 50 X Denhardt's løsning, 3,0 ml 1 M
fosfatbuffer (pH 6,8) (69 ml 1 M NaH₂PO₄, 31 ml 1 M Na₂HPO₄),
30 0,75 ml 20 % SDS og 78,75 ml dH₂O. For prehybridisering ble
1,4 ml 10 mg/ml laksesperma-DNA (Stratagene) kokt i 5 min med
0,6 ml dH₂O og deretter tilsatt 7 ml dH₂O og 72 ml stam-
bufferløsning. Filtre ble inkubert ved 65 °C i minimum 2 t i
prehybridiseringsbuffer.

35 For hybridisering ble 30 μ l probe, 200 μ l 10 mg/ml
laksesperma-DNA og 770 μ l dH₂O kombinert, kokt i 5 min og
tilsatt til 36 ml stambuffer med 3 ml dH₂O. Prehybridiser-
ingsløsningen ble fjernet fra filterne, hybridiseringsbuffer

ble tilsatt og filterne ble inkubert ved 65 °C over natten. Etter hybridisering ble filterne vasket i 3 t ved 65 °C med 3 utskiftninger av buffer inneholdende 2 x SSC og 0,1 % SDS og deretter autoradiografert i 48 t.

5 47 positive kloner ble identifisert og tilsatt til 1 ml SM-buffer inneholdende 20 µl kloroform. For å luke ut mulige pseudogener som manglet ett eller flere introner, ble PCR-primerpar utformet til å flankere to introner hver: primere 95-136 (SEK.ID. NR. 4) og 95-137 (SEK.ID. NR. 5) som om-
10 spenner introner 2 og 3: primere 95-138 (SEK.ID. NR. 6) og 95-139 (SEK.ID. NR. 7) som omspinner introner 3 og 4: primere 95-140 (SEK.ID. NR. 8) og 96-141 (SEK.ID. NR. 9) som omspenn-
er introner 4 og 5: og primere 95-142 (SEK.ID. NR. 10) og 95-143 (SEK.ID. NR. 11) som omspinner introner 6 og 7.

15

95-136 (SEK.ID. NR. 4) GCCACCTGATCTACAAATGT
95-136 (SEK.ID. NR. 5) GAGATACCAGCCTCAAATTC
95-136 (SEK.ID. NR. 6) ATGTGACCATCATTGATGCC
20 95-136 (SEK.ID. NR. 8) GTTGGAAATGGTGACAACATG
95-136 (SEK.ID. NR. 9) CAGGTTTTAAAACACCAGTC
95-136 (SEK.ID. NR. 10) AATGACCCACCAATGGAAGC
95-136 (SEK.ID. NR. 11) ACAGCAACTGTCTGCCTCAT

Forhåndsberegnet størrelse av PCR-produkter ved an-
25 vendelse av CHO EF-1α-templat-DNA, var basert på størrelse og beliggenhet av introner i den publiserte humane EF-1α-sekvens. Hver PCR-reaksjon inkluderte 2 µl fag, 2,5 µl av hver primer fra det passende par (100 µg/ml), 2 µl 2 mM dNTP-blanding, 2,5 µl 10 x PCR-buffer (Roche Molecular Systems,
30 Branchburg, NJ), 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,125 l Taq-polymerase (5 enheter/µl) (Perkin Elmer) og 11,8 µl dH₂O. Amplifikasjon ble utført i 4 min ved 94 °C, etterfulgt av 30 sykluser på 1 min ved 90 °C, 2 min ved 50 °C og 4 min ved 72 °C. Amplifikasjonsprodukter ble separert på 1,2 % agarosegeler
35 eluert med 1 x TAE. 3 av de 47 positive plakker ble funnet å

kode for ekte gener (nr. 2, 7 og 40) inneholdende alle intro-
ner, og 3 positive prøver ble underkastet tertiær screening
som følger: utspredningskulturer ble preparert som beskrevet
ovenfor med 10 til 10^5 fortykning av stamløsninger preparert
5 for hver av de tre positive plakker. 20 til 50 isolerte plak-
ker fra hver stamløsning ble screenet ved hjelp av PCR med de
følgende resultater. Klon nr. 2 ga to positive prøver (beteg-
net 2.12 og 2.17) fra 20 screenede prøver, klon nr. 7 ga én
(betegnet 7,44) av 40 screenet og klon nr. 40 ga én positiv
10 prøve (betegnet positiv 40.24) av 40 screenede. Fag-DNA ble
isolert fra hver av de fire prøver som følger.

XL-1 Blue MRA (P2)-vertsceller ble utstrekert på LB-
agaroseplater og dyrket over natten ved 37 °C. En enkel kolo-
ni ble utvalgt til inokulasjon i 50 ml LB-medium (innehold-
15 ende 0,2 % maltose og 10 mM $MgSO_4$) og kulturen ble dyrket
over natten ved 30 °C. Cellene ble innhøstet ved sentrifuge-
ring i 5 min ved romtemperatur ved 2 000 rpm i en borsentri-
fuge og cellene ble resuspendert i 50 ml 10 mM $MgSO_4$. De re-
suspenderte vertsceller (50 µl) ble blandet med 100 µl stam-
20 løsning og hver positiv fag og inkubert i 15 min ved 37 °C
for å tillate binding til cellene. Ca. 500 µl LBM-medium ble
tilsatt og blandingen ble omrørt i 2 t ved 37 °C. Ytterligere
200 µl vertsceller ble tilsatt og inkubasjonen ble fortsatt i
ytterligere 15 min ved 37 °C. Toppagar (8 ml 0,75 % LBM-
25 agarose ved 48 °C) ble tilsatt og deretter ble blandingen ut-
spredt og dyrket over natten ved 37 °C.

Etter dyrkning over natten ble 12 ml lambda-fortyn-
ningsmiddel (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgSO_4$) tilsatt til
hver plate og platene ble forsiktig vugget i 2 t. Fortyn-
30 ningsmidlet ble fjernet og sentrifugert i 10 min, 4 000 x g,
i en borsentrifuge. 1 µl av hver av 1 mg/ml RNase A og
1 mg/ml DNase I ble tilsatt og inkubasjonen ble utført ved
37 °C i 15 min. Et like stort volum utfellingsbuffer (20 %
PEG 8 000, 2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgSO_4$) ble
35 tilsatt, etterfulgt av inkubasjon på is i 1 t, hvorefter
blandingens ble sentrifugert ved 8 000 x g i 20 min, superna-
tanten ble fjernet og pelletten ble lufttørket i 10 min ved
romtemperatur. Pelletten ble resuspendert i 500 µl TE, sen-
trifugert i kort tid for å fjerne partikler og supernatanten

ble overført til et rent 1,65 ml epirør. Ca. 2,5 µl 20 % SDS ble tilsatt (med 5 min inkubasjon ved 65 °C), etterfulgt av tilsetning av 2,5 µl 10 mg/ml proteinase K (med inkubasjon i én time ved 65 °C) og 10 µl 5 M NaCl. Blandingen ble ekstrahert én gang med et like stort volum fenol:CHCl₃ og én gang med et like stort volum CHCl₃. Et like stort volum isopropanol ble tilsatt, etterfulgt av inkubasjon ved -70 °C i 3 t, hvorefter blandingen ble sentrifugert i 15 min i en epifuge ved topphastighet. Den resulterende pellet ble vasket med 70 % etanol, lufttørket og resuspendert i 100 µl TE.

Eksempel 2

Subkloning av den EF-1α-regulatoriske sekvens

For å bestemme størrelsen av den innføyde EF-1α-DNA ble fag-DNA, preparert som beskrevet i eksempel 1, spaltet med NotI og de resulterende restriksjonsfragmenter ble separert på en 0,6 % 1X TAE-agarosegel. Kloner 2.12 og 2.17 viste identiske spaltningsmønstre med bånd på 11 kb og 4,5 kb i tillegg til de forventede, flankerende lambda-fragmenter på 19 kb og 10 kb. Kloner 7.44 og 40.24 viste også identiske spaltningsmønstre med innføyde bånd på 12 kb og 7 kb som, sammen med spaltningsinformasjonen for kloner 2.12 og 2.17, indikerte tilstedeværelse av et internt NotI-restriksjonssete i EF-1α-DNA. Innføyde fragmenter fra kloner 2.12 og 7.44 ble subklonet som følger.

Fag-DNA (60 µl), preparert som beskrevet i eksempel 1, ble spaltet med NotI og deretter ble det spaltede DNA utfelt ved tilsetning av 20 µl 3 M natriumacetat og 400 µl 100 % etanol. Utfelt DNA ble oppsamlet ved sentrifugering, vasket i 200 µl 70 % etanol, lufttørket i 15 min, resuspendert i 20 µl TE og oppvarmet til 65 °C i 10 min før tilsetning av 2 µl appliseringsbuffer for elektroforese. DNA ble separert ved anvendelse av agarosegelelektroforese og bånd på 4,5 kb, 7 kb, 11 kb og 12 kb ble utskåret som agaroseskiver. DNA ble ekstrahert fra hver gelskive ved anvendelse av QIAGEN QIAquick gelekstraksjons-sett i overensstemmelse med produsentens foreslåtte protokoll. Båndets renhet og konsentrasjon ble beregnet ved å separere en 5 µl aliquot av hvert isolert fragment på en 0,6 % 1X TAE-agarosegel.

Individuelle fragmenter ble hver for seg ligert til NotI-spaltet pBluescript SW⁺. Ved ligeringer med fragmentene på 11 kb og 12 kb ble den lineariserte vektor behandlet med kalv-alkalisk fosfatase før innføring av fragmentinnføyelsen.

5 2 µl av hver ligering ble anvendt for å elektroporere 40 µl XL-1 Blue elektrokompetente celler. Transformerte celler ble utspreidt på LBM/karb-agaroseplater med 40 µl 5 % X-gel i dimetylformamid (DMF) og 20 µl 0,1 N IPTG pr. plate. Cellene ble inkubert over natten ved 37 °C, og om morgenen ble plat-

10 ene overført til 4 °C for å øke intensiteten av blåfargen.

I en sekundær screening ble hvite kolonier utstreket på LBM/karb-agaroseplater inneholdende X-gal og IPTG, som beskrevet ovenfor, og kolonier som var hvite den etterfølgende dag ble dyrket i 3 ml LBM/karb over natten ved

15 37 °C. Plasmid-DNA fra hvite kolonier dyrket over natten ble preparert ved anvendelse av WIZARD Plus Minipreps DNA-rensingssystem (Promega, Madison, WI) i overensstemmelse med produsentens foreslåtte protokoll.

Restriksjonsanalyse av det isolerte plasmid-DNA indikerte at fragmentene på 4,5 kb, 7 kb og 12 kb vellykket ble ligert inn i pBluescript SW⁺-vektoren og de resulterende plasmider ble hhv. betegnet pSK/EF1.4.5, pSK/EF1.7 og pSK/EF1.12.

Hvert plasmid ble deretter preparert ved anvendelse

25 av et QIAGEN midi prep-sett i overensstemmelse med produsentens foreslåtte protokoll. PCR ble utført på hver nye vektor ved uttitrering av templat-DNA og anvendelse av kodingsområdeprimerne (SEK.ID. NR. 4-11, anvendt i par som beskrevet ovenfor for å screene for pseudogener som mangler ett eller

30 flere av de forskjellige introner). Titreringen ble utført etter at det ble funnet at, ved høye konsentrasjoner, alle tre fragmenter ble vist å inkludere det komplette EF-1α-kodingsområdet, hvilket antyder mulig krysskontaminering mellom de tre plasmidpreparater. Ved titreringen ble PCR ut-

35 ført i reaksjonsblandinger inneholdende 2,5 µl templat-DNA ved en konsentrasjon på 0,001, 0,01, 0,1, 1 eller 10 ng/µl og inkludert 2,5 µl 10 x PCR-buffer (Perkin Elmer), 2,0 µl 2 mM dNTP-blanding, 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,125 µl Taq-polymerase (Perkin Elmer) og 11,4 µl dH₂O. Amplifikasjon ble utført

under de følgende betingelser: 4 min ved 94 °C, etterfulgt av 30 sykluser på 1 min ved 90 °C, 2 min ved 50 °C og 4 min ved 72 °C. Resultatene indikerte at det komplette EF-1 α -kodingsområdet var lokalisert innen 4,5 kb- og 7 kb-fragmentene.

5 Et restriksjonskart ble frembrakt for hver innførelse ved anvendelse av det ikke-radioaktive genkartleggingssett FLASH fra Stratagene, utformet for anvendelse med lambda FIX II \oplus -vektoren. Istedenfor anvendelse av fag-DNA ble det imidlertid benyttet plasmid-DNA utskåret ved hjelp av NotI-
10 spaltning fra pSK-vektorene beskrevet ovenfor. Kartleggingsprotokollen var vesentlig den foreslåtte av produsenten. Kort beskrevet ble plasmider sekvensert med M13 (SEK.ID. NR. 12) og M13 (SEK.ID. NR. 13) reverse primere (komplementære med områder innen det pBluescript SW⁺-multiple kloningsområdet)
15 for å lokalisere T3 (SEK.ID. NR. 14) og T7 (SEK.ID. NR. 15) primersekvensene internt for NotI-setet for hver innføyelse.

	M13	GTAAAACGACGGCCAGT	(SEK.ID. NR. 12)
	M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	(SEK.ID. NR. 13)
20	T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGG	(SEK.ID. NR. 14)
	T7	GTTAATACGACTCACTATAGGGC	(SEK.ID. NR. 15)

T7- og T3-primere ble anvendt som prober i genkartleggingsprotokollen. Fordi EF-1 α -innføyelsen var vist å
25 inkludere et internt NotI-sete, ble fragmentparene (4,5 kb/11 kb og 7 kb/12 kb) forhåndsberegnet å inkludere den ene eller den andre av primersekvensene og det ble således bestemt at 4,5 kb- og 12 kb-innføyselsene inkluderte T7-primersekvensen, mens 7 kb-innføyselsen inneholdt T3-sekvensen.

30 4,5 kb- og 7 kb-innføyselsene inneholdende EF-1 α -kodingsområdet, ble utskåret fra vektoren ved spaltning med NotI. Spaltet DNA ble separert på en agarosegel, de separerte fragmenter ble skåret ut av gelen og DNA ble isolert fra hver gelskive ved anvendelse av et QIAGEN QIAquick-gelekstraksjonssett i overensstemmelse med produsentens foreslåtte
35 protokoll. Kartlegging ble utført ved anvendelse av 7 forskjellige enzymer i partielle restriksjonsspaltninger. Reaksjonsprodukter ble separert på agarosegel, DNA ble overført til

Duralon-UV-nylonmembran og probet med T3- eller T7-oligonukleotider som probe. Båndstørrelsene ble målt og restriksjonskart ble formulert.

Plasmid pSK/EF1.7 ble sekvensert med de interne primere opprinnelig utformet for PCR-screeningen (SEK.ID. NR. 4-11 [primere 95-136-95-143, beskrevet tidligere]) for å sikre at gensekvensen var sekvensen av det tidligere identifiserte protein. Orientering av kodingsområdet ble bestemt og ytterligere primere ble utformet som tillot sekvensering til det interne NotI-sete. Sekvensen av hele kodingsområdet ble bestemt og ble deretter sammenlignet med den forventede cDNA-sekvens beskrevet i Hayashi et al. [supra]. Sekvensanalyse bekreftet at det isolerte DNA i realiteten kodet for de samme EF-1 α -sekvenser som beskrevet av Hayashi [supra]. Sekvensen av det første ekson var dessuten identisk med den tidligere publiserte hamster-EF-1 α -cDNA-sekvens ved 5'-enden [Hayashi, supra] og 7 introner ble identifisert, hvilket gir en struktur som er lignende den kjente for den humane homolog.

Sekvensen og restriksjonskartet oppnådd fra 7 kb-fragmentet indikerte at en del av det 5'-flankerende intron og promotoren var lokalisert i 12 kb-fragmentet 5' for det interne NotI-sete. Et SpeI/NotI 3 kb-fragment 5' for det interne NotI-sete, ble utskåret fra 12 kb-innføyselsen og subklonet i pBluescriptSK⁺ som tidligere var spaltet med de samme enzymer og det resulterende plasmid ble betegnet pSK/EF1.3. 3 kb-fragmentet ble kartlagt som beskrevet ovenfor ved anvendelse av KpnI og ClaI for å bekrefte restriksjonssetene og sekvensert ved anvendelse av et Erase-a-basesett (Promega, Madison, WI) under anvendelse av ClaI- og KpnI-setene for å danne hhv. 5'- og 3'-utvidelser. Sekvensanalyse indikerte områder inneholdende promotoren, TATA-boksen og et 0,9 kb-intron i det 5'-utranslaterte, flankerende område som hadde den samme lengde som det første intron i det humane gen [Uetsuki, 1989, supra]. Sekvensen for CHEF1-promotoren og 5'-intronet er vist i SEK.ID. NR. 1, intronet omfattende nukleotider 2699-3641.

Eksempel 3Karakterisering av det CHEF-regulatoriske DNA

Sekvensen oppstrøms for og inkludert ATG-startkodonet for hamster-EF-1 α -genet, er vist i SEK.ID. NR. 1. De fleste av de identifiserbare transkripsjonsfaktorbindingsseter synes å ligge 3' for det oppstrøms SacI-sete lokalisert 1,56 kb 5' for det initierende ATG-kodon i EF-1 α -genet. Hver av ekspresjonsvektorene, inkludert CHEF1-sekvensene beskrevet nedenfor, inneholder imidlertid også 2 kb CHEF1-sekvens 5' for SacI-setet.

Sekvensering indikerte tilstedeværelsen av perfekt konsensus-TATA-boks lokalisert ca. 1 kb 5' for det initierende ATG-startkodon, og området mellom oppstrøms SacI-setet og TATA-boksen inkluderer et stort antall potensielle transkripsjonsfaktorbindingsseter [Boulikas, Crit. Rev. Euk. Gene Exp. 4:117-321 (1994)], inkludert Sp1-seter (SEK.ID. NR. 16 eller 17), ATF-seter (SEK.ID. NR. 18) og NF-1-seter (SEK.ID. NR. 19).

20	GGCGGG	SEK.ID. NR. 16
	GGGCGG	SEK.ID. NR. 17
	TGACGY(C/A)R	SEK.ID. NR. 18
	TTGCCN ₃₄ (T/G)CCR	SEK.ID. NR. 19

Likeledes som for det humane EF-1 α -gen [Uetsuki et al, supra] finnes det et 943 bp-intron i det 5'-utranslaterte område (UTR) av hamster-EF-1 α -genet, som fremgår fra lokaliseringen av donor- og akseptor-spleisingssekvenser. Ved anvendelse av Geneworks DNA-analyseprogram ble imidlertid sekvensen av intronet i 5'UTR funnet å være kun 62 % identisk med sekvensen i det humane gen. 5'-intronet inkluderer et stort antall potensielle transkripsjonsfaktorbindingsseter, grovt beregnet likt med antallet bindingsseter mellom SacI-setet og TATA-boksen, hvilket indikerer at 5'-intronet kan være viktig for optimal transkripsjon fra EF-1 α -promotoren.

Ved anvendelse av Geneworks DNA-analyseprogram ble CHEF1-sekvensen fra oppstrøms SacI-setet nedstrøms for, men ikke inkludert, 5'-intronsekvensene funnet å være 64 % iden-

tiske med den humane EF-1 α -sekvens. En sammenligning mellom lokaliseringen av Spl-transkripsjonsfaktorbindingssteder i både de humane og hamsterregulatoriske sekvenser, er vist i tabell 1. Den komplette humane EF-1 α -gensekvens [Uetsuki et al, supra] er vist i SEK.ID. NR. 29.

Tabell 1

Distanse for Spl-seter fra TATA-boksen

10

Hamsternukleotidposisjon	Humannukleotidposisjon
-424	-335
-304	-220
-183	-208
-171	432
-151	476
-135	573
- 26	581
63	690
156	
168	
257	
261	
425	
495	
589	
594	
688	

Eksempel 4

Konstruksjon av ekspresjonsplasmider

15 Et stort antall plasmider anvendt i etterfølgende eksempler ble konstruert i overensstemmelse med de følgende prosedyrer.

20 Plasmid pSV2-dhfr (ATCC aksesjonsnr. 37146) ble spaltet med SphI/BamHI og et 1,8 kb fragment som koder for dihydrofolatreduktase (DHFR), ble renset (fragment 1). Det

DHFR-kodende fragment inkluderte også SV40-promotor/operator- og polyadenyleringssekvenser lokalisert hhv. 5' og 3' i forhold til dhfr-genet. Plasmid pSL1190 (Pharmacia) ble spaltet med HindIII, de overhengende ender ble utfylt med Klenow og det butt-endede DNA ble religert for å ødelegge HindIII-setet for å gi plasmid pSL1190H som deretter ble spaltet med SphI/BamHI og et 3,4 kb-fragment ble renset (fragment 2). pSV2-dhfr 1,8 kb-fragmentet (fragment 1) ble ligert til pSL1190H 3,4 kb-fragmentet (fragment 2) for å gi plasmid pSL1190H-dhfr.

Plasmid pSL1190H-dhfr ble modifisert for å eliminere flere restriksjonssteder som følger. Plasmidet ble først spaltet med XbaI/NheI (som gir komplementære overhengende ender) og det lineære plasmid ble religert for å eliminere både XbaI- og NheI-setene. I den andre prosedyre ble pSL1190H-dhfr spaltet med HindIII, de overhengende ender ble utfylt med Klenow og det lineære plasmid ble religert for å eliminere HindIII-setet. I den tredje prosess ble pSL1190H-dhfr spaltet med BglII, de overhengende ender ble utfylt med Klenow og det lineære plasmid ble religert for å eliminere BglII-setet. Sluttresultatet av disse tre trinn ga plasmid pSL1190H-dhfr/NXHB, hvori XbaI-, NheI-, HindIII- og BglII-setene var ødelagt. Plasmid pSL1190H-dhfr/NXHB ble deretter spaltet med EcoRI/BamHI og en NPBI/NPB2-linker [konstruert fra annealing av oligonukleotider NPBI og NPB2 (SEK.ID. NR. 20 og 21)] ble innføyd for å gi plasmid pSL/dhfr/NotI inneholdende et unikt NotI-restriksjonssete.

NPBI GATCGCGGCCGCGTTTAAACGGATCC (SEK.ID. NR. 20)

NPB2 AATTGGATCCGTTTAAACGCGGCCGC (SEK.ID. NR. 21)

Det resulterende plasmid pSL/dhfr/NotI ble spaltet med Asp718/BamHI og et 1,8 kb fragment som koder for DHFR, ble renset (fragment 3). Plasmid pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) ble spaltet med Asp718/BglII for å fjerne CMV-promotor og bovint veksthormon (BGH) polyadenylerings-DNA og et 3,7 kb-fragment ble renset (fragment 4). 1,8 kb pSL/dhfr/-NotI-fragmentet som koder for DHFE med SV40-promotor/operator

og polyadenyleringssekvenser (fragment 3), ble ligert til 3,7 kb pRc/CMV-fragmentet (fragment 4) for å gi plasmid pRc/DHFR/NotI.

Plasmid pRc/CMV ble spaltet med Asp718/XbaI og et 0,8 kb-fragment som koder for BGH-polyadenylerings-DNA, ble rensset (fragment 5). Plasmid pRc/DHFR/NotI ble spaltet med BamHI/Asp718 og et 4 kb-fragment med DHFR, SV40-promotor/-operator og polyadenyleringssekvenser ble rensset (fragment 6). Plasmid pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) ble spaltet med BglII/SacI og et 0,7 kb-fragment som koder for CMV-promotoren, ble rensset (fragment 7). 0,8 kb pRc/CMV-fragmentet (fragment 5), 4 kb pRc/DHFR/NotI-fragmentet (fragment 6), 0,7 kb pCEP4-fragmentet (fragment 7) og et syntetisk SacI/XbaI-adaptorfragment ble kombinert i en 4-veis ligering for å gi plasmid pDC1. Adaptoren ble konstruert ved annealing av oligonukleotider SXP1 og SXP2.

SXPI (SEK.ID. NR. 22)

5'-CGTTTAGTGAACCGTCAGATCTACATAACAACATTCCCTC
CTCTAAAGAAGCCCCAAGCTTGATATCTGCAGAATTCT-3'

SXP (SEK.ID. NR. 23)

5'-CTAGAGAATTCTGCAGATATCAAGCTTGGGGCTTCTTTAGAG
GAGGAATGTTGTTATGTAGATCTGACGGTTCCTAAACGAGCT-3'

Plasmid pDC1 inkluderer derfor CMV-promotoren, et polylinkerområde, et polyadenyleringssete fra BGH og dhfr-genet under kontroll av en SV40-promotor og en SV40-spleisings/polyadenyleringssekvens.

Plasmid pDC1 ble spaltet med XhoI, et 4,5 kb-fragment som mangler CMV-promotor og BHG-polyadenylerings-DNA, ble isolert og ligert for å gi plasmid pDC11. Plasmid pDC11 ble deretter spaltet med BamHI/XhoI, og et 4,5 kb-fragment ble rensset (fragment 8). 4,5 kb pDC11-fragmentet (fragment 8) ble ligert til et BamHI/SalI-spaltet PCR-fragment som koder for en partiell CMV-promotorsekvens produsert ved anvendelse

av primere 96-13 og 96-14 (plasmid pDC1 som templat) for å gi plasmid pDC12.

Primer 96-13 (SEK.ID. NR. 24)

5 5'-AGTTCAGTCGACGGCGCGCCAACCCGGAATCC
GGACGGGATCTATACATTGAATCAATATTGGCA-3'

Primer 96-14 (SEK.ID. NR. 25)

ATGTCAGGATCCACGCGGAAGTCCATATATGGGCTATGAACT

10

Plasmid pDC12 ble spaltet med Asp718/SpeI og et 4,2 kb fragment som koder for DHFR med SV40-promotor/operator og polyadenyleringssekvenser, ble renset (fragment 9) og pDC1 ble spaltet med Asp718/SpeI og et 1,5 kb-fragment omfattende partielt CMV-promotor-DNA med BGH-polyadenyleringssignaler, 15 ble renset (fragment 10). 4,2 kb pDC12-fragmentet (fragment 9) ble ligert til 1,5 kb pDC1-fragmentet (fragment 10) for å gi plasmid pDC31. Plasmid pDC31 var forskjellig fra pDC1 ved at flere nye restriksjonssteder, inkludert SmaI og AscI, ved 20 5'-enden av CMV-promotoren, ble dannet. Plasmid pDC31 ble spaltet med NotI, det overhengende DNA ble butt-endet ved anvendelse av T4-polymerase og Plasmidet ble religert for å eliminere NotI-setet og gi plasmid pDC36. Plasmid pDC36 er det samme som pDC31, med unntak av at NotI-setet ble ødelagt.

25

Plasmid pDC36 ble spaltet med ApaI/BamHI, overhengende ender ble utfylt og plasmidet ble religert for å gi pDC38. pDC38 er det samme som pDC36, med unntak av at ApaI/BamHI-fragmentet som inneholder den bovine veksthormon-polyadenyleringssekvensen, er blitt fjernet. Plasmid pDC38 30 ble spaltet med SmaI/HindIII og et 4,6 kb-fragment som mangler CMV-promotor-DNA, ble renset (fragment 11).

35

Plasmid pSK/EF1.3 ble spaltet med EcoRV/NotI/PvuI og et 2,9 kb-fragment som koder for CHEF1-promotoren og oppstrøms DNA-sekvenser ble renset (fragment 12). Bluescript SW⁺II (pSK⁺) ble spaltet med NotI og et 2,9 kb-fragment ble renset (fragment 13). 7 kb NotI-fragmentet fra lambda-fag 7.4, ble ligert til 2,9 pSK⁺-fragmentet (fragment 13) for å gi plasmid pSK/EF1.7.

Plasmid pSK' ble spaltet med HindIII/NotI og et 2,9 kb-fragment ble rensset (fragment 14). Plasmid pSK/EF1.7 ble spaltet med NotI/NcoI og et 620 bp-fragment som koder for en del av det CHEF1 5'-utranslaterte intron, ble rensset
 5 (fragment 15). Et 123 bp HindIII/NcoI-spaltet PCR-fragment som koder for resten av 5'-intronet, dannet med primere 96-36 og 96-45 og pSK/EF1.12 som templat, ble rensset (fragment 16).

10 Primer 96-36 (SEK.ID. NR. 26)

GGCTTAGCTCCGAGGAGGG

15 Primer 96-45 (SEK.ID. NR. 27)

CGTGACAAGCTTGGTTTTCAACAC

2,9 kb pSK'-fragmentet (fragment 14), 620 bp
 20 pSK/EF1.7-fragmentet (fragment 15) og 123 bp HindIII/NcoI-fragmentet (fragment 16) ble ligert for å gi plasmid pSK/5'EF-1 som har den komplette CHEF1 5'-intronsekvens. Plasmid pSK/5'EF-1 ble spaltet med HindIII/NotI og et 0,7 kb-fragment som koder for 5'-intronet, ble rensset (fragment 17).
 25 4,6 kb pDC38-fragmentet som mangler CMV-promotoren (fragment 11), 2,9 kb pSK/EF1.3-fragmentet med CHEF1-promotor og oppstrøms sekvenser (fragment 12) og 0,7 kb pSK/5'EF-1-fragmentet som koder for det komplette 5'-intron (fragment 17), ble kombinert i en 3-veisligering for å gi plasmid pDEF1 som således inneholdt det komplette 5'CHEF1-regulatoriske DNA,
 30 dhfr-genet og SV40-replikasjonsstartområdet som tillater replikasjon til et meget høyt kopiantall i cellelinjer transformert med SV40 T-antigenet.

Plasmid pDEF1 ble spaltet med HindIII, de overhengende ender ble utfylt og plasmidet ble spaltet med NotI og
 35 et 2,6 kb-fragment med CHEF1-promotor og oppstrøms DNA-sekvenser i tillegg til en partiell 5'-intro-sekvens ble rensset (fragment 18). Plasmid pDEF1 ble spaltet med NotI/Asp718 og et 1,3 kb-fragment som koder for resten av 5'-intronet, ble

renset (fragment 19). Plasmid pDC38 ble spaltet med SmaI/-
Asp718 og et 4 kb-fragment som koder for DHFR med SV40-
promotor/operator og polyadenylerings-DNA, ble renset (frag-
ment 20). 2,6 kb pDEF1-fragmentet (fragment 18), 1,3 kb
5 pDEF1-fragmentet (fragment 19) og 4 kb pDC38-fragmentet
(fragment 20) ble kombinert i en 3-veisligering for å gi
plasmid pDEF2. Plasmid pDEF2 i E. coli-stamme XL-1-Blue ble
deponert den 4. mars 1997 hos the American type Culture
Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, og
10 gitt aksjesjonsnr. 98343. Plasmid pDEF2 er forskjellig fra
pDEF1 ved at 0,3 kb HindIII/SpeI-fragmentet 2,3 kb oppstrøms
for CHEF1 TATA-boksen, var fjernet og inneholder kun ett
HindIII-sete lokalisert i polylinkerområdet. pDEF2 anvendes i
tilfeller hvor genet som skal uttrykkes, inkluderer sitt eget
15 polyadenyleringssete.

Plasmid pDEF2 ble spaltet med Asp718/XbaI for å
linearisere plasmidet, men dette eliminerte også sekvensene i
replikasjonsstartområdet, og et 7,4 kb-fragment ble renset
(fragment 21). Plasmid pDC1 ble spaltet med Asp718/XbaI og et
20 0,8 kb-fragment som inkluderte en startområdeerstatning eller
et replikasjons-DNA i tillegg til BGH-polyadenyleringssekven-
ser, ble renset (fragment 22). 7,4 kb pDEF2-fragmentet (frag-
ment 21) og 0,8 kb pDC21-fragmentet (fragment 22) ble kombi-
nert for å produsere plasmid pDEF10 som er forskjellig fra
25 pDEF1 på samme måte som pDEF2 er forskjellig. Plasmid pDEF10
er forskjellig fra pDEF2 ved at et polyadenyleringssete fra
det bovine veksthormongen, befinner seg på 3'-enden av poly-
linkerområdet i pDEF10.

Plasmid pDEF10 ble spaltet med HindIII/XbaI for å
30 linearisere plasmidet og et 8,2 kb-fragment ble renset (frag-
ment 23). Plasmid pDC1/MDC, et plasmid som koder for det
humane kjemokinmakrofagavlede kjemokin (MDC), ble spaltet
med HindIII/XbaI og et 0,4 kb-fragment som koder for MDC, ble
renset (fragment 24). Ligering av 8,2 kb pDEF10-fragmentet
35 (fragment 23) med 0,4 kb pDC1/MDC-fragmentet (fragment 24)
produserte plasmid pDEF10/MDC.1.

Plasmid pRc/CMV ble spaltet med BamHI, de overhen-
gende ender ble utfylt med Klenow, plasmidet ble spaltet med
Asp718 og et 1,5 kb-fragment ble renset (fragment 25).

Plasmid pDC1 ble spaltet med NotI, de overhengende ender ble utfylt med Klenow, plasmidet ble spaltet med Asp718, og et 3,9 kb-fragment ble rensset (fragment 26). 1,5 kb pRc/CMV-fragmentet (fragment 25) ble ligert med 3,9 kb pDC1-fragmentet (fragment 26) for å gi plasmid pNCX.

Eksempel 5

Transfeksjon av DG44-celler og produktivitetsanalyse

For transfeksjon av DG44-vertsceller med et enkelt plasmid ble 50-100 µg plasmid vanligvis linearisert ved spaltning med restriksjonsenzymene PvuI eller AscI. For transfeksjoner hvori to plasmider skulle innføres i CHO-celler, ble plasmidene ikke spaltet. Før transformasjon ble plasmidene utfelt med etanol og vasket to ganger med 70 % etanol. DNA-pelleter ble tørket i kort tid og resuspendert i 400 µl sterilt, destillert vann. Til det resuspenderte DNA ble det tilsatt 400 µl steril 2 x HeBS (40 mM HEPES-NaOH, pH 7,0; 274 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,4 mM Na₂HPO₄; 12 mM deksrose). Utransfekteerte DG44-celler ble dyrket i DMEM/F-12-medium supplert med hypoksantin (0,01 mM sluttkonsentrasjon) og tymidin (0,0016 mM sluttkonsentrasjon), også referert til som "HT". For dyrkning av både utransfekteerte og transfekteerte DG44-celler, ble dialysert FBS tilsatt til mediet til en sluttkonsentrasjon på 5 til 10 volum%. DG44-celler ble preparert for transfeksjon ved dyrkning av kulturer til ca. 50 % eller mindre konfluens i behandlede, 150 cm², vevskulturflasker av polystyren (Corning). Cellene ble fjernet fra plasten ved at mediet først ble fjernet, de adherente celler ble vasket én gang med kalsium-magnesium-fri fosfatbufret saltløsning (CMF-PBS: 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8,1 mM Na₂HPO₄), 4 ml av en løsning inneholdende 0,0125 % bestrålt trypsin (Worthington Biochemical Corporation) i CMF-PBS, ble tilsatt og blandingen ble inkubert ved 37 °C i noen minutter. Medium (4 ml) inneholdende bovint fosterserum (FBS) ble tilsatt, cellekonsentrasjonen ble bestemt og aliquoter på 2 x 10⁷-celler ble pelletert ved sentrifugering. Hver cellepellet ble vasket én gang i CMF-PBS og resuspendert i 0,8 ml av en løsning inneholdende HeBS med det ønskede plasmid-DNA. De resuspenderte celler ble overført til en 0,4 cm genpulser-

kyvette (Bio-Rad) ved romtemperatur og plassert i en Bio-Rad-
genpulser-elektroporeringsapparat. Cellene ble elektro-
porert ved romtemperatur med en kondensatorutladning på 290 V
og 960 μ FD (9 til 11,5 msek puls) Celler ble oppbevart i
5 kyvetten i ca. 10 min før de ble tilsatt til 10 ml DMEM/F-12
supplert med 5-10 % dialysert FBS og HT. Mengden av døde
celler ble bestemt ved dette punkt (trypanblått-ekskludering)
og ble typisk funnet å være ca. 50 %. Cellene ble deretter
pelletert ved sentrifugering, resuspendert i 2 ml DMEM/F-12
10 supplert med 5-10 % dialysert FBS og HT ("ikke-selektivt
medium") og utspreddt på 10 cm vevskulturplater av polystyren.
Etter to dagers dyrkning ble cellene, vanligvis konfluente
ved dette punkt, fjernet fra platene ved anvendelse av tryp-
sin som beskrevet ovenfor, og applisert på 10 cm² plater ved
15 forskjellige fortynninger i DMEM/F-12 supplert med 5-10 %
dialysert FBS og uten HT ("selektivt medium"). Fem og ni
dager senere ble cellene tilført selektivt medium. Etter ca.
2 uker ble de transfektante kolonier (typisk mer enn 1 000
for hver transfeksjon) fjernet fra platene ved anvendelse av
20 trypsin som beskrevet ovenfor, og etter tilsetning av selek-
tivt medium, ble cellekonsentrasjonen bestemt. Fra hver tran-
sfeksjon ble minst to aliquoter med 2×10^6 -celler tilsatt
til 10 cm plater inneholdende 10 ml selektivt medium. Cellene
ble dyrket til alle celler var utdødd, ved hvilket tidspunkt
25 de fleste celler hadde løsnet fra platen pga. overbefolkning.
Supernatant fra de utdødde kulturer ble analysert ved ELISA
for å bestemme det gjennomsnittlige produkttiter.

Eksempel 6

30 Produksjon av rekombinant protein ved anvendelse av CHEF1

DG44-celler beskrevet i eksempel 5, ble transfek-
tert med plasmider inneholdende genene vist i tabell 3 opera-
tivt bundet til CHEF1-regulatorisk DNA. Bakteriestammer
transformert med plasmider som koder for hvert av genene
35 anvendt i analysene, ble deponert den 1. april 1997 hos
American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive,
Rockville, Maryland 20852, og gitt aksjesjonsnr. vist i tabell
2.

Tabell 2Aksesjonsnumre for plasmider

5

Innkodet gen	Plasmidbetegnelse	Aksesjonsnummer
Antistoff ICM3 tung kjede	pDEF1/ICM3H.2	98381
Antistoff ICM3 lett kjede	pNEF1/ICM3L.3	98382
Antistoff 23F2G tung kjede	pDEF1/F2GH.1	98383
Antistoff 23F2G lett kjede	pNEF1/F2GL.1	98384
Kitinase	pDEF1/CTN.1	98385
Blodplateaktiverende faktor-acetylhydrolase (PAF-AH)	pDEF2/HPH.4	98386
Makrofagavledet kjemokin (MDC)	pDEF10/MDC.1	98387

Etter seleksjon for transfektanter ble en samling av kolonier (flere enn 200) fra hver transfeksjon fjernet fra hver plate ved anvendelse av trypsin og et identisk antall celler fra hver transfeksjon ble utspredd på nytt og dyrket til de var utdødd. Supernatantene ble fjernet og protein-ekspressjon ble analysert ved enten ELISA eller enzymanalyse. Resultatene er vist i tabell 3.

15

20

Tabell 3

Proteinekspresjon ved anvendelse av CHEF1- og CMV-
regulatoriske sekvenser

5

Transfekttert gen	Proteintiter	
	CMV	CHEF1
ICM3 H + L	554	1 862
ICM3 H + L	288	2 153
Hu23F2G H + L	337	1 848
MDC	360	2 100
PAF-AH	590	6 574
Kitinase-1	3 200	2 300
Kitinase-2	8 900	12 850

Med unntak av det første eksperiment som undersøkte
 10 kitinaseekspressjon (betegnet kitinase-1 i tabell 3), førte
 anvendelse av CHEF1-regulatorisk DNA til betydelig høyere
 proteinproduksjonsnivåer der økningene varierte fra 3 ganger
 til 11 ganger høyere enn ekspressjon med CMV-promotoren.

For å bestemme hvorvidt den reduserte ekspressjon
 15 observert i analysen for kitinase var en anomali eller et re-
 peterbart resultat karakteristisk for og/eller unikt for,
 kitinase, ble eksperimentet utført en andre gang, men ved an-
 vendelse av 2 separate transfeksjoner, i motsetning til den
 enkle transfeksjon anvendt i det første eksperiment som re-
 20 sulterte i et uvanlig lavt antall oppnådd transfektanter. Det
 ble dessuten benyttet en annerledes analyse for kitinaseakti-
 vitet som ble vist å være mer nøyaktig enn teknikkene anvendt
 i det første eksperiment.

Transfeksjoner i det andre forsøk førte til et an-
 25 tall transfektanter som var mer overensstemmende med resul-
 tater tidligere observert ved anvendelse av pDEF2-plasmid som
 i andre eksperimenter produserte mer enn 150 % av antallet
 transfektanter med CMV-plasmidet. Resultater fra det andre
 eksperiment (betegnet kitinase-2 i tabell 3) var internt
 30 overensstemmende, hvilket ga ytterligere tiltro til resulta-

tene, selv om den observerte økning i proteinekspresjon (ca. 1,4 ganger) i forhold til ekspresjon med CMV-promotoren, var mindre enn den observerte for de andre tidligere undersøkte proteiner.

5

Eksempel 7

Produksjon av rekombinant protein ved anvendelse av CHEF1-regulatorisk DNA med forskjellige lengder

En ekspresjonsvektor omfattende ytterligere 8 kb av
 10 5'-flankerende DNA fra EF-1 α -genet ble også konstruert og
 betegnet pDEF14. Plasmid pDEF14 er forskjellig fra pDEF2 ved
 at pDEF14 inneholder ca. 11,7 kb av hamster-EF-1 α -5'-flanke-
 rende DNA, mens pDEF2 inneholder kun 3,3 kb av de samme se-
 kvenser. pDEF14-plasmidet inkluderer også 4 kb av hamster 3'-
 15 flankerende DNA tilgrensende 3'-enden av DHFR-ekspresjons-
 kassetten. Det større pDEF14-plasmid ble konstruert som be-
 skrevet nedenfor.

Kort beskrevet ble et 2,6 kb AscI/NotI-CHEF1-frag-
 ment fjernet fra pDEF2 og et 11 kb AscI/NotI-CHEF1-fragment
 20 ble innsatt i stedet for dette. Innføyelse av den større se-
 kvens fordres først modifikasjon av et XbaI-sete lokalisert
 11,7 kb 5' for det EF-1 α -initierende ATG til et AscI-sete.
 Et 4 kb butt-endet NsiI/SalI-fragment, bestående av CHEF1-
 flankerende sekvens med start ved et NsiI-sete 118 bp 3' for
 25 EF-1 α -stoppkodonet, ble innføyd i PmeI/SalI-setet 3' for
 DHFR-ekspresjonskassetten lokalisert på 3'-enden av poly-
 linkerområdet som gener som skal uttrykkes, er innføyd i. Den
 komplette 3'DNA-sekvens, med start ved stoppkodonet til EF-
 1 α -genet, er vist i SEK.ID. NR. 28. Bakterier transformert
 30 med dette plasmid ble deponert den 9. april 1997 hos the
 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive,
 Rockville, Maryland 20852, og gitt aksjonsnr. 98398. Det
 resulterende pDEF14-plasmid inkluderer unike XbaI- og NotI-
 seter sammen med multiple HindIII-seter, hvilket derved nød-
 35 vendiggjør 3-veislivering for å innføre et gen i plasmidet
 for ekspresjon. Et gen kan f.eks. innføres i plasmidet ved
 ligering av et HindIII/XbaI-fragment som omfatter det ønskede
 gen med et 737 pb NotI/HindIII-fragment fra pDEF14 og et
 19,7 kb XbaI/NotI-fragment fra pDEF14.

Proteinekspresjon ved anvendelse av denne vektor ble sammenlignet med ekspresjon ved anvendelse av pDEF2-vektoren som omfatter en mindre del av det EF-1 α -5'-flanke-
rende område. I tidligere eksperimenter ble DNA som koder for
5 både de tunge og lette kjeder av antistoffet 23F2G, subklonet
i både pDEF2- og pDEF14-vektorer, og ekspresjonsnivåer ble
bestemt etter transfeksjon i DG44-celler, som beskrevet oven-
for i eksempel 5. Gener som koder for begge antistoffkjeder,
ble arrangert lineært i vektorene og ekspresjon av begge ge-
10 ner ble styrt av CHEF1-sekvensen i de individuelle plasmider.
Kodingsområder for de to kjeder i hvert plasmid ble separert
ved hjelp av identiske 4,3 kb av DNA avledet fra 3'-utransla-
tert område-humant IgG4.

Resultatene viste at 23F2G-ekspresjon fra den
15 større CHEF1-sekvens i pDEF14 var fire ganger større enn
antistoffekspresjon fra den mindre pDEF2-sekvens. Dette re-
sultat var overraskende ved at de fleste av de identifiser-
bare pDEF14-transkripsjonsbindingsfaktorseter også er i DNA-
sekvensen i pDEF2. Det er derfor mulig at ett eller flere
20 ytterligere og uidentifiserte transkripsjonsfaktorbindings-
seter eller enhancersekvenser er lokalisert i CHEF1-DNA i
pDEF14-plasmidet. Alternativt kan det større CHEF1-DNA gi
fordelen med økt transkripsjon som et resultat av 3'DNA-
sekvensegenskapene.

25 Et stort antall modifikasjoner og variasjoner av
foreliggende oppfinnelse som vist i de illustrerende eksemp-
ler ovenfor, forventes å fremgå for fagfolk. Oppfinnelsen bør
således kun begrenses i overensstemmelse med de medfølgende
krav.

30

35

SEKVENSLISTER

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Allison, Daniel S.
- (ii) TITLE OF INVENTION: Hamster EF-1 δ Regulatory DNA
- 5 (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 29
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray &
Borun
 - (B) STREET: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower
 - 10 (C) CITY: Chicago
 - (D) STATE: Illinois
 - (E) COUNTRY: USA
 - (F) ZIP: 60606
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - 15 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - 20 (A) APPLICATION NUMBER: US
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - 25 (A) NAME: Williams Jr., Joseph A.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 38,659
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 27866/33537
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: 312-474-6300
 - (B) TELEFAX: 312-474-0448

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 3678 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - 35 (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ACTAGTTCCA AAGATGAATT ACTAACCAGT GTTCCBAGG AATAAATGA
 AAGCAGAGAG 60
 ATTAGTTCTA TTGCTAGTGT TTCATTTTCG TATATTCTT ACRATTTCTC
 TTGTTACAAA 120
 5 TAGGCACCTAG GGTATCARGA TAATTTTAAAC GACTGGCTGA GAACCCTAGA
 AATCTCTGT 180
 GAAAAAGGGA TTTGTGAAT GAGAGAGGGT AATGTGCCA TTATAGAAA
 GGCTTTTCTG 240
 TGCCTTGCAT GCATAGACCC TGTGTTTGTAT CTCTTACAC CCTCCTTGAC
 CAGAAAAAGC 300
 TTCTGTGGAT AGAAAATGAT TAGTTATATA TACTTTTAGG GAACGTAGT
 TCTGGATTCT 360
 10 TTGGTTACAA TTAACAGAAAT TAAGTGCAA CAAAGCCAGA AACCTCCTGA
 TAATGAGAA 420
 AACCTCCTTG TAGAAGGTTG TAAGGCTCTG TARTATAGGA ATTAGGAGAA
 AAGAACCTG 480
 TGTGGTGGGG CACGTCGTGA ATCCCAGCAT TGGGAGTAG AGGTAGAAGA
 TTAGAAATCA 540
 AAGCCAGCC TCAGCAACAC AGTGAGTTG AGCCBCCCT GAACACATC
 15 AGGTTCTGTC 600
 TCCTTTCTTT TTTTTTTTT TTTCTTTCT TTTTTGGTT TCTCTGTGA
 GTTTTGGAGC 660
 CTATCCTGGC ACTAGCTCTG AAGAGCAGGC TGGCCTCGA CTCAGAGATC
 AGCCAGCCTC 720
 TGCTGGGATT AAAGGTATGC ACCACCAAG CCCCAGGTT TGTCTCAAA
 AACRAAAAT 780
 20 AACATCAGGA GGTGOTGAGA GGGCTCAGT GTCACAGCA TTCTCTGCAA
 AGCCTGACTC 840
 TGAGTTGGAT CCTTTAGAGC TACATGOTTG AGGGAGAGA ACTGACTCCT
 GGAGGTGTC 900
 CTCTGGTCCC CACACATAGC TATACACAGC ATGTGCATTC ACACACACTA
 AATAATGCTA 960
 TTTTTAAAAA AATTAAAAAC AACACAGTT TGGGTTGTGA ARACTAGAAC
 TAGATAATAG 1020
 25 GTAGAAATCA AGTATCATGT AATTTGCTT TCACTCATC CCAAATTTG
 TTTTATATT 1080
 CAGTTTTTTT CCTTCCTAGC TTGACTGTGG AGTCTTGTC GGAGCAAAT
 AGTTCCTTTG 1140
 CAGATCCAC ATGTGGACAC CCGACATAG GTCCTCAAT GCTCCTTATT
 AGGTTGGTTC 1200
 AATAATATCA ATTGTTTGT ACTAGGCAGT GATGTTGTAC ATCTGGAGGA
 30 GATCTCTTGA 1260
 GCCCATAATC AGGTTATTAG GATAAATAC TCTRAGGCTA AAAATGTAGC
 TTAGTGATAA 1320
 GAGTGCTTGC CTGGTGTGCT GAGACCCTCG GTTCCATCTC CACAAACCCA
 TATTCATTA 1380
 CAAAATACCT TTTCCCGTC CCTAGCATTA AGAACAATA CACAAGAA
 GTTTTCTTT 1440
 35 CTCTGAGAT CCTCCCCGA GAGGCATTA AACTGGCCA GGGCCAAAA
 AAAAAAATA 1500
 AAAAGAAAAA AAAGAAAAA AACCAGGCTA GGGCCGCAT GGTGGCCAC
 GCCTTAATC 1560
 CCAGCACGCA GGAGCCAGG GCAGGGCGA TCTCTGTGAG TTTGAGTCA
 GCCTGGTCTA 1620

CCTAGTGAGT TTCAGGGCAC CCAGGGCTAA AGAGACTGTC TCRAAAACAA
 AACAGCCACA 1680
 CAATCAGAAC CACAGCAAAA CGCAGTTATG ATCCTTGGAA CTGTAGGAA
 GRCAGCATT 1740
 TAATAATAG GACGAGCCAT TTTGAGAAG CTCTGATTTC ACRAAGTGTCA
 GGGATGGGCT 1800
 5 CTGGCCGAGT AAGATTGCTA ATGCTGGCCT CTAATGAGA CCRCGTGGAC
 TTGATTAGAT 1860
 TCTTTTCATG TTCTCGTGC TCTATCAAAAT AACTGTACCC AAATACACAC
 ACACACACAC 1920
 ACACACACAA TGGCCGCACA CACAAAATCC TTTTTTAGCT TARGAAGCCC
 AGAATCAGAA 1980
 GTARAGCTAA CTGTGGGACT TAAATATTAT TCTGAACGGA ACTCCCAGGG
 10 CGTGAAGCGC 2040
 GCTTCAGGCT TCCAGAGAAG CAGCTGGCGC TGGATGGAAT GAACCAAGAG
 GCCAGCACAG 2100
 GGGCAGATCC GTCGAGCTCT CGGCCACCGA GCTGAGCCCT TAGGTCTGG
 GGCTGGGAG 2160
 GGTCCCTAGG ATTGTGCACC TCTCCCGCGG GGGRCAGCA GGGGATGGCG
 GGGCTGACGT 2220
 CGGGAGGTGG CCTCCACGGG AAGGGACACC CGGATCTCGA CACAGCCTTG
 15 GCAGTGGACT 2280
 CAGGAAGGGT AGGACAGATT CTGACGCCC TCTTGGCCAG TCCTCACCCG
 CCCACCCCG 2340
 ATGGAGCCGA GAGTAATTCA TACAAAAGCA GGGATCGCCT TCGCCCTGG
 GARTCCAGG 2400
 GACCGTCGCT AAATTCTGGC CGGCCTCCCA GCGCGAACC GCTGTGCCCG
 CCCAGCGCGG 2460
 20 CGGGAGGAGC CTCCCCCTAG GCGCGATCCG GGGTCCCGG GAGAGCACAA
 GCCCACAGTC 2520
 CCCGCGGTG GGGGAGGGGC GCGCTGAGCG GGGGCCCGG AGCCAGCGCG
 GGGCRAACTG 2580
 GGAAGTGGT GTCGTGTGCT GGTCCGCCC TCTTCCCGAG GGTGGGGAG
 AACGGTATAA 2640
 AAGTCCGTA GTCGCTTGG ACGTCTTTT TCGCAGCGG TTTGCCGTCA
 GAACGAGGT 2700
 25 GAGTGGCGG TGTGGCTCC GCGGGCCCG GCTCCCTCCT TTGAGCGGG
 TCGGACCGCC 2760
 GTGCGGTGT GTCGCGCGG GCTTCTCTGC GAGCGTCCC GCCCTGGATG
 GCGGGCTGT 2820
 CGGGAGGGCG AGGGGGGAG GCCTGGCGC GCGCCCGAG CCTCGCCTCG
 TGTGGGCGT 2880
 GAGGCCTAGC GTGGCTCCG CCGCGCCCG TCCACCGCG GCGCGCTTT
 30 GCTGTCTGCC 2940
 CGGCTGCCCT CGATTGCCCTG CCGCGGCC CCGCAACAA AGGGAGGGCG
 TGGAGCTGGC 3000
 TGGTAGGGAG CCCCCTAGTC CGCATGTCG GCAGGGAGAG CGGCAGCAGT
 CCGGGGGGG 3060
 ACCGGGCCCG CCGTCCCGC AGCAGATGTC CGACCGCGC TGGACGGGTA
 GCGGCTGTG 3120
 35 TCCTGATAAG GCGGCCGGC GGTGGGTTT AGATGCCGGG TTCAGGTGGC
 CCCGGTCCC 3180
 GCGCCGCTT GCCAGTACC CCGTAGTGGC TTAGCTCCA GAGGGCCAG
 CCGCCCGCC 3240
 CGGCACAGT TCGTCCCGG GAAAGATGCC CGCTCCCGG CCTGTAGCA
 AGGAGCTCAA 3300

AATGGAGGAC GCGGCAGCCC GCGGGAGCGG GCGGGGTGAG TCACCCACAC
 AAAGGAAGAG 3360
 GGCCTTGCCC CTGCGCGGCC GCTGCTTCCT GTGACCCCGT GGTGTACCGG
 CCGCACTTCA 3420
 GTCACCCCGG GCGCTCTTTC GGAGCACCGC TGGCCTCCGC TGGGGGAGGG
 GATCTGTCTA 3480
 5 ATGGCGTTGG AGTTTGCTCA CATTGGTGG GTGGAGACTG TAGCCAGGCC
 AGCCTGGCCA 3540
 TGGAGTAAT TCTTGAATT TGCCATTTI GAGTTGGAG CGAAGCTGAT
 TGACAAAGCT 3600
 GCTTAGCCGT TCAAAGOTAT TCTTCGAACT TTTTTTTTAA GGTGTTGTA
 AAACCACCGC 3660
 TAATTCAAAT CCAACATG 3678

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

AGGCACAGTC GAGGCTGATC

20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TTCCAGGGTC AAGGAAGGCA

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GCCACCTGAT CTACAAATGT

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GAGATACCAG CCTCAAATTC

20

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

ATGTGACCAT CATTGATGCC

20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GTGACTTTCC ATCCCTTGAA

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

GTTGGAATGG TGACAACATG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

CAGGTTTTAA AACACCAGTC

20

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

AATGACCCAC CAATGGAAGC

20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

ACAGCAACTG TCTGCCTCAT

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

GGAAACAGCT ATGACCATG

19

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

AATTAACCCT CACTAAAGGG

20

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

GTTAATACGA CTCACTATAG GGC

23

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 6 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

GGCGGG

6

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 6 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

GGGCGG

6

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 8 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

TGACGYMR

8

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

TGGCNNNNNKCCR

13

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

GATCGCGGCC GCGTTTAAAC GGATCC

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

AATTGGATCC GTTTAAACGC GGCCGC

26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 77 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

15 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

CGTTTAGTGA ACCGTCAGAT CTACATRACA ACATTCCTCC TCTAAGAAG

CCCCAAGCTT

60

20

GATATCTGCA GAATTC

77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

30 CTAGAGAATT CTGCAGATAT CAGCTTGGG GCTTCTTTAG AGGAGGAATG

TTGTTATGTA

60

GATCTGACGG TTCACTAAC GAGCT

85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

35 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

AGTTCAGTCG ACGGCGCGCC AACCCGGGAA TCCGGACGGG ATCTATACAT
TGAATCAATA
TTGGCA

60

66

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 42 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

10 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

ATGTCAGGAT CCACGCGGAA CTCATATAT GGGCTATGAA CT

42

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 19 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

20 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

GGCTTAGCTC CGAGGAGGG

19

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

30 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

CGTGACAAGC TTGGTTTTCA CAACAC

26

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 4263 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

TGAATATTAC CCCTAACACC TGCCACCCCA GTCTTAATCA GTGGTGGAG
 AACGGTCTCA 60
 GAACTGTTTG TCTCAATTGG CCATTTAAGT TTAAATAGTA AAGACTGGTT
 AATGATAACA 120
 ATGCATCGGA AAACCTTCAG GAGGAAAGGA GAATGTTTTG TGGAACATTT
 TTGTGTGTGT 180
 10 GGCAGTTTTA AGTTATTAGT TTTCAAAATC AGTACTTTTT AATGGAAACA
 ACTTGACCAA 240
 AAATCTGTCA CAGAATTTTG AGACCCATTA AAATACAAGT TTAATGAGAA
 GTCTGTCTCT 300
 GTTAATGCTG AAGTCATTAC TAAGTGCTTA GCTTAGCAAG GTATGTGGAT
 GCCCATTGT 360
 GTTCCAAGGG ATTGGACTGT TCATCAGGAC CCAGAGCTGA GTTTCRAAGG
 CTCAGAGAT 420
 15 GGCATTATTAC CTGTGGGTGT CTTGAAAGTT CTGGTTGGGA CAAATTAGGA
 ATGTTTTTGG 480
 CAGACATGCT GACTACCTTC ATCTGGGTGA GTTCAGTTGA TTTGTCTTGA
 GCCTTTGGGG 540
 TTTACACAAG TAAATGACAT CATAACGTTA GGTATTGTT AGTGAATATT
 AATAIATGAG 600
 GCAGGCTTTG CTCTAGCAAT TTTAGACTA GTTTTCAGGA AAGGGTTCAT
 20 CTTGTGCATT 660
 GGATGTTTGA TTCTATCACT TAGAGTTTAA ACTGAAAGTG CTCAGAGGOT
 TTTATTAGG 720
 CTGGGATATA AATAAGCCTT TCTGTAGCTT GTAATGGTAT CAGGAATTA
 ARAGGCCATC 780
 TGGGGCACAA AGATTAAGCA GAAAAGGTAG AAGGTGAGAT TGGGGGACTT
 TGAGTACTTC 840
 25 ACRCACTTTA ATGTGTGAGT GCTTTAGTGC ATATAGTACA ACTGCCAGAT
 AAGGGCATCC 900
 ACATCTGATT GTTTGGAAGG CACCTTGTGG TTTCTGGGA TTCAGAAITG
 GGAGAAAAT 960
 GCTCCCAACC GCTGAAGCCC TTGGTAATCT GCAGGGTGT TATTTAGCAG
 GAGATAAGGA 1020
 CAAAAGTTA TAGTGTGGAG TTGGTTGAGT TGGTAGTGT CATTACAACA
 30 GGTGGTCTTA 1080
 AATTGGGTTA GGAGTCACCT TGAATACCT GGGCCATAAG CAAAGTGGCA
 TTTTACCTT 1140
 TCAGGAGAAA CTGGTACACT TATCCATTCT ATAGTGCATG CTTGTTCAAT
 TGGGCTGATG 1200
 ACTAAACCGG TGACTAAAGG TTTGTCAGTA TAAATGGATG GGTGTAGGC
 AGACGGTGAG 1260
 GAATTACTAT ACCTGCAAGG AGTCATTGCC TGATCTGCC TGGAAAGGGG
 35 AGGATTGACT 1320
 CTCAGAACCT GTACACCATA GGATATGGAA AAAAAATGCA CACCTAGCAT
 TCAACTTACT 1380
 GGTGTAGCCG CACCTACTGG CACTTTAAA GCTTAGCATA GAGGAGCATG
 TGTGTTAGGA 1440

GCTCGGATGG GATCCAGGGC CTC AAGGTTT GCATGTAAAT AAAGCCCTT
 TACCAARATTA 1500
 ACTACATACC AGCATAATC AGTCCTTTAG TGTGAAAAA CAGRAGGGAA
 AGCTAATATA 1560
 TATAGTCTCT GCTTTATTTA AGTCTAGCTG ATTACGTGTT TGGTTGCCAG
 TGTGACTAGT 1620
 5 CTGGAGTTGA ATTTGTCCCTC AGACACGTAA AATGGAATTT GGGATTACAA
 AACTCTTAGT 1680
 ATGAGGGACC TAATGGCCTG TACCAAGGCAC AAACGTGTCT ATAACTACA
 CAAAACGAAG 1740
 GAATTTACAG GAATTAGGAA GGTATTCTTA ACATTAATAAC ATTTGCGCA
 TTTTAAAAA 1800
 AGCTTTGACA GGATTTCTTT GTCATGCTG TCCTGGAGCT AGTTGTGTAG
 ACCAGGCTGG 1860
 10 GCTGAATCT TGTCTGCTG CCTGGCTTGG AACTTTTTT ATTATGTATA
 CAACATCTG 1920
 CTTCCATGTA TATCTGCACA TTAGAAGAGC GCACCAGATC TCCTAATGGA
 TGGTTGTGAG 1980
 CCACCATGTG GTTCTGGGA ATTGAACCTA GGACCTCTGG AAGAGCAGTG
 CTCTAACCT 2040
 CTGAGCCATC TCCAGCCCCA GCTTGGGCAC ATTTTAAATG GCTGGGAAT
 15 CAAACCCCT 2100
 AGGCCTTCTG TCAGTAATGA AGGCCTTTG GCTACCGAGA GTAGGATTTA
 AGGTATTCTG 2160
 GAGCTGCAGG TCTGCCTCAG TGCAGGTTG GGAATCCAGC ATCTTAGAAA
 ATGCAGTGAA 2220
 GCCAAGCTGA GCTATATTTT GTTAAAAAA AAAATAAGTG GGTAAAGTGC
 TGCTGAGCCT 2280
 20 GATGACCCAG CTGGACACA AGTAGAAGAA CATAGGCCAA TGCTCTATAT
 TAAAGCATG 2340
 GGTCAATTTT AATGCTCTTG ABAAGGCTAT GCCTACACTA CTCTGAGCCA
 CCGCAGCCTG 2400
 TTTAAATTA ACTAGTTTGG AAATTTCTT TGGGGGTAG CTATTTAAC
 TAGTGCCTTG 2460
 GCAGGTATAC TACTGAATC TCCTCCTCAT TCCTTTTTGT TTTTAAAGAA
 TTTCAATCAG 2520
 25 GCTCAGGCAG CCCTTAAACT TGTGATTAAG CCTGAGAACG GTTACGATTA
 TGAACCTATT 2580
 AGTATACCGA TCAATATGTG AATTTTTTGG GATGGGGGT CAGGCCTCCC
 TGCCTCCCA 2640
 ATACTGGGAC TAAAGGCTGC ACCACCACAA CCTGGCTCTT GAATACTTT
 TCTACATTTT 2700
 TTGGGGGGCA TGGGTGGGAG AGCAGGTTT CTCTGTATTA GCCCTGGCTC
 30 TCCTGGAAT 2760
 CTGTAGACCA GGCTATTCTT GAGCTCAGAT TAGCCTGTCT CTGCCTCCTA
 AATTCGGGA 2820
 TTAAGGTGT GTCTACTGC TGCCTGGCTA CAAAGACATT TTTTTTTTC
 TTAATTTAA 2880
 AAACAAAAGT GGTCTTTTTA GAAGGGTGGT TGGTGTGGC ACATACICCA
 AGCACTCAGG 2940
 35 TTTTGAATTT GTCCAGGAA TGAAGACTGC ATTACTGCCG CCCCTCCCTG
 GTRAGGGCTA 3000
 CACAGAGAAA TCCTATTTGG AGCCTATCCT GGTAACTCGC TCTGTAGACC
 AGGCTGGCCT 3060
 CGAATCAAG AGAACCACT GCCTCTGAAT GCTGTATTA AGGGCAGGCA
 CCACCAACAC 3120

CCAGCCTAAA AAATGCTTT TTTTAAAGA TTTTTTTT TTTTTTACA
 GAATAACAT 3180
 TCTGTTTACA ATATTCTGCT TCTATGTATA TCTGCACACT AGAAGAGGGC
 ACCCGATCTC 3240
 ATAATGGATG GTTGTGAGCC ACCAAGTGGT TCGTGGGAAAT TGAAGTCAAG
 ACCTCTGGAA 3300
 5 GAGCAGTCAG TGCTCTTAAC CTCTGAGCCA TCTCTCCAGC CCCTAAAAAT
 GGCTCTTGAG 3360
 ATAGGGTCTC AAGTAGTTTG AGACTGAGTT GGCTATATA ACAAGGCTGG
 CACATAGCAC 3420
 CATGTACAGC TGGGTTTACT TTACATGGGC TGTTTTTGTC TCTGGAGCCA
 GGAGGATCAT 3480
 TTGAGCATAG GAGTTAATA GTGAGGTCAAT GTTTTATCTA CTCTTCTGAA
 10 TTGAGAACTA 3540
 AGCTGATGCA AAGCAAGTTT GACTGAAGAA GTCCAGTTTA TGAGAACAG
 GGTGGAAACT 3600
 AATGTGTCAG AGATGGCCTT GCATGTGTTT TAGATGATGA CCCAGTCACT
 TGGGAATTAC 3660
 TGGATGTGTA AGACCTATAT CTTGACAGGA GTGAACAGTG TCTTATAGT
 CCTATATGAA 3720
 AGAAATGAGA CATACCCATT TTGTTCCCC TAAGAATTCA CTTTTCCTAA
 15 CCTGGTTCAT 3780
 GCTATTTAGG TTATTTTACT TGCAATCCT AGGTGCTCCC TTACCCAGTA
 TTGCTTATGT 3840
 GGCACCAAG TCACCTACTC CCATGATTTG CAAGTCTCTG GGAAGTCCA
 TGACACCTA 3900
 GAATAGCAAC TCAATACAT TTTCTCAGTA CCAATTTTGA AGAAAAATA
 TTTTCAAAA 3960
 20 TAGCTGTATG GATGGTACT AAATAGTGA GTTATCTCCA GAAGGCCTAT
 GAAGAATTAA 4020
 GGTGAGTTC AGTTGAGTTC AGCAGCAAGT TTAAGGTTCA TCCATTTTIG
 TACAGTGTIT 4080
 TCCTATTAGG GTAAGTGTIT TGCTGCAGG AATATCTGTA CCACATGCTT
 GCCTGGTACC 4140
 TATATCGGCC AGAAGAGGGC TTTGGATCCT CTGACTTGA ATTACAGATG
 GGTATTAGCC 4200
 25 ACCATTTAGG TGCTGGGAAT TGAACCAAG TCCTCTGAAA GAACAGCAAG
 TGATCGAGTC 4260
 GAC 4263

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4695 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

CCGGGCTGG GCTGAGACC GCAGAGGAG ACGCTCTAGG GATTGTCCC
 GGACTAGCGA 60
 GATGCCAAG CTGAGGACGG GAGGCTGATT GAGAGCCGAA GGTACCCCT
 ARTCTCAATA 120

CACCTTTGG AGCTAAGCCA GCAATGCTAG AGGGARGATT CTGCACGTCC
 CTTCCAGGCG 180
 GCCTCCCCGT CACCACCCCC CCCRACCCGC CCCGACCGGA GCTGAGAGTA
 ATTCATACAA 240
 AAGGACTCGC CCCTGCCTTG GGGAAATCCCA GGGACCGTCG TTAACCTCCC
 ACTAACGTAG 300
 5 AACCCAGAGA TCGCTGCGTT CCCGCCCCCT CACCCGCCCG CTCTCGTCAT
 CACTGAGGTG 360
 GAGAAGAGCA TCGGTGAGGC TCCGGTGCCC GTCAGTGGGC AGAGCCGACA
 TCGCCACAG 420
 TCCCCGAGAA GTTGGGGGGA GGGGTCCGCA ATTGARCCGG TGCCTAGAGA
 AAGTGGCCGC 480
 GGGTAAACTG GGAAGTGAT GTCGTGTACT GCCTCCGCT TTTCCCGAG
 10 GGTGGGGGAG 540
 AACCGTATAT AAGTGCAGTA GTCGCCGTGA ACGTTCITTT TCGCAACGGG
 TTTGCCGCCA 600
 GAACACAGGT AAGTGCCTG TGTGTTCCC GCGGGCCTGG CCTCTTTACG
 GGTATGGCC 660
 CTTGCGTGCC TTGAATTACT TCCACGCCCC TGGCTGCAGT ACGTGATTCT
 TGATCCCGAG 720
 CTTCCGGTTG GAAGTGGGTG GGAGAGTTCC AGGCCTTCCG CTTAAGGAGC
 15 CCCTTCGCCT 780
 CGTGTGAG TTGAGCCCTG GCCTGGGGCC TGGGCCGCC GCGTGCMAAT
 CTGGTGGCAC 840
 CTTCCGCCCT GTCTCGCTGC TTTGATAAG TCTCTAGCCA TTTAAATTT
 TTGATGACCT 900
 GCTGCGACGC TTTTTTCTG GCAAGATAGT CTTGTAAATG CGGGCCAAGA
 TCTGCACACT 960
 20 GGTATTTCCG TTTTTGGGGC CGCGGGGGCC GACGGGGCCC GTGCGTCCCA
 GCGCACATGT 1020
 TCGGCGAGGC GGGCCCTGCG AGCGCGGCCA CCGAATCG GACGGGGTA
 GTCTCAAGCT 1080
 GCGCCGCTG CTCTGGTGCC TGGCCTGCG CCGCCGTGTA TCGCCCCGCC
 CTGGCGGCA 1140
 AGGCTGGCCC GGTCCGCACC AGTTGCCGTA GCGAAGAT GCGCGTTCC
 CGGCCCTGCT 1200
 25 GCAGGGAGCT CAAATGGAG GACCGCGGCC TCGGAGAGC GGGCGGTA
 GTCACCCACA 1260
 CAAGGAAAA GGGCCTTCC GTCCTAGCC GTCGTTTAT GTGACTCCAC
 GGAGTACCGG 1320
 GCGCCGTCCA GGCACCTCGA TTAGTCTCG AGCTTTTGA GTACGTGTC
 TTTAGGTTGG 1380
 GGGGAGGGT TTTATGCGAT GAGTTTCCC CACACTGAGT GGTGGAGAC
 30 TGAAGTTAGG 1440
 CCAGCTTGGC ACTTGATGTA ATTCTCTTG GAATTGCC TTTTGAGTT
 TGGATCTTGG 1500
 TTCATTCTCA AGCCTCAGAC AGTGGTTCAA AGTTTTTTC TTCATTCA
 GGTGTCGTGA 1560
 AACTACCCC TAAAGCCAA ARTGGGAAG GAAGAGCTC ATATCAACAT
 TGTCGTCATT 1620
 35 GGACAGTAG ATTGGGGCAA GTCCACCACT ACTGGCCATC TGATCTATAA
 ATGCGGTGGC 1680
 ATCGACAAA GAACCAITGA AAAATTTGAG AAGGAGGCTG CTGAGGTATG
 TTTAATACCA 1740
 GAAGGGAAA GATCAACTAA AATGAGTTT ACCAGCAGAA TCATTAGGTG
 ATTTCCCGAG 1800

AACTAGTGAG TGGTTAGAT CTGAATGCTA ATACTTAAQA CCTTACTTAT
 GRAATAATTT 1860
 TGCTTTTGGT GACTTCTGTA ATCGTATTGC TAGTGRGTRG ATTTGGATGT
 TAATAGTTAA 1920
 GATCCTACTT ATAAAAGTTT GATTTTGGT TGCTTCTGTA ACCCAAAGTG
 ACCAAAATCA 1980
 5 CTTTGGACTT GGAGTTGTAA AGTGAAACT GCCAATTARG GGCTGGGGAC
 AAGGRAATTG 2040
 AAGCTGGAGT TTGTGTTTTA GTAACCAAGT AACGACTCTT AATCCTTACA
 GATGGGAAG 2100
 GGCTCCTTCA AGTATGCCCTG GGTCTTGGAT AAAGTCAARG CTGAGCCGTGA
 ACGTGGTATC 2160
 ACCATTGATA TCTCCTTGTG GAAATTTGAG ACCAGCAAGT ACTATGTGAC
 TATCATTGAT 2220
 10 GCCCCAGGAC ACAGAGACTT TATCAAAAAC ATGATTACAG GGACATCTCA
 GGTGGGAT 2280
 AATAATTCTA GGTTCCTTTA TCCCAAAAGG CTTGCTTTGT ACACTGGTTT
 TGTCAATTTG 2340
 AGAGTTGACA GGGATATGTC TTTGCTTTCT TTAAGGCTG ACTGTGCTGT
 CCTGATTGTT 2400
 GCTGCTGGTG TTGOTGAATT TGAAGCTGGT ATCTCCAAGA ATGGGCAGAC
 15 CCGAGAGCAT 2460
 GCCCTTCTGG CTTACACACT GGGTGTGAAA CAAGTAATTG TCGGTGTTAA
 CAATATGGAT 2520
 TCCACTGAGC CACCCTACAG CCAGAAGAGA TATGAGGAAA TTGTTAAGGA
 AGTCAGCACT 2580
 TACATTAAGA AATTTGGCTA CAACCCCGAC ACAGTAGCAT TTGTGCCAAT
 TTCTGTTGG 2640
 20 AATGGTGACA ACATGCTGGA GCCAAGTGT AACGTARGTG CTTTCAAGA
 CCATTGTTAA 2700
 AARGCTCTGG GAATGGCGAT TTCATGCTTA CACAATTGG CATGCTTGTG
 TTTCAAGTGC 2760
 CTTGGTTCAA GGGATGGAAA GTCACCCGTA AGGATGGCAA TGCCAGTGA
 ACCCAGCTGC 2820
 TTGAGGCTCT GGAATGCATC CTACCACCAA CTGCTCCARC TGACAGCCCC
 TTGCGCCTGC 2880
 25 CTCTCCAGGA TGCTACAAA ATTGGTGGTA AGTTGGCTGT AAACAAGTT
 GAATTTGACT 2940
 TGATAGAGTA CTGTCTGCCT TCATAGGTAT TTAGTATGCT GTAATATTT
 TTAGGTATTG 3000
 GTACTGTTCC TGTGGCCGA GTGGAGACTG GTGTTCTCAA ACCCGGTATG
 GTGTCACCT 3060
 TTGCTCCAGT CAACGTTACA ACGGAAGTAA AATCTGTGCA AATGCACCAT
 30 GAAGCTTTGA 3120
 GTGAGCTCT TCCTGGGGAC AATGTGGGCT TCAATGTCAA GAATGTGTCT
 GTCRAGGATG 3180
 TTCGTCGTGG CAACGTTGCT GGTGACAGCA AAAATGACCC ACCRATGGRA
 GCAGCTGGCT 3240
 TCACTGCTCA GGTAACAATT TAAAGTAACA TTAAGTTATT GCAGAGGCTA
 AATCATTG 3300
 35 AGACTTTGGA TTTGCACTGA ATGCAAATCT TTTTCCAAG GTGATTATCC
 TGAACCATCC 3360
 AGGCCAAATA AGCGCCGGCT ATGCCCTGT ATTTGGATTGC CACACGGCTC
 ACATTGCATG 3420
 CAAGTTTGTCT GAGCTGAAGG AAAAGATTGA TCGCCGTCTT GGTAAAAGC
 TGGAGATGG 3480

CCCTAATTC TTGAAGTCG GTGATGCTGC CATTGTTGAT ATGGTTCCTG
 GCAAGCCCAT 3540
 GTGTGTTGAG AGCTTCTCAG ACTATCCACC TTTGGGTAAG GATGACTACT
 TAAATGTAAA 3600
 AAAGTTGTGT TAAAGATGAA AAATACAAC TAAACAGTACT TTGGGTAATA
 ATTAACTTTT 3660
 5 TTTTAAATAG GTCGCTTTGC TGTTCGTGAT ATGAGACAGA CAGTTCCCGT
 GGGTGTGATC 3720
 AAACAGTGG ACAGAAGGC TGCTGGAGCT GGCAGGTCA CCAAGTCTGC
 CCAGAAAGCT 3780
 CAGRAGGCTA AATGAATATT ATCCCTAATA CCTGCCACCC CACTCTTAAT
 CAOTGGTGG 3840
 AGAACGGTCT CAGAACTGTT TGTTCAATT GCCCATTTAA GTTTAGTAGT
 AAAAGACTGG 3900
 10 TTAATGATAA CAATGCATCG TAAACCTTC AGAAGGAAA GAGATGTTT
 TGTGGACCAC 3960
 TTTGTTTTTC TTTTTCGCT GTGGCAGTT TAAATTTA GTTTTAAA
 TCAGTACTTT 4020
 TTAATGGAAA CAACTTGACC AAAAATTTGT CACAGAATTT TGAGACCCAT
 TAAAAAGTT 4080
 AAATGAGAAA CCTGTGTGTT CCTTTGGTCA ACACCGAGAC ATTAGTGA
 15 AAGACATCTA 4140
 ATTCTGGTTT TACGAATCTG GAACTTCTT GAAAATGTAA TTCTTCAATT
 AACACTTCTG 4200
 GGTGAGAAAT AGGGTTGTTT TCCCCCACA TAATTGGAAG GGGAGGAAT
 ATCATTAAA 4260
 GCTATGGGAG GGTTCCTTTG ATTACAACAC TGGAGAGAAA TGCAGCATGT
 TGCTGATTGC 4320
 20 CTOTCACTAA AACAGGCCAA AAACAGATC CTGGGGTGC ATAGAAAGCT
 TCATGTTGCT 4380
 AAACCAATGT TAAGTGAATC TTTGAAACA AAATGTTTCC AARTTACTGG
 GATGTGCATG 4440
 TTGAACGCTG GGTAAAAATG ACTGGGCAGT GAAAGTGCAC TATTGCCAT
 GACATAAGAA 4500
 ATAAAGTGTAG TGGCTAGTGT ACACCCATG AGTGAAGGG TCCATTTGA
 AGTCAATGGA 4560
 25 GTAAGCTTTA TGCCATTTG ATGGTTTAC AAGTTCTATT GAGTGTATT
 CAGATAGGA 4620
 ACAAGTTTCT AATAGAAAAA GATGGCAATT TGAAGTAGCT ATAAATTAG
 ACTAATTACA 4680
 TTGCTTTTCT CCGAC

4695

30

35

P a t e n t k r a v

1. Renset og isolert hamster-EF-1 α -
5 transkripsjonsregulatorisk DNA,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t e r v a l g t f r a :
a) et DNA som omfatter nukleinsyresekvensen ifølge
SEK.ID. NR.1,
b) et DNA som omfatter en del av en
10 nukleinsyresekvens ifølge SEK.ID. NR.1 som er i stand til å
fremme transkripsjon av et gen som er operativt bundet til det
regulatoriske DNA,
c) et DNA som omfatter fra omtrent nukleotid 2114 til
omtrent nukleotid 3656 i polynukleotidet ifølge SEK.ID. NR.1,
15 d) en hamster-EF-1 α -regulatorisk DNA-sekvens på 11,7
kb i plasmid pDEF14 (ATCC-aksesjonsnummer 98398),
e) et DNA som omfatter nukleinsyresekvensen ifølge
SEK.ID. NR.28,
f) en hamster-regulatorisk DNA-sekvens som
20 hybridiserer med DNA ifølge SEK.ID. NR.1 ved betingelser som
inkluderer en siste vask ved 65°C i en buffer inneholdende
2XSSC og 0,1 % SDS eller
g) et DNA som omfatter omtrent 1,56 kb 5' i forhold
til ATG-startkodon i SEK.ID. NR.1.
25
2. DNA ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t r e g u l a t o r i s k e D N A
omfatter nukleinsyresekvensen vist i SEK.ID. NR. 1.
- 30 3. DNA ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e t r e g u l a t o r i s k e D N A
omfatter en del av en nukleinsyresekvens ifølge SEK.ID. NR. 1
som er i stand til å fremme transkripsjon av et gen operativt
bundet til det regulatoriske DNA.
35
4. DNA ifølge krav 3,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det regulatoriske DNA
omfatter fra omtrent nukleotid 2 114 til omtrent nukleotid
3 656 i polynukleotidet ifølge SEK.ID. NR. 1.

5 5. Vertscelle som omfatter DNA ifølge ethvert av kravene
1 til 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at dette DNA ikke er
opererbart bundet til EF-1 α -kodende sekvenser.

10 6. Vektor som omfatter DNA ifølge ethvert av kravene 1-
4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at dette DNA ikke er
opererbart bundet til EF-1 α -kodende sekvenser.

15 7. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert eller
transfektet med vektoren ifølge krav 6.

8. Kimært polynukleotid,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter hamster-EF-
1 α -regulatorisk DNA ifølge krav 1 opererbart bundet til en
proteinkodende DNA-sekvens, der nevnte proteinkodende DNA-
sekvens koder for et annet protein enn hamster-EF-1 α .

25 9. Kimært polynukleotid ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det regulatoriske DNA
omfatter nukleinsyresekvensen ifølge SEK.ID. NR. 1.

10. Kimært polynukleotid ifølge krav 8,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det regulatoriske DNA
omfatter en del av en nukleinsyresekvens ifølge SEK.ID. NR. 1,
hvori denne delen er i stand til å fremme transkripsjon av et
gen opererbart bundet til det regulatoriske DNA.

35 11. Kimært polynukleotid ifølge krav 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det regulatoriske DNA
omfatter fra omtrent nukleotid 2 114 til omtrent nukleotid
3 656 i polynukleotidet ifølge SEK.ID. NR. 1.

12. Kimært polynukleotid ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den proteinkodende DNA-
sekvensen koder for et protein, foruten EF-1 α , som er endogent
5 for hamsterceller.

13. Kimært polynukleotid ifølge krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA-sekvensen koder for
et protein som er heterologt for hamsterceller.

10

14. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert eller
transfektet med kimært polynukleotid ifølge ethvert av
kravene 8-13.

15

15. Ekspresjonsplasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter det kimære
polynukleotidet ifølge ethvert av kravene 8-13.

20 16. Ekspresjonsplasmid ifølge krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter
nukleinsyresekvensen ifølge SEK.ID. NR. 28.

25 17. Ekspresjonsplasmid ifølge krav 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyresekvensen
ifølge SEK.ID. NR. 28 er beliggende 3' med hensyn til det
kimære polynukleotidet.

30 18. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert eller
transfektet med ekspresjonsplasmidet ifølge krav 15.

35 19. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert eller
transfektet med ekspresjonsplasmidet ifølge enten krav 16
eller 17.

20. Plasmid,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF2 (ATCC-
aksesjonsnummer 98343).

21. Plasmid,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF14 (ATCC-
aksesjonsnummer 98398).

22. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF1./ICM3H.2
10 (ATCC-aksesjonsnummer 98381).

23. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pNEF1/ICM3L.3
(ATCC-aksesjonsnummer 98382).

15
24. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF1/P2GH.1
(ATCC-aksesjonsnummer 98383).

20
25. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pNEF1/F2GL.1
(ATCC-aksesjonsnummer 98384).

26. Plasmid,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF1/CTN.1 (ATCC-
aksesjonsnummer 98385).

27. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF2/HPH.4 (ATCC-
30 aksjonsnummer 98386).

28. Plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er pDEF10/MDC.1
(ATCC-aksesjonsnummer 98387).

35
29. Vertscelle,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert eller transfektert med ekspresjonsplasmidet ifølge ethvert av kravene 20-28.

5 30. Fremgangsmåte for økning av transkripsjon av et gen av interesse i en vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter integrasjon av et DNA som omfatter hamster-EF-1 α -regulatorisk DNA i genomisk DNA i vertscellen i en posisjon opererbart bundet til
10 genet av interesse.

31. Fremgangsmåte ifølge krav 30,
k a r a k t e r i s e r t v e d at DNA som skal integreres ytterligere omfatter en målrettingssekvens.

15 32. Fremgangsmåte ifølge krav 30,
k a r a k t e r i s e r t v e d at vertscellen er en kinesisk hamster-ovariecelle.

20 33. Fremgangsmåte ifølge krav 32,
k a r a k t e r i s e r t v e d at genet av interesse er endogent for den kinesisk hamster-ovarievertscelle.

25 34. Fremgangsmåte ifølge krav 30,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det ønskede genet er heterologt for kinesisk hamster-ovarieceller og er stabilt integrert i genomisk DNA i kinesisk hamster-ovariecellene.

30

35