



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1486/81 (51) Int.Cl.6 C 12 N 15/73
(22) Indleveringsdag: 01 apr 1981
(41) Alm. tilgængelig: 07 dec 1981
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 26 aug 1996
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 06 jun 1980 GB 8018701 15 aug 1980 GB 8026661 08 sep 1980 GB 8028983

(73) Patenthaver: *Biogen, Inc.; Cambridge Center 14; Cambridge, Massachusetts 02142, US

(72) Opfinder: Walter Charles *Fiers; BE, Erik Rene *Remaut; BE

(74) Fuldmægtig: Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Plasmid-vektorer, fremgangsmåde til fremstilling deraf samt fremgangsmåde til fremstilling af polypeptid

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Gene 5, 59-76 (1979)
Gene 8, 107-119 (1979)
Methods Enzymol. 68, 482-492 (1979)

(57) Sammendrag:

1486 - 81

Forbedrede vektorer til ekspresion af klonede gener af prokaryotisk eller eukaryotisk oprindelse og fremgangsmåde til fremstilling af sådanne vektorer beskrives, hvilke forbedrede vektorer omfatter promotorer og operatorer fra λ fager og fortrinsvis ikke indeholder et aktivt *cro*-gen eller et aktivt *N*-gen, hvilke vektorer har mindst ét endonuklease genkendelsespunkt til kloning af ønskede gener mindre end ca. 300 basepar fra promotorerne og operatorerne, og som, ligesom de fremgangsmåder der udnytter vektorerne, kan anvendes til fremstilling af en lang række prokaryotiske, eukaryotiske og virale polypeptider, hormoner, enzymer, antigener, proteiner og aminosyrer.

Den foreliggende opfindelse angår forbedrede, hidtil ukendte plasmid-vektorer, som er ejendommelige ved det i krav 1's kendetegnende del angivne, en fremgangsmåde til fremstilling af sådanne vektorer, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 7's kendetegnende del angivne, samt en fremgangsmåde til fremstilling af polypeptider, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 12's kendetegnende del angivne. De her omhandlede vektorer og fremgangsmåder udmærker sig ved forbedret ekspression af klonede gener, især af eukaryotisk oprindelse i prokaryotiske værter. Som det vil kunne forstås af det følgende, kan disse vektorer og fremgangsmåder anvendes til forbedring af produktionen af forskellige polypeptider, proteiner og aminosyrer i værtsceller.

Produktionsniveauet af et protein i en værtscelle styres af tre hovedfaktorer, nemlig antallet af kopier af dets gen i cellen, effektiviteten, hvormed disse genkopier transkriberes, og effektiviteten, hvormed den resulterende budbringer-RNA ("mRNA") translateres. Effektiviteten af transkription og translation (som tilsammen udgør ekspression) er igen afhængig af de nukleotidsekvenser, som normalt er placeret forud for den ønskede kodningssekvens. Disse nukleotidsekvenser eller ekspressionskontrolsekvenser definerer inter alia den position, hvor RNA-polymerase indvirker (promotorsekvensen) til initiering af transkription, og hvor ribosomer binder og indvirker med mRNA'en (produktet for transkription) til initiering af translation.

Ikke alle sådanne ekspressionskontrolsekvenser fungerer med lige stor effektivitet. Det er derfor ofte en fordel at adskille den specifikke kodningssekvens for et ønsket protein fra dens tilgrænsende nukleotidsekvenser og i stedet fusionere denne til andre ekspressionskontrolsekvenser for herved at favorisere højere ekspressionsniveauer. Når dette er blevet opnået, kan det nysplejsede DNA-fragment indføres i et højere kopiantal plasmid eller et bakteriofag-derivat for at forøge antallet af genkopier i cellen og herved yderligere forbedre udbyttet af ekspressioneret protein.

Da overproduktion af selv normalt non-toxiske gen-produkter kan være skadelig for værtsceller og føre til formindsket stabilitet af særlige værts-vektorsystemer, bør en god ekspressionskontrolsekvens, udover at forbedre effektiviteten af transkription og translation af klonede gener, også være kontrollabel for modulering af ekspression under bakteriel vækst. F.eks. er de foretrukne ekspressionskontrol-

sekvenser sådanne, som kan afbrydes for at tillade værtscellerne at propagere uden for stor opbygning af gen-produkter og derefter tilsluttes for at fremme ekspressionen af større mængder af de ønskede protein-produkter.

5 Adskillige ekspressionskontrolsekvenser, der tilfredsstiller nogle af de ovenfor anførte kriterier, har været anvendt til forbedring af ekspressionen af proteiner og polypeptider i bakterielle værter. Disse omfatter f.eks. de operator-, promotor- og ribosom-bindende og -interaktionerende sekvenser af lactose-operonen af *E. coli* (f.eks. K. Itakura et al., "Expression In *Escherichia coli* Of A Chemically Synthesized Gene For The Hormone Somatostatin", *Science*, 198, pp. 1056-63 (1977); D.V. Goeddel et al., "Expression In *Escherichia coli* Of Chemically Synthesized Genes For Human Insulin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, pp. 106-10 (1979)) de tilsvarende sekvenser af tryptofan-syntetasesystemet af *E.*
 10 *coli* (J.S. Emtage et al., "Influenza Antigenic Determinants Are Expressed From Haemagglutinin Genes Cloned in *Escherichia coli*", *Nature*, 283, pp. 171-74 (1980); J.A. Martial et al., "Human Growth Hormone: Complementary DNA Cloning And Expression In Bacteria", *Science*, 205, pp. 602-06 (1979)) og hoved-operator- og -promotor-områderne af fag λ (H. Bernard et al., "Construction Of Plasmid Cloning Vehicles That Promote Gene Expression From The Bacteriophage Lambda P_L Promoter", *Gene*, 5, pp. 59-76 (1979)). Den foreliggende opfindelse vedrører den sidste af disse ekspressionskontrolsekvenser.

Bakteriofag λ indeholder tre hovedpromotorer -- P_L , P_R og P'_R . Et
 25 repressor-protein, produktet af fag gen *cI*, vides at kontrollere aktiviteten af promotorer P_L og P_R . Repressoren binder til de respektive operator-områder -- O_L og O_R -- for disse promotorer og blokerer initiering af transkription fra den tilsvarende promotor. Endvidere er én kopi af *cI*-genet på kromosomet for en lysogenisk stamme, på grund af dets
 30 autoregulerende syntese måde (M. Ptashne et al., "Autoregulation And Function Of A Repressor In Bacteriophage λ ", *Science*, 194, pp. 156-61 (1976)), i stand til fuldstændigt at undertrykke P_L - eller P_R -promotorerne, som er til stede i et multikopi plasmid (infra). Det bør bemærkes, at i systemer, som involverer lac-promotoren, er repression af promotor-
 35 en under non-inducerede betingelser kun partiel (K. Itakura et al., supra; D.V. Goeddel et al., supra).

Den kontrol, som udøves af repressoren over promotorer P_L og P_R , kan ændres ved modifikation af repressor-proteinet eller dets gen.

F.eks. kendes der én mutation, hvor repressor-proteinet er temperaturfølsomt. Når denne mutation anvendes, kan promotorerne aktiveres eller inaktiveres ved at variere dyrkningstemperaturen og hermed repressorens stabilitet.

5 Bakteriofag λ indeholder også gener N og cro. N-genet er under P_L kontrol. Produktet af N-genet vides at virke som en anti-terminator i bakteriofag λ . Anti-terminering er fordelagtig ved at overskygge transkript-terminering eller fartnedsættelse forårsaget af tilstedeværelsen af termineringssekvenser, termineringslignende sekvenser eller
10 transkriptions-fartnedsættende sekvenser i de bestemte DNA-sekvenser, som skal transkriberes. Endvidere kan polaritetseffekter indført ved tilstedeværelsen af nonsens-codoner i promotor-transkriptet fjernes af N-gen-produktet (N. Franklin & C. Yanofsky, "The N Protein of λ : Evidens Bearing On Transcription Termination, Polarity And The Alteration Of E.
15 coli RNA Polymerase" i RNA Polymerase (Cold Spring Harbor Laboratory) pp. 693-706 (1976)).

Produktet af det fra P_R -promotoren transkriberede cro-gen vides at være en sekundær repressor for begge promotorer P_L og P_R (J. Pero, "Deletion Mapping Of The Site Of The *tof* Gene Produkt", i The Bacteriophage λ , (Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 549-608 (1971); H. Echols, "Role Of The *cro* Gene In Bacteriophage λ Development", J. Mol. Biol.,
20 80, pp. 203-16 (1973); A. Johnson et al., "Mechanism Of Action Of The *cro* Protein Of Bacteriophage λ ", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, pp. 1783-87 (1978)). Da cro-gen-produktet coproduceres sammen med de ønskede
25 produkter af værtsvektorkombinationen, har cro-gen-produktets virkning på ekspresion fra P_L - og P_R -promotorerne tendens til at stige med tiden. Derfor er i ethvert system, hvor der ønskes kontinuerte høje ekspresionsniveauer fjernelse eller inaktivering af cro-genet nødvendig.

30 Effektiviteten af P_L -promotoren til ekspresion af klonede gener er blevet påvist ved at inkorporere tryptofan (*trp*)-operonen af E. coli i fag λ . (N. Franklin, "Altered Reading Of Genetic Signals Fused To The N Operon Of Bacteriophage λ : Genetic Evidence For Modification Of Polymerase By The Protein Product Of The N Gene", J. Mol. Biol., 89, pp.
35 33-48 (1979); A. Hopkins et al., "Characterization Of λ *trp* - Transducing Bacteriophages Made In Vitro", J. Mol. Biol., 107, pp. 549-69 (1976)). I denne modificerede fag kan *trp*-generne transkriberes enten fra deres egen promotor eller fra P_L -promotoren. P_L -medieret ekspresion

blev fundet at være 3-4 gange højere end de fra den homologe trp-promotor opnåede niveauer.

Virkningen af repressor på P_L -medieret ekspression påvistes også i denne modificerede fag. F.eks. var i fravær af repressor P_L -kontrolleret
 5 ekspression af antranilat-syntetase (det første enzym i trp-operonen) 11
 gange større end observeret for enzymet under trp-promotion i fravær af
 trp-repressor (J. Davison et al., "Quantitative Aspects Of Gene Expression In A λ trp Fusion Operon", Molec. gen. Genet., 130, pp. 9-20
 (1974)). Alligevel blev i nærværelse af et aktivt cI -gen P_L -medieret
 10 ekspression af enzymet reduceret med mindst 900 gange. Disse studier
 viste også, at kontinuert højt niveau af P_L -medieret transkription kun
 var mulig, såfremt cro -genet ikke var funktionelt i værten.

Problemet er, at, selv om de ovenfor beskrevne λ trp-fager viser
 anvendeligheden af P_L -promotoren til ekspression af indførte gener, er
 15 brugen af sådanne fager i nogen grad begrænset ved vanskeligheder i
 opbygning og stabil propagering af cro^- -acceptor-fager. Uden sådanne
 fager falder de iagttagne høje ekspressionsniveauer hurtigt, når
 niveauet af det coproducerede cro -gen-produkt vokser og undertrykker
 transkription fra P_L -promotoren.

20 Selv om ulempen ved λ -fager i nogen grad er blevet overvundet ved
 at klonе λ -kontrolelementerne på et autonomt replicerende plasmid, såsom
 Col EI eller dets derivater (J. Hedgpeth et al., "Lambda Phage Promoter
 Used To Enhance Expression Of A Plasmid-Cloned Gene", Molec. gen.
 Genet., 163, pp. 197-203 (1978) og D.R. Helinski et al., "Construction
 25 and Properties of Plasmid Cloning Vehicles" in Recombinant Molecules;
 Impact on Science and Society, Raven Press, New York (1977), s. 151-165)
 eller ved konstruktion af mindre plasmider, som kun inkorporerer λ P_L -
 systemet (H. Bernard et al., supra), har disse sidstnævnte vektorer
 ulemper ved afstanden mellem de punkter, som er tilgængelige for
 30 indføring af klonede gener og P_L -promotoren. F.eks. indeholder de af
 Helinski et al., supra, beskrevne Col EI vektorer trp B-, C-, og D-gener
 og kræver et funktionelt N-gen, som begrænser placeringen af punkter til
 gen-indføring. I vektorerne beskrevet af Bernard et al, supra, er
 afstanden mellem punkterne for gen-indføring og P_L -promotoren på
 35 vektorområdet fra ca. 300 til ca. 8600 baser. De mere almindeligt
 anvendte EcoRI og BamHI indføringspunkter i Bernard et al.'s vektorer er
 ikke tættere end henholdsvis 600 til 1000 baser på P_L -promotoren.
 Desuden er HpaI punktet af Bernard et al.'s vektor pHUB2, det punkt, der

er nærmest ved ca. 300 baser fra P_L promotoren, lokaliseret inden for N-gen-kodningssekvensen af denne vektor. Endvidere kan virkningen af N-gen-produktet på transkription af de ønskede DNA-sekvenser ikke let fastlægges i Bernard et al.'s vektorer, fordi N-gen-produktet indkodes
5 på selve plasmidet og ikke er af kromosomal oprindelse. Endelig er der foruden manglende direkte bevis for, at Bernard et al.'s vektorer bevirker højere niveauer af protein-ekspression, ingen angivelse hos Bernard et al. om, at disse vektorer kan anvendes med nytte ved ekspressionen af eukaryotiske gen-produkter i prokaryotiske værter.

10 Den foreliggende opfindelse løser de omtalte problemer ved at tilvejebringe forbedrede vektorer og fremgangsmåder til fremstilling af sådanne vektorer og til ekspression af klonede gener i værtsceller.

Mere specielt tilvejebringes i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse en plasmid-vektor omfattende mindst én DNA-sekvens, der
15 omfatter den venstrevendte promotor og operator afledt af bakteriofag λ , P_{LO_L} , hvilken DNA sekvens er ejendommelig ved fraværet af et aktivt cro-gen og et aktivt N-gen, og ved i det mindste ét endonuklease genkendelsespunkt, hvilket endonuklease genkendelsespunkt er lokaliseret mindre end 300 basepar nedstrøms fra P_{LO_L} og lokaliseret opstrøms fra
20 vilkårlige sekvenser af λ DNA nedstrøms fra HaeIII punktet (73,1%), der kan være til stede i nævnte DNA sekvens, hvilken DNA sekvens yderligere omfatter, i et af nævnte endonuklease genkendelsespunkter, en DNA sekvens, som indeholder et kodningsområde for et eukaryotisk, prokaryotisk eller viralt protein, polypeptid, enzym, hormon, antigen eller
25 fragment deraf.

P_L -promotoren for fag λ i plasmid-vektorerne ifølge den foreliggende opfindelse fremmer transkriptionen af DNA-sekvenser, som er indført i disse vektorer. Vektorerne ifølge den foreliggende opfindelse er yderligere ejendommelige ved tilstedeværelsen af en eller flere passende
30 genkendelsespunkter for indføring af ønskede DNA-sekvenser i vektorerne nær P_L -promotoren. Afstanden mellem P_L -promotoren og genkendelsespunkterne er mindre end ca. 300 basepar og mere foretrukket mindre end ca. 150 basepar. De foretrukne vektorer ifølge opfindelsen er også sådanne, hvori aktive N-gener og aktive cro-gener mangler. Derfor kan ved valg af
35 passende vært, f.eks. en indeholdende eller manglende et aktivt kromosomalt N-gen, enhver af vektorerne ifølge opfindelsen anvendes til ekspression af DNA-sekvenser i nærværelse eller i fravær af N-gen-produktet.

Som det vil kunne forstås af den følgende beskrivelse, tillader vektorerne og fremgangsmåderne ifølge opfindelsen konstruktion af værtsvektorkombinationer, som muliggør forbedret ekspression af prokaryotiske og eukaryotiske produkter i værtsceller.

5 Der henvises i det følgende til tegningen, hvor:

Figur 1 er en skematisk oversigt over et område af fag λ trp 44 cIAt₂ cro⁻. Ikke alle restriktionspunkter er blevet vist. Afstandene er kortlagt i λ -enheder som beskrevet af E. Szybalski og W. Szybalski, "A Comprehensive Molecular Map Of Bacteriophage Lambda", Gene, 7, pp. 10 217-70 (1979).

Figur 2 er en skematisk oversigt over opbygningen af vektorer i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse -- pPLc2A, pPLc20 og pPLa23.

Figur 3 er en skematisk oversigt over opbygningen af vektorer i 15 overensstemmelse med den foreliggende opfindelse -- pPLa2311, pPLa231 og pPLa8.

Figur 4 er en skematisk oversigt over opbygningen af vektorer i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse -- pPLa83, pPLa831, pPLa832, pPLc2, pPLc23, pPLc236 og pPLc28.

20 Figur 5 er en skematisk oversigt over opbygningen af vektorer i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse -- pPLc24.

Figur 6 viser nukleotid-sekvensen for O_LP_L-området af pPLa2311.

Figur 7 viser omdannelsen af et PstI-punkt i β -lactamase til et BamHI-punkt.

25 Figur 8 er en autoradiografi for måling af proteinsyntese ved 28⁰C og 42⁰C i E. coli K12 Δ HI (pPLa23) og E. coli M5219 (pPLa23).

Figur 9 er en autoradiografi, der måler proteinsyntese ved 28⁰C og 42⁰C i E. coli K12 Δ HI (pPLa23trp₁) og E. coli K12 Δ HI (pPLa23trpA₂).

Figur 10 er en autoradiografi, der måler proteinsyntese ved 28⁰C og 30 42⁰C i E. coli K12 Δ HI (pPLc23trpA₁).

Figur 11 er en autoradiografi, der måler proteinsyntese ved 28⁰C og 42⁰C i E. coli K12 Δ HI (pPLa2311R₁).

Figur 12 er en skematisk oversigt over opbygningen af pPLc28SV_t5 og pPLc28SV_t5-37.

35 Figur 13 viser opbygningen af pPLc28SV_t5-37 fra pPLc28SV_t5 på nukleotid niveauet.

Figur 14 er en autoradiografi, der måler proteinsyntese ved 28⁰C og 42⁰C af E. coli K12 Δ HI (pPLc28SV_t5-37-9) og immunofældning med serum

fra en SV40-tumor-bærende hamster af proteinerne syntetiseret fra denne vært efter indføring ved 42°C sammenlignet med immunofældning af autentisk small-t antigen syntetiseret i SV40-inficerede nyreceller fra afrikansk grøn abe med samme antiserum.

5 Til nærmere forståelse af opfindelsen gives i det følgende en mere detaljeret beskrivelse.

I denne beskrivelse anvendes følgende udtryk:

Nukleotid - En monomer enhed af DNA eller RNA bestående af en sukkerdel (pentose), et fosfat og en nitrogenholdig heterocyklisk
10 base. Basen er bundet til sukkerdelen via det glykoside carbonatom (carbon 1' i pentosen), og denne kombination af base og sukker er et nukleosid. Basen karakteriserer nukleotidet. De fire DNA-baser er adenin ("A"), guanin ("G"), cytosin ("C") og thymin ("T"). De fire RNA-baser er A, G, C og uracil ("U").

15 DNA-sekvens - En lineær serie af nukleotider, som er bundet til hinanden ved phosphodiester-bindinger mellem nabostillede pentosers 3'- og 5'-carbonatomer.

Codon - En DNA-sekvens af tre nukleotider (en triplet), der gennem dens templat eller budbringer RNA ("mRNA") indkoder en aminosyre, et
20 translations-startsignal eller et translations-slutsignal. F.eks. indkoder nukleotid-tripletterne TTA, TTG, CTT, CTC, CTA og CTG for aminosyren leucin ("Leu"), TAG, TAA og TGA er translations-stopsignaler og ATG er et translations-startsignal.

Polypeptid - En lineær serie af aminosyrer, som er forbundet til
25 hinanden ved hjælp af peptid-bindinger mellem α -amino- og carboxy-grupperne i nabostillede aminosyrer.

Strukturelt gen - En DNA-sekvens der gennem dens mRNA indkoder en sekvens af aminosyre, som er karakteristisk for et specifikt polypeptid.

30 Transkription - Fremgangsmåden til fremstilling af mRNA ud fra et strukturelt gen.

Translation - Fremgangsmåden til fremstilling af et polypeptid ud fra mRNA.

Ekspression - Den proces et strukturelt gen undergår til dannelse af et polypeptid. Det er en kombination af transkription og translation.

35 Plasmid - En non-kromosomal dobbeltstrenget DNA-sekvens, der omfatter en intakt "replicon", således at plasmidet repliceres eller formeres i en værtscelle. Når plasmidet anbringes i en unicellulær organisme, ændres eller transformerer egenskaberne af denne organisme som følge af

plasmidets DNA. F.eks. transformerer et plasmid, der bærer genet for tetracyclin-resistens (Tet^R), en celle, der forud var følsom over for tetracyclin, til en celle, der er resistent derfor. En værtscelle, som er transformeret med et plasmid, kaldes en "transformant".

- 5 Fag eller bakteriofag - Bakterielle virus, hvoraf mange omfatter DNA-sekvenser, der er indkapslet i en proteinomslutning eller et proteinovertræk ("capsid").

Klon-bærer eller vektor - Et plasmid, en fag-DNA eller andre DNA-sekvenser, der er i stand til at formeres i en værtscelle, karakteriseret ved én eller et lille antal endonuklease-genkendelsespunkter, hvor sådanne DNA-sekvenser kan skæres på en determinerbar måde uden ledsagende tab af en essentiel biologisk funktion for DNA'en, f.eks. formering, produktion af overtrækningsproteiner eller tab af promotor eller bindings-positioner, og som indeholder en markør, der er egnet til brug ved identifikationen af transformerede celler, f.eks. tetracyclin-resistens eller ampicillinresistens.

15 Kloning - Processen til opnåelse af en population af organismer eller DNA-sekvenser afledt af én sådan organisme eller sekvens ved asexuel reproduktion.

- 20 Rekombinations-DNA-molekyle eller hybrid DNA - Et molekyle, der består af segmenter af DNA fra forskellige genomer (den fuldstændige DNA af en celle eller et virus), der ende-mod-ende er blevet splejset uden for levende celler, og som besidder evnen til at inficere en værtscelle og forblive deri.

- 25 Ekspressions-kontrolsekvens - En DNA-sekvens af nukleotider, der kontrollerer og regulerer ekspressionen af strukturelle gener ved operativ binding til disse gener.

Værtscellerne ifølge opfindelsen

- 30 Enhver blandt et stort antal tilgængelige værtsceller kan anvendes i værtsvektorkombinationerne ifølge opfindelsen udvælgelsen af en bestemt vært afhænger af et antal i og for sig kendte faktorer. Disse omfatter f.eks. forenelighed med den valgte vektor, toxicitet af proteiner indkodet af det hybride plasmid, udvindingslethed af det ønskede protein, ekspressionskarakteristika, biosikkerhed og omkostninger. En afbalancering af disse faktorer må baseres på en forståelse af, at ikke alle værter kan være lige effektive til ekspression af et bestemt rekombinations-DNA molekyle. Inden for disse almene retningslinier kan

værdifulde værter omfatte stammer af *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* og andre bacilli, gærarter og andre fungi, dyre- eller planteværter, såsom dyr (herunder mennesker) eller planteceller i kultur eller andre værter.

- 5 De foretrukne værtsceller ifølge opfindelsen er *E. coli*-stammer K12 $cI_{ts}\Delta HI$ (K12 M72 $lac_{am} \Delta trpEA2 Sm^R (\lambda cI857 N_{am7} N_{am53} \Delta HI bio^-)$) ("K12 ΔHI ") (H. Bernard et al., supra) og M5219 (K12 M72 $lac_{am} trp_{am} Sm^R (\lambda cI857 \Delta HI bio252)$) ("M5219") (H. Greer, "The *kil* Gene Of Bacteriophage λ ", *Virology*, 66, pp. 589-604 (1975)) eller enhver anden
10 stamme, der fører til enten et kromosomalt - eller plasmid-kodet *cI*857 gen (eller dets ækvivalent).

Begge stammer fører til et defekt non-exciserbart λ -profag bærende et mutant *cI* gen. Det mutante gen koder for en temperaturfølsom repressor og muliggør således, at transkription fra P_L -promotoren kan
15 aktiveres ved justering af temperaturen -- ved 28°C er repressoren aktiv, og transkription fra P_L -promotoren undertrykkes, men ved 42°C inaktiveres repressoren, og transkription fra P_L promotoren tilsluttes.

ΔHI -udslettelse af profagen fjerner en del af *cro*-genet og alle andre gener yderligere til højre for *cro* i profagen (M. Castellazzi et
20 al., "Isolation And Characterization Of Deletions In Bacteriophage λ Residing As Prophage In *E. coli* K12", *Mol. gen. Genet.*, 117, pp. 211-18 (1972)).

Stamme M5219 indeholder endvidere en *bio252* udslettelse, som fjerner alle gener til venstre for *cIII*, herunder *kil* i profagen. Endvidere
25 udtrykker stamme M5219 ved temperaturinduktion et funktionelt *N*-gen-produkt fra et kromosomalt *N*-gen. Stamme K12 ΔHI har på den anden side to *ambi*-mutationer i *N*, som gør den funktionelt *N*-negativ.

De to stammer muliggør derfor eksperimentel tilslutning eller afbrydelse af ekspresion af P_L -promotoren. Endvidere muliggør et valg af
30 K12 ΔHI eller M5219, at medieret transkription kan forløbe i fravær eller nærværelse af *N*-gen-produktet. Og fordi hverken *E. coli* K12 ΔHI eller *E. coli* M5219 udtrykker et funktionelt *cro*-gen-produkt, undgås sekundær repression af P_L -medieret ekspresion i disse.

35 Konstruktion af nogle udførelsesformer af vektorer ifølge opfindelsen.

Selv om der findes flere velerkendte kilder for fag λ promotorerne, valgtes med henblik på de følgende udførelsesseksempler på konstruktionen af vektorer ifølge den foreliggende opfindelse fag λ *trp* 44 *cI* Δ_2 *cro*⁻

som kilde for fag λ promotorer.

Fremstillingen af fag λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ er beskrevet af N. Franklin, "The N Operon Of Lambda: Extent And Regulation As Observed In Fusions To The Tryptophan Operon Of Escherichia Coli", i The Bacteriophage λ (Cold Spring Harbor Laboratories), pp. 621-38 (1971). At₂-mutationen i cI-genet gør repressoren termolabil (M. Lieb, "Studies Of Heat-Inducible Lambda Bacteriophages. Order Of Genetic Sites And Properties Of Mutant Prophages", J. Mol. Biol., 16, pp. 149-63 (1966)). cro⁻-mutationen hindrer sekundær repression af P_L funktion. Det bør naturligvis forstås, at selv om cro⁺ fager er mindre foretrukne til langtids-ekspression, kan de anvendes i vektorerne ifølge opfindelsen. Fagen bærer også et funktionelt N-gen og aktiv P_L-promotor. Fagen giver 3 til 4 gange højere niveauer af trp enzym ekspression, end selve den homologe trp promotor gør (N. Franklin, supra).

15 En λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ DNA fremstilledes ud fra denne fag ved phenolekstraktion fra CsCl-rensede fag-partikler. Strukturen af P_LO_L området for denne fag er vist i figur 1.

P_L-promotoren og tilgrænsende operatorer (O_L) er sammen med starten af N-gen-sekvensen defineret inden for en strækning af DNA, der er ca. 20 100 basepar lang, lokaliseret ved ca. 73,4% på λ -kortet (figur 1) (T. Maniatis et al., "Recognition Sequences Of Repressor And Polymerase In Operators Of Bacteriophage λ ", Cell, 5, pp. 109-13 (1975); J. Dahlberg & F Blattner, "Sequence Of Promoter-Operator Proximal Region Of The Major Leftward RNA Of Bacteriophage λ ", Nucleic Acids Res., 2, pp. 1441-58 25 (1975)). Tilsvarende er P_R promotoren og tilgrænsende operator (O_R) sammen med starten på cro-gen-sekvensen defineret inden for en strækning af DNA, lokaliseret ved ca. 76,6% på λ -kortet (figur 1) (T. Maniatis et al., supra).

Enhver blandt adskillige måder til isolering af disse områder fra 30 fag λ DNA kan anvendes til fremstilling af kloner indeholdende de ønskede promotorsekvenser. F.eks. kan forskellige kombinationer af restriktionsenzymmer anvendes til spaltning af de ønskede områder fra fag λ DNA'en (figur 1). Disse fragmenter kan dernæst anvendes direkte til fremstilling af kloner, eller fragmenterne kan yderligere behandles til 35 trimming eller forlængelse af disse på i og for sig kendt måde før kloning.

Efter fremstilling af det passende DNA-fragment kan det indføres i enhver blandt adskillige kloningsbærere eller vektorer. F.eks. kan an-

vendelige kloningsbærere bestå af segmenter af kromosomale, non-kromosomale og syntetiske DNA-sekvenser, såsom forskellige kendte derivater af SV40 og kendte bakterielle plasmider, f.eks. plasmider fra *E. coli*, herunder Col E1, pCR1, pBR322, pMB9 og deres derivater, videre værts-område
 5 plasmider, f.eks. RP4, fag DNA'er, f.eks. de talrige derivater af fag λ , andre DNA fager, filamentøse enkeltstrengede DNA-fager, f.eks. M13, og vektorer afledt af kombinationer af plasmid og fag DNA'er eller gærtype-plasmider, såsom 2μ plasmidet eller derivater deraf.

Endvidere kan inden for hver specifik kloningsbærer forskellige
 10 punkter anvendes til indføring af fag λ DNA fragmentet. Disse punkter betegnes sædvanligvis ved den restriktionsendonuklease, som afskærer dem. F.eks. er i pBR322 forskellige restriktionspunkter tilgængelige for DNA fragmentindføring (F. Bolivar et al., "Construction And Characterization Of New Cloning Vehicles II. A Multi-Purpose Cloning System",
 15 Gene, 2, pp. 95-113 (1977); J.G. Sutcliffe, "pBR322 Restriction Map Derived From The DNA Sequence: Accurate DNA Size Markers Up To 4361 Nucleotide Pairs Long", Nucleic Acids Res., 5, pp. 2721-28 (1978)). Se også figur 2 og 4. Det skal naturligvis forstås, at en kloningsbærer, som er anvendelig i forbindelse med den foreliggende opfindelse, ikke behøver
 20 at have et restriktionspunkt til indføring af fag λ DNA fragmentet. I stedet kan bæreren forbindes med fragmentet på alternativ måde til fremstilling af den ønskede vektor i overensstemmelse med opfindelsen.

A. Vektorer ifølge opfindelsen indeholdende P_L -promotoren
 25 i orientering modsat uret med hensyn til replikationsoprindelsen. *

1. pPLa23

Idet der nu henvises til figur 2, fremstilledes en forbedret vektor
 30 ifølge opfindelsen pPL23 i en række af trin. Disse er afbildet i figur 2 og nærmere beskrevet nedenfor.

(a) Mellem-plasmid pPLc2A

Den ovenfor isolerede λ trp 44 $cIAt_2$ cro^- DNA fordøjedes med
 35 BamHI og EcoRI til afskæring et fragment forløbende fra ca. 71,3% til

* Orientering af oprindelsessegmentet tages, som det er til stede i pBR322 som normalt repræsenteret (Sutcliffe et al., supra).

81,02% på λ -kortet (figur 1 og 2). På tilsvarende måde fordøjedes pBR322 med BamHI og EcoRI, og fag λ DNA fragmentet indførtes i stedet for det afskårne EcoRI-BamHI pBR322 fragment (figur 2).

Den resulterende vektor betegnedes pPLc2A, hvor "c" tjener til at
 5 indicere orienteringen modsat urets omdrejning af P_L -promotoren med hen-
 syn til replikationsoprindelsen. λ -informationen på dette molekyle
 strækker sig fra BamHI punktet på fagen (71,3% λ) til EcoRI punktet
 (81,02% λ) og omfatter genet N , $O_L P_L$ området, gener rex og cI (mutant),
 $O_R P_R$ området, gener cro (mutant) og cII og del af gen O (figur 1 og 2).
 10 $E. coli$ C600 ($CaCl_2$ kompetent) transformeredes med den ovenfor
 fremstillede pPLc2A under passende betingelser og omgivelser. Transfor-
 manter udvalges ved $34^{\circ}C$ på LB plader podet med 10^9 pfu af fag λ_{clear}
 mutant (M. Lieb, supra) og også indeholdende $100 \mu g/ml$ carbenicillin.
 Det valgte λ DNA fragment omfatter $cIAt_2$ genet, og transformanter
 15 indeholdende dette fragment vil derfor være resistente over for fag
 λ_{clear} mutant ved $34^{\circ}C$. Endvidere omfatter det valgte pBR322 fragment
 genet for ampicillinresistens, således at værter transformeret med
 plasmider med dette gen intakt vil vokse i kultur indeholdende dette
 antibiotikum til udelukkelse af værter, der ikke er således transfor-
 20 rede.

Tyve transformanter udvalgte, og kulturer dyrkedes ved $34^{\circ}C$ i LB
 medium indeholdende $100 \mu g/ml$ carbenicillin og $10^{-2}M$ $MgCl_2$. For at sik-
 re, at transformanterne var sande transformanter, som rummer et cI -gen
 og ikke sjældne bakterier, der er ude af stand til at adsorbere λ fag,
 25 inficeredes portioner af disse kulturer med enten λ_{clear} eller λ_{vir} (F.
 Jacob & E. Wollman, "Etude Génétique d'un Bacteriophage Tempere
 d'Escherichia Coli. I. Le Système Génétique du Bacteriophage λ ", Ann.
 Inst. Pasteur, 87, pp. 653-90 (1954)). Alle tyve transformanter udviste
 resistens over for λ_{clear} og sensitivitet over for λ_{vir} .

30 Form I DNA fra én af disse tyve transformanter isoleredes under
 anvendelse af standard teknik, begrænsedes med EcoRI og BamHI og
 vurderedes over for standard markører. DNA'en udviste to bånd svarende
 til de forventede størrelser af pBR322 fragmentet og fag λ fragmentet.

35 (b) Mellem-plasmid pPLa20 -- eliminering
 af BglII fragmenter fra pPLc2A

λ området for pPLc2A omfatter fire BglII punkter lokaliseret ved
 73,77, 78,80, 80,16 og 80,28% λ (figur 1 og 2) (V. Pirotta, "Two

Restriction Endonucleases From Bacillus Globigi"; Nucleic Acids Res., 3, pp. 1747-60 (1976); H. Szybalski & W. Szybalski, "A Comprehensive Molecular Map Of Bacteriophage λ ", Gene, 7, pp.217-70 (1979)).

For at eliminere BglII fragmenterne mellem 73,77% λ og 80,28% λ
 5 fordøjedes pPLc2A DNA med BglII, gensnøredes ved en DNA koncentration på mindre end 1 $\mu\text{g/ml}$ og transformeredes i E. coli W6 (λ_{rex}) (CaCl₂ kompetent) med en kromosomal λ - repressor cI for at hindre P_L-afhængig transkription (figur 2). Carbenicillin-resistente kloner udvalgte ved dyrkning i L-substrat indeholdende 100 $\mu\text{g/ml}$ carbenicillin og screenedes
 10 for tab af λ_{rex} funktion under anvendelse af T₄ rII 638 mutant. λ_{rex} funktionen hindrer vækst af T₄ rII 638 mutanten (B. Howard, "Phage λ Mutants Deficient In rII Exclusion", Science, 158, pp. 1588-89 (1967)). Derfor viste disse BglII begrænsede transformanters mangel på at hindre væksten af T₄ rII 638 mutanten sammenlignet med manglen på vækst af
 15 mutanten i værter transformeret med pPLc2A, at rex funktionen var blevet elimineret fra pPLc2A rekombinations DNA molekylet ved BglII-fjernelsen.

Restriktionsanalyse af rekombinats-DNA molekylerne af disse BglII begrænsede transformanter viste tilstedeværelsen af et enkelt BglII punkt. Endvidere producerede fordøjelse med EcoRI og BamHI to fragmenter
 20 --ét svarende til det forventede pBR322 fragment, og det andet til den forventede størrelse (1900 basepar) af fag λ DNA fragmentet efter eliminering af denne del mellem BglII punkter 73,77% λ og 80,28% λ . Dette modificerede plasmid betegnede pPLc20. Dets λ DNA indføring forløber fra BamHI punktet (71,3%) til BglII punktet (73,77%) og fra
 25 BglII punktet (80,28%) til EcoRI punktet (81,02%). Det omfatter gen N, O_LP_L området og del af gen O (figur 1).

Selv om den resterende del af dette eksempel på konstruktionen af udførelsesformer af vektorer ifølge opfindelsen fokuserer på P_L promotoren --P_R promotoren er blevet elimineret fra pPLc2A med BglII-BglII
 30 fragmentet --skal det forstås, at tilsvarende manipulationer kunne have været anvendt til eliminering af P_L-promotoren fra pPLc2A og til konstruktion af en vektor, som bibeholder P_R-promotoren. Endvidere kunne vektorer ifølge opfindelsen konstrueres ved hjælp af tilsvarende midler med både P_L og P_R-promotorerne til stede, således at de to promotorer
 35 virker i harmoni eller opposition til mediering af ekspressionen af indførte DNA sekvenser.

(c) pPLa23 -- Indføring af et EcoRI punkt i en kort afstand på nedløbssiden fra P_L

BglII-BamHI fragmentet, som er til stede på pPLc20 indeholder et enkelt HaeIII punkt [73,1% λ , figur 1] lokaliseret ca. 150 nukleotider på nedløbssiden fra P_L (B. Allet og R. Solem "Separation And Analysis Of Promoter Sites In Bacteriophage λ DNA By Specific Endonucleases" J. Mol. Biol., 85, 475-84 (1975)). Dette punkt kan omdannes til et EcoRI punkt ved "flush-end" afsnøring af en åben HaeIII ende til en åben EcoRI ende, der forud har været "flush-end"-behandlet ved forlængelse af den recesserede 3'-ende med DNA polymerase I i nærværelse af deoxyribonukleosid-triphosphater (K. Backman et al. "Construction Of Plasmids Carrying The cI Gene Of Bacteriophage λ ", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, pp. 4174-78 (1976)). Detaljer vedrørende proceduren er beskrevet nedenfor og vist i figur 2.

Seks pmol pBR322 fordøjedes med EcoRI. Efter varmedrab af enzymet fældedes DNA'en og opløstes i 250 μ l af en puffer indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM β -mercaptoethanol, 2 μ M af hver af de fire deoxyribonukleosid-triphosphater (med α - ^{32}P -dATP (345 Ci ^{32}P /mmol)) og 50 μ g BSA/ml. Seks enheder DNA polymerase I fra E. coli (Worthington) tilsattes, og blandingen inkuberedes ved 16°C i 90 minutter. Denne proces resulterede i "flush-ending" af det åbne 3' EcoRI punkt i det lineariserede pBR322.

Efter varmeinaktivering af enzymet justeredes blanding til 50 mM NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol og DNA'en fordøjedes med BamHI. Fragmenterne adskiltes ved elektroforese på en 1,4% agarose-gel og bestemtes ved autoradiografi. En gel-skive indeholdende det største af de to fragmenter --pBR322 indeholdende et åbent BamHI punkt og et "flush-ended" EcoRI punkt --blev udskåret og frosset ved -90°C. Dette agaroseemne centrifugeredes dernæst (SS34 rotor (Sorvall)) i 20 minutter ved 20.000 opm. Den udstødte supernatant fjernedes, og frysings- og centrifugeringstrinnene gentoges endnu to gange. Under disse betingelser blev ca. 30% af den i agaroseskiven indeholdte DNA udstødt i supernatanten. Den udstødte DNA fældedes fra de forenede supernatanter og opløstes i 10 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol.

To pmol pPLc20 fordøjedes med BglII og BamHI, og fragmenterne separeredes på agarose-gel. Det mindste fragment (BglII-BamHI) elueredes fra gelen som beskrevet ovenfor og fordøjedes med BspRI, en isoschizomer af HaeIII (A. Kiss et al., "A New Sequence-Specific Endonuclease (Bsp) From Bacillus Sphaericus", Gene, 1, pp. 323-29 (1977)) til dannelsen af en blanding af BamHI-BspRI- og BspRI-BglII-fragmenter, den sidstnævnte

bærende P_L -promotoren. Enzymerne BglII og BamHI giver identiske åbne ender, således at en åben BglII ende kan snøres til en åbnet BamHI ende og vice versa. Endvidere er resultatet af ingen af afsnøringerne længere et substrat for BglII eller BamHI, men erkendes af enzymet Sau3A1 (Mbol)

5 (V. Pirotta, supra).

To pmol af det ovennævnte større pBR322-EcoRI-BamHI fragment snøres til 0,8 pmol af blandingen af BamHI-BspRI- og BspRI-BglII-fragmenter. Efter afsnøring (det åbne BamHI punkt på pBR322 fragmentet er tilgængelig for snøring til enten de åbne BglII- eller BamHI-punkter på

10 pPLc20 fragmenterne og det "flush-end"-behandlede EcoRI punkt for pBR322 fragmentet er tilgængeligt for snøring til BspRI (HaeIII) punkterne for pPLc20 fragmenterne) fordøjedes blandingen med BamHI til eliminering af de rekombinationsmolekyler, som indeholdt det uønskede BamHI-BspRI fragment indført i pBR322 vektoren. Den resulterende blanding transformere-

15 des til *E. coli* M5219, og transformanter udvalgte for resistens over for carbenicillin. Ialt 23 transformanter opnåedes. Alle disse transformanter var følsomme over for tetracyclin (også båret af pBR322), fordi BamHI restriktionen af pBR322 gjorde genet, der koder for Tet^R ikke længere intakt i det modificerede plasmid (figur 2).

20 Den fortsatte tilstedeværelse i disse kloner af det P_L -bærende BspRI-BglII fragment kontrolleredes ved fordøjelse af DNA'en med HincII. Da pBR322 indeholder to HincII punkter (J. Sutcliffe, supra), og det forventede λP_L fragment indeholder et enkelt HincII punkt (73,4% λ , figur 1) (B. Allet og R. Solem, supra), bør korrekt konstruerede rekombinats-DNA molekyler indeholde tre HincII punkter. Blandt de opnåede

25 23 transformanter indeholdt fem de tre forudsete HincII punkter. Tre af disse havde et unikt EcoRI punkt, hvilket indicerede, at den korrekte forbindelse mellem BspRI (HaeIII) punktet for pPLc20 fragmentet og "flush-end" EcoRI punktet for pBR322 fragmentet var blevet foretaget i

30 disse kloner. Disse tre kloner manglede også et BamHI punkt som forudset ved den forventede afsnøring af BglII enden af pPLc20 fragmentet til BamHI enden af pBR322 fragmentet. Én af disse kloner valgtes til yderligere arbejde og betegnedes pPLa23 (figur 2).

pPLa23 består af et pBR322 fragment, som forløber fra BamHI punktet

35 (basepar 377 for pBR322) til EcoRI punktet (basepar 4362 for pBR322) (J. Sutcliffe, supra) (figur 2). Den resterende del af pBR322 er i pPLa23 blevet erstattet af fragmentet af λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ DNA lokaliseret mellem HaeIII punktet ved 73,3% λ (nu et rekonstrueret EcoRI punkt) og

BglIII punktet ved 73,77% λ (nu et Sau3A punkt (figur 2). Størrelsen af dette fragment skønnedes ved agarose-gel elektroforese at være ca. 300 basepar. Inde i dette fragment er indeholdt $O_L P_L$ området og de første 115 nukleotider for N-gen-transkriptet (J. Dahlberg & F. Blattner, supra). Transkriptionsretningen af P_L -promotoren er fra BglIII punktet mod HaeIII punktet og løber i samme forstand som transkription fra β -lactamase protoren for pBR322 (J. Dahlberg & F. Blattner, supra; J. Sutcliffe, supra).

To egenskaber ved plasmidet er af særlig interesse: 1) områderne, som koder for P_L -promotoren og for β -lactamase genet er til stede på et enkelt BglIII fragment, delineret af BglIII punkterne ved basepar 2720 og 436 for pBR322 (figur 3) (J. Sutcliffe, supra; B. Allet og R. Solem, supra); V. Pirotta, supra). 2) Replikationsoprindelsen er lokaliseret på et 370 basepar BglIII fragment i nærheden af det β -lactamase-bærende BglIII fragment (figur 3). En funktionel replikationsoprindelse kræver, at bindingen omkring BglIII punktet ved position 2720 opretholdes (A. Oka et al, "Nucleotide Sequence Of Small Col E1 Derivatives. Structure Of The Regions Essential For Autonomous Replication And Colicin E1 Immunity", Mol. gen. Genet., 172, pp. 151-59 (1979)). Disse egenskaber ved pPLa23 blev udnyttet til indføring af en anden antibiotisk resistensmarkør i vektoren.

2. pPLa231 og pPLa2311 -- Indføring af en kanamycin resistensmarkør i pPLa23

Idet der nu henvises til figur 3 er de til fremstilling af andre vektorer ifølge opfindelsen fra pPLa23 anvendte trin afbildet. Disse trin beskrives nærmere nedenfor.

Et HaeII fragment, som koder for resistens mod kanamycin opnåedes fra plasmid pMK20 (M. Kahn et al., "Plasmid Cloning Vehicles Derived From Plasmids ColE1, F, R6K and RK2", Methods in Enzymology, 68, pp. 268-80 (1979)). Replikationsoprindelsen på plasmid pMK20 er stort set indeholdt inden for et 359 basepar HaeII fragment. Oprindelsen spænder imidlertid også over bindingen mellem dette fragment og et tilgrænsende HaeII fragment (M. Kahn et al., supra). Nukleotidsekvensen omkring dette HaeII punkt er identisk med den i pBR322 fundne sekvens omkring HaeII punktet ved position 2720 (A. Oka et al., supra; J. Sutcliffe, supra).

En blanding af pPLa23 og pMK20 fordøjedes til fuldstændighed med HaeII, gensnøredes og transformeret til E. coli M5219 ($CaCl_2$ kompe-

tent) (figur 3). Korrekt transformerede kolonier udvalgte på basis af deres resistens over for carbenicillin og kanamycin, fordi kun kloner indeholdende β -lactamase genet fra pBR322 og kanamycin genet fra pMK20 vil udvise dual antibiotisk resistens. Tolv dual resistente transformanter udvalgte. Plasmid DNA isoleredes fra disse transformanter som før og analyseredes ved HaeII restriktion og fragmentstørrelsesbestemmelse på en 6% acrylamid-gel. Fem af disse kloner havde kun tre HaeII fragmenter -- et HaeII fragment svarende til HaeII fragmentet for pPLa23, som bærer P_L -promotoren og β -lactamase genet, et HaeII fragment svarende til HaeII fragmentet på pMK20, som bærer genet for kanamycinresistens og et lille HaeII fragment, som også afledes af pMK20 og kræves til plasmid-replikation (figur 3).

De fem udvalgte kloner undersøgte yderligere til bestemmelse af orienteringen af kanamycin genet indeholdende HaeII fragment fra pMK20 med hensyn til det rekonstruerede EcoRI punkt i HaeII fragmentet fra pPLa23. Kanamycin genet indeholdende HaeII fragment fra pMK20 vides at indeholde et unikt asymmetrisk HindIII punkt (M. Kahn et al., supra) (figur 3). Derfor giver dette punkt et middel til bestemmelse af orienteringen af fragmentet.

De fem kloner fordøjedes med HindIII og EcoRI, og de resulterende fragmenter størrelsesbestemtes som før. Fire af fem kloner havde den større del af det HindIII-spaltede kanamycin gen indeholdende HaeII fragment fra pMK20 i nærheden af det lille HaeII fragment indeholdende oprindelsen. Én klon havde den modsatte orientering. Disse to sæt af kloner betegnedes arbitrært henholdsvis pPLa231 og pPLa2311 (figur 3).

pPLa2311 udvalgte arbitrært fra de ovenfor konstruerede plasmider, og nukleotidsekvensen af P_L området bestemtes.

Forud for sekventeringen fremstilledes to sæt restriktionsfragmenter fra pPLa2311 -- EcoRI-HincII fragmenter og HincII-EcoRI-XhoI fragmenter (ikke vist i figur 3). I begge tilfælde fordøjedes pPLa2311 med det første restriktionsenzym, og de resulterende fragmenter mærkedes med ^{32}P under anvendelse af T_4 polynukleotid kinase (P-L Biochemicals). Dernæst fordøjedes fragmenterne med det andet restriktionsenzym eller par af enzymer, i tilfælde af EcoRI-XhoI, og fragmenterne adskiltes på en 6% agarose-gel. Sekventering foretoges konventionelt under anvendelse af procedurerne ifølge A. Maxam & W. Gilbert, "A New Method For Sequencing DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, pp. 560-64 (1977).

Nukleotidsekvensen af dette område er afbildet i figur 6. Det for-

løber fra HaeII punktet i pBR322 til det rekonstruerede EcoRI punkt ved bindingen mellem λ fag fragmentet og pBR322. Den bestemte sekvens har følgende egenskaber i forhold til kendte sekvenser: (1) Nukleotidsekvensen for $O_L P_L$ operator-promotor området er identisk med sekvensen for dette område i fag λ (T. Maniatis et al., supra); (2) sekvensen mellem HaeII punktet og Sau3A punktet ved bindingen mellem λ fag fragment og pBR322 er identisk med bindingen i autentisk pBR322 (J. Sutcliffe, supra); (3) sekvensen af N-gen transkriptet er i overensstemmelse med den af Dahlberg & Greenblatt (supra) bestemte sekvens ved mRNA niveauet, bortset fra en fjernelse af en adenosinrest ved position 41 af transkriptet; og (4) sekvensen indeholder ikke oversættelsesstartsignalet for N-genet (N. Franklin & G. Bennett, "The N Protein Of Bacteriophage λ , Defined By Its DNA Sequence, Is highly Basic", Gene, 8, pp. 107-19 (1979)).

15

3. pPLa4 og pPLa8 -- Omdannelse af PstI punktet i β -lactamase genet for pPLa2311 til et BamHI punkt.

Figur 3 og 7 afbilder i skematisk oversigt omdannelsen af PstI punktet i β -lactamase genet for pPLa2311 til et BamHI punkt. Plasmid pPLa2311 lineariseredes med PstI. Efter phenol- og chloroformekstraktion fældedes DNA'en, genopløstes til en koncentration på 50 pmol/ml i 25 mM NaCOOCH₃ (pH 4,5), 1 mM ZnCOOCH₃, 125 mM NaCl og behandledes med S1 nuklease (Sigma) ved 1,5 enheder pr. pmol DNA i 90 minutter ved 25°C til fjernelse af de 3'-udragende ender (figur 7). Reaktionen afsluttedes ved tilsætning af EDTA til 5 mM. S1 nuklease fjernedes ved inkubation af blandingen i nærværelse af 0,2% SDS i 10 minutter ved 70°C efterfulgt af phenol- og chloroformekstraktion. DNA'en fældedes ved tilsætning af 4 vol. 2 M NH₄COOCH₃ og 14 vol. ethanol.

Den udvundne DNA "blunt-end"-snøredes til en 10 gange molært overskud af BamHI bindingsmolekyler (Collaborative Research In.) (C. Bahl et al. "A General Method For Inserting Specific DNA Sequences Into Cloning Vehicles", Gene, 1, pp. 81-92 (1977)) (figur 7). Efter spaltning med BamHI og gensnøring ved lav DNA koncentration (figur 7) spaltedes blandingen med PstI til modudvalgelse af de molekyler, som var undsluppet S1 nuklease behandling og bibeholdt et intakt PstI punkt. To μ g behandlet DNA transformerades dernæst i E. coli M5219, og transformanter udvalgtes ved hjælp af kanamycinresistens. Ialt 10 transformanter opnåedes, to af hvilke manglede et PstI punkt og havde fået et BamHI punkt. Rekombina-

35

tions-DNA molekylerne af de to sidstnævnte transformanter betegnedes pPLa8 og pPLa4 (figur 3, pPLa4 er ikke vist i figur 3). De efter kombi-
neret EcoRI-BamHI fordøjelse af rekombinations-DNA molekylerne af disse
transformanter opnået fragmenter comigrerede på en 1,4% agarose-gel med
5 de fragmenter, som var opnået af pPLa2311 efter EcoRI-PstI spaltning.
Derfor er PstI punktet i pPLa2311 blevet erstattet af et BamHI punkt.

Idet der igen henvises til figur 7, er afbildet virkningen af den
ovenfor beskrevne sekvens af trin på β -lactamase genet. Som vist i figur
7 er slutresultatet af konstruktionen en erstatning af Ala aminosyre-
10 resten ved position 182 i β -lactamaseproteinet med sekvensen Arg-Ile-
Arg. Da denne substituering vil efterlade læserammen i β -lactamase genet
intakt, forventedes det, at transformanter af de rekonstruerede kloner
ville udvise resistens over for carbenicillin. Uventet var værtsceller
transformeret med pPLa4 og pPLa8 ikke resistente over for carbenicillin.

15

4. pPLa83 -- Indføring af et BamHI punkt ved siden af
EcoRI punktet i pPLa8.

Plasmid pAD3 (en gave fra H. Schaller) indeholder en 47 basepar
sekvens indført i BamHI punktet på pBR322. Denne sekvens består af
20 følgende enheder -- BamHI punkt-EcoRI punkt-lactose operator-EcoRI
punkt-BamHI punkt. For at indføre denne sekvens i det rekonstruerede
BamHI punkt på pPLa8 fordøjedes pPLa8 og et 10 gange overskud af pAD3
med BamHI, genafsnøredes og transformeret til *E. coli* W6 (λ_{rex}) (figur
4). Transformanterne udvalgte på plader indeholdende minimalt medium,
25 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin, 0,1% glucose, 40 $\mu\text{g/ml}$ X gal (5-brom-4-chlor-3-
indolyl- β -D-galactosid) (J. Miller, Experiments In Molecular Genetics
(Cold Spring Harbor Laboratory), p. 48 (1972)), fordi tilstedeværelsen
af X gal farvestof tillader bestemmelse af transformanter, som
indeholder et lactose-operator fragment. I virkeligheden er lactose-ope-
30 rator holdige transformanter blå i dette medium og kan derfor let skel-
nes fra andre transformanter.

Rekombinations-DNA molekylerne isoleredes fra en af de blå kolonier
som før og fordøjedes med EcoRI. De resulterende to fragmenter comigre-
rede i det væsentlige på agarose-gel med to fragmenter opnået fra EcoRI-
35 BamHI fordøjelse af pPLa8 og bekræftede herved, at det ønskede 47 base-
par fragment fra pAD3 var blevet korrekt indført på det rekonstruerede
BamHI punkt i pPLa8. Plasmidet kaldtes pPLa83 (figur 4).

5. pPLa831 -- Bringning af et BamHI punkt
nærmere til P_L -promotoren i pPLa83.

For at bringe et BamHI punkt nærmere til P_L -promotoren i pPLa83 fjernedes EcoRI-EcoRI fragmentet ved fordøjelse af pPLa83 med EcoRI og
5 gensnøring ved fortyndet DNA koncentrering (figur 4). Transformering af de resulterende rekombinations-DNA molekyler i *E. coli* W6 (λ_{rex}) og dyrkning på plader indeholdende minimalt medium suppleret som før med X gal og kanamycin tillod udvælgelse af de kloner, som ikke længere indeholdt lactose-operator området. Restriktion af DNA fra en udvalgt trans-
10 formant med BamHI-XhoI og en sammenligning af migreringen af de resulterende fragmenter med de ved EcoRI-XhoI fordøjelse af pPLa8 opnåede to fragmenter bekræftede, at BamHI punktet i det modificerede plasmid som forventet var ca. 150 basepar fra P_L -promotoren. Det modificerede plasmid kaldtes pPLa831.

15 Det skal naturligvis forstås, at manipulationer svarende til de under ethvert af punkterne 3, 4 og 5 ovenfor beskrevne kan anvendes til tilvejebringelse af andre endonukleasegenkendelsespunkter mindre end end 300 basepar fra den valgte promotor og de valgte operatorer i vektorerne ifølge opfindelsen. Eksempler på sådanne manipulationer omfatter de
20 nedenfor beskrevne.

6. pPLa832 -- Indføring af et HindIII punkt ved
siden af BamHI punktet i pPLa831.

Plasmid pAD16 (en gave fra H. Schaller) indeholder et 36 basepar
25 fragment indført i BamHI punktet på pBR322 bestående af BamHI punkt-HindIII punkt-HindIII punkt-BamHI punkt. Til indføring af denne sekvens på BamHI punktet i pPLa831 spaltedes pPLa831 og et 10 gange overskud af pAD16 spaltedes med BamHI, genafsnøredes og transformerades i *E. coli* M5219 til udvælgelse for kanamycin resistens (figur 4). Da der ikke fin-
30 des nogen let screeningsmetode til bestemmelse af korrekt indføring af det ønskede BamHI fragment i pPLa831, afgang analyse af transformanterne, som voksede i nærværelse af kanamycin, a restriktionsspaltning af individuelle tilfældigt valgte kloner. Blandt 32 analyserede kloner fandtes én, som producerede to fragmenter efter spaltning med HindIII
35 (figur 4). Størrelsen af disse fragmenter kunne på en 1,4% agarose-gel ikke skelnes fra fragmenter opnået efter BamHI-HindIII spaltning eller EcoRI-HindIII spaltning af pPLa831. Dette modificerede plasmid kaldtes pPLa832.

B. Vektorer indeholdende P_L -promotoren i orientering efter urets retning med hensyn til replikationsoprindelsen

5

1. pPLc2 -- kloning af det P_L bærende fragment af pPLa832

En ækvimolær blanding af pBR322 og pPLa832 spaltes med BamHI og derefter med HindIII (figur 4). Blandingen gensnøredes og transformere-
10 des i M5219 til udvælgelse for resistens mod carbenicillin. Da korrekt fremstillede rekombinations-DNA molekyler af denne konstruktion ikke længere indeholder intakt gen for tetracyclin, screenedes transformant-
erne også for tab af resistens over for tetracyclin. Rekombinations-DNA molekylet isoleredes som før fra udvalgte transformanter og analyseredes
15 ved restriktion. Det udvalgte plasmid indeholdt et enkelt HindIII punkt. Forenet HindIII-BamHI fordøjelse producerede to fragmenter, som i det væsentlige comigrerede på agarose-gel med de to ved enkelt EcoRI for-
døjelse producerede fragmenter. Tilstedeværelsen af det P_L bærende frag-
ment verificeredes ved HincII fordøjelse. Dette enzym spaltede vektoren
20 i tre fragmenter, hvis størrelser var i overensstemmelse med strukturen af de i figur 4 viste fragmenter. Dette plasmid kaldtes pPLc2, hvor "c" tjener til at indicere orienteringen i urets retning af P_L -promotoren med hensyn til replikationsoprindelsen.

25 2. pPLc23 -- Fjernelse af ét EcoRI fra pPLc2

Plasmid pPLc2 indeholder to EcoRI punkter -- et afledt af stam-
pBR322-vektoren og et nær ved BamHI punktet indført ved indføring af
HindIII-BamHI fragmenterne fra pPLa832 (figur 4). Det fra pBR322 afledte
EcoRI punkt fjernedes ved spaltning af pPLc2 med HindIII og XhoI efter-
30 fulgt af fordøjelse med Bal31'en i 30 minutter ved 25°C i 0,6 M NaCl,
12,5 mM hver $CaCl_2$ og $MgSO_4$, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1). Exonu-
klease Bal31 nedbryder 3'- og 5'-termini på trinvis måde (H. Gray et
al., "Extracellular Nucleases of Pseudomonas Bal31. I. Characterization
of Single Strand-Specific Deoxyriboendonuclease And Double-Strand Deoxy-
35 riboexonuclease Activities", Nucleic Acids Res., 2, pp. 1459-92 (1975)).

Blandingen ekstraheredes med phenol og chloroform, fortyndes til en
DNA koncentration på 1 $\mu g/ml$ og afsnøredes. Efter afsnøring spaltedes
DNA'en igen med XhoI og HindIII til eliminering af parental plasmid

molekyler og transformerades til M5219 til udvælgelse for resistens over for carbenicillin. En transformant blev fundet, som manglede et HindIII og et XhoI punkt. Dette plasmid indeholdt et enkelt EcoRI punkt og besad tre HincII punkter (figur 4). Denne sidstnævnte egenskab bekræftede, at
5 P_L området stadig var til stede. Dette plasmid kaldtes pPLc23.

Til bestemmelse af graden af exonukleolytisk nedbrydning af Bal31 enzymet spaltedes pPLc23 DNA samtidigt med BamHI og PstI, og fragmenternes størrelsesbestemtes på en 1,4% agarose-gel. I forhold til PstI-BamHI fragmentformen udviste stam-pPLc2 PstI-BamHI-fragmentet fra pPLc23 en
10 fjernelse på mere end 800 basepar. Kombineret fordøjelse med EcoRI-PstI-HaeII i forhold til EcoRI-PstI spaltning bekræftede, at HaeII punktet ved bindingen mellem det P_L bærende fragment og kanamycinfragmentet var blevet bibeholdt.

15 3. pPLc236 -- Indføring af et HindIII punkt i pPLc23

Plasmid pPLc23 indeholder unike EcoRI og BamHI punkter lokaliseret ca. 150 nukleotider på nedstrømssiden fra P_L -promotoren (figur 4). Et HindIII indføringspunkt indførtes i pPLc23 ved afsnøring af BamHI-HindIII-HindIII-BamHI fragmentet opnået fra pPLa832 i BamHI punktet for
20 pPLc23. Transformanter opnåedes i M5219 og screenedes ved restriktionsanalyse for tilstedeværelsen af et HindIII punkt. Strukturen af en repræsentativ klon bekræftedes ved agarose-gel elektroforese på de efter PstI-EcoRI, PstI-BamHI eller PstI-HindIII fordøjelse opnåede fragmenter. De efter hver af disse kombinerede fordøjelser opnåede fragmenter
25 comigrerede i det væsentlige på en 1,4% agarose-gel, hvilket viser, at EcoRI, BamHI og HindIII punkterne er lokaliseret i den umiddelbare nærhed af hinanden. Dette plasmid kaldtes pPLc236 (figur 4).

Den større del af plasmid pPLc236 afledes af pBR322 fra BamHI punktet ved position 377 (J. Sutcliffe, supra) indtil i det mindste
30 starten af β -lactamase-genet omkring position 4160 (J. Sutcliffe, supra). Den resterende del er sammensat af 1) sekvenser afledt fra en del af kanamycin-genet, som befinder sig mellem XhoI punktet og én HaeII ende af dette fragment, 2) et HaeII-BamHI fragment indeholdende P_L promotoren omfattende ca. 300 nukleotider og afledt af pPLa832, 3) en
35 sekvens, der koder for BamHI-HindIII-HindIII-BamHI punkter.

4. pPLc28 -- Fjernelse fra pPLc236

Overlappende de to tilgrænsende HindIII punkter i pPLc236 findes et

BaII punkt (ikke vist i figur 4). Plasmidet indeholder et unikt PvuII punkt ved basepar 2067 for pBR322 delen (J. Sutcliffe, supra) (figur 4). Enzymerne BaII og PvuII producerer begge flush ender. pPLc236 DNA spaltedes med BaII og PvuII og genafsnøredes ved lav DNA koncentration.

- 5 Transformanter opnåedes i M5219 til udvælgelse for resistens over for carbenicillin. DNA for en repræsentativ klon analyseredes ved restriktion. BamHI spaltning producerede et enkelt fragment, der på 1,4% agarose-gel comigrerede med den større del af pPLc236 efter BamHI-PvuII spaltning. Forenet fordøjelse med enten PstI-EcoRI, PstI-BamHI eller PstI-
10 HindIII producerede i hvert tilfælde to fragmenter, hvoraf den mindste i det væsentlige comigrerede på en 1,4% agarose-gel med et PstI-EcoRI fragment opnået fra pPLc236. Dette plasmid kaldtes pPLc28 (figur 4).

pPLc28 kan lige som de øvrige plasmider beskrevet i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse naturligvis manipuleres yderligere
15 til indføring af andre restriktionspunkter. F.eks. er et fragment indeholdende følgende: Xba restriktionspunkt - Sal restriktionspunkt - Xba restriktionspunkt - Pst restriktionspunkt - Xba restriktionspunkt blevet indført i pPLc28 på HindIII restriktionspunktet. Dette plasmid kaldtes pPLc2819. En anden tilsvarende manipulation gav et plasmid indeholdende
20 fragmentet Pst restriktionspunkt - Sal restriktionspunkt - Xba restriktionspunkt - Sal restriktionspunkt - Xba restriktionspunkt indført på BamHI punktet i pPLc28. Dette plasmid kaldtes pPLc2833.

5. pPLc24 -- Indføring af ribosom-bindingspunktet
25 og aminoterminaldelen af bakteriofag MS2 replicase protein i pPLc28

Et 431 basepar EcoRI BamHI fragment, der koder for ribosom-bindingspunktet og de første 98 aminosyrerester i bakteriofag MS2 replicase-genet opnåedes fra plasmid pMS2-7 (R. Devos et al., "Construction And
30 Characterization Of A Plasmid Containing A Nearly Full-Size DNA Copy Of Bacteriophage MS2 RNA", J. Mol. Biol., 128, pp. 595-619 (1979)). Dette fragment indførtes i plasmid pPLc28 til erstatning for det oprindelige EcoRI-BamHI fragment deri (figur 5). Strukturen af det resulterende plasmid, kaldet pPLc24, verificeredes ved restriktionsanalyse med EcoRI-
35 BamHI og størrelsessammenligning af de resulterende fragmenter med de efter EcoRI-BamHI fordøjelse af pMS2-7 og pPLc28 opnåede. I pPLc24 foreløber translation af MS2 replicase protein fragmentet colineært med transkriptionen fra P_L -promotoren og er således under P_L kontrol.

Biologiske egenskaber af værtsceller transformeret med vektorerne ifølge opfindelsen

5 1. Stabilitet ved 28⁰C.

Stammer K12ΔHI eller M5219, der var transformeret med vilkårlige blandt de ovenfor beskrevne vektorer, dyrkedes ved 28⁰C i 20 generationer i LB medium uden udvælgelse for den antibiotiske resistens markør. Egnede fortyndinger af kulturerne blev dernæst pladeudstrøget ved 28⁰C
10 enten i nærværelse eller fravær af det ønskede antibiotikum. I alle tilfælde var antallet af opnåede kolonier det samme uanset udvælgelsen for den antibiotiske resistens, hvilket viste, at vektorerne var fuldt stabile i disse værter ved 28⁰C (se tabel I, infra).

Alle vektorer kunne også transformeres i en værtsstamme, der var
15 lysogen for bakteriofag λ. Sådanne stammer, hvor den iboende fag syntetiserer et vild-type cI produkt var levedygtigt ved forhøjet temperatur (37⁰C). I modsætning hertil kunne non-lysogene værter ikke transformeres med disse vektorer. I stedet indeholdt de sjældne transformanter opnået fra disse forsøg til stadighed vektorer med udslettelser, der
20 havde fjernet hele eller det meste af P_L området.

2. Opførsel af celler indeholder P_L vektorer efter forlænget induktion ved 42⁰C

Effektiviteten af pladeudstrygning ved 42⁰C af stammer K12ΔHI og
25 M5219 transformeret med vektorerne ifølge opfindelsen bestemtes enten i nærværelse eller fravær af antibiotisk udvælgelse.

Vektorer med P_L indført i urets omdrejningsretning med hensyn til replikationsoprindelsen (pPLc-type) opførte sig tilsvarende. De med pPLc236 opnåede resultater er anført i tabel I, infra. Stamme
30 K12ΔHI transformeret med pPLc236 var lige god ved pladeudstrygning ved 42⁰C og 28⁰C, uanset om antibiotisk udvælgelse anvendtes eller ikke. Stamme M5219 transformeret med pPLc236 havde ved pladeudstrygning på non-selektive plader en effektivitet på 1. Når imidlertid antibiotisk udvælgelse anvendtes, faldt effektiviteten af pladeudstrygningen med
35 mindst 1000 gange. Kolonier opnået ved 42⁰C på non-selektive plader havde ikke længere nogen resistens mod den antibiotiske markør.

Vektorer med P_L indført modsat urets omdrejning med hensyn til replikationsoprindelsen (pPLa-type) udviste et mere kompleks mønster for

kolonidannelse ved 42°C. Transformanter af stamme M5219 dannede ikke kolonier ved 42°C, selv i fravær af antibiotisk udvælgelse (effektiviteten af pladeudstrygning var mindre end 10⁻³, tabel I). Opførslen af transformanter af stamme K12ΔHI ved 42°C afhang af naturen af den til-

5 stedelevende vektor. F.eks., medens transformanter indeholdende pPLa832 til stadighed udviste i det mindste en 1000 reduktion af pladeudstrygningens effektivitet, både med og uden antibiotisk udvælgelse, udviste transformanter indeholdende pPLa23 eller pPLa2311 pladeudstrygnings-

10 effektiviteter varierende fra 1 til 10⁻³, ofte med vid heterogenitet i kolonistørrelse.

Ekspression af pPLa-type vektorer ved 42°C bevirker derfor interferens med værtsmetabolisme, hvilket gør cellerne ude af stand til at overleve ved denne høje temperatur, selv i fravær af udvælgelse for plasmidet. Denne virkning er mere udtalt ved anvendelse af M5219 værter.

15 Omvendt interfererer pPLc-type vektorer ikke direkte med værtscellemetabolisme, fordi der iagttages 100% overlevelse af inducerede celler i fravær af selektivt tryk. Fortsat transkription fra P_L-promotoren sideløbende med ekspression af N-genet i M5219 kan imidlertid resultere i inhibering af vektorreplikation i M5219 stammer. Dette er belyst ved den

20 manglende evne hos sådanne celler til at vokse ved 42°C på selektive plader.

Tabel I

Stamme	Vektor	Pladeudstrykningseffektivitet*			
		28°C		42°C	
		Uden udvælgelse	Med udvælgelse	Uden udvælgelse	Med udvælgelse
K12ΔHI	Ingen	1	-	1	-
	pPLa23	1	1	1 til $\leq 10^{-3}$	1 til $\leq 10^{-3}$
	pPLa2311	1	1	1 til $\leq 10^{-3}$	1 til $\leq 10^{-3}$
	pPLa832	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
	pPLc236	1	1	1	1
M5219	Ingen	1	-	1	-
	pPLa23	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
	pPLa2311	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
	pPLa832	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
	pPLc236	1	1	1	$\leq 10^{-3}$

26

* Bakterielle kulturer dyrkedes til mætning i LB medium ved 28°C i nærværelse af antibiotikum. Egnede fortyndinger blev udstrøget på plade enten i nærværelse eller fravær af antibiotikum og inkuberet ved 28°C eller 42°C. Antallet af opnåede kolonier bestemtes.

Ekspression af gener i vektorerne ifølge opfindelsen

1. Almen procedure

Vektorerne ifølge opfindelsen kan med nytte anvendes til fremstilling af en række polypeptider og proteiner ved indføring af DNA sekvenser omfattende gener, der koder for de ønskede polypeptider eller proteiner i vektorerne ved ét af endonuklease genkendelsespunkterne i nærheden af promotoren og operatoren, transformering af passende værter med vektorer indeholdende disse indførte DNA sekvenser, dyrkning af værterne og opsamling af polypeptiderne eller proteinprodukterne. Eksempler på sådanne polypeptider og proteiner omfatter leukocyt-interferon, insulin, antigener af hepatitis, antigener af mund- og klovssyge, fibroblast-interferon, humant væksthormon, immun-interferon og en lang række andre prokaryotiske, eukaryotiske og virale enzymer, hormoner, polypeptider, antigener og proteiner.

Til belysning af disse fremgangsmåder bestemtes syntesen af specifikke gen-produkter i vektorerne ifølge opfindelsen ved impuls-mærkning af inducerede celler og analyse af de mærkede proteiner ved polyacrylamidgel-elektroforese.

Celler transformeret med vektorerne ifølge opfindelsen dyrkedes i LB medium uden antibiotikum ved 28°C til en tæthed på 2×10^8 /ml. Cellerne opsamledes ved centrifugering og resuspenderedes i det oprindelige volumen af et medium bestående af 19 mM NH_4Cl , 86 mM NaCl , 42 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgSO_4 , 0,2% glucose, 0,05% casaminsyrer (Difco), 0,01% gærekstrakt og 50 µg/ml L-tryptofan til mærkning af cellerne med ^{14}C -aminosyreblending eller ovennævnte medium bortset fra en erstatning med 5% methionin prøvemedium (Difco) for casaminsyrerne og gærekstrakten til mærkning af cellerne med ^{35}S -methionin. Inkubation ved 28°C fortsattes i 60 minutter. Halvdelen af kulturen ændredes til 42°C. Til forskellige tidspunkter efter induktion som indikeret ved antallet af minutter anført over banerne i figur 8-11 mærkedes portioner fra kulturerne ved 28°C og 42°C med ^{14}C -aminosyreblending eller med ^{35}S -methionin (Amersham).

Inkorporering af mærkning afsluttedes ved phenolekstraktion. De syntetiserede proteiner fældedes fra phenollaget ved tilsætning af 5 vol. ethanol og genopløstes i 1% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8). Prøver kogtes i 5 minutter, centrifugeredes 12000 x g og elektroforesebehandledes i SDS-holdige polyacrylamid-

geler (10% til 15% acrylamid) i henhold til proceduren ifølge U. Laemmli, "Cleavage Of Structural Proteins During the Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4", Nature, 227, pp. 680-82 (1970). Efter elektroforese præpareredes gelerne for fluorografi i henhold til fremgangsmåden ifølge W. Bonner & R. Laskey, "A Film Detection Method For Tritium-Labelled Proteins And Nucleic Acids In Polyacrylamide Gels", Eur. J. Biochem., 46, pp. 83-88 (1974) bortset fra, at EN³HANCE (NEN) anvendtes i stedet for PPO-DMSO.

10 2. Prokaryotiske gener

(a) β -lactamase-genet

pPLa23 (figur 3) omfatter β -lactamase-genet i nedstrømsorientering fra P_L-promotoren. Derfor kan produktion af protein kodet for ved hjælp af β -lactamase-genet bestemmes som en indikation for effektiviteten af vektoren til ekspression af prokaryotiske gener.

Transformanter af K12 Δ HI og M5219 med pPLa23 -- E. coli K12 Δ HI (pPLa23) og E. coli M5219 (pPLa23) -- fremstilledes som foran beskrevet, og deres proteinsyntese bestemtes. Resultaterne er vist i figur 8. Her kan det ses, at der kort efter induktion af transformanterne ved 42°C skete en dramatisk forøgelse i syntesehastigheden for to proteiner med tilsyneladende olekylvægte på henholdsvis 27,5K og 30K. Størrelserne af disse udtrykte proteiner er i overensstemmelse med den forventede mængde af moden β -lactamase og dens prækursor (J. Sutcliffe, supra). Endvidere blev induceret syntese af disse proteiner ledsaget af en voksende enzymatisk aktivitet af β -lactamase bestemt ved fremgangsmåden ifølge O'Callaghan et al., "Novel Method For Detection Of β -Lactamases By Using A Chromogenic Cephalosporin Substrate", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1, pp. 283-88 (1972), og begge proteiner fældedes specifikt ved hjælp af anti- β -lactamase serum. Som kontrol bestemtes proteinsyntesen i værter, der ikke var transformeret med vektor pPLa23. Ingen syntese af nogen af de to ovenfor beskrevne proteiner iagttoges fra disse non-transformerede værter.

Som vist i figur 8 er det samlede mønster for proteinsyntese i disse transformanter meget lig hinanden ved 28°C og 42°C. Imidlertid synes syntesehastigheden af visse proteiner at blive ændret signifikant ved ændring af cellerne til 42°C. Tilsvarende opførsel er blevet iagttaget i celler, der ikke er transformeret med pPLa23. Endvidere bliver som vist i figur 8 den relative mængde af det største af de to β -lacta-

mase-relaterede proteiner -- den ubehandlede prækursor for β -lactamase -
 - større med tiden efter induktion. Denne forskydning mod en opbygning
 af prækursor-protein kan indicere en mætning af β -lactamase behandlings-
 maskineriet i cellen.

5 Til bestemmelse af den procentuelle syntese af β -lactamase i for-
 hold til total de novo proteinsyntese af transformanten blev protein-
 båndene for β -lactamsen (27,5K) og den prækursor (30K) udskåret fra den
 tørrede gel og deres radioaktivitet sammenlignet med den totale radio-
 aktivitet tilført gelen. Disse resultater er vist i tabel II.

10

Tabel II

Procentuel syntese af β -lactamase i forhold
 til total de novo proteinsyntese

15

Minutter efter induktion ved 42 ⁰ C	Stamme	
	K12 Δ HI	M5219
0-10	8%	9%
10-20	9%	16%
20-30	10%	25%
30-40	16%	24%
40-50	23%	30%
50-60	27%	-
60-70	30%	-
25 70-80	33%	-
Kontrol ved 28 ⁰ C	5%	4%

Som vist i tabel II når syntese af β -lactamase og dens prækursor et
 maksimalt niveau på ca. 30% af total de novo proteinsyntese i begge
 30 værtscellestammer. Kinetikken til opnåelse af dette niveau er imidlertid
 forskellig for de to stammer -- stamme K12 Δ HI er ca. 20 minutter efter
 stamme M5219 til opnåelse af 30% niveauet. Uden at det ønskes at være
 bundet af teori kan det være, at N-gen-produktet, som er coproduceret
 ved induktion af stamme M5219, men mangler i stamme K12 Δ HI, kan over-
 35 vinde visse transkriptionsfartnedsættende signaler i DNA sekvenserne på
 nedstrømssiden fra P_L-promotoren og herved fremskynde β -lactamase-
 syntese i stamme M5219.

Til bestemmelse af hastigheden af total proteinsyntese i disse

transformanter bestemtes total radioaktivitet inkorporeret i løbet af et specifikt tidsrum og sammenlignedes med den i løbet af 0-10 minutters intervallet inkorporerede (dvs. at oprindeligt interval arbitrært blev valgt som 100% for reference). Resultaterne er vist i tabel III.

5

Tabel III

Hastighed af total proteinsyntese

10	Minutter efter induktion ved 42°C	Stamme	
		K12ΔHI	M5219
	0-10	100%	100%
	10-20	104%	92%
	20-30	134%	56%
15	30-40	113%	31%
	40-50	120%	10%
	50-60	113%	7%
	60-70	96%	3%
	70-80	96%	3%
20	150-160	20%	-

Som vist i tabel III standses total proteinsyntese i *E. coli* M5219 hurtigt efter induktion. Dette stemmer overens med den tidligere iagttagne mangel på M5219 transformanter på at overleve 42°C. Ingen tilsvarende inhibering af proteinsyntese iagttages i *E. coli* M5219 (pBR322). En væsentlig reduktion i total proteinsyntese iagttages også i *E. coli* K12ΔHI (pPLa23) efter forlænget inkubation ved 42°C. Disse celler er imidlertid i stand til at overleve temperaturer på 42°C.

30 (b) Tryptofan syntetase A-genet

(i) pPLa23

Et EcoRI fragment (5300 b.p.) indeholdende *trp A* cistronet af *Salmonella typhimurium* opnåedes fra pES9 (E. Selker et al., "Mitomycin C Induced Expression Of *trp A* Of *Salmonella typhimurium* Inserted Into The Plasmid ColEI", *J. Bacteriology*, 129, pp. 388-94 (1977)) og indførtes i pPLa23 på dets EcoRI punkt. To repræsentative plasmider med dette fragment indført i hver af de to mulige orienteringer med hensyn til retningen af P_L-promotoren betegnedes pPLa23trpA₁ og pPLa23trpA₂.

35

Induktionsprofiler af stamme K12 Δ HI indeholdende enten pPLa23trpA₁ eller pPLa23trpA₂ er vist i figur 9. Et større protein på ca. 25000 daltons induceredes ved hjælp af pPLa23trpA₁, men manglede i inducerede celler indeholdende pPLa23trpA₂. Den observerede molekylvægt af dette protein er i overensstemmelse med den teoretiske værdi (28500) forudset ud fra nukleotidsekvensen af *S. typhimurium* trp A-genet (B. Nichols & C. Yanofsky, "Nucleotide Sequences Of trp A Of Salmonella tryphimurium And Escherichia coli: An Evolutionary Comparison", Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76, pp. 5244-48 (1979). Endvidere voksede enzymaktivitet i overensstemmelse med tilstedeværelsen af et trp A-genprodukt som bestemt i henhold til metoderne ifølge O. Smith & C. Yanofsky "Enzymes Involved In The Biosynthesis Of Tryptophan", Methods in Enzymology, 5, pp. 794-806 (1962) sideløbende med akkumuleringen af dette inducerede protein.

Efter forlænget induktion af både pPLa23trpA₁ og pPLa23trpA₂ syntetiseres et protein med en omtrentlig molekylvægt på 18K (figur 9). Den procentuelle syntese af dette protein i forhold til total de novo proteinsyntese af transformanten er uafhængig af orienteringen af EcoRI trp A fragmentet med hensyn til transkriptionsretningen fra P_L-promotoren. Derfor kontrolleres syntesen af dette protein formentlig af en måske let temperaturafhængig bakteriel promotor, som er til stede på 5300 basepar EcoRI trp A fragmentet, hvis kodningskapacitet i virkeligheden er meget større end nødvendig for trp A. (E. Selker, supra).

Den procentuelle syntese af trp A i forhold til den totale de novo proteinsyntese i transformanten bestemtes i det væsentlige som tidligere beskrevet for β -lactamase. Resultaterne er vist i tabel IV. Igen nåede trp A syntese et maksimalt niveau på ca. 30% af total de novo syntese.

30

35

Tabel IV

Procentuel syntese af trp A i forhold til
total de novo proteinsyntese

5	Minutter efter induktion ved 42 ^o C	K12ΔHI /pPLa23A ₁	K12ΔHI /pPLa23A ₂
	0-10	3%	2%
10	30-50	4%	2%
	60-80	14%	1%
	90-110	21%	2%
	120-140	24%	2%
	150-170	33%	2%
15	Kontrol ved 28 ^o C	2%	3%

(ii) pPLa2311

Et rekombinations-DNA molekyle identisk med pPLa23trpA₁, men baseret på pPLa2311, fremstilledes også i det væsentlige som tidligere beskrevet. K12ΔHI transformanter med pPLa2311trpA₁ opførte sig på tilsvarende måde som af pPLa23trpA₁ (bortset fra at det maksimale niveau af total de novo syntese i dette forsøg kun var 20% efter 150 minutter). Igen førte forlænget induktion til en netto formindskelse i total proteinsyntese.

25

(iii) pPLc23

EcoRI fragment af pES9 har én ende beliggende inden for trp B genet og indeholder et enkelt SalI punkt ca. 2500 basepar fra EcoRI punktet (E. Selker et al., supra). Da trp A genet ikke indeholder et SalI punkt (B. Nichols & C. Yanofsky, supra), må trp A genet være lokaliseret fuldstændigt i den del af EcoRI fragmentet af pES9, som strækker sig fra det første EcoRI punkt til SalI punktet. Derfor fordøjedes det tidligere fremstillede EcoRI fragment af pES9 med SaII, og det resulterende fragment indførtes i pPLc23 som en erstatning for EcoRI-SaII fragmentet deri (figur 4). Baseret på den iagttagne translationsretning af trp A genet i pPLa23trpA₁ og pPLa23trpA₂ blev det pPLc23 baserede rekombinations-DNA molekyle med trp A genet colineært med transkription fra P_L-motoren betegnet pPLc23trpA₁.

35

Ved induktion (42°C) af *E. coli* K12 Δ HI (pPLc23trpA₁) syntetiseredes trp A til et maksimalt niveau på ca. 40% af total de novo protein syntese efter 3 timers induktion. Endvidere blev dette høje niveau af de novo syntese opretholdt i 2 timer (figur 10). Disse resultater er vist i tabel V, infra. I modsætning til opførslen af pPLa-type vektorerne falder proteinsyntesen af pPLc-type transformanterne derfor ikke før indtil 5 timer efter induktion.

Tabel V

Minutter efter induktion ved 42°C	Procentuel syntese af trp A*	Hastighed for total proteinsyntese
30-50	11%	100% (reference)
60-80	17%	198%
120-140	31%	228%
180-200	41%	162%
240-260	36%	205%
300-320	39%	213%
Kontrol ved 28°C	3%	-

* I forhold til total de novo proteinsyntese.

Den aktuelle mængde induceret protein, som er akkumuleret i de ovennævnte transformanter målttes også ved hjælp af kontinuert mærkning af de inducerede celler. *E. coli* K12 Δ HI (pPLc23trpA₁) dyrkedes ved 28°C i LB medium til en tæthed på 1×10^7 celler/ml. Dernæst mærkede cellerne med $10 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -aminosyreblending. Ved en dyrkningstæthed på 4×10^7 celler/ml ændredes cellerne til 42°C , og inkubation fortsattes. Da kulturen nåede mætning (6 timer efter induktion), ekstraheredes proteinerne fra cellerne og adskiltes på SDS-polyacrylamidgeler. Den procentuelle inkorporerede radioaktivitet i trp A båndet bestemtes. Under de anvendte betingelser kan det antages, at cellerne er blevet ensartet mærket, således at den i et protein inkorporerede radioaktivitet reflekterer den aktuelle mængde af protein, som er til stede i cellen. trp A proteinet viste sig at udgøre 10% af totale celleproteiner.

Denne 10% koncentration af trp A i de totale celleproteiner af *E. coli* K12 Δ HI (pPLc23trpA₁) tjener også til påvisning af de vigtige forskelle mellem de λ P_L holdige vektorer ifølge H. Bernard et al.,

supra, og vektorerne ifølge den foreliggende opfindelse. I modsætning til den 10% aktuelle trp A koncentration, som tilvejebringes af vektorerne ifølge opfindelsen, rapporterer H. Bernard et al. kun en 6,6% koncentration af trp A -- skønnet på basis af trp A enzymatisk aktivitet og en antaget specifik aktivitet for proteinet. Det skal også bemærkes, at den af Bernard et al. rapporterede 6,6% trp A koncentration blev iagttaget med vektorer, som også omfattede et aktivt N-gen, og derfor var transkription formentlig foregået i nærværelse af det anti-terminerende N-gen-produkt. Kun en 2% trp A koncentration rapporteredes af H. Bernard et al. med en vektor, som ikke indeholdt et aktivt N-gen. I modsætning hertil fandtes den 10% trp A koncentration, som iagttoges med forbedrede vektorer ifølge opfindelsen, i fravær af N-gen-produkter. De foreliggende vektorer og fremgangsmåder udgør derfor en markant forbedring i forhold til de tidligere beskrevne vektorer og fremgangsmåder.

15

(c) Bakteriofag MS2 replicase protein gen

Plasmid pMS2-7 indeholder en nærværende fuld størrelse kopi af genomet af RNA bakteriofagen MS2 (R. Devos et al., supra). Fag-replicase genet (R) er indeholdt i et EcoRI-PstI fragment. Dette fragment indførtes i pPLa2311 ved simpel erstatning af EcoRI-PstI fragmentet for denne vektor. Transformanter *E. coli* K12ΔHI (pPLa2311R₁) screenedes for sensitivitet over for carbenicillin, da genet for ampicillin resistens ikke længere er intakt i pPLa2311R₁. Identiteten af det indførte fragment etableredes ved coelektroforese på agarose-geler med de kendte fragmenter fra pMS2-7 DNA. I pPLa2311R₁ forløber transkription af MS2 replicase proteinet colinear med transkription fra P_L-promotoren.

Inducerede celler af *E. coli* K12ΔHI (pPLa2311R₁) syntetiserer et protein med en tilsyneladende molekylvægt på 59K (figur 11). Størrelsen af dette protein er i overensstemmelse med den 60692 daltons molekylvægt, som beregnes for MS2 replicasen fra sekvens data for den virale RNA (W. Fiers et al., "Complete Nucleotide Sequence Of Bacteriophage MS2 RNA: Primary And Secondary Structure Of The Replicase Gene", *Nature*, 260, pp. 500-507 (1976)).

Tilstedeværelsen af funktionelt MS2 replicase protein i proteinprodukterne for celler transformeret med pPLa2311R₁ verificeredes også ved komplementationsanalyse med MS2 ambi-mutanter. Denne analyse bekræftede, at celler transformeret med pPLa2311R₁ producerede et produkt, som specifikt komplementerede produktet af en MS2 mutant bærende

en læsion i replicase genet, og at celler, som ikke var transformeret med pPLa2311R₁, ikke komplementerede produktet for en sådan mutant.

Med hensyn til MS2 replicase protein syntese opførte både E. coli K12ΔHI (pPLa2311R₁) og E. coli M5219 (pPLa2311R₁) sig tilsvarende
 5 -- efter 30 minutters induktion var den procentuelle syntese af MS2 replicase 29% af total de novo protein syntese, idet protein syntese niveauet hurtigt faldt ved yderligere induktion (figur 11). Da en sådan formindskelse i synteseniveauet ikke iagttoges ved syntesen af β-lactamase eller trp A, kan reduktionen være forårsaget af en besynderlig
 10 egenskab ved MS2 replicasen. F.eks. kan den iagttagne tendens hos fag-replicase til at binde til sin egen mRNA på et punkt nær midten af cistronen (Meyer et al., "The Binding Sites Og Qβ RNA", Experienta, 31, pp. 143 et seq. (1975)) interferere med yderligere translation af den kompleksbundne mRNA.

15

3. Eukaryotiske gener

(a) Small-t antigenet af Simian Virus 40 gen

Et HindIII DNA fragment indeholdende den fuldstændige kodnings-sekvens for SV40 small-t antigenet (G. Volckaert et al., "Nucleotide
 20 Sequence Of The Simian Virus 40 Small-t Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, pp. 2160-64 (1978)) indførtes i HindIII punktet på pBR322 (figur 12). Orienteringen af indføringen bestemtes ved restriktions-analyse baseret på tilstedeværelsen af et asymmetrisk lokaliseret TaqI punkt. Fra dette hybride DNA molekyle blev udskåret et EcoRI-BamHI frag-
 25 ment omfattende det ovennævnte HindIII fragment og portioner af pBR322, og indførtes i pPLc28 som erstatning for dets EcoRI-BamHI fragment, således at oversættelsesmåden for small-t antigenet forløbet colineært med transkription fra P_L-promotoren (figur 12). Det resulterende rekombinations-DNA molekyle kaldtes pPLC28SV_t5.

30 For at forkorte afstanden mellem P_L-promotoren og den initierende codon (ATG) for genet, der koder for small-t antigen, modificeredes pPLC28SV_t5 til eliminering af EcoRI-HindIII fragmentet mellem genet af P_L-promotoren. Disse manipulationer er vist i figur 12 og 13. De bestod i spaltning af pPLC28SV_t5 med ClaI, tilbagetygning af 3'-enden for
 35 DNA'en i to adskilte trin under anvendelse af 3' exonukleaseaktiviteten for T4 DNA polymerase i nærværelse af henholdsvis GTP og TTP, yderligere behandling med S1 nuklease, tilsætning af EcoRI bindere til den stumpede ende, spaltning af fragmentet med EcoRI og gensnøring af de

komplementære ender.

Transformation af *E. coli* K12ΔHI med disse modificerede hybride DNA molekyler og induktion bevirkede ekspression af temmelig store mængde af et protein med en tilsyneladende molekylvægt på 14K (figur 5 14). Dette protein produceredes ikke uden induktion og produceredes ikke af værtsceller, som ikke var blevet transformeret med vektorer indeholdende SV40 DNA.

Selv om autentisk small-t antigen har en molekylvægt på 19K, og det i disse transformerede celler producerede protein kun fældedes meget 10 svagt af antistoffer opfostret over for large-T antigenet af SV40, bekræftede to dimensionelle fingeraftryk (elektroforese ved pH 3,5 efter fulgt af kromatografi i butanol/eddikesyre/pyridin/vand (15:3:10:12)) af tryptiske peptider afledt af dette protein og autentisk small-t antigen, at de to var relateret. Uden at det ønskes at være bundet til teori, kan 15 det være, at den sekundære struktur af mRNA'en, som begynder ved P_L-promotoren, er en sådan, at initiering af en intern initierende codon af small-t antigen favoriseres i forhold til initiering af det sande startsignal. Denne hypotese stemmer også overens med den sekundære struktur, som kunne udledes under anvendelse af proceduren ifølge D. 20 Iserentant & W. Fiers, "Secondary Structure Of mRNA And Efficiency Of Translation Initiation", *Gene*, 9, pp. 1-12 (1980)) ud fra nukleotid sekvenserne af nogle af disse SV_t holdige vektorer.

Ét af de modificerede pPLc28SV_t5 rekombinations-DNA molekyler fremstillet ovenfor udtrykte mindre mængder af en 17K komponent foruden den 25 større 14K proteinkomponent. Dette molekyle kaldtes pPLcSV_t5-37. Selv om tilstedeværelsen af 17K proteinet kun kunne påvises initialt ved specifik immunofældning med large-T antiserum, tillod yderligere modifikation af molekylet forbedret syntese af 17K komponenten. Denne modifikation, som bestod i spaltning af pPLc28SV_t5-37 med EcoRI under forlængelse af 30 de recesserede 3'-ender med DNA polymerase I (K. Backman et al., supra) og gensnøring af de stumpe ender, kan have ændret den sekundære struktur af mRNA'en. Værter transformeret med pPLc28SV_t5-37-9 gav omtrentlig 4% af deres totale de novo proteinsyntese som en 17K proteinkomponent ved induktion. Disse resultater er vist i figur 14. Som vist i linie c i 35 figur 14 immunfældedes 17K komponenten med serum fra en SV40-tumor-bærende hamster i det væsentlige i samme omfang som autentisk small-t antigen dyrket i SV40 inficerede nyreceller fra afrikansk grøn abe.

(b) Human fibroblast interferon (HFIF) gen

Som beskrevet i EP patent nr. 41.313 indleveret 1. april 1981 indførtes genet, der koder for human fibroblast interferon i vektorer pPLa8 og pPLc24 til fremstilling af rekombinations-DNA molekyler, som er i stand til i transformerede værter efter passende induktion af udtrykke proteiner med en antiviral, fysio-kemisk, immunologisk og biologisk aktivitet, der tæt svarer til autentisk human fibroblast interferon.

(c) Et FMDV antigen gen

Som beskrevet i EP patent nr. 40.922 indleveret 11. maj 1981 indførtes en DNA sekvens, der koder for et polypeptid, som udviser specificiteten af FMD virale antigener, i vektor pPLc24 til dannelse af rekombinations-DNA molekyler, der er i stand til i transformerede værter efter passende induktion af udtrykke polypeptider med specificiteten for FMD virale antigener.

Mikroorganismer og vektorer fremstillet ved hjælp af de her beskrevne fremgangsmåder er eksemplificeret ved kulturer deponeret i American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA den 8. september 1980 og identificeret som PL-A til PL-D:

- A. E. coli M5219 (pPLa2311)
- B. E. coli K12 Δ HI (pPLa8)
- C. E. coli K12 Δ HI (pPLc28)
- D. E. coli M5219 (pPLc24)

Disse kulturer blev tildelt accessionsnumrene ATTC 31694-31697, respektive, og er blevet konverteret til deponeringer ifølge Budapest traktaten.

Endvidere er mikroorganismer og vektorer fremstillet ved hjælp af de her beskrevne fremgangsmåder og også indeholdende indførte DNA sekvenser til ekspression deri eksemplificeret ved kulturer deponeret i kultursamlingen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen in Gottingen, Vest-tyskland og identificeret som følger:

- HFIF-D: E. coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12) [DSM 1851]
- HFIF-E: E. coli K12 Δ HI (G-pPLa-HFIF-67-12) [DSM 1852]
- HFIF-F: E. coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19) [DSM 1853]
- HFIF-G: E. coli M5219 (G-pPLc-HFIF-67-8) [DSM 1854]

- FMDV-A: E. coli W6 (λ_{rex} - pPL-VP1-1) [DSM 1879]
 FMDV-B: E. coli NF1 ($\lambda\text{N}^{-}\text{cro}^{-}\text{cI}_{\text{ts}}$ -pPL-VP1-1) [DSM 1880]
 FMDV-C: E. coli NF1 ($\lambda\text{N}^{-}\text{cro}^{-}\text{cI}_{\text{ts}}$ -pPL-VP1-5) [DSM 1881]

5 Kulturer HFIF-D til HFIF-G blev deponeret den 5. juni 1980. Kulturer FMDV-A til FMDV-C blev deponeret den 30. juli 1980. Disse deponeringer er blevet konverteret til deponeringer ifølge Budapest traktaten.

Selv om der i det foregående er beskrevet et antal udførelsesformer af opfindelsen, er det klart, at den basale konstruktion kan ændres til
 10 tilvejebringelse af andre udførelsesformer, som udnytter fremgangsmåderne og midlerne ifølge den foreliggende opfindelse. Det vil derfor kunne indses, at opfindelsens rammer defineres af de følgende patentkrav snarere end af de specifikke udførelsesformer, som eksempelvis er anført i det foregående.

15

PATENTKRAV

20

1. Plasmid-vektor omfattende mindst én DNA sekvens, der omfatter den venstrevendte promotor og operator afledt af bakteriofag λ , $P_{L}O_{L}$, hvilken DNA sekvens er KENDETEGNET ved fraværet af et aktivt cro-gen og et aktivt N-gen, og ved i det mindste ét endonuklease genkendelsespunkt,
 25 hvilket endonuklease genkendelsespunkt er lokaliseret mindre end 300 basepar nedstrøms fra $P_{L}O_{L}$ og lokaliseret opstrøms fra vilkårlige sekvenser af λ DNA nedstrøms fra HaeIII punktet (73,1%), der kan være til stede i nævnte DNA sekvens, hvilken DNA sekvens yderligere omfatter, i et af nævnte endonuklease genkendelsespunkter, en DNA sekvens, som
 30 indeholder et kodningsområde for et eukaryotisk, prokaryotisk eller viralt protein, polypeptid, enzym, hormon, antigen eller fragment deraf.

35

2. Vektor ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, AT genkendelsespunktet omfatter EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, XbaI eller SalI.

3. Vektor ifølge krav 1 eller 2, KENDETEGNET ved, AT genkendelsespunktet, hvori DNA sekvensen er blevet indføjet, er lokaliseret mindre end 150 basepar nedstrøms fra $P_{L}O_{L}$.

4. Vektor ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, KENDETEGNET ved, AT den omfatter et ribosom bindingspunkt lokaliseret mellem $P_{L}O_{L}$ og endonuklease genkendelsespunktet, hvori DNA sekvensen er blevet
5 indføjet.

5. Vektor ifølge krav 4, KENDETEGNET ved AT ribosom bindingspunktet er afledt af bakteriofag MS2 replikase.

10 6. Plasmid-vektor ifølge krav 1, hvori DNA sekvensen indføjet i genkendelsespunktet indeholder kodningsområdet for et polypeptid valgt fra gruppen bestående af leukocyt interferon, fibroblast interferon, immun interferon, insulin, humant væksthormon, animalsk væksthormon, antigener af hepatitis og antigener af mund- og klovsyge.

15

7. Fremgangsmåde til fremstilling af en forbedret plasmid-kloningsvektor, KENDETEGNET ved, AT man i en eksisterende kloningsbærer indfører i det mindste én DNA sekvens, som omfatter den venstrevendte promotor og operator afledt af bakteriofag λ , $P_{L}O_{L}$, hvilken DNA sekvens er
20 karakteriseret ved fraværet af et aktivt cro-gen og et aktivt N-gen, tilvejebringende i nævnte kloningsbærer i det mindste ét endonuklease genkendelsespunkt, hvilket endonuklease genkendelsespunkt er lokaliseret mindre end 300 basepar nedstrøms fra $P_{L}O_{L}$ og lokaliseret opstrøms fra vilkårlige sekvenser af λ DNA nedstrøms fra HaeIII punktet (73,1%), der
25 kan være til stede i nævnte DNA sekvens, og i et af nævnte endonuklease genkendelsespunkter indfører en DNA sekvens, som indeholder et kodningsområde for et eukaryotisk, prokaryotisk eller viralt protein, polypeptid, enzym, hormon, antigen eller fragment deraf.

30 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, KENDETEGNET ved, At genkendelsespunktet omfatter EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, XbaI eller SallI.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 7 eller 8, KENDETEGNET ved, AT genkendelsespunktet, hvori DNA sekvensen er blevet indføjet, er
35 lokaliseret mindre end ca. 150 basepar nedstrøms fra $P_{L}O_{L}$.

10. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som af kravene 7-9, KENDETEGNET ved indføring af et ribosom bindingspunkt i vektoren mellem $P_{L}O_{L}$ og

endonuklease genkendelsespunktet, hvori DNA sekvensen er blevet indføjet.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, KENDETEGNET ved, AT ribosom
5 bindingspunktet er afledt af bakteriofag MS2 replikase.

12. Fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid, KENDETEGNET
ved, AT man dyrker en vært, som er transformeret med en plasmid-vektor
ifølge krav 1, og opsamler polypeptidet.

10

13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, KENDETEGNET ved, AT polypeptidet
omfatter leukocyt interferon, fibroblast interferon, immun interferon,
insulin, humant væksthormon, animalsk væksthormon, antigener af
hepatitis og antigener af mund- og klovtsyge.

15

14. Plasmid-vektor deponeret ved kultursamlingen Deutsche Sammlung
von Mikroorganismen og identificeret som DSM 1851, DSM 1852, DSM 1853,
DSM 1854, DSM 1879, DSM 1880 og DSM 1881 og ved American Type Culture
Collection og identificeret som ATCC 31694, ATCC 31695, ATCC 31696 og
20 ATCC 31697.

25

30

FIG. 1

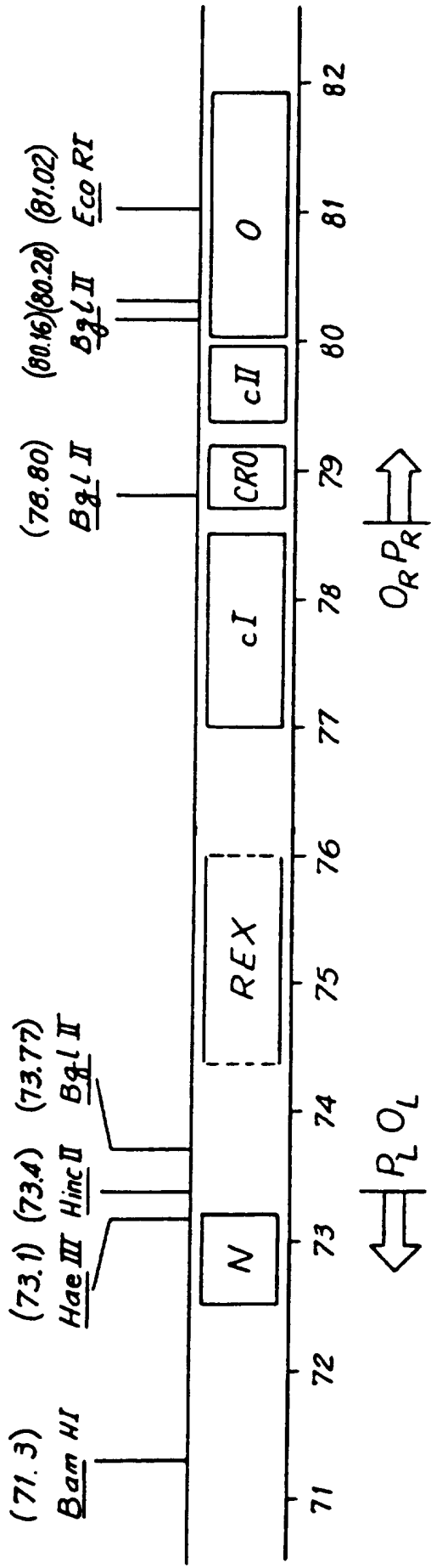


FIG. 2

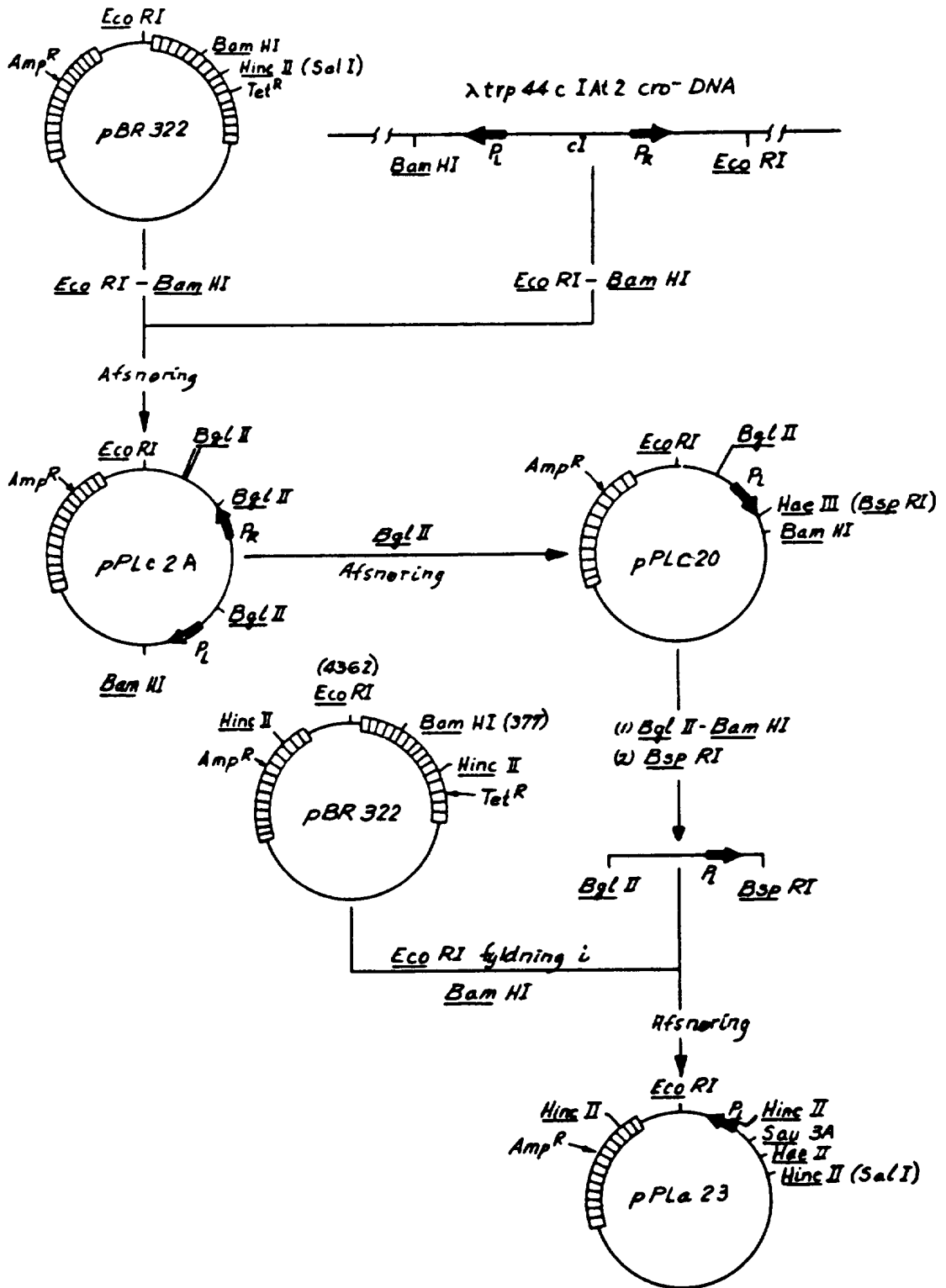


FIG. 3

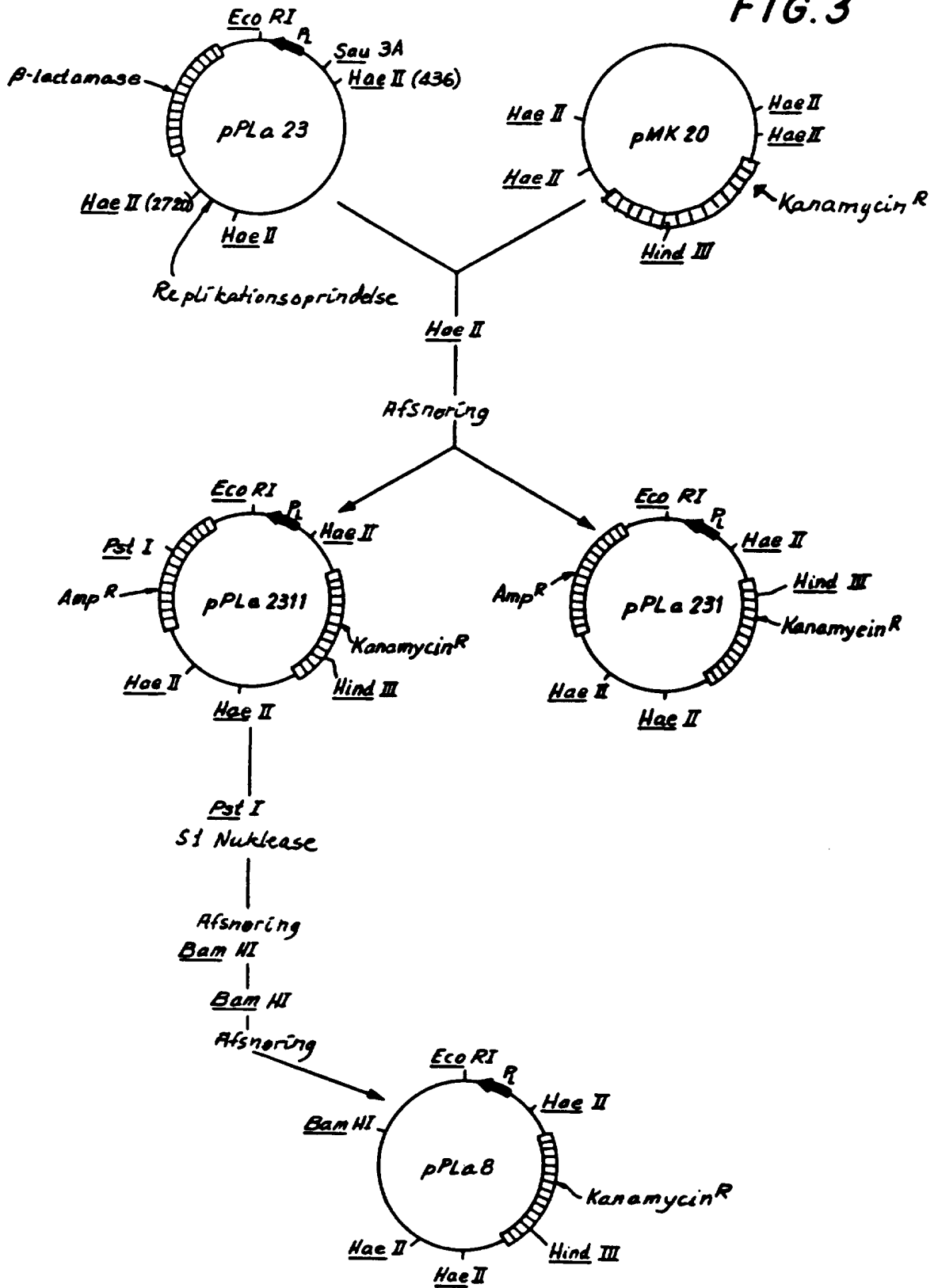


FIG. 4

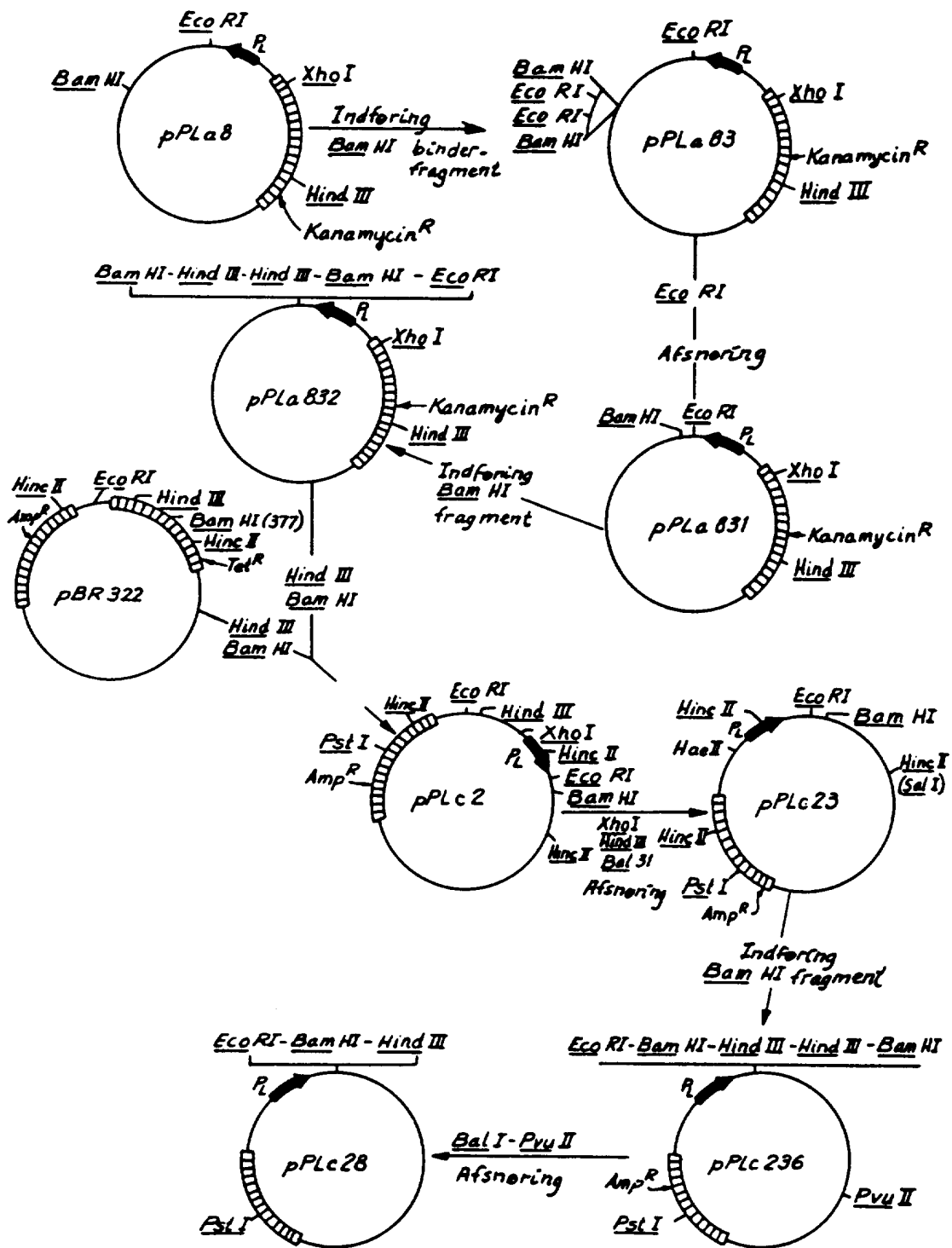


FIG. 5

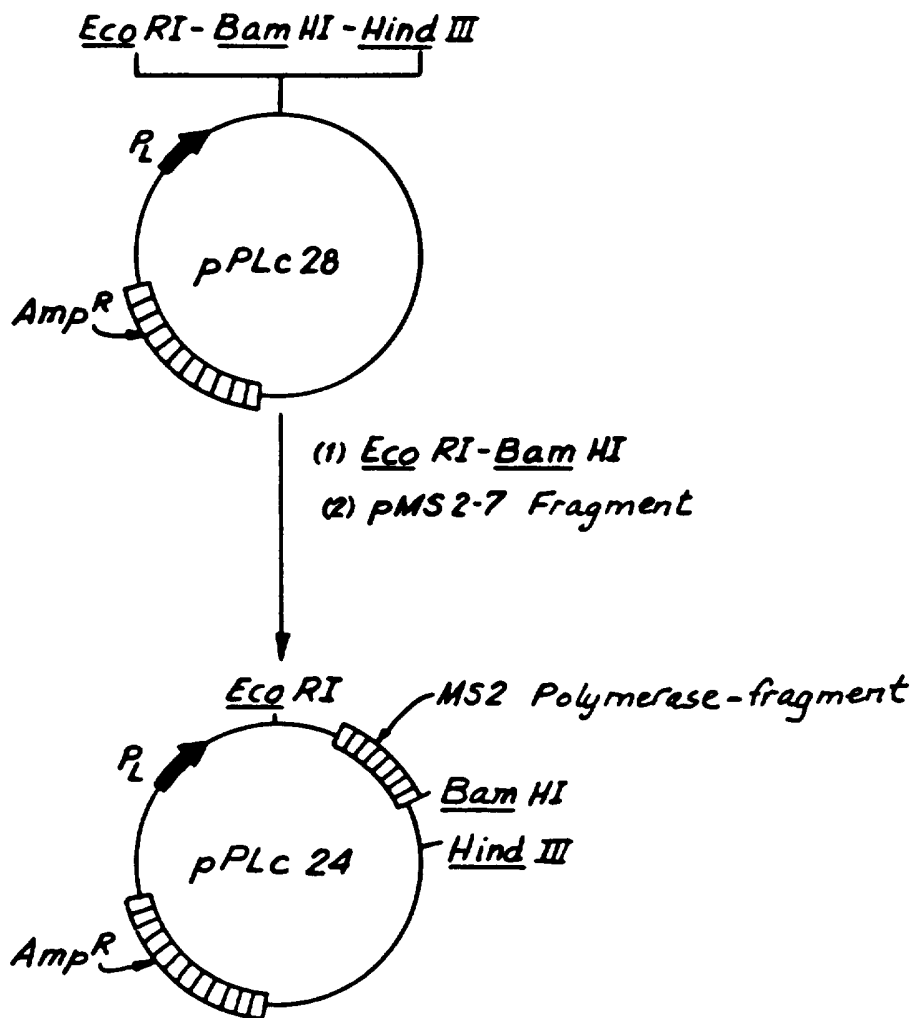


FIG. 6
LAMBDA Promoter P_L

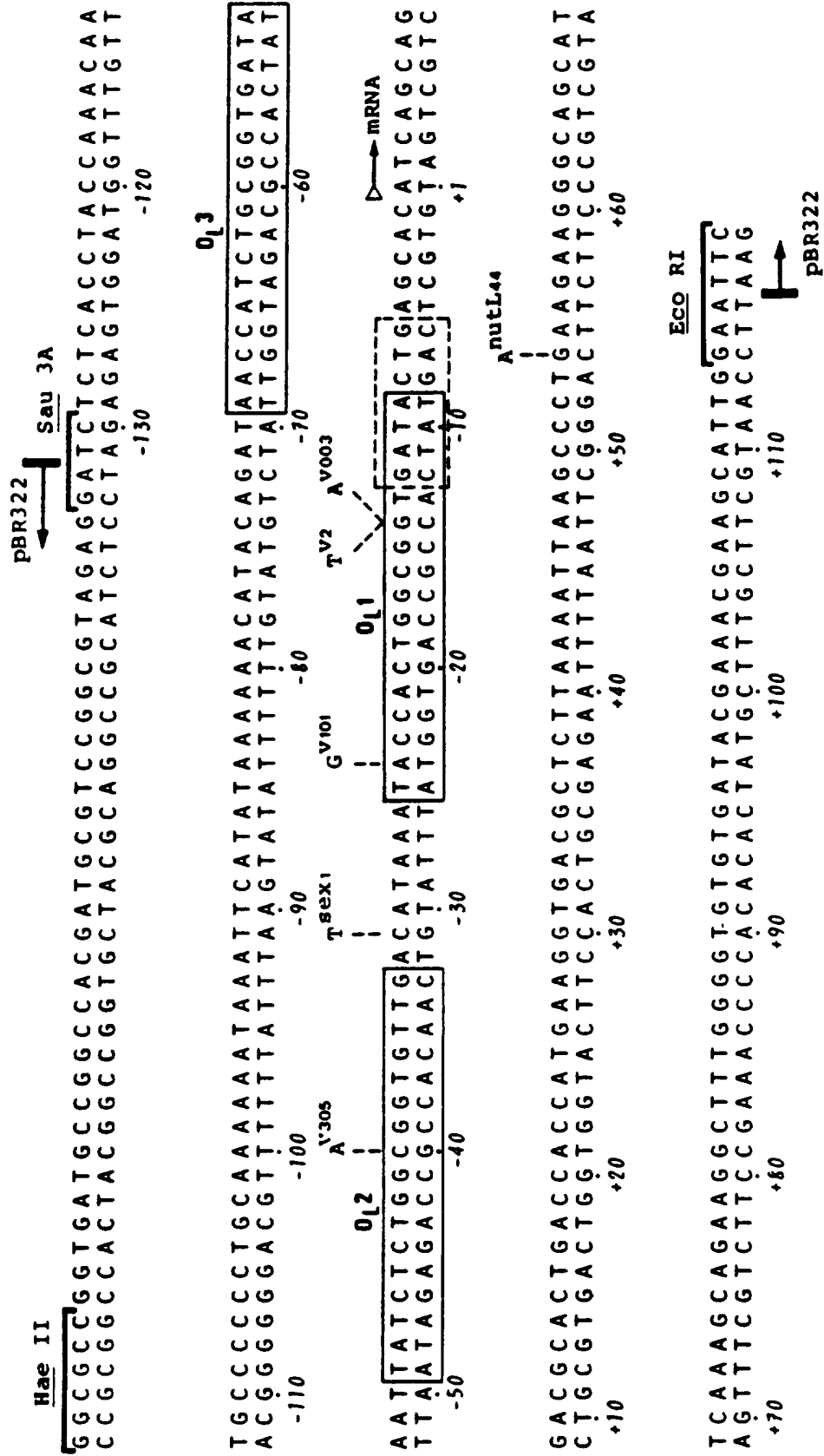
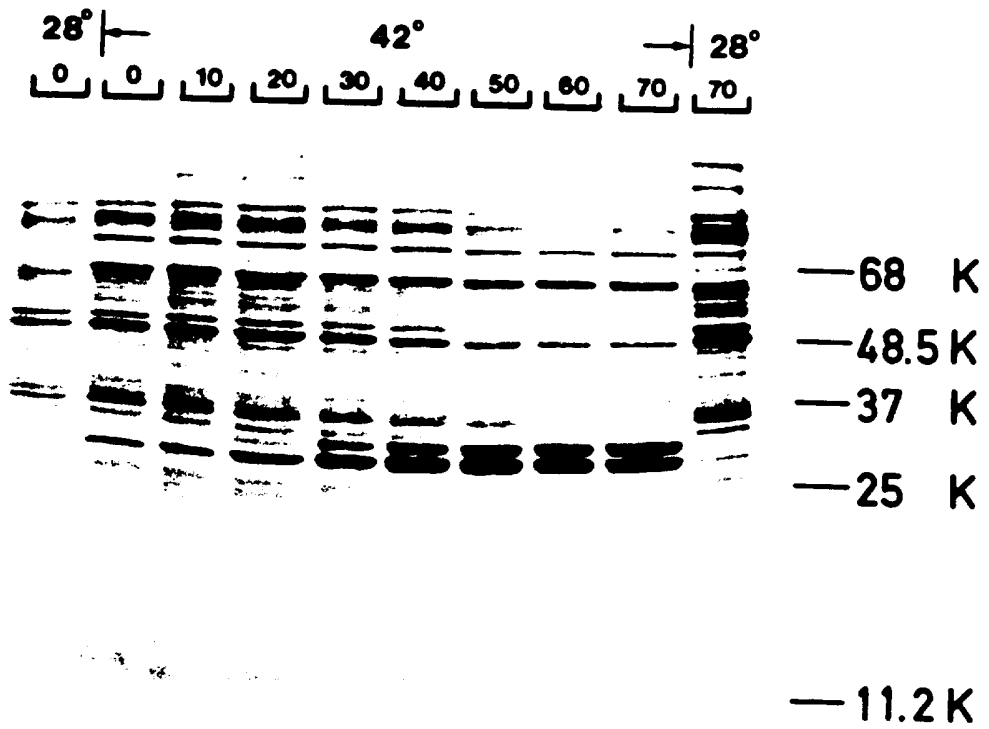


FIG. 8

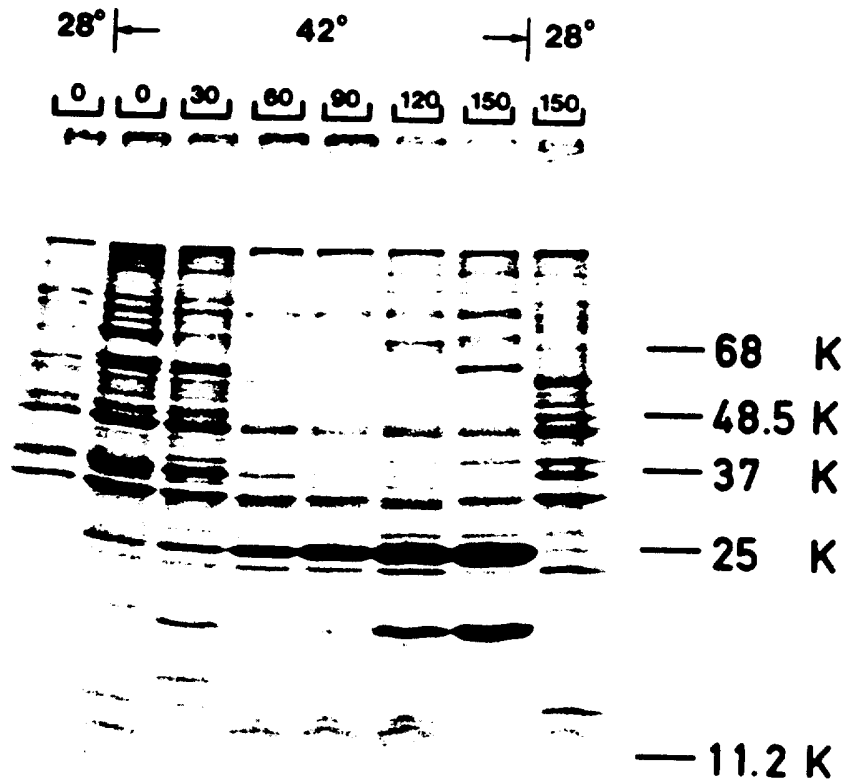


E. coli K12ΔHI (pPLa23)

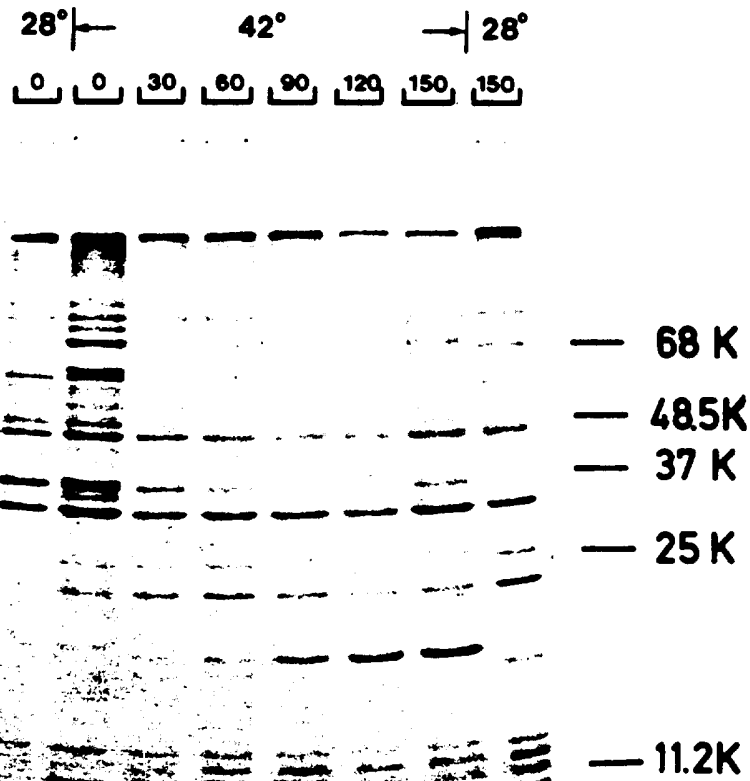


E. coli M5219 (pPLa23)

FIG.9

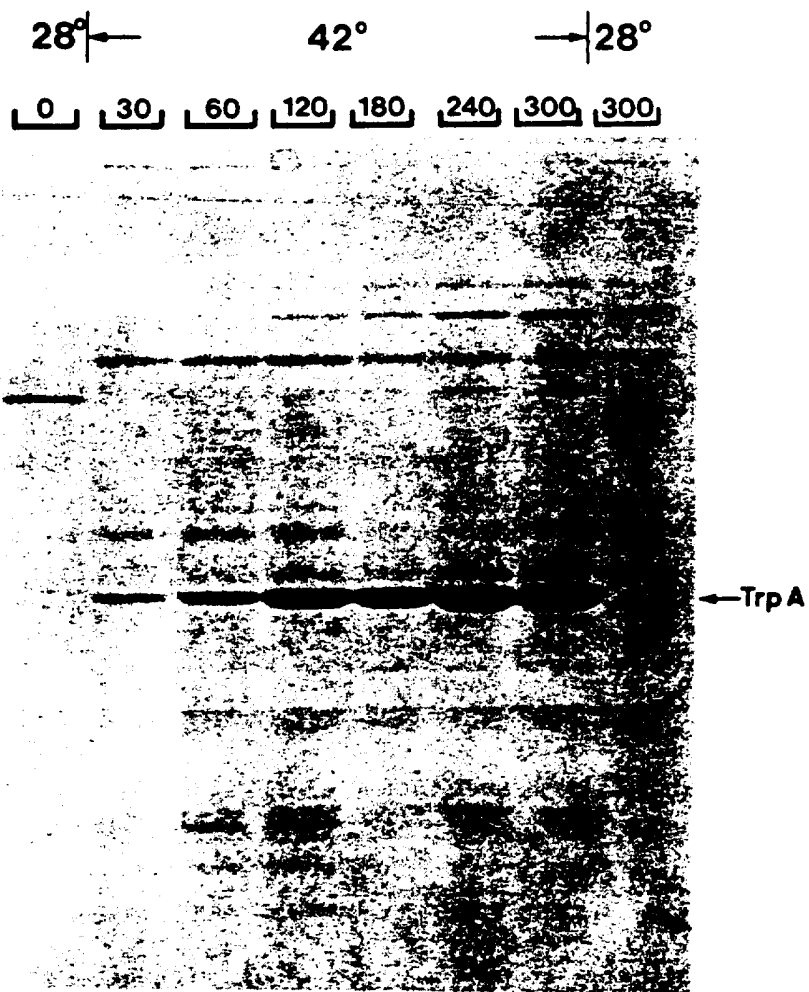


E. coli K12ΔHI (pPLa23trpA₁)



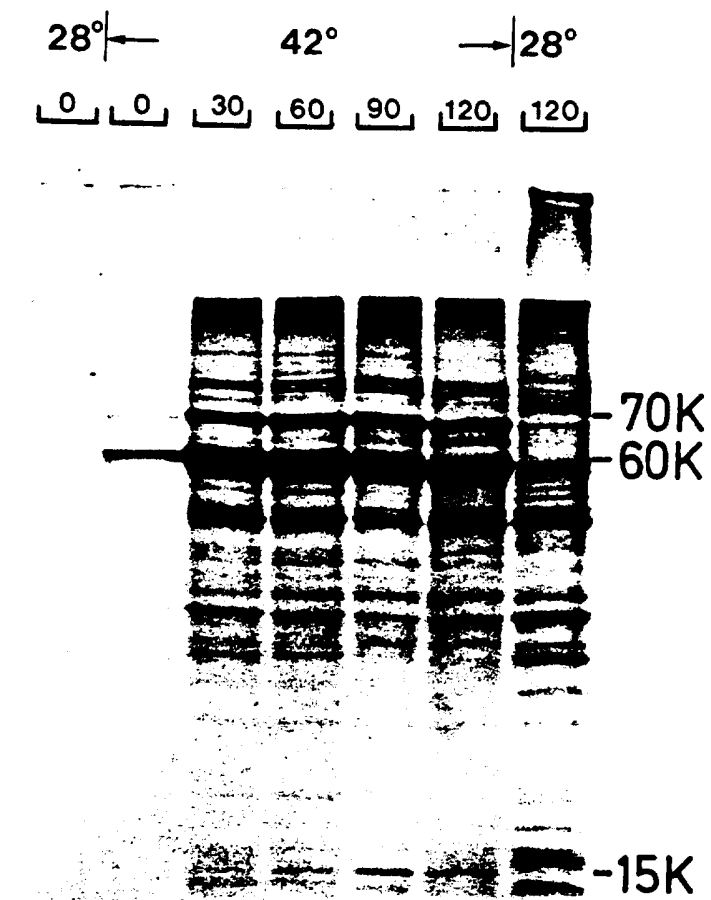
E. coli K12ΔHI (pPLa23trpA₂)

FIG. 10



E.coli K12ΔHI (pPLc23trpA₁)

FIG. 11



E. coli K12ΔHI (pPLa2311R₁)

FIG. 12

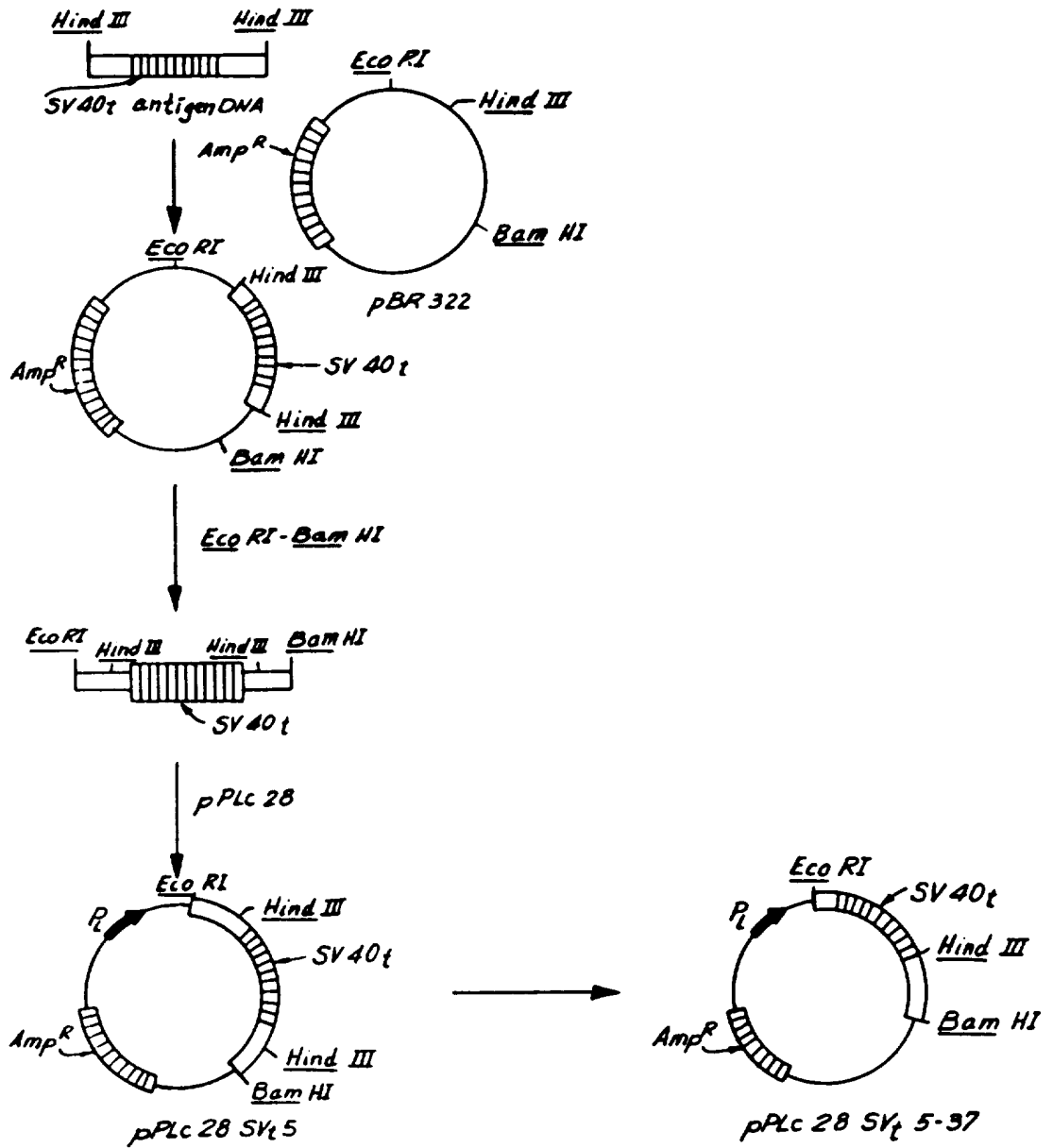
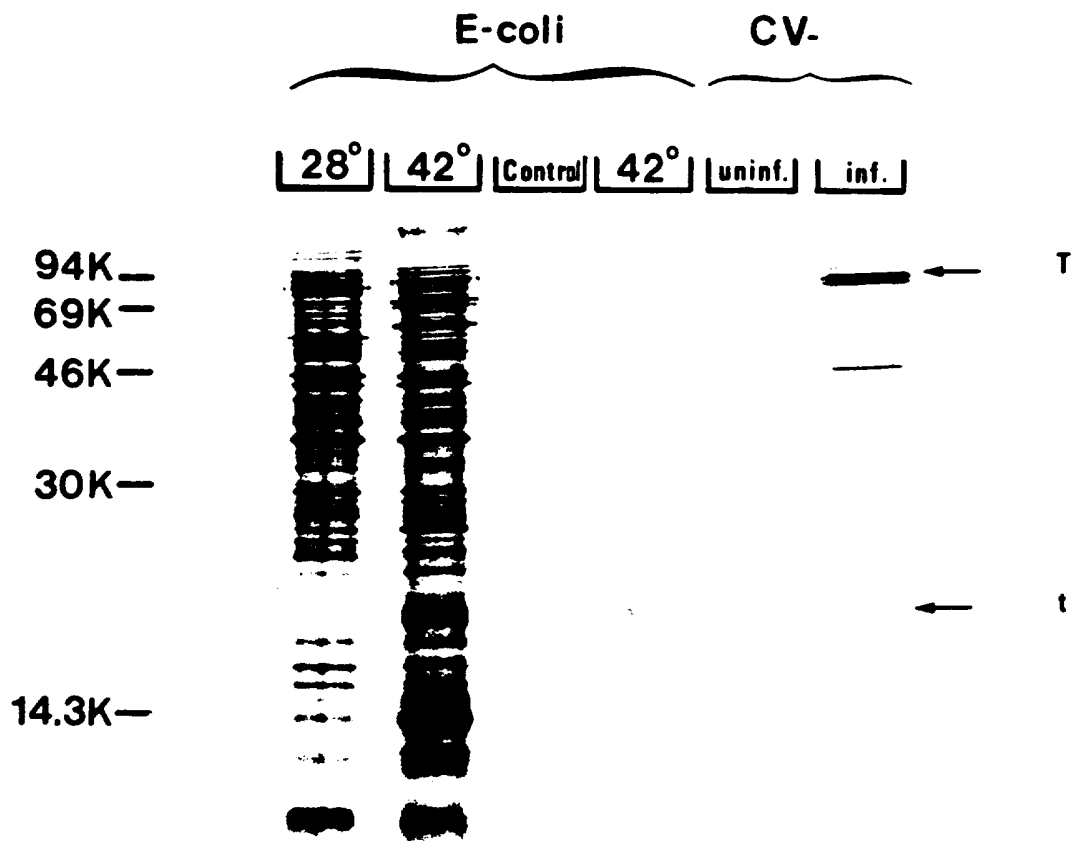


FIG. 14



E. coli K12ΔHI (pPLc28SV_t5-37-9)