



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **317659**

(13) **B1**

(51) Int Cl<sup>7</sup>

C 07 K 14/415 , C 12 N 15/29, 15/70, 5/10

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19940736	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1992.08.21 PCT/US92/07066
(22)	Inng.dag	1994.03.03	(85)	Videreføringsdag	1994.03.03
(24)	Løpedag	1992.08.21	(30)	Prioritet	1991.09.06, US, 755949
(41)	Alm.tilgj	1994.03.03			
(45)	Meddelt:	2004.11.29			
(71)	Søker	Research Development Foundation , 402 North Division Street, Carson City, NV 89703, US			
(72)	Oppfinner	Michael Rosenblum, 8810 North Rylander Circle, Houston, TX 77071, US Kenneth L. Beattie, 2 Hollymeade Drive, The Woodlands, TX 77381, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Syntetisk DNA som koder for gelonin-polypeptid, fremgangsmåte for fremstilling av dette, samt en vertselle som inneholder en ekspresjonsvektor omfattende nevnte syntetiske DNA</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	Stripe F. Et al., 1980 Chaudhary V.K et al., 1989 Wosnick M.A. et al., 1987 Hostomsky Z. Et al., 1987 US- 4888415 Aota S. Et al., 1988 NO 19930428			
(57)	Sammendrag				

Nukleotidsekvensen for et syntetisk gen for plantetoksingelonin og en fremgangsmåte for fremstilling, kloning og uttrykking av dette syntetiske genet er beskrevet. DNA sekvensen for et syntetisk gen for gelonin er som vist i sekvens ID No. 1. Ekspresjonsvektorer inneholdende DNA sekvensene for gelonin og celler transformert med disse vektorene samt et immunotoksin som omfatter et antistoff konjugert til proteinet gelonin er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører generelt immunotoksine gelonin og spesifikt den molekylære biologien til gelonin, inkludert en fremgangsmåte for fremstilling av et syntetisk gen for gelonin.

- 5 Interessen for cytotoxiske forbindelser innbefatter den potensielle anvendelsen overfor spesifikke måltumorceller. Plantetoksingelonin er av den grunn av interesse. Gelonin er et glykoprotein (molekylvekt på omtrent 20-30.000 Kd) rensset fra frøene til *Gelonium multiflorum*. Gelonin hører til en klasse potente ribosomal-inaktiverende plantetoksiner. Andre medlemmer av denne klassen av ribosomal-inaktiverende plantetoksiner er kje-
- 10 den av abrin, ricin og modesin. Gelonin, som abrin og ricin, inhiberer proteinsyntesen ved å skade 60S subenheten til pattedyrribosomer. Til tross for at A-kjeden av ricin (RTA) har vært populær for anvendelse i immunotoksiner, ser gelonin ut til å være mer stabil overfor kjemisk og fysisk behandling enn RTA (Barbieri et al, *Cancer, Surv.* 1: 489-520 (1982)). Selve geloninet blir ikke bundet til cellene og er derfor ikke-toksisk
- 15 (unntatt i høye konsentrasjoner) og kan trygt manipuleres i laboratoriet. Inaktivering av ribosomer er irreversibel og ser ikke ut til å involvere kofaktorer og oppstår med en effektivitet som tyder på at gelonin virker enzymatisk.

- Gelonin og ricin er blant de mest aktive toksinene som inhiberer proteinsyntesen i
- 20 forhold til en proteinvektbasis. Gelonin er 10 til 1000 ganger mer aktiv når det gjelder å inhibere proteinsyntesen enn ricin A-kjeden. Peptider som ricin og abrin består av to kjeder, en A-kjede som er den toksiske enheten og en B kjede som fungerer ved binding til cellene. Ulikt ricin og abrin består gelonin av en enkeltkjede og pga at den mangler en B kjede for binding til cellene er den selv relativt ikke-toksisk for intakte celler
- 25 (Stirpe et al *J. Biol. Chem.* 225: 6947-6953 (1980)). Pattedyrceller ser ut til å mangle evnen til å binde og/eller internalisere det native geloninmolekylet. Konjugater av gelonin med et tumormålsøkende monoklonalt antistoff, så som det monoklonale antistoffet SME rettet mot et antigen tilstede på visse tumorceller så som melanomceller, gir både en spesifikk metode for binding av gelonin til cellen og en vei
- 30 for internalisering av geloninantistoffkomplekset. En av fordelene ved anvendelse av toksingelonin i forhold til anvendelse av toksiner så som ricin A-kjeden er denne reduserte toksisiteten overfor normale vev sammenlignet med ricin A-kjeden. Gelonin-koblet med et monoklonalt antistoff rettet mot et anti-tumorassosiert antigen er et aktivt og selektivt immunotoksisk middel for tumorterapi.

35

Flere forskere har anvendt gelonin som et cytotoxiske middel kjemisk koblet til monoklonale antistoffer eller til peptidhormon cellulærmålsøkende ligander. Kjemisk modifi-

kasjon av gelonin og cellulært målsøkende deler kan redusere den målsøkende effektiviteten og det cytotoxiske potensiale til selve gelonin. Naturlige geloninkilder er videre utsatt for variabilitet ved høsting og planteveksten som kan påvirke gelonincytotoksisk aktivitet. Evnen til å produsere et syntetisk gelonintoksin, kjemisk eller anvendelse av rekombinant teknologi gir en tilstrekkelig, reproducerbar toksinkilde. Det er derfor meget ønskelig å fremstille et syntetisk gen for gelonin og fremgangsmåter for fremstilling av det syntetiske genet ved anvendelse av rekombinant teknologi.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nukleotidsekvensen for et syntetisk gen for gelonin og fremgangsmåter for fremstilling derav. DNA-sekvensen for et syntetisk gen for gelonin er vist i SQE ID NO:1. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også ekspressjonsvektorer som inneholder disse DNA-sekvensene og celler som er transformert med disse vektorene.

Ifølge en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for fremstilling, kloning og uttrykking av et syntetisk gen kodende for gelonin. Et dobbeltrådet DNA-fragment som koder for den primære aminosyresekvensen bestemt ut fra rensset geloninprotein er blitt konstruert. Dette DNA-fragmentet ble manipulert for å lette syntesen, kloningen, ekspresjonen eller den biokjemiske manipulasjonen av genet. Deretter ble et sett av syntetiske oligonukleotider som kan bli koblet sammen for å oppstille det ønskede genet konstruert, syntetisert, rensset og 5'-fosforylert. Deretter ble disse oligonukleotidene sammensmeltet og ligert sammen for å oppstille det intakte genet. Det syntetiske genet ble ligert sammen med en egnet kloningsvektor og deretter ble nukleotidsekvensen til det klonede genet bestemt. Etter at seterettet mutagenese var utført for å korrigere eventuelle uønskede mutasjoner i det klonete genet blir genet subklonet inn i en egnet ekspresjonsvektor. Ekspresjonsvektoren som bærer det syntetiske geloningenet ble skutt inn i en egnet ekspresjonsvert. Deretter blir ekspresjonsverten opprettholdt under betingelser som er egnede for produksjon av geloningenproduktet og geloninproteinet blir isolert og rensset fra celler som uttrykker genet.

Ifølge en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt et syntetisk DNA inneholdende sekvensen av nukleotider og fragmenter og derivater derav, kodende for proteinet gelonin eller for et polypeptid som inhiberer den cellulære proteinsyntesen, men som ikke binder en celleoverflatereseptor, med nukleotidsekvensen som har formelen ifølge sekvens ID NO 1. Også gitt er en ekspresjonsvektor inneholdende syntetisk gelonin DAN og vertsceller inneholdende og som uttrykker det syntetiske geloningenet.

I foreliggende oppfinnelse blir betegnelsen "fragment" definert som en hvilken som helst del av SEQ ID NO 1 som vil produsere et protein som inhiberer den cellulære proteinsyntesen, men som ikke blir bundet til en overflatereseptor. "Derivat" er definert å ha substitusjonen til én eller flere individuelle nukleinsyrer slik at det samme proteinet eller polypeptidet blir produsert.

Foreliggende oppfinnelse omfatter et syntetisk gen kjennetegnet ved at det inneholder en sekvens av nukleotider omfattende SEQ ID Nr. 1 hvor nevnte gen koder for et geloninprotein eller et polypeptidfragment av gelonin hvor nevnte protein eller polypeptidfragment inhiberer den cellulære proteinsyntesen, men som ikke blir bundet til en celleoverflate reseptor og en fremgangsmåte som omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av det syntetiske genet som nevnt over, idet den omfatter å:

- 15 a. syntetisere, rense og 5'-fosforylering av et sett av syntetiske oligonukleotider som når de er koblet sammen utgjør det syntetiske genet, og
- b. sammensmelte og ligere oligonukleotidene for å sammenstille det syntetiske genet.

20

Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte som omfatter følgende trinn:

- a) selektere sekvensen av nukleotidene som tidligere nevnt, hvor nevnte sekvens inneholder en tre-base-kodon-triplet for hver aminosyre i geloninprotein eller polypeptidfragmentet, hvor nevnte triplet blir valgt fra gruppen bestående av tripletter kodende for hver aminosyre for å maksimalisere ekspresjonen, manipulasjon eller stabiliteten til det syntetiske genet i en ekspresjonsvektor og

30

- b) syntetisere nevnte syntetiske gen hvor nevnte syntese omfatter følgende trinn:

å dele nevnte syntetiske gen i overlappende sett av enkeltrådede fragmenter av oligonukleotider, hvor nevnte fragmenter blir kjemisk syntetisert;  
rensing av nevnte oligonukleotider;  
fosforylering av nevnte oligonukleotider i den 5' enden; og  
35 sammensmelte trådene av oligonukleotider hvor dupleks-DNA blir dannet, for derved å danne det syntetiske genet som koder for gelonin

- c) ligere det syntetiske genet sammen med en egnet kloningsvektor for å danne et klonet gen;
- d) å bestemme nukleotidsekvensen til det klonede genet for å verifisere sekvensen til genet;
- e) utføres setedirigert mutagenese for å korrigere for uønskede mutasjoner i det klonede genet;
- f) subklone det klonede genet inn i en ekspresjonsvektor;
- g) introdusere ekspresjonsvektoren som bærer det syntetiske genet som koder for gelonin i en ekspresjonsvertscelle; og
- h) dyrke ekspresjonsverten som bærer ekspresjonsvektoren i trinn g) under betingelser som er egnet for produksjon av geloninproduktet.

Videre omfatter oppfinnelsen en ekspresjonsvektor kjennetegnet ved at den er produsert ved metoden som nevnt over og en vertscelle kjennetegnet ved at den inneholder nevnte ekspresjonsvektor.

Foreliggende oppfinnelse hører inn under det tidligere nevnte behovet og oppfyller disse behovene. Fagfolk innenfor dette området vil lett kunne oppdage ytterligere hensikter og fordeler. I sammenheng med de vedlagte tegningene er den følgende beskrivelsen av foretrukne utførelsesformer gitt som beskrivelse.

For at ovennevnte beskrivelse skal fremstå klarere, skal det refereres til de vedlagte tegningene. Disse tegningene utgjør en del av denne beskrivelsen. De vedlagte tegningene illustrerer foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen og skal ikke begrense rammen derav. Oppfinnelsen kan vedrøre andre like effektive ekvivalente utførelsesformer.

FIG 1 angir en skjematisk illustrasjon av en fremgangsmåte for kjemisk fremstilling av oligonukleotider.

35

FIG 2 viser en illustrasjon av fast fasegen-oppstillingsprosessen.

FIG 3 illustrerer et skjematisk diagram av gelonin-sammenstillingsprosessen.

FIG 4 viser den skjematiske illustrasjonen av arrangementet av oligonukleotider i geloningoppstillingen.

5

FIG 5 angir oligonukleotidsekvensene anvendt for å oppstille geloningenet.

Den senere utviklingen innen molekylær biologi har muliggjort kloning, ekspresjon og genetisk modifisering av mangfoldige gener som koder for proteiner som er av biomedisinsk og landbruksmessig viktighet. En betydelig fordel innen dette området er evnen til å konstruere og produsere syntetiske gener. De syntetiske genene kan kode for proteiner med kjent aminosyresekvens samt nye proteiner som ikke eksisterer i naturen. Dette er spesielt nyttig når det gjelder proteiner som er av terapeutisk verdi, så som gelonin. Det er mulig å konstruere, syntetisere, klonere og uttrykke et gen basert på aminosyresekvensen til et protein. Konstruksjonen, sekvensen, kloningen og ekspresjonen er også mulig selv om spesifikk informasjon om det naturlige genet ikke er tilgjengelig, for eksempel dersom genet ikke er blitt klonet. Gensyntese letter konstruksjon av variantgenproduktene, som har egenskaper som ikke finnes i naturlig forekommende protein. Et gen kodende for et protein som normalt bare finnes i planter eller dyr kan for eksempel bli konstruert, syntetisert og klonet inn i en vektor som kan gi store mengder av proteinet i mikrobielle vertsceller.

En fordel med syntetiske gener er relatert til degenereringen av den genetiske koden. De fleste aminosyrene kan kodes av mer enn et tre-base "kodon" innenfor et gen. Forskjellige organismer anvender forskjellige sett av kodoner for deres proteiner (S. Aota et al, Nucleic Acid Res v. 16, Supplement sidene r325-r391 (1987)). Kodonene som er "foretrukne" av en organisme er forskjellig fra de som er foretrukket av en annen organisme. Dette fenomenet antas å være relatert til forskjeller i relativ hyppighet av det spesifikke iso-aksepterende transfer RNA molekylet for en gitt aminosyre. Syntetiske gener kan konstrueres for å inkorporere foretrukne kodoner for et gitt ekspresjonssystem selv om genproduktet er fra en "heterolog" vertsorganisme som anvender et annet sett av foretrukne kodoner for noen aminosyrer. Det er blitt vist at syntetiske gener som koder for pattedyrproteiner kan tilveiebringe signifikant mer proteinprodukt i en mikrobiell vert dersom de valgte kodonene i genet som blir konstruert tilsvarer de som oftest blir anvendt av mikrobielle verter. Dette fenomenet ble tatt i betraktning i konstruksjonen av geloningenet (opprinnelig fra planter), ment for innføring i *Escherichia coli* ekspresjons-

verten. For ekspresjon i et annet vertsystem kan geloningenet lett endres av fagfolk innen dette området for å inkorporere kodoner som er optimale for den andre verten.

5 En annen fordel med syntetiske gener som muliggjøres ved degenereringen av den genetiske koden er i dette tilfellet at DNA-sekvensen som koder for gen av interesse kan modifiseres (uten å forandre den kodete aminosyresekvensen) for å inneholde et maksimalt antall unikt oppstående restriksjonsenzymgjenkjenningsseter i genet. Tilstedeværelse av mange enkeltspaltende restriksjonsseter langs et gen letter den biokjemiske manipuleringen av genet. Evnen til å spalte ut et segment av et gen og erstatte det med en 10 annen sekvens (muliggjort ved nære unike restriksjonsseter) muliggjør innføring av ny genetisk informasjon inn i genet ved hjelp av rekombinante DNA teknikker. Nyttige manipulasjoner som er mulig ved hjelp av denne metoden, omfatter innføring av mutasjoner inn i definerte regioner av et gen, korreksjon av mutasjoner som oppstår i løpet av gensyntese, oppstilling og kloning, og dannelse av chimere eller fusjonsgener som 15 koder for proteiner som kombinerer funksjonelle domener til separate proteiner. Konstruksjon av et syntetisk gen kan også innbefatte ikke-kodende "flankerende" DNA-sekvenser som kan lette kloningen og ekspresjonen av genet. For eksempel kan restriksjons endonuklease gjenkjenningssekvenser bli inkorporert inn i flankerende regioner av genet for å muliggjøre spesifikk legering av genet inn i den ønskede 20 kloningsvektoren. I tillegg kan genetiske signaler bli inkorporert inn i et syntetisk gen som kontrollerer genekspressjonen *in vivo*.

De novo-genkonstruksjonen kan i tillegg muliggjøre *in vivo* målsøking av et genprodukt til et visst vev eller en organelle som kan forsterke den terapeutiske virkningen til genproduktet. Det er for eksempel mulig å målsøke et terapeutisk middel til en bestemt 25 celletype ved å inkorporere inn i det relevante genet en sekvens som koder en polypeptidomene som spesifikt blir bundet til en reseptor på overflaten til målcellene.

Syntetisk genkonstruksjon kan videre innbefatte hensyn som er relatert til den kjemiske 30 syntesen av korte DNA tråder og oppstilling av oligonukleotider tilgjengelige dupleks DNA segmenter. Det er fordelaktig innen kjemisk syntese av DNA å unngå dårlig koblingseffektivitet som er assosiert med påfølgende tilsetning av mange G eller C residier til en kjede. Det er videre ønskelig å unngå DNA-sekvenser som inneholder intrasekundær trådstruktur (hårspennestruktur) eller intermolekylær komplementaritet som kan 35 interferere med korrekt oppstilling av et gen i løpet av sammensmeltning av komponentoligonukleotider. Dette kan vanligvis oppnås ved valg av alternative kodoner ved genkonstruksjonen.

Prosess med genoppstilling omfatter følgende trinn. Først blir nukleotidsekvensen som tilsvarer de to trådene til den ønskede kodende regionen skrevet ut med perfekt komplementær baseparring mellom de to trådene. Deretter blir ønskede flankerende sekvenser tilsatt. For eksempel kan flankerende sekvenser bli tilsatt for å inkorporere restriksjons endonuklease gjenkjenningsseter ved siden av den kodende sekvensen. Genet blir deretter delt inn i overlappende sett av enkelttrådede fragmenter. Enkelttrådede fragmenter blir kjemisk syntetisert av automatiserte DNA synteseinstrumenter. Grad av komplementær overlapping mellom suksessive oligonukleotider langs det syntetiske genet er valgfritt, men er vanligvis 6-20 baser. Etter at alle nukleotider som er nødvendige for det syntetiske genet er blitt kjemisk syntetisert blir de fortrinnsvis rensed ved polyakrylamingelektroforese eller høy-ytelse-væskekromatografi. De rensede oligonukleotidene blir deretter 5'-fosforylert ved innvirkning av polynukleotidkinase og adenosin 5'-trifosfat. Trådene blir deretter smeltet sammen, enten i en enkelt blanding, i blokker på 3-10 overlappende oligonukleotider eller ved trinnvis tilsetning av oligonukleotidene på en fast fasebærer. Endene til det oppstilte genet blir utstyrt med restriksjonsseter som blir anvendt for kloning av genet. Det oppstilte genet blir vanligvis innledningsvis klonet inn i enkelttrådet vektor M13 for hensiktsmessig DNA-sekvensering. Om nødvendig blir mutasjonene korrigert ved oligonukleotid-rettet mutagenese.

20

Ønskede trekk ved det syntetiske genet (optimal kodon anvendelse), tilstedeværelse av unike restriksjonsseter, eliminering av sekundær struktur osv. (kan klonstrueres ved hjelp av de mange kommersielt tilgjengelige DNA-sekvenseringsanalyse-programmene for mikrocomputere).

25

To former for utvikling som begge anvendes i foreliggende oppfinnelse muliggjør at genene blir syntetisert hurtigere og økonomisk og danner nye muligheter for protein-konstruering (K.L. Beattie et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 19, 510-521 (1988); K.L. Beattie og R.F. Fowler, *Nature*, 352, 548-549 (1991)). Den første utviklingen, illustrert i fig. 1, er en teknologi for hurtig, økonomisk syntese av store antall oligonukleotider. Denne teknologien muliggjør fremstilling av syntetisk DNA som er nødvendig for oppstilling av et gen på en enkelt dag. Med referanse til fig. 1 blir nukleosid-derivatiserte kontrollporeglass plassert innenfor individuelle syntesevafler bestående av teflonsylindere med porøse ender for å muliggjøre væskestrømning gjennom en stabel av lag. Samtidig tilsetning av A, G, C eller T til DNA-kjedene koblet til CPG og beholdt innenfor lagene blir oppnådd ved sekvensiell strømning av reagensene gjennom kolonnene ved hjelp av fosforamidit metoden (L.J. McBride og M.H. Caruthers, *tetrahedron Lett.*,

35



24, 245-248 (1983)). Etter at hver kjemiske reaksjonssyklus er fullført blir lagene ("wafers") sortert inn i forskjellige kolonner for å muliggjøre syntese av en annen nukleotidsekvens innenfor hvert lag. Den sekvensielle posisjonen av et lag (mørkt) gjennom fire sykluser er angitt og vil resultere i tilsetning av AGCT til den voksende DNA-kjeden innbefattet deri.

En annen teknologisk utvikling som letter gensyntesen angir en måte for trinnsvis kobling av syntetiske oligonukleotider på en fast fase bærer for å danne et gen. Med referanse til fig. 2 er det å bemerke at det ønskede genet er konstruert og blir oppstilt ut fra et sett av overlappende komplementære oligonukleotider. Oppstillingen blir initiert med et oligonukleotid bundet i en ende til en fast fase bærer. 5'-fosforlyerte oligonukleotider blir tilsatt sekvensielt (ved molart overskudd) til den bærer-bundede tråden. Ved hvert trinn av genoppstillingen blir ubundet DNA vasket bort før den neste sammensmeltningsreaksjonen blir utført. Den fullførte sammenstillingen blir behandlet med DNA ligase for å forsegle mellomrom ("nicks") og deretter blir genet frigjort fra bæreren ved spaltning ved et unikt restriksjonssete innbefattet i det bærer-bundede oligonukleotidet. Frigjort DNA blir ligert inn i en egnet vektor for sekvensering og ekspresjon.

Det eksisterer mange valg for vektorvertmiljøer for ekspresjonen av det syntetiske genet som resulterer i produksjon av det kodede proteinet. Disse er i detalj diskutert i *Methods in Enzymology*, Vol. 152, 1987, Academic Press. Spesialiserte ekspresjonsvektorer er tilgjengelige for innskudd i bakterier, sopp, dyr eller planteverter. Bakterien *Escherichia coli* blir vanligvis anvendt for ekspresjon av "fremmede" gener. Gjæren *saccharomyces cerevisiae* er en annen populær ekspresjonsvert. Som tidligere nevnt, dersom det klonede genet av interesse syntetiseres kjemisk er optimal kodonbruk for den ønskede ekspresjonsverten gitt i genet konstruert for å øke ekspresjonsnivået. De fleste ekspresjonsvektorene inneholdende genetiske kontrollelementer som ligger ved siden av kloningssetet som gir høye nivåer av genekspresjon. Induserbare promotere til ekspresjonsvektorer er vanligvis avledet fra bakterier (for eksempel *tac*, *trp*) eller virus (for eksempel *lambda*, SC40). "Signalsekvens"-elementer blir noen ganger innbefattet i vektoren for å lette transporten av genproduktet ut av vertscellen. Signalsekvensene kan lette rensningen og redusere den proteolytiske degraderingen. Når det gjelder syntetiske gener kan et hvilket som helst ønskelig genetisk kontrollelement innbefattes innenfor duplex DNA som blir oppstilt. Noen ekspresjonsvektorer inneholder en kodende sekvens som er et ved siden av kloningssetet slik at i-ramme innskudd av den fremmede kodende sekvensen resulterer i produksjon av et fusjonsprotein. Den ytterligere kodende sekvensen kan bli gitt innenfor den oppstilte sekvensen når det gjelder syntetiske gener.

Produksjonen av et gen som et fusjonsprotein kan gi flere fordeler, inkludert øket ekspresjon, bedre stabilitet, hurtigere affinitetsrensning ved anvendelse av en bærerbundet ligand som blir bundet til den ytterligere polypeptidkomponenten og celleulær målsøking av genproduktet (for eksempel til en celletype som har en celleoverflatereseptor for ytterligere polypeptidkomponent). Genkonstruering som inkorporerer dette sistnevnte trekket kan anvendes i den ytterligere utviklingen av gelonin-baserte terapeutiske midler.

Ved kloning og ekspresjon av DNA-sekvenser kodende for plantetoksin gelonin er mange forskjellige vektorer nyttige. Disse innbefatter for eksempel vektorer bestående av segmenter av kromosomale, ikke-kromosomale og syntetiske DNA-sekvenser, så som forskjellige kjente derivater av SV40, kjente bakterielle plasmider, for eksempel plasmider fra *E. coli* inkludert col E1, pCR1, pBR322, pMB9 og derivater derav, ytterligere vertsplasmider (for eksempel RP4, fag DNA for eksempel de mange derivatene av fag lambda (for eksempel) NM 989 og andre DNA fag (for eksempel) M13 og filamentøse enkelttrådede DNA-fag, gjærplasmider så som 2 mu plasmid eller derivater derav og vektorer avledet fra kombinasjoner av plasmidene og fag DNA, så som plasmider som er blitt modifisert for å anvende fag DNA eller andre ekspresjonskontrollsekvenser.

Innenfor hver spesifikk klonings- eller ekspresjonsbeholder kan forskjellige seter velges for innskudd av DNA-sekvensene ifølge oppfinnelsen. Disse setene blir vanligvis konstruert av restriksjons-endonukleasen som spalter dem og er kjent for fagfolk innenfor dette området. Forskjellige fremgangsmåter for innskudd av DNA-sekvensene inn i disse setene for å danne rekombinante DNA-molekyler er også velkjent. Disse innbefatter for eksempel dG-dC eller dA-dT tailing, direkte ligering, syntetiske linkere, eksoknuklease og polymerase-koblede repareringsreaksjoner etterfulgt av ligering eller ekstensjon av DNA-tråden med DNA polymerase og et hensiktsmessig enkelttrådet templat etterfulgt av ligering. Det er underforstått at en klonings- eller ekspresjonsbeholder som er nyttig ifølge denne oppfinnelsen, ikke behøver å ha et restriksjonsendonukleasesete for innskudd av det valgte DNA-fragmentet. Beholderen kan derimot bli koblet til fragment ved hjelp av alternative metoder.

For ekspresjon av DNA-sekvensene ifølge oppfinnelsen blir disse DNA-sekvensene operabelt koblet til én eller flere ekspresjonskontrollsekvenser i ekspresjonsvektoren. En slik operativ kobling som kan bli oppnådd før eller etter den valgte DNA-sekvensen

blir skutt inn i en kloningsbeholder, muliggjør ekspresjonskontrollsekvenser og kontrollerer og fremmer ekspresjonen av den innskutte DNA-sekvensen.

Hvilke som helst av de mange ekspresjonskontrollsekvensene som kontrollerer ekspresjonen av en DNA-sekvens kan anvendes i disse vektorene for å uttrykke DNA-sekvensen ifølge foreliggende oppfinnelse. Slike nyttige ekspresjonskontrollsekvenser omfatter for eksempel tidlig- og sen-promotere fra SC40 lakksystemet, trp systemet, TAC eller TRC systemet, hovedoperator og promoterregioner til fase lambda, kontrollregionene til fd-kappeprotein, promoter for 3-fosfoglycerat kinase eller andre glycolytiske enzymer, promoter til sur fosfatase, for eksempel Pho5, promoter til gjær alfa-parrende faktorer og andre sekvenser som er kjent for å kontrollere ekspresjonen av gener til prokaryote eller eukaryote celler eller virus derav og forskjellige kombinasjoner derav. I pattedyr-cellene er det i tillegg mulig å amplifisere ekspresjonsenhetene ved å koble genet til det som koder for dehydrofolatreduktase og påfører en seleksjon overfor vert kinesisk hamster ovarie celler.

Vektoren eller ekspresjonsbeholderen og spesielt setene valgt deri for innskudd av selektert DNA-fragment og ekspresjonskontrollsekvensen anvendt i denne oppfinnelsen, blir bestemt av forskjellige faktorer. Disse faktorene innbefatter for eksempel antall seter mottagelige for et bestemt restriksjonsenzym, størrelsen på proteinet som skal bli uttrykt, ekspresjonskaraktertrekkene så som beliggenheten til start og stopp kodoner relativt til vektorsekvensene. Andre faktorer vil bli bestemt av fagfolk innenfor dette området. Valg av en vektor, ekspresjonskontrollsekvens og et innskuddssete for en bestemt fosfolipaseinhibitor-proteinsekvens blir bestemt i en vurdering av disse faktorene idet ikke alle valgene er like effektive for et gitt tilfelle.

Det rekombinante DNA-molekylet som inneholder det ønskede genet operabelt koblet til en ekspresjonskontrollsekvens kan deretter anvendes for å transformere forskjellige hensiktsmessige verter for å muliggjøre at disse vertene (transformantene) uttrykker genet, eller fragmentet derav, og produsere polypeptidet eller deler derav, som hybrid DNA koder for.

Forskjellige verter er også nyttige for produksjon av antigener og DNA-sekvenser ifølge denne oppfinnelsen. Disse vertene innbefatter for eksempel bakterier, så som E. coli, Bacillus og Streptomyces, sopp, så som gjær, og dyr, så SCH celler og planteceller i vevskultur. Valg av en hensiktsmessig vert blir kontrollert av et antall faktorer som blir anerkjent innenfor dette området. Disse innbefatter for eksempel kompatibiliteten med

valgt vektor, toksisiteten til koprodukter, lettheten hvorved isoleringen av ønsket polypeptid skjer, ekspresjonskaraktertrekkene, biologisk trygghet og kostnader. Ikke noe absolutt valg av vert kan utføres for et bestemt rekombinant DNA-molekyl eller polypeptid for noen av disse faktorene alene. Derimot kan en vurdering av disse faktorene utføres med den kjensgjerningen at ikke alle vertene kan være like effektive for ekspresjon av et bestemt rekombinant DNA-molekyl.

Som tidligere demonstrert er det å bemerke at DNA-sekvensene som blir skutt inn ved det valgte setet til en klonings- eller ekspresjonsbeholder kan innbefatte nukleotider som ikke er del av det bestemte genet som koder for det ønskede polypeptidet eller kan innbefatte bare et fragment av det ønskede genet for proteinet. Det er bare nødvendig at DNA-sekvensen som anvendes, den transformerte verten produserer et protein gelonin eller et polypeptid som har vesentlig den samme funksjonelle aktiviteten som gelonin. DNA-sekvensene ifølge denne oppfinnelsen kan for eksempel kobles i samme lese-ramme i en ekspresjonsvektor til en del av en DNA-sekvens kodende for minst et eukaryotisk eller prokaryotisk bærerprotein eller en DNA-sekvens kodende for minst én eukaryot eller prokaryot signalsekvens, eller kombinasjoner derav. Slike konstruksjoner kan behjelpe ekspresjonen av den ønskede DNA-sekvensen, forbedre rensingen eller muliggjøre sekresjonen, og fortrinnsvis modningen, av det ønskede polypeptidet fra vertscellen. DNA-sekvensen kan alternativt innbefatte et ATG startkodon, alene eller sammen med andre kodoner, koblet direkte til sekvensen kodende for den første aminosyren til et ønsket polypeptid. Slike konstruksjoner muliggjør produksjon av for eksempel et methionyl eller annet peptidylpolypeptid som er del av denne oppfinnelsen. Dette N-terminale methioninet eller peptidet kan deretter spaltes intra- eller ekstracellulært ved hjelp av forskjellige kjente fremgangsmåter eller polypeptider anvendt sammen med methioninet eller annen fusjon koblet til dette i sammensetninger og fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen.

### Eksempler

30 Syntese og oppstilling av geloningenet

#### Eksempel 1

#### Binding av 5'-biotinylert oligonukleotid til streptavidin-belagte mikrosfærer:

En 0,2 ml prøve av DYNABEADS M280 Streptavidin (Dynal Corp.) ble plassert i et 35 1,5 ml Eppendorf rør. Røret ble holdt mot en magnetisk plate (Advanced Magnetics, Inc.) i noen minutter for å forårsake at de paramagnetiske lateksmikrosfærene blir trukket til siden av røret og deretter ble fluidet fjernet. Kulene ble vasket to ganger med 0,1

ml sammensmeltningsbuffer (sammensetning gitt nedenfor) ved romtemperatur og deretter resuspendert i 0,2 ml sammensmeltningsbuffer.

5 Til kulesuspensjonen ble det tilsatt 1 nmol 5'-biotinylert oligonukleotid. Etter 30 min. ved romtemperatur ble kulene vasket to ganger med 0,2 ml sammensmeltningsbuffer og resuspendert i 0,2 ml sammensmeltningsbuffer. Spektrofotometrisk analyse av ubundet oligonukleotid i vaskingene indikerte at omtrent 300 pmol oligonukleotid var bundet til kulene.

#### 10 Eksempel 2

Sammensmelting/vaske syklus, gjentatt for tilførsel av hvert suksessive oligonukleotid:

Før anvendelsen i genoppstillingen ble oligonukleotidene rensset ved polyakrylamid gelelektroforese og enzymatisk 5'-fosforylert ved anvendelse av T4 polynukleotid kinase.

15 Til 150 pmol bærerbundet oligonukleotid ble det tilsatt 750 pmol overlappende komplementært oligonukleotid og sammensmeltingen ble utført i 0,10 ml 50 mM natriumfosfatbuffer, pH 7,5, 1M NaCl (sammensmeltningsbuffer) i 5 min. ved 45°C og deretter ble blandingen avkjølt til romtemperatur over en 7 min. periode. Kulene ble deretter vasket to ganger med 0,2 ml av samme buffer ved romtemperatur. Denne syklusen ble gjentatt

20 helt til det siste oligonukleotidet i oppstillingen var tilsatt.

#### Eksempel 3

Ligering av produktet og frigjøring fra bæreren ved restriksjonsenzymspaltning:

25 Etter endt sammenstilling ble kulene vasket og resuspendert i 0,04 ml ligase buffer. Etter tilsetning av 0,005 ml DNA ligase (New England Biolabs, høy spesifikk aktivitetsgrad) ble blandingen inkubert ved romtemperatur i 2 timer og deretter vasket og resuspendert i 0,04 ml restriksjonsspaltningbuffer. Etter tilsetning av 10 enheter restriksjonsendonuklease EcoRI ble blandingen inkubert ved 37°C i 90 minutter. Væsken ble

30 fjernet og frigjort DNA ble etanolpresipitert og resuspendert i 0,01 ml ligasebuffer.

#### Eksempel 4

Oppstilling av geloningenet:

35 Genet ble oppstilt fra begge retningene som illustrert i fig. 3 og fig. 4 Oligonukleotidsekvensene er identifisert i fig. 5. Oppstilling av 5'-enden til genet (omtrent 500 bp N-terminalt kodende region) begynte med bærerbundet BtgII og oligonukleotidene ble

tilsatt i følgende rekkefølge (hver innbefatter en sammensmeltnings-/vaskesyklus):  
gel39, gell, gel38, gel2, gel37, gel3, gel36, gel4, gel35, gel5, gel34, gel6, gel33, gel7,  
gel32, gel8, gel31, gel19, gel30, gel10, gel29, gel11, gel28, gel2, gel27.

- 5 Oppstilling av 3'-enden av genet (omtrent 300 bp C-terminalt kodende region) begynte med bærerbundet Btgel2 og oligonukleotidene ble tilsatt i følgende rekkefølge: gel20, gel19, gel21, gel18, gel22, gel17, gel23, gel16, gel24, gel15, gel25, gel14, gel26, gel13.

- 10 Med referanse til fig. 3 ble 5'-enden av genet (N-terminalt kodende region) frigjort fra bæreren ved spaltning med restriksjonsendonukleasen EcoRI og 3'-enden av genet (C-terminalt kodende region) ble frigjort fra bæreren ved spaltning med restriksjonsendonukleasen HindIII. Med referanse til fig. 4 ble de to genfragmentene, inneholdende komplementære 20-base hale innenfor oligonukleotidene gel27 og gel13 smeltet sammen og deretter ligert for å danne det intakte genet.

15

#### Eksempel 5

##### Kloning av det syntetiske gelonin genet

- 20 Det fullførte DNA-produktet ble ligert med M13mp19FDNA som ble spaltet med EcoRI og HindIII ifølge standardmetoder beskrevet i Molecular Cloning: A laboratory manual, E.F. Sambrook et al., 1989.

#### Eksempel 6

##### Sekvensering av det syntetiske gelonin genet:

25

Sekvensen til det syntetiske genet i M13mp19 ble bekreftet ved dideoksey sekvensering. To mutasjoner ble funnet i det klonede syntetiske genet og begge var i 5'-enden (N-terminalt kodende region).

#### Eksempel 7

##### Seterettet mutagenese for å korrigere mutasjonene i det klonede syntetiske genet:

Oligonukleotid-rettet mutagenese ble utført for å korrigere de to mutasjonene innenfor geloninogenet ifølge prosedyren i *in vitro* mutagenese reagens kit (Amersham Corp).

35

Eksempel 8Subkloning av syntetisk gen inn i ekspresjonsvektoren:

- 5 Det syntetiske geloningenet ble spaltet fra M13mp19 vektoren ved innvirkning av EcoRI og HindIII og det gen-inneholdende fragmentet ble rensset ved agarosegelelektroforese og ligert inn i EcoRI/HindIII-spaltet ekspresjonsvektor pKK223-3 (Pharmacia).

Eksempel 9

- 10 Analyse av ekspresjonen til syntetisk geloningen i E. coli:

- 15 En 50 ml kultur av E. coli JM105 inneholdende det syntetiske geloningenet klonet inn i pKK223-3 blir dyrket, induisert med IPTG og lysert for å oppnå et råekstrakt. Ekstraktet blir analysert ved SDS polyakrylamid gelelektroforese (sammen med et kontrollekstrakt dannet fra vertsceller inneholdende ekspresjonsvektoren uten innskudd). Westernblot analyse og funksjonelle analyser av gelonin blir også utført for å bekrefte at proteinet blir uttrykt og er aktivt.

- 20 Det fremgår derfor at foreliggende oppfinnelse og utførelsesformene beskrevet deri er godt tilpasset for å utføre hensiktene og resultatene angitt deri.

SEKVENSLISTE

## (1) GENERELL INFORMASJON:

- (i) APPLICANT: Rosenblum, Michael  
Beattie, Kenneth L.
- (ii) TITLE OF INVENTION: DNA SEQUENCES ENCODING GELONIN  
POLYPEPTIDE
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 1
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
  - (A) ADDRESSEE: James F. Weiler, Attorney-at-Law
  - (B) STREET: One Riverway, Suite 1560
  - (C) CITY: Houston
  - (D) STATE: Texas
  - (E) COUNTRY: USA
  - (F) ZIP: 77056
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
  - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: WordPerfect 5.1
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
  - (A) APPLICATION NUMBER: US 07/755,949
  - (B) FILING DATE: 06-SEP-1991
  - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
  - (A) NAME: Weiler, James F.
  - (B) REGISTRATION NUMBER: 16,040
  - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: D-5385
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
  - (A) TELEPHONE: (713) 626-8646
  - (B) TELEFAX: (713) 963-5853



## (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO:1:

## (i) SEKVENNS KARAKTERTREKK

(A) LENGDE: 783 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

5 (C) TRÅDTYPE: dobbel

(D) TOPOLOGI: ukjent

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomsik)

(iii) HYPOTETISK: JA

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

10 (A) ORGANISME: *Gelonium multiforum*

(D) UTVIKLINGSSTADIUM: frø

(F) VEVSTYPE: nøtt

## (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO:1:

15

ATGGGTCTGG ATACCGTTAG CTCAGCACC AAAGGCGCGA CCTACATCAC CTACGTTAAC	60
TTCCTGAACG AACTGCGTGT TAAACTGAAA CCGGAAGGTA ACAGCCATGG CATCCCGCTG	120
CTGCGTAAAG GTGATGACCC GGGTAAATGC TTCGTGCTGG TGGCGCTGAG CAACGATAAC	180
GGTCAGCTGG CAGAAATCGC AATCGATGTT ACCAGCGTGT ACGTAGTTGG CTATCAGGTG	240
CGTAACCGCA GCTACTTCTT CAAAGATGCT CCGGATGCAG CGTACGAAGG CCTGTTCAA	300
AACACCATCA AAAACCCGCT GCTGTTCGGT GGCAAACTC GTCTGCACTT CGGTGGCAGC	360
TATCCGAGCC TGGAAGGCGA AAAAGCGTAC CGCGAACTA CCGATCTGGG TATCGAACCG	420
CTGCGCATCG GCATCAAAA ACTGGACGAA AAGCGGATCG ACAACTACAA ACCGACCGAA	480
ATCGCGAGCT CTCTGCTGGT TGTGATCCAG ATGGTGAGCG AAGCGGCACG TTTCACCTTC	540
ATCGAAAACC AGATTCGTAA CAACTCCAG CAGCGTATCC GTCCGGCGAA CAACACCATC	600
TCTCTGGAAA ACAAATGGGG CAACTGAGC TTCCAGATCC GTACCAGCGG TCGGAACGGT	660
ATGTTTCAGCG AAGCGGTGGA ACTGGAACGC GCGAACGGCA AAAAATACTA CGTGACTGCG	720
GTGGATCAGG TGAACCGAA AATCGCACTG CTGAAATTCG TGGACAAAGA CCCGGAATAG	780
TGA	783

P a t e n t k r a v

1.

5 Syntetisk gen, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en  
 sekvens av nukleotider omfattende SEQ ID Nr. 1 hvor nevnte gen koder for et gelonin-  
 protein eller et polypeptidfragment av gelonin hvor nevnte protein eller  
 polypeptidfragment inhiberer den cellulære proteinsyntesen, men som ikke blir bundet  
 til en celleoverflate reseptor.

10 2.

Syntetisk DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 nevnte nukleotidsekvens er operabelt koblet til en ekspresjonskontrollsekvens.

3.

15 Syntetisk DNA ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 nevnte ekspresjonskontrollsekvens blir valgt fra gruppen bestående av en early promoter  
 SV40, en late promoter SV40, et lokksystem, et TAC-system, et TRC-system, et TRP-  
 system, hovedoperator og promoterregioner til fag lambda og kontrollregioner til fd  
 kappeprotein.

20

4.

Syntetisk DNA ifølge krav 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d  
 at det videre omfatter en DNA-sekvens som koder for en polypeptiddomene som  
 bindes spesifikt til en celleoverflatereseptor som er til stede på selekterte målceller.

25

5.

Fremgangsmåte for fremstilling av det syntetiske genet ifølge krav 1, k a r -  
 a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å:

30

a. syntetisere, rense og 5'-fosforylering av et sett av syntetiske oligonukleotider  
 som når de er koblet sammen utgjør det syntetiske genet, og

b. sammensmelte og ligere oligonukleotidene sammen for å sammenstille det  
 syntetiske genet.

35

6.

Fremgangsmåte for fremstilling av det syntetiske genet kodende for gelonin ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende trinn:

- 5 a) selektere sekvensen av nukleotidene ifølge krav 1, hvor nevnte sekvens inneholder en tre-base-kodon-triplet for hver aminosyre i geloninprotein eller polypeptidfragmentet, hvor nevnte triplet blir valgt fra gruppen bestående av tripletter kodende for hver aminosyre for å maksimalisere ekspresjonen, manipulasjon eller stabiliteten til det syntetiske genet i en ekspresjonsvektor og
- 10 b) syntetisere nevnte syntetiske gen hvor nevnte syntese omfatter følgende trinn:
- å dele nevnte syntetiske gen i overlappende sett av enkelttrådede fragmenter av oligonukleotider, hvor nevnte fragmenter blir kjemisk syntetisert;
- 15 rensing av nevnte oligonukleotider;  
fosforylering av nevnte oligonukleotider i den 5' enden; og  
sammensmelte trådene av oligonukleotider hvor dupleks-DNA blir dannet, for derved å danne det syntetiske genet som koder for gelonin,
- 20 c) ligere det syntetiske genet sammen med en egnet kloningsvektor for å danne et klonet gen;
- d) å bestemme nukleotidsekvensen til det klonede genet for å verifisere sekvensen til genet;
- 25 e) utføres setedirigert mutagenese for å korrigere for uønskede mutasjoner i det klonede genet;
- f) subklone det klonede genet inn i en ekspresjonsvektor;
- 30 g) introdusere ekspresjonsvektoren som bærer det syntetiske genet som koder for gelonin i en ekspresjonsvertscelle; og
- h) dyrke ekspresjonsverten som bærer ekspresjonsvektoren i trinn g) under betingelser som er egnet for produksjon av geloninproduktet.
- 35

7.

Fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ytterligere omfatter å koble flankerende sekvenser til nevnte dupleks DNA.

5 8.

Fremgangsmåten ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d inkorporering av restriksjonsendonuklease-gjenkjenningsetene inn i nevnte syntetiske gen eller inn i nevnte flankerende sekvenser.

10 9.

Fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t trinn d) ytterligere omfatter:

(a) isolering av DNA til det klonede genet,

15 (b) sekvensering av DNA til det klonede genet, og

(c) å gjenta trinnene a og b med en multiplisitet av kloner helt til en klon inneholdende den ønskede DNA-sekvensen er blitt identifisert og nøyaktigheten av det oppstilte og klonede genet er verifisert.

20 10.

Fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter følgende trinn:

(a) isolering av DNA til nevnte mutasjonsinnholdende gen for å korrigere ved setedirigert mutasjon en mutasjon i det klonede genet

25

(b) sammensmeltning av DNA-tråden til det mutasjonsinnholdende genet som inneholder mutasjonen med en syntetisk korrigerende oligonukleotidprimer som dekker setet til nevnte mutasjon og inneholder den korrekte DNA-sekvens,

(c) elongering av den korrigerende oligonukleotidprimeren sammensmeltet til

30

nevnte mutasjonsinnholdende tråd ved innvirkning av en DNA-polymerase, som produserer et korrigert gen;

(d) innføring av DNA produktet ifølge trinn (c) inn i en hensiktsmessig vertscelle ved transfeksjon eller transformasjon, og

(e) isolering av det korrigerede genet.

35

11.

Fremgangsmåte for kloning av det syntetiske genet produsert ved fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinn f) ytterligere omfatter følgende trinn:

5

- (a) isolering av DNA som koder for det klonede genet i lineær dupleksform,
- (b) spaltning av en ekspresjonsvektor med en restriksjonsendonuklease,
- (c) kobling av nevnte lineære dupleks-DNA fra nevnte klonede gen med nevnte ekspresjonsvektor.

10

12.

Fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinn h) ytterligere omfatter følgende trinn:  
rensing av geloninproduktet fra nevnte celler.

15

13.

Fremgangsmåten ifølge kravene 6 - 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter å detektere geloninproduktet ved SDS gelelektroforese, Western blot analyse eller aktivitetsanalyse.

20

14.

Fremgangsmåten ifølge kravene 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at kodontriplettene blir valgt for å maksimalisere ekspresjon i en bakteriell vert.

25

15.

Fremgangsmåten ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte vert er Escherichia coli.

30

16.

Fremgangsmåten ifølge kravene 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at kodontriplettene blir valgt for å maksimere ekspresjon i en soppvert.

17.

35

Fremgangsmåten ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at verten er gjær.

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at kodontriplettene blir valgt for å maksimere ekspresjon i pattedyrceller.

5 19.

Fremgangsmåten ifølge krav 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at kodontriplettene blir valgt for å maksimere ekspresjon i insektceller.

20.

10 Fremgangsmåten ifølge krav 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at kodontriplettene blir valgt for å maksimere ekspresjon i planteceller.

21.

15 Fremgangsmåten ifølge krav 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at alle oligonukleotidene blir smeltet sammen i en reaksjonsblanding for å sette sammen ("assemble") genet.

22.

20 Fremgangsmåten ifølge krav 6 - 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at oligonukleotidene er sammensmeltet ("annealed") i blokker, og nevnte blokker blir deretter sammensmeltet og ligert sammen for å danne det intakte genet.

23.

25 Fremgangsmåten ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at genet som koder for gelonin blir konstruert ved hjelp av en fast fase oppstillingsprosess omfattende følgende trinn:

- (a) kobling av et syntetisk oligonukleotid ved eller nære ved en av endene til nevnte oligonukleotid til et fast fasebærer-materiale,
- 30 (b) bortvasking av ubundet oligonukleotid i overskudd,
- (c) tilsetning av et molart overskudd oligonukleotid, som har perfekt basesekvens komplementaritet med det bærerbundne oligonukleotidet, gjennom en del eller hele lengden til nevnte bærerbundne oligonukleotider, og sammensmeltning av trådene for å danne en dupleks-DNA-struktur, deretter bortvasking av ubundet oligonukleotid i
- 35 overskudd,
- (d) gjentakelse av trinn (c) helt til hele genet er blitt sammenstilt,

(e) behandling av det sammenstilte genet med DNA ligase for å danne et intakt dupleks DNA og

(f) frigjøring av det syntetiske genet fra bæreren med et restriksjonsenzym eller andre egnede metoder.

5

24.

Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er produsert ved metoden ifølge krav 6.

10

25.

Ekspresjonsvektoren ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte vektor er pKK223-3.

26.

15

Ekspresjonsvektoren ifølge krav 24 eller 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte vektor er pKC30 eller et av derivatene derav.

27.

20

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder eks-presjonsvektoren ifølge krav 24 eller 25.

28.

Vert ifølge krav 27, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte vertscelle er avledet fra en bakteriell sopp, insekt, dyr eller plantekilde.

25

29.

Vert ifølge krav 22 eller 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte bakterielle vertskilde blir valgt fra gruppen bestående av stammer av E. coli, Pseudomonas eller Bacillus og nevnte soppkilde er gjær.

30

30.

Vertscellene ifølge krav 27 - 29, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte dyrekilde omfatter mus, svin eller humane vevsceller.

35

31.

Vertscellene ifølge krav 27 - 30, k a r a k t e r i s e r t v e d at E. colistammen er E. coli JM105.

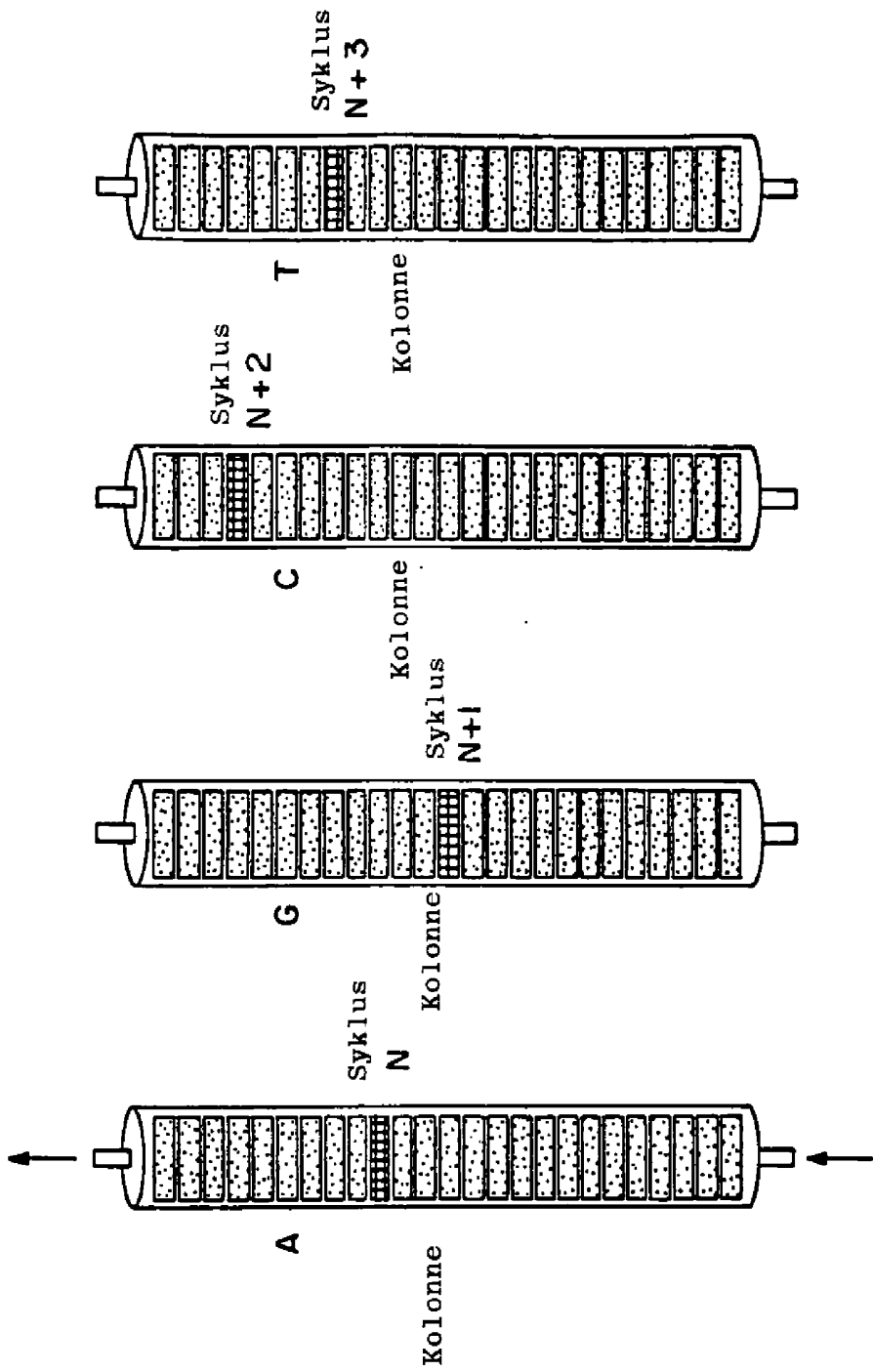
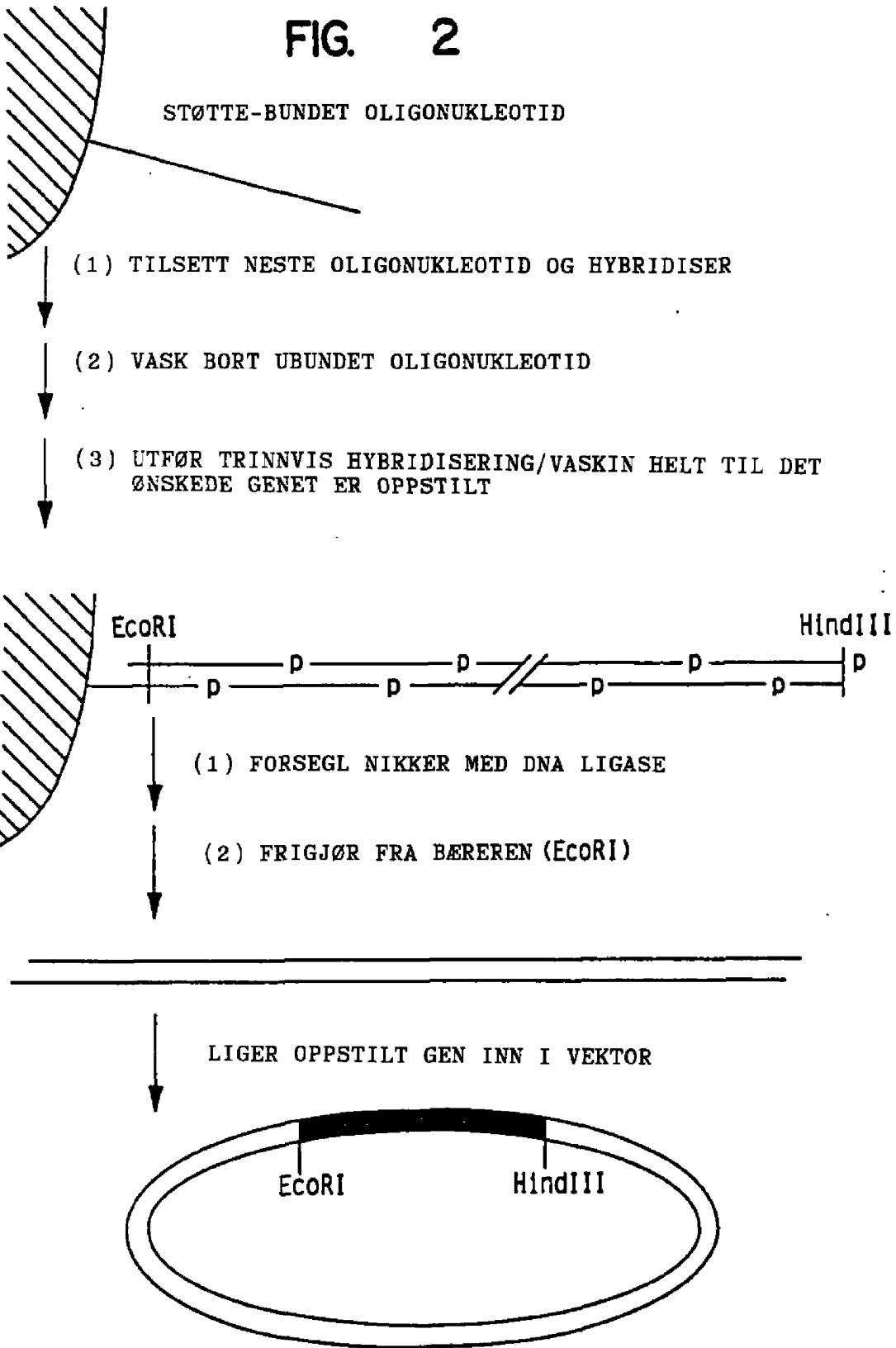


FIG. 1



FIG. 2



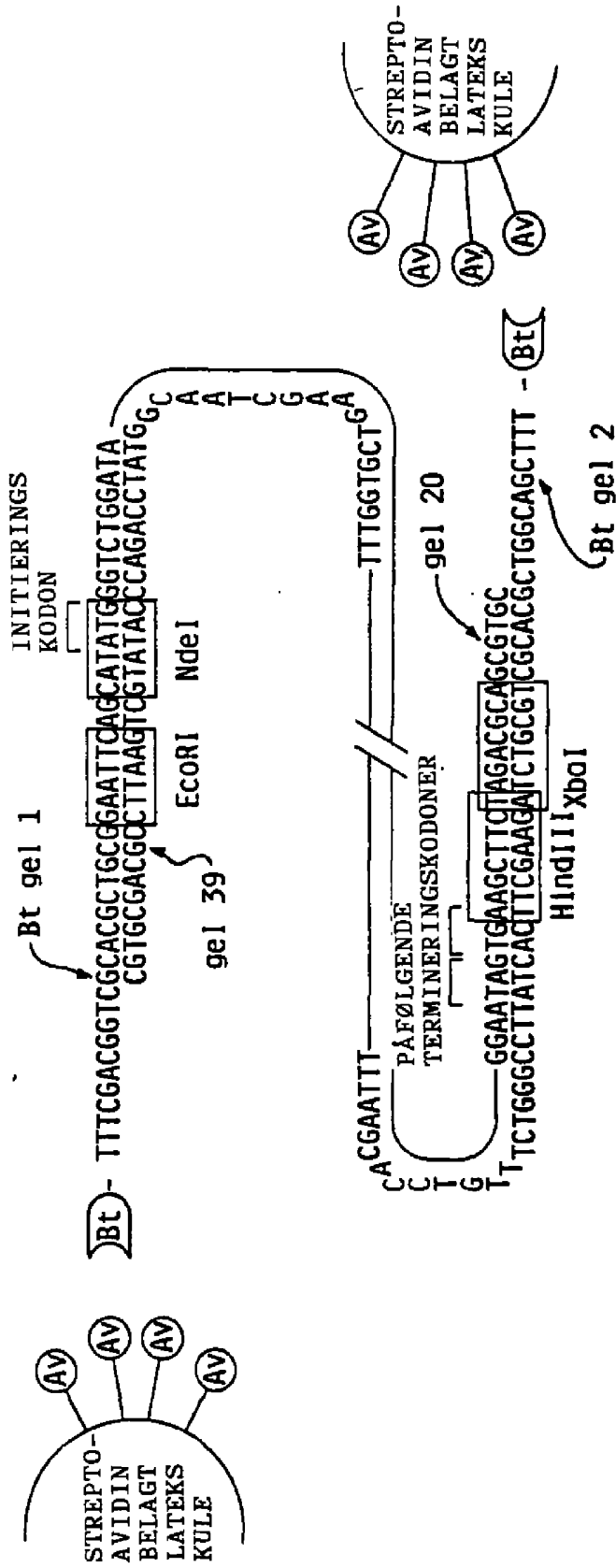


FIG. 3

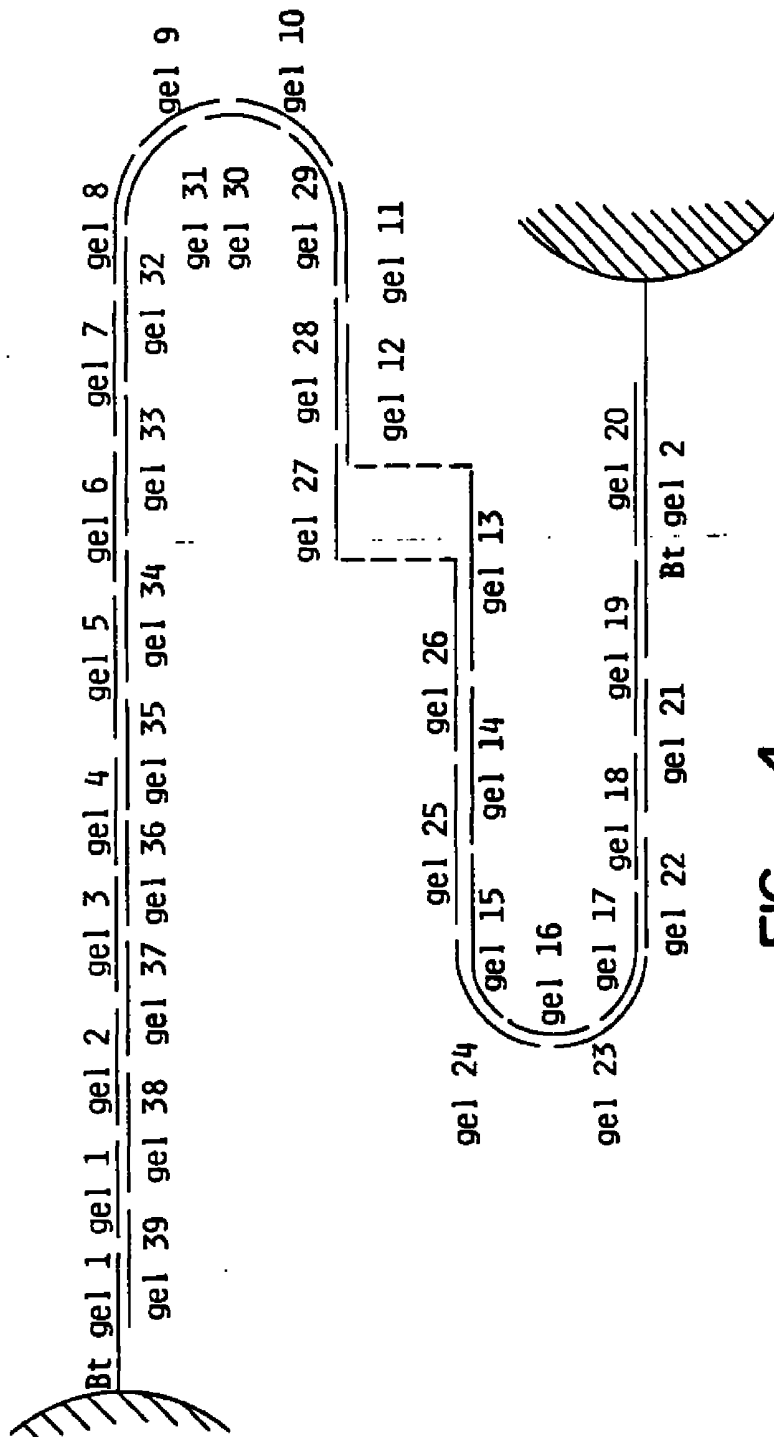


FIG. 4

NAVN PÅ GENET: GELONIN

Oligo navn lengde sekvens (5' → 3')

FIG. 5

1.	Btge11	45+bt	Bt-TTTCGACGGTCCACACGCTGCGGAAATTCAGLATAATGGGCTGGATA
2.	Btge12	61+bt	Bt-TTTCGACGGTCCACACGCTGCGTCTAGAGCTTACACTATCCGGGTCITT6TCCACGAATTT
3.	ge11	40+P	D-CGGTTAGCTTACAGCACCAWAGGCGGACCTACACTACCTA
4.	ge12	40+P	D-CGTTAATCTCTGAACGAATGCGGTGTTAAACTGAAACCG
5.	ge13	40+P	D-GAAGGTAAACAGCTGACCTCCGCTGCTGCTGCTAAAGGIG
6.	ge14	40+P	D-ATGACCCGGGTAATGCTTCGTGCTGGTGGCGCTGAGCAA
7.	ge15	40+P	D-CGATAACCGTACGCTGGCAGAAATCGCAAATCGATGTTACC
8.	ge16	40+P	D-AGCGGTACGTAGTGGCTATCAGGTGCGTAAACCGCAGCT
9.	ge17	40+P	D-ACTTCTTCAAGATGCTCCGGATGCAGGCTACGAAGGCCCT
10.	ge18	40+P	D-GTTCAAAAACACCATCAAAAACCCGCTGCTGTTCCGGTGGC
11.	ge19	40+P	D-AAACTCGTCTGCACCTCCGGTGGCAGCTATCCGAGCCTGG
12.	ge110	40+P	D-AAGGCGAAAAGCGTACC6CGAAACTACCGATCTGGGTAT
13.	ge111	40+P	D-CGAACCGCTGCGCATCGGCATCAAAAACACTGGACGAAAAC
14.	ge112	40+P	D-GCGATCGACACTACAACCCGACCGAAATCCGGAGCTCTC
15.	ge113	40+P	D-TGCTGGTGTGATCCAGATGGTGAGCGAAGCGGCACGTTT
16.	ge114	40+P	D-CACCTTCATCGAAAACAGATTCGTAACTCCAGCAG
17.	ge115	40+P	D-CGATCCGTCGGCGAACACCACTCTCTGGAAAACA
18.	ge116	40+P	D-AATGGGGCAAACTGAGCTCCAGATCCGTACCCAGCGGTGC
19.	ge117	40+P	D-GAACGGTATGTTACGCGAAGCGGTGGAACGGAAACCGCGG
20.	ge118	40+P	D-AACGGCAAAAATACTACGTGACTGCGGTGGATCAGGTGA
21.	ge119	40+P	D-AAACCGAAATCGACATGCTGAATTCGTGGACAAGACCC
22.	ge120	30+P	D-GGAAATAGTGAAGCTTAGACGCGAGCGTGC
23.	ge121	40+P	D-CAGCAGTGGATTTTCGGTTTCCACTGATCCACC6CAGTC
24.	ge122	40+P	D-ACGTAGATTTTTCGGTTTCGCGGTTCCAGTCCACCCG
25.	ge123	40+P	D-CTTCGCTGAACATACCGTTCGACCCGCTGGTACGGATCTG
26.	ge124	40+P	D-GAAGCTCAGTTTGC6CCATTTGTTTTCCAGAGAGATGGTG
27.	ge125	40+P	D-TTGTCCGCCGACGGATACGCTGCTGGAAATGTTACGAA
28.	ge126	40+P	D-TCTGGTTTTCGATGAAGGTGAACGTGCCGCTTCGCTCAC
29.	ge127	40+P	D-CATCTGGATCACACCAGCAGAGAGCTCGCGATTTCCGGTC
30.	ge128	40+P	D-GGTTTGTAGTGTGATCGGTTTTCGTCCAGTTTTTTTGA
31.	ge129	40+P	D-TGCCGATGCGACGGGTCGATACCCAGATCGGTAGTITTC
32.	ge130	40+P	D-GCGGTACGCTTTTCGCTCCAGGCTCGGATAGCTGCCA
33.	ge131	40+P	D-CCGAAGTGCAGCAGTTTGGCCACCAGCAGCAGCGGGT
34.	ge132	40+P	D-TTTTGAATGGTITTTGAACAGGCTTCGTACCGCTGCATC
35.	ge133	40+P	D-CGGAGCAICTTGAAGAAGTAGCTGCGGTACGGCACCTGA
36.	ge134	40+P	D-TAGCCAACTACGTACAGCTGGTAACTCGATGCGGATTT
37.	ge135	40+P	D-CTGCCAGCTGACCGTTATCGTGCACGCGCCACCAGCAC
38.	ge136	40+P	D-GAAGCATTTACCCGGGTCATCACCTTACGCGCAGCAGCGGG
39.	ge137	40+P	D-ATGCCCATGGCTGTACCCTCCGGTTTACGTTAAACCGCA
40.	ge138	40+P	D-GTTTCGTTCAGGAAGTAAACGTAGGTGATGATGGTCCGGCC
41.	ge139	54+P	D-TTTTGGTGTGAAGCTAACGGTATCCAGACCCCATATGCTGAATTC6CGCAGCGGTGC