

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COME
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-050457- -00013-0000

Fecha: 2012-02-24 15:58:01
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 12

Re: PI.-GLYCART BIOTECHNOLOGY AG.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCIÓN EFECTORA".-Clase C07K 16/28- Expediente número 06-050.457.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 15 de Diciembre de 2011.

2. Con el propósito de responder a las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **19417** en relación con la Claridad del Capitulo Reivindicatorio de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones, sino que además se establece de manera irrefutable la patentabilidad de la presente solicitud.

3. **CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

(a) En primera instancia, el Señor Examinador objeta la claridad de las reivindicaciones 7, 8 y 14 actualmente presentadas, señalando que *"la célula huésped debe ser definida como una línea celular o una célula recombinante caracterizada a partir del número de depósito y no por el resultado a alcanzar de la misma"*.

Sobre este particular **muy respetuosamente me permito resaltar que, contrario a lo afirmado por el Señor Examinador, el capítulo reivindicatorio como ha sido presentado se refiere de manera clara y suficiente a la célula huésped que es parte de la invención, toda vez que el solicitante no ha desarrollado una línea celular particular, ni es este el objetivo principal de la invención, sino que la célula huésped que es reclamada por la solicitud en estudio corresponde a cualquier célula que haya sido transfectada con los polinucleótidos necesarios para la expresión del anticuerpo de la invención,**

y que posea la maquinaria suficiente para la glicosilación específica del Fc de dicho anticuerpo.

Por lo tanto, para la identificación y caracterización completa de dicha célula, el solicitante no requiere demostrar su existencia a través de un depósito de material biológico, toda vez que la descripción completa de las características celulares puede realizarse únicamente refiriéndose a los genes particulares que la distinguen.

En este sentido me permito resaltar que para la persona versada en la materia sería evidente que para obtener el anticuerpo objeto de la presente solicitud no se requiere desarrollar una línea celular particular, sino que cualquier célula eucariota usada generalmente dentro del campo técnico de la invención para la expresión de genes recombinantes podría ser adecuada para obtener dichos anticuerpos, una vez esta célula haya sido transformada para incluir el DNA que codifica las regiones variables desarrolladas por el solicitante.

Es así como el párrafo [0130] de la página 61 de la descripción de la solicitud, se refiere claramente a que cualquier línea celular eucariota podría ser empleada para obtener los anticuerpos de la invención:

"[0130] Generalmente, se puede usar cualquier tipo de línea de célula cultivada para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferida, se usan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER. C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta como la línea de célula patrón para generar las células huésped diseñadas de la invención."

Por lo tanto, la referencia hecha a la célula huésped en las mencionadas reivindicaciones 7, 8 y 14 sería suficiente para que la persona versada en la materia delimitara el alcance de la invención, toda vez que la característica distintiva de la célula no es la totalidad de su genoma, sino que esta contiene la información genética suficiente para producir los anticuerpos que son objeto de la solicitud en estudio con la glicosilación particular deseada.

En este sentido es pertinente resaltar que la mención dentro de las reivindicaciones con respecto a que la célula expresa el anticuerpo de la invención de ninguna manera puede ser considerado como un "resultado a alcanzar" toda vez que esta es la mejor manera de describir dicha célula, dado que la característica que

permite distinguirla de todo lo existente es precisamente el hecho de que contiene la información genética suficiente para la producción de dicho anticuerpo.

A pesar de todo lo anterior, el solicitante desea clarificar aún más la reclamación de estas células por lo que ha **modificado la reivindicación 7** actualmente presentada de manera que se indique expresamente que la célula huésped que es objeto de reclamación está transfectada con polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo de la invención, y que dicha célula tiene la maquinaria necesaria para glicodiseñar la región Fc de dicho anticuerpo.

Así mismo, **se han modificado las reivindicaciones 8 y 14** actualmente presentadas, con el fin de hacerlas congruentes con la reivindicación 7 modificada.

En conexión con estas reivindicaciones, me permito resaltar que los párrafos [0137] a [0142] y [0146] a [0162] de las páginas 68 a 75 de la descripción de la solicitud proporcionan una guía detallada de cómo preparar una célula huésped de manera que la región Fc esté glicodiseñada y tenga una incrementada función efectora (actividad ADCC).

En este sentido, los párrafos [0133] a [0136] revelan cómo preparar una célula huésped que exprese un vector que contenga un anticuerpo según se reclama en las reivindicaciones 1 a 6 la cual está caracterizada porque dicho vector corresponde a aquel referido en la reivindicación 12.

Igualmente, los ejemplos contenidos dentro de la descripción de la solicitud describen la generación de células huésped representativas que producen los anticuerpos de la presente invención, como lo evidencian los párrafos [0207] a [0224] de las páginas 89 a 96 de la descripción, donde se muestra la generación de células huésped que expresan GnTIII y producen variantes glicodiseñadas de anticuerpos anti-CD20 representativos.

Adicionalmente, dentro de este marco de ideas considero pertinente resaltar las disposiciones del Artículo 29 de la Decisión Andina 486 de 2000:

*"Artículo 29.- Cuando la invención se refiera a un producto o a un procedimiento relativo a un material biológico y **la invención no pueda describirse de manera que pueda ser comprendida y ejecutada por una persona capacitada en la materia técnica**, la descripción deberá complementarse con un depósito de dicho material."* (Resaltado fuera de texto).

En vista de todo lo anterior, **es evidente la persona versada en la materia podría entender claramente a partir de las enseñanzas de la descripción de la solicitud que las células huésped de la invención expresan los anticuerpos que comprenden las secuencias específicas que se describen en las reivindicaciones 1 a 3 y tienen una región Fc glicodiseñada como se describe en las reivindicaciones 4 a 6 y corresponden a cualquier célula eucariota que comprenda el material genético necesario para esta expresión, y por lo tanto, no se requeriría un depósito de material biológico para definir de manera completa la célula huésped que hace parte del desarrollo hecho por el solicitante, y las reivindicaciones 7, 8 y 14 (nueva reivindicación 13) modificadas serían totalmente claras al referirse a dicha célula huésped.**

(b) De otra parte, el Señor Examinador indica *"el polinucleótido que codifica el anticuerpo de la solicitud, debe ser definido a partir de las secuencias (SEQ N°) e incluir la estructura completa del anticuerpo reclamado, es decir indicar las secuencias nucleótidas tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada (reivindicaciones 9 a 12)"*.

A este respecto **muy comedidamente me permito señalar que la persona versada en la materia reconocería que sería una restricción injusta definir el polinucleótido que codifica un anticuerpo por una sola secuencia de nucleótidos particular, toda vez que dentro del campo técnico de la invención es conocido que más de una secuencia de nucleótidos puede codificar la misma secuencia de aminoácidos.**

En este sentido, me permito resaltar que para dicha persona versada en la materia sería claro que el código genético es degenerado y un mismo aminoácido puede ser codificado por más de un codón¹:

Table 38-1. The genetic code (codon assignments in mammalian messenger RNA).¹

First Nucleotide	Second Nucleotide				Third Nucleotide
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term ²	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile ²	Thr	Lys	Arg ²	A
	Met	Thr	Lys	Arg ²	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

¹ Murray, et al. "Harper's Illustrated Biochemistry" 26th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2003, página 359.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

4. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que en virtud de las modificaciones realizadas y discutidas en el presente memorial, el capítulo reivindicatorio modificado es totalmente claro y conciso al reclamar los anticuerpos anti-CD20 humanizados que son objeto de la presente invención, las células huésped y los polinucleótidos que los expresan, en concordancia con las enseñanzas de la descripción de la solicitud.

Es así como las reivindicaciones 7, 8 y 14 (nueva reivindicación 13) modificadas describen de forma clara y pertinente a la célula huésped relacionada con la presente invención, y las reivindicaciones 9, 10 y 12 (nueva reivindicación 11) reclaman de manera precisa el polinucleótido que hace parte del aporte realizado por la presente solicitud.

En este sentido me permito señalar que las modificaciones realizadas de ninguna manera constituyen una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está definiendo más claramente las realizaciones preferidas de acuerdo con lo revelado dentro de la descripción de la solicitud.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado es totalmente claro y conciso al reclamar el objeto de la presente solicitud y por lo tanto dicho capítulo reivindicatorio cumple a cabalidad con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. Anexo me permito presentar:

(a) Copia de las páginas **107 a 110** que corresponden al nuevo capítulo reivindicatorio, constituido por **18** reivindicaciones;

(b) Copia de la portada y de la página 359 del documento: Murray, et al. "*Harper's Illustrated Biochemistry*" 26th edition, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2003; y

(c) Copias de la página 316 del documento: David L. Nelson, Michael M. Cox, "*Lehninger Principles Of Biochemistry*" 5th Edition, Freeman and Company, New York 2008.

JOSÉ LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

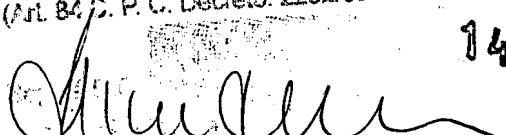
6. En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y de las modificaciones realizadas y conceder el privilegio de patente solicitado.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

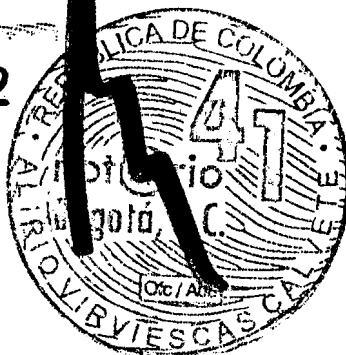
T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con: 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 33215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 05)


ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713.de Usaquén

14 FEB. 2012



Módulo de
C.C. 1.015.7.213
V.B.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado glicodiseñado anti-CD20 Tipo II que tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementada como un resultado de dicho diseño, y teniendo una habilidad incrementada para inducir apoptosis de células objetivo luego de dicha humanización, donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo murino B-Ly1, donde:

- a. el CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO:16;
- b. el CDR2 de cadena pesada es SEQ ID NO:26; y
- c. el CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO:28;

donde las regiones marco (FRs) de las regiones variables de cadena pesada, FR1, FR2 y FR3 de dicho anticuerpo son secuencias FR humanas codificadas por la secuencia VH1_10 de la línea germinal humana y la región variable de cadena pesada FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia humana FR codificada por la secuencia JH4 de la línea germinal humana; y

donde dicho anticuerpo además comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRs del anticuerpo murino B-Ly1, donde:

- d. el CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO:18;
- e. el CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO:19; y
- f. el CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO:20; y

donde las regiones variables de cadena ligera FRs, FR1, FR2 y FR3 de dicho anticuerpo son secuencias FR humanas codificadas por la secuencia VK2_40 de la línea germinal humana y la región variable de cadena ligera FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia humana FR codificada por la secuencia JK4 de la línea germinal humana.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende un primer polipéptido aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:40.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo comprende un segundo polipéptido aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 76.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho anticuerpo tiene una región Fc con oligosacáridos modificados.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, donde al menos el 20% de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo son bisecados, no fucosilados.
6. El anticuerpo de la reivindicación 4, donde al menos el 50% de los oligosacáridos de la región Fc de dicho anticuerpo son no fucosilados.
7. Una célula huésped que expresa el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, dicha célula huésped caracterizada por estar transfectada con uno o más polinucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo y comprenden al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III que se expresa en una cantidad suficiente para glicodiseñar la región Fc.
8. La célula huésped de la reivindicación 7, donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica a una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.
9. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que comprende la región variable de cadena pesada de la reivindicación 2, o la región variable de cadena ligera de la reivindicación 3, o una combinación de las mismas, donde el polipéptido es una parte de un anticuerpo humanizado glicodiseñado anti-CD20 Tipo II que tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementada como un resultado de dicho diseño, y teniendo una habilidad incrementada para inducir apoptosis de células objetivo luego de dicha humanización.
10. El polinucleótido aislado de la reivindicación 9, donde dicho polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena pesada de dicho polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 39.

11. El polinucleótido aislado de la reivindicación 9, donde dicho polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena ligera de dicho polipéptido comprende la secuencia SEQ ID NO:75.

12. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

13. Una célula huésped que expresa el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.

14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un método para producir un anticuerpo anti-CD20, dicho método comprende:

a. cultivar una célula huésped de la reivindicación 13 bajo condiciones que permitan la producción de dicho anticuerpo; y

b. aislar dicho anticuerpo.

16. Un método para producir en una célula huésped un anticuerpo anti-CD20 que tiene una región Fc con oligosacáridos modificados y diseñada para tener una función efectora aumentada, dicho método comprende:

a. cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permitan la producción de dicho anticuerpo, y el cual permite la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicho anticuerpo; y

b. aislar dicho anticuerpo;

donde dicho anticuerpo es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia de región variable seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID No : 40 y SEQ ID No: 76, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, donde dichos oligosacáridos modificados tienen una fucosilación reducida comparada con los oligosacáridos no modificados.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo producido por dicha célula huésped tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido.

a LANGE medical book

Harper's Illustrated Biochemistry

twenty-sixth edition

Robert K. Murray, MD, PhD

*Professor (Emeritus) of Biochemistry
University of Toronto
Toronto, Ontario*

Daryl K. Granner, MD

*Joe C. Davis Professor of Biomedical Science
Director, Vanderbilt Diabetes Center
Professor of Molecular Physiology and Biophysics
and of Medicine
Vanderbilt University
Nashville, Tennessee*

Peter A. Mayes, PhD, DSc

*Emeritus Professor of Veterinary Biochemistry
Royal Veterinary College
University of London
London*

Victor W. Rodwell, PhD

*Professor of Biochemistry
Purdue University
West Lafayette, Indiana*

Lange Medical Books/McGraw-Hill

Medical Publishing Division

New York Chicago San Francisco Lisbon London Madrid Mexico City
Milan New Delhi San Juan Seoul Singapore Sydney Toronto

Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition

Copyright © 2003 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved. Printed in the United States of America. Except as permitted under the United States Copyright Act of 1976, no part of this publication may be reproduced or distributed in any form or by any means, or stored in a data base or retrieval system, without the prior written permission of the publisher.

Previous editions copyright © 2000, 1996, 1993, 1990 by Appleton & Lange; copyright © 1988 by Lange Medical Publications.

2 3 4 5 6 7 8 9 0 DOC/DOC 0 9 8 7 6 5 4 3

ISBN 0-07-138901-6

ISSN 1043-9811

Notice

Medicine is an ever-changing science. As new research and clinical experience broaden our knowledge, changes in treatment and drug therapy are required. The authors and the publisher of this work have checked with sources believed to be reliable in their efforts to provide information that is complete and generally in accord with the standards accepted at the time of publication. However, in view of the possibility of human error or changes in medical sciences, neither the authors nor the publisher nor any other party who has been involved in the preparation or publication of this work warrants that the information contained herein is in every respect accurate or complete, and they disclaim all responsibility for any errors or omissions or for the results obtained from use of the information contained in this work. Readers are encouraged to confirm the information contained herein with other sources. For example and in particular, readers are advised to check the product information sheet included in the package of each drug they plan to administer to be certain that the information contained in this work is accurate and that changes have not been made in the recommended dose or in the contraindications for administration. This recommendation is of particular importance in connection with new or infrequently used drugs.

This book was set in Garamond by Pine Tree Composition

The editors were Janet Foltin, Jim Ransom, and Janene Matragrano Oransky.

The production supervisor was Phil Galea.

The illustration manager was Charissa Baker.

The text designer was Eve Siegel.

The cover designer was Mary McKeon.

The index was prepared by Kathy Pitcoff.

RR Donnelley was printer and binder.

This book is printed on acid-free paper.

ISBN-0-07-121766-5 (International Edition)

Copyright © 2003. Exclusive rights by the McGraw-Hill Companies, Inc., for manufacture and export. This book cannot be re-exported from the country to which it is consigned by McGraw-Hill. The International Edition is not available in North America.

Table 38–1. The genetic code (codon assignments in mammalian messenger RNA).¹

First Nucleotide	Second Nucleotide				Third Nucleotide
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Term	Term ²	A
	Leu	Ser	Term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile ²	Thr	Lys	Arg ²	A
	Met	Thr	Lys	Arg ²	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

¹The terms first, second, and third nucleotide refer to the individual nucleotides of a triplet codon. U, uridine nucleotide; C, cytosine nucleotide; A, adenine nucleotide; G, guanine nucleotide; Term, chain terminator codon. AUG, which codes for Met, serves as the initiator codon in mammalian cells and encodes for internal methionines in a protein. (Abbreviations of amino acids are explained in Chapter 3.)

²In mammalian mitochondria, AUA codes for Met and UGA for Trp, and AGA and AGG serve as chain terminators.

THE GENETIC CODE IS DEGENERATE, UNAMBIGUOUS, NONOVERLAPPING, WITHOUT PUNCTUATION, & UNIVERSAL

Three of the 64 possible codons do not code for specific amino acids; these have been termed **nonsense codons**. These nonsense codons are utilized in the cell as **termination signals**; they specify where the polymerization of amino acids into a protein molecule is to stop. The remaining 61 codons code for 20 amino acids (Table 38–1). Thus, there must be “**degeneracy**” in the genetic code—ie, multiple codons must decode the same amino acid. Some amino acids are encoded by several codons; for example, six different codons specify serine. Other amino acids, such as methionine and tryptophan, have a single codon. In general, the third nucleotide in a codon is less important than the first two in determining the specific amino acid to be incorporated, and this accounts for most of the degeneracy of

the code. However, for any specific codon, only a single amino acid is indicated; with rare exceptions, the genetic code is **unambiguous**—ie, given a specific codon, only a single amino acid is indicated. **The distinction between ambiguity and degeneracy is an important concept.**

The unambiguous but degenerate code can be explained in molecular terms. The recognition of specific codons in the mRNA by the tRNA adapter molecules is dependent upon their **anticodon region** and specific base-pairing rules. Each tRNA molecule contains a specific sequence, complementary to a codon, which is termed its anticodon. For a given codon in the mRNA, only a single species of tRNA molecule possesses the proper anticodon. Since each tRNA molecule can be charged with only one specific amino acid, each codon therefore specifies only one amino acid. However, some tRNA molecules can utilize the anticodon to recognize more than one codon. **With few exceptions, given a specific codon, only a specific amino acid will be incorporated—although, given a specific amino acid, more than one codon may be used.**

As discussed below, the reading of the genetic code during the process of protein synthesis does not involve any overlap of codons. **Thus, the genetic code is nonoverlapping.** Furthermore, once the reading is commenced at a specific codon, there is **no punctuation** between codons, and the message is read in a continuing sequence of nucleotide triplets until a translation stop codon is reached.

Until recently, the genetic code was thought to be universal. It has now been shown that the set of tRNA molecules in mitochondria (which contain their own separate and distinct set of translation machinery) from lower and higher eukaryotes, including humans, reads four codons differently from the tRNA molecules in the cytoplasm of even the same cells. As noted in Table 38–1, the codon AUA is read as Met, and UGA codes for Trp in mammalian mitochondria. In addition, in mitochondria, the codons AGA and AGG are read as stop or chain terminator codons rather than as Arg. As a result, mitochondria require only 22 tRNA molecules to read their genetic code, whereas the cytoplasmic translation system possesses a full complement of 31 tRNA species. These exceptions noted, **the genetic code is universal.** The frequency of use of each amino acid codon varies considerably between species and among different tissues within a species. The specific tRNA levels generally mirror these codon usage biases. Thus, a particular abundantly used codon is decoded by a similarly abundant specific tRNA which recognizes that particular codon. Tables of **codon usage** are becoming more accurate as more genes are sequenced. This is of considerable importance because investigators

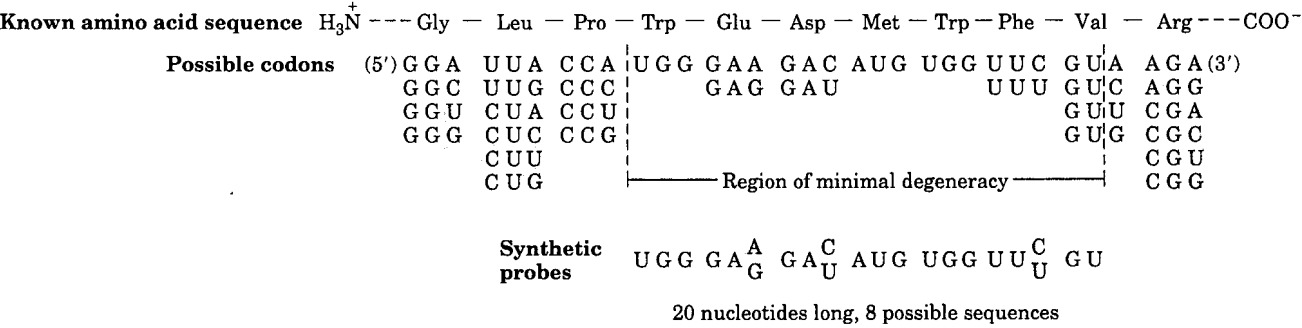


FIGURE 9-10 Probe to detect the gene for a protein of known amino acid sequence. Because more than one DNA sequence can code for any given amino acid sequence, the genetic code is said to be “degenerate.” (As described in Chapter 27, an amino acid is coded for by a set of three nucleotides called a *codon*. Most amino acids have two or more codons; see Fig. 27-7.) Thus the correct DNA sequence for a known amino acid sequence cannot be known in advance. The probe is designed to be complementary to a region of the gene with

minimal degeneracy, that is, a region with the fewest possible codons for the amino acids—two codons at most in the example shown here. Oligonucleotides are synthesized with selectively randomized sequences, so that they contain either of the two possible nucleotides at each position of potential degeneracy (shaded in pink). The oligonucleotide shown here represents a mixture of eight different sequences: one of the eight will complement the gene perfectly, and all eight will match at least 17 of the 20 positions.

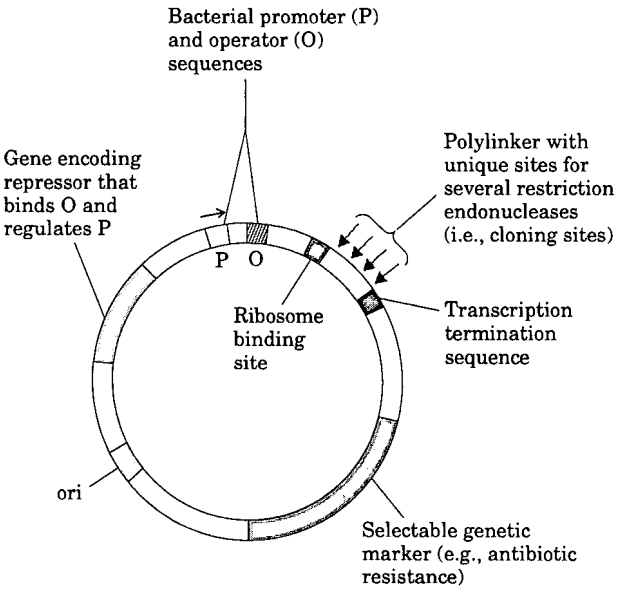


FIGURE 9-11 DNA sequences in a typical *E. coli* expression vector. The gene to be expressed is inserted into one of the restriction sites in the polylinker, near the promoter (P), with the end encoding the amino terminus proximal to the promoter. The promoter allows efficient transcription of the inserted gene, and the transcription termination sequence sometimes improves the amount and stability of the mRNA produced. The operator (O) permits regulation by means of a repressor that binds to it (Chapter 28). The ribosome binding site provides sequence signals needed for efficient translation of the mRNA derived from the gene. The selectable marker allows the selection of cells containing the recombinant DNA.

Alterations in Cloned Genes Produce Modified Proteins

Cloning techniques can be used not only to overproduce proteins but to produce protein products subtly altered from their native forms. Specific amino acids may be replaced individually by **site-directed mutagenesis**. This powerful approach to studying protein structure and function changes the amino acid sequence of a protein by altering the DNA sequence of the cloned gene. If appropriate restriction sites flank the sequence to be altered, researchers can simply remove a DNA segment and replace it with a synthetic one that is identical to the original except for the desired change (Fig. 9-12a). When suitably located restriction sites are not present, an approach called **oligonucleotide-directed mutagenesis** (Fig. 9-12b) can create a specific DNA sequence change. A short synthetic DNA strand with a specific base change is annealed to a single-stranded copy of the cloned gene within a suitable vector. The mismatch of a single base pair in 15 to 20 bp does not prevent annealing if it is done at an appropriate temperature. The annealed strand serves as a primer for the synthesis of a strand complementary to the plasmid vector. This slightly mismatched duplex recombinant plasmid is then used to transform bacteria, where the mismatch is repaired by cellular DNA repair enzymes (Chapter 25). About half of the repair events will remove and replace the altered base and restore the gene to its original sequence; the other half will remove and