



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

203 746

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 D/ 2434 083
(31) 133296

(22) 23.03.81
(32) 24.03.80

(44) 02.11.83
(33) US

- (71) siehe (73)
(72) KLEID, DENNIS K.;US;YANSURA, DANIEL G.;US;HEYNEKER, HERBERT L.;NL;
MIOZZARI, GUISEPPE F.;CH;
(73) GENENTECH INC, SAN FRANCISCO, US
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN) 60999/18/37 1020 BERLIN WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES EXPRESSIONSPLASMIDS

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung eines Expressionsplasmids für die Expression eines heterologen Gens. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß in Phase die folgenden Elemente gleichzeitig verknüpft werden: a) ein erstes lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das ein Replikon enthält und ein Gen, das eine selektierbare Eigenschaft exprimiert, wenn es unter die Steuerung eines bakteriellen Promoters gestellt wird, wobei das Fragment keinen derartigen Promoter aufweist, b) ein zweites lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das das genannte heterologe Gen aufweist, c) ein drittes doppelsträngiges DNA-Fragment, das einen bakteriellen Promoter aufweist, wobei die verknüpfbaren Enden der genannten Fragmente so gestaltet sind, daß nach dem Verknüpfen zum Bilden eines sich replizierenden Plasmids sowohl das Gen für die selektierbare Eigenschaft als auch das heterologe Gen unter die Steuerung des Promoters kommen, wodurch die Verwendung der selektierbaren Eigenschaft bei der Selektion von transformierten Bakterienkolonien möglich ist, welche zur Expression der heterologen Gene fähig sind.

Verfahren zur Herstellung eines Expressionsplasmids

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Expressionsplasmids für die Expression eines heterogenen Gens.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Mit dem Aufkommen der DNA-Rekombinations-Technologie ist die kontrollierte bakterielle Produktion einer enormen Vielfalt nützlicher Polypeptide möglich geworden. Man hat bereits Bakterien in der Hand, die durch diese Technologie verändert wurden, um die Produktion derartiger Polypeptid-Produkte zu ermöglichen, wie z. B. Somatostatin (K. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977)), die jeweils einzelnen A- und B-Ketten des menschlichen Insulins (D. V. Goeddel, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., USA 76, 106 (1979)) und menschliches Wachstumshormon (D. V. Goeddel, et al., Nature 281, 544 (1979)). Kürzlich wurde die DNA-Rekombinations-Technik dazu verwendet, um die bakterielle Herstellung von Thymosin $\alpha 1$ zu ermöglichen, einer immunverstärkenden Substanz, die in der Thymusdrüse gebildet wird (US-Patentanmeldung von Roberto Crea und Ronald Wetzel vom 28. Februar 1980, übertragen auf die Anmelderin der vorliegenden Anmeldung). Die Möglichkeiten dieser Technologie sind derartig durchschlagend, daß so gut wie jedes nützliche Polypeptid bakteriell hergestellt werden kann und die kontrol-

- 2 - 243408 3

lierte Herstellung von Hormonen, Enzymen, Antikörpern und Impfstoffen gegen eine große Vielfalt von Krankheiten in Reichweite gebracht wird. Die zitierten Veröffentlichungen, die im Detail die oben genannten repräsentativen Beispiele beschreiben, sowie weitere, im folgenden genannte Veröffentlichungen, welche den Hintergrund der Erfindung bilden, sind durch Verweis in die Offenbarung mit einbezogen.

Das Arbeitspferd der DNA-Rekombinations-Technologie ist das Plasmid, ein nichtchromosomaler Ring doppelsträngiger DNA, der in Bakterien gefunden wird und oft in vielfacher Kopie pro Bakterienzelle vorliegt. Die DNA des Plasmids enthält eine Information, die benötigt wird, um das Plasmid in Tochterzellen zu reproduzieren (d. h. ein "Replikon") und normalerweise ein oder mehr Selektions-Charakteristika, wie z. B. Resistenz gegen Antibiotika, die es erlauben, diejenigen Clone der Wirtszelle, die das interessierende Plasmid enthalten, zu erkennen und bevorzugt in selektivem Medium wachsen zu lassen. Der Nutzen der bakteriellen Plasmide liegt in der Tatsache, daß sie durch die eine oder andere Restriktionsendonuklease oder "Restriktionsenzym" spezifisch geschnitten werden können, von denen jedes eine andere Stelle auf der Plasmid-DNA erkennt. Danach können heterologe Gene oder Genfragmente in das Plasmid eingefügt werden, wobei entweder die Enden der Schnittstellen oder unmittelbar an die Schnittstellen angefügte Enden miteinander verbunden werden. Im folgenden wird der Terminus "heterolog" für ein Gen verwendet, das normalerweise nicht in *E. coli* gefunden wird oder eine Polypeptidsequenz, die normalerweise nicht durch

E. coli hergestellt wird. Der Terminus "homolog" wird für ein Gen oder Polypeptid verwendet, das in Wildtyp E.coli hergestellt wird. Die DNA-Rekombination wird außerhalb der Bakterie durchgeführt. Das resultierende "rekombinante" Plasmid kann durch ein Verfahren, das als Transformation bekannt ist, in Bakterien eingeführt werden, und man erhält große Mengen des rekombinanten Plasmids, das das heterologe Gen enthält, indem man die Transformanten wachsen läßt. Wenn das Gen im Hinblick auf Bereiche des Plasmids, die die Transkription und Translation der codierten DNA-Information regeln, richtig eingefügt ist, kann der resultierende Expressionsvektor dazu verwendet werden, tatsächlich die Polypeptidsequenz zu produzieren, für die das inserierte Gen codiert, ein Prozeß, der Expression genannt wird.

Die Expression wird in einer Gegend initiiert, die als Promoter bekannt ist, der von der RNA-Polymerase erkannt wird und an den diese bindet. In einigen Fällen, wie z. B. beim trp-Operon, das im nachfolgenden noch ausführlich diskutiert werden wird, werden Promoterregionen von "Operator"-Regionen überlappt, wodurch ein kombinierter Promoter-Operator gebildet wird. Operatoren sind DNA-Sequenzen, die von sogenannten Repressorproteinen erkannt werden, die dazu dienen, die Häufigkeit der Initiation der Transkription an einem speziellen Promoter zu regulieren. Die Polymerase arbeitet sich an der DNA entlang, wobei sie die in dem codierenden Strang enthaltene Information vom 5'- zum 3'-Ende in Messenger-RNA (mRNA) transkribiert, die ihrerseits wieder in ein Polypeptid translatiert wird, das die Aminosäuresequenz aufweist, für die die DNA codiert.

- 4 - 243408 3

Jede Aminosäure wird durch ein einziges Nukleotidtriplet oder "Codon" codiert, das innerhalb eines "Strukturgens" liegt, wie man es für die vorliegenden Zwecke nennen mag, d. h. in dem Teil, der für die Aminosäuresequenz des exprimierten Produkts codiert. Nach dem Binden an den Promoter transkribiert die RNA-Polymerase vorerst Nukleotide, die für eine Ribosomen-Bindestelle codieren, sodann ein Initiations- oder "Start"-Signal (normalerweise ATG, das in der resultierenden mRNA zu AUG wird) und schließlich die Nukleotidcodons innerhalb des Strukturgens selbst. Sogenannte Stop-Codons werden am Ende des Strukturgens transkribiert, wonach die Polymerase eine zusätzliche Sequenz von mRNA bilden kann, die, aufgrund der Anwesenheit des Stoppsignals, von den Ribosomen nicht mehr translatiert wird. Ribosomen binden an die auf der mRNA zur Verfügung gestellten Bindestelle, bei Bakterien normalerweise wenn die mRNA gebildet wird, und stellen selbst das codierte Polypeptid her, wobei sie am Translations-Startsignal beginnen und an dem oben erwähnten Stoppsignal enden. Das gewünschte Produkt wird hergestellt, wenn die Sequenzen, die für die Ribosomen-Bindestelle codieren, im Hinblick auf das AUG-Initiatorcodon richtig liegen und wenn alle übrigen Codons dem Initiatorcodon in Phase folgen. Das resultierende Produkt kann erhalten werden, indem man die Wirtszelle lysiert und das Produkt durch geeignete Reinigungsschritte von anderen bakteriellen Proteinen trennt.

Die durch die Anwendung der DNA-Rekombinations-Technik exprimierten Polypeptide können vollkommen heterolog sein, wie im Falle der direkten Expression des menschlichen Wachstumshormons, können aber auch andererseits

ein heterologes Polypeptid enthalten, das zumindest mit einem Teil der Aminosäuresequenz eines homologen Peptids verbunden ist, wie im Fall der Herstellung von Zwischenprodukten für Somatostatin und die Bestandteile des menschlichen Insulins. Im letzteren Fall enthält beispielsweise das angefügte homologe Polypeptid einen Teil der Aminosäuresequenz für β -Galactosidase. In diesen Fällen ist das angestrebte bioaktive Produkt durch das angefügte homologe Polypeptid so lange bioinaktiv, bis dieses durch extrazelluläre Maßnahmen abgeschnitten wird. Die ebengenannten "Fusionsproteine" können so hergestellt werden, daß ein hochspezifisches Schneiden des Vorläuferproteins von dem angestrebten Produkt ermöglicht ist, beispielsweise durch die Einwirkung von Bromcyan auf Methionin oder aber durch enzymatisches Schneiden, siehe auch GB-PS Nr. 2 007 676 A.

Wenn die DNA-Rekombinations-Technologie ihr Versprechen voll halten soll, müssen Systeme erdacht werden, die die Expression der Geninsertionen optimieren, so daß das angestrebte Polypeptid-Produkt in großen Mengen erhalten werden kann. Die β -Lactamase- und Lactose-Promoter-Operator-Systeme, die in der Vergangenheit üblicherweise verwendet wurden, haben, obwohl sie gut zu verwenden sind, vom Standpunkt der Menge her die Kapazität der Technologie nicht voll ausgenutzt. Es besteht ein Bedürfnis für einen bakteriellen Expressionsvektor, der fähig ist, das gewünschte Polypeptid-Produkt in größerer Menge kontrolliert zu exprimieren.

Tryptophan ist eine Aminosäure, die von Bakterien als Bestandteil eines homologen Polypeptids verwendet wird und in einem Biosyntheseweg hergestellt wird, der folgende Schritte enthält:

- 6 - 243408 3

Chorisminsäure \longrightarrow Anthranilsäure \longrightarrow Phosphoribosyl-anthranilsäure \longrightarrow CDRP (Enol-1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-Ribulose-5-Phosphat) \longrightarrow Indol-3-Glycerinphosphat und letztlich Tryptophan selbst. Die enzymatischen Reaktionen dieses Synthesewegs werden durch Produkte des Tryptophan- oder "trp"-Operons katalysiert, einem polycistronischen DNA-Segment, das unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems transkribiert wird. Die resultierende polycistronische mRNA codiert die sogenannte trp-Führer- (im folgenden "Leader"- genannte) Sequenz und dann, der Reihe nach, die Polypeptide, genannt trpE, trpD, trpC, trpB und trpA. Diese Polypeptide katalysieren und kontrollieren auf verschiedene Weise einzelne Schritte des Synthesewegs, ausgehend von der Chorisminsäure bis zum Tryptophan.

Im Wildtyp *E.coli* ist das Tryptophan-Operon unter der Kontrolle mindestens dreier, deutlich zu unterscheidender Arten. Im ersten Fall, einer Promoter-Operator-Repression, handelt das Tryptophan als Corepressor und bindet an seinen Aporepressor, um einen aktiven Repressorkomplex zu bilden, der seinerseits an den Operator bindet, wodurch das Tryptophan seinen eigenen Syntheseweg vollkommen verschließt. Zweitens bindet Tryptophan in einem Prozeß von Rückkopplungshemmung an einen Komplex der trpE- und trpD-Polypeptide und verhindert dadurch deren Beteiligung an dem Syntheseweg. Letztlich wird eine Kontrolle ausgeübt durch einen Prozeß, der als "Attenuierung" bekannt ist. Dieser Vorgang läuft unter der Kontrolle einer "Attenuator-Region" des Gens ab, einer Region, die innerhalb der trp-Leader-Sequenz liegt. Die Attenuierung ist ein Vorgang, der phänotypisch als eine Art Verdünnung des Tryptophans in der Zelle in

Erscheinung tritt (siehe dazu allgemein G. F. Miozzari et al., J. Bacteriology 133, 1457 (1978); The Operon 263-302, Cold Spring Harbor Laboratory (1978), Miller und Reznikoff, eds.; F. Lee et al., Proc Nat'l Acad Sci, USA 74, 4365 (1977) und K. Bertrand et al., J. Mol. Biol. 103, 319 (1976)). Das Ausmaß der Attenuierung scheint durch die intrazelluläre Konzentration des Tryptophans geregelt zu werden, und in Wildtyp E.coli beendet der Attenuator die Expression in ungefähr neun von zehn Fällen, möglicherweise durch die Bildung einer Sekundärstruktur, eines "Terminationsrings" in der mRNA, welcher der RNA-Polymerase dazu veranlaßt, sich verfrüht von der DNA zu lösen.

Andere Autoren haben das trp-Operon dazu verwendet, um bis zu einem gewissen Grad heterologe Polypeptide zu exprimieren. Mit diesen Arbeiten hat man sich versuchsweise mit Problemen der Repression und Attenuierung befaßt, wobei Indolacrylsäure zugegeben wird, ein Induktor und Analogon, das mit Tryptophan um das trp-Repressor-Molekül konkurriert, wobei durch kompetitive Hemmung auf Derepression abgezielt wurde. Gleichzeitig verringert der Induktor durch Hemmung der enzymatischen Umwandlung von Indol zu Tryptophan die Attenuierung und bewirkt dadurch, daß der Zelle Tryptophan entzogen wird. Als Ergebnis davon lesen mehr Polymerasen erfolgreich über den Attenuator hinweg. Vom Standpunkt der vollständig durchgehenden Translation und der angestrebten großen Mengen erscheint dieser Versuch jedoch problematisch, da die Tryptophan-enthaltenden Proteinsequenzen während der Synthese infolge des Mangels von nutzbarem Tryptophan vorzeitig beendet werden. Tatsächlich ist bei diesem Versuch eine wirkungsvolle Unterstützung der Attenuierung vollständig von einer strengen Tryptophan-Aushungerung abhängig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur Herstellung eines Expressionsplasmids für die Expression eines heterologen Gens.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Systeme aufzufinden, die die Expression der Geninsertionen optimieren, so daß das gewünschte Polypeptid-Produkt in großen Mengen erhalten werden kann, und insbesondere einen bakteriellen Expressionsvektor aufzufinden, der fähig ist, das gewünschte Polypeptid-Produkt in größerer Menge kontrolliert zu exprimieren.

Es wird ein Polypeptid-Produkt durch die Expression in Bakterien eines für dieses codierenden Gens in der Weise hergestellt, daß

- a) eine bakterielle Kultur geschaffen wird, die mit einem sich replizierenden, von einem Plasmid abgeleiteten Expressionsvektor transformiert wurde, welcher eine Sequenz doppelsträngiger DNA enthält, die in Phase von einem ersten 5'-Ende bis zu einem zweiten 3'-Ende ihres codierenden Strangs die folgenden Elemente aufweist:
- (i) ein bakterielles trp-Promoter-Operator-System
 - (ii) Nukleotide, die für eine Ribosomen-Bindestelle für die Translation des Elements (iv) codieren
 - (iii) Nukleotide, die für ein Translations-Startsignal für die Translation des Elements (iv) codieren
 - (iv) ein Strukturgen, das für die Aminosäuresequenz eines heterologen Polypeptids codiert

- 9 - 243408 3

wobei die genannte Sequenz weder irgendeine trp-Attenuierungs-Fähigkeit noch Nukleotide aufweist, die für die trpE-Ribosomen-Bindestelle codieren

- b) die transformierte Bakterienkultur in ein Fermentationsgefäß überführt und diese Kultur bis zu einer vorgegebenen Dichte in einem geeigneten Nährmedium gezüchtet wird, welches zusätzliches Tryptophan enthält, und zwar in ausreichender Menge, um das genannte Promoter-Operator-System zu reprimieren
- c) den genannten Bakterien das zusätzliche Tryptophan entzogen wird, um das genannte System zu dereprimieren und die Expression des Produkts, für welches das genannte Strukturgen codiert, anlaufen zu lassen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dabei in der Weise durchgeführt werden, daß das durch das genannte Strukturgen exprimierte Polypeptid vollständig heterolog ist; das exprimierte Polypeptid ein Fusionsprotein ist, das ein heterologes Polypeptid und mindestens einen Teil der Aminosäuresequenz eines homologen Polypeptids aufweist; der genannte Teil ein Teil der Aminosäuresequenz eines Enzyms ist, das am Biosyntheseweg von der Chorisminsäure zum Tryptophan beteiligt ist; das heterologe Polypeptid ein bioaktives Polypeptid und das angefügte homologe Polypeptid ein spezifisch spaltbares bioinaktivierendes Polypeptid ist; das homologe Polypeptid das trpE-Polypeptid ist und die genannte Ribosomen-Bindestelle diejenige für das trp-Leader-Polypeptid ist oder daß das homologe Polypeptid das trpD-Polypeptid ist.

Es ist besonders vorteilhaft, wenn das Fusionsprotein ein heterologes und ein homologes Polypeptid enthält, wobei das homologe Polypeptid selbst eine Fusion darstellt, und zwar aus etwa den ersten sechs Aminosäuren des trp-Leader-Polypeptids und der Aminosäuresequenz, die durch mindestens etwa dem distalen Drittel des trpE-Polypeptidgens codiert wird.

Der Tryptophan-Entzug wird dadurch bewirkt, daß die Zugabe des zusätzlichen Tryptophans beendet und das Fermentationsmedium, in dem die Bakterienkultur zuerst gewachsen ist, verdünnt wird.

In dem Verfahren wird als Wirtsbakterium *E. coli* angewendet.

Beschrieben wird weiterhin ein von einem Plasmid abgeleiteter Expressionsvektor zum Herstellen eines heterologen Polypeptid-Produkts in *E. coli*-Bakterien. Der Vektor enthält eine Sequenz doppelsträngiger DNA, die in Phase von einem ersten 5'-Ende bis zu einem zweiten 3'-Ende ihres codierenden Strangs die folgenden Elemente aufweist:

- a) ein bakterielles trp-Promoter-Operator-System
- b) Nukleotide, die für eine Ribosomen-Bindestelle für die Translation des Elements (iv) codieren
- c) Nukleotide, die für ein Translations-Startsignal für die Translation des Elements (iv) codieren
- d) ein Strukturgen, das für die Aminosäuresequenz eines heterologen Polypeptids codiert

wobei die genannte Sequenz weder irgendeine trp-Attenuierungs-Fähigkeit noch Nukleotide aufweist, die für die trpE-Ribosomen-Bindestelle codieren.

Dabei ist das durch das genannte Strukturgen exprimierte Polypeptid vollständig heterolog oder das exprimierte Polypeptid ist ein Fusionsprotein, das ein heterologes Polypeptid und mindestens einen Teil der Aminosäuresequenz eines homologen Polypeptids aufweist, wobei der genannte Teil ein Teil der Aminosäuresequenz eines Enzyms ist, das am Biosyntheseweg von der Chorisminsäure zum Tryptophan beteiligt ist.

Weiterhin ist es möglich, daß das heterologe Polypeptid ein bioaktives Polypeptid und das angefügte homologe Polypeptid ein spezifisch spaltbares bioinaktivierendes Polypeptid ist.

Insbesondere ist der Vektor derart zusammengesetzt, daß das homologe Polypeptid das trpE-Polypeptid ist und die genannte Ribosomen-Bindestelle diejenige für das trp-Leader-Polypeptid ist;
das homologe Polypeptid das trpD-Polypeptid ist;
das Fusionsprotein ein heterologes und ein homologes Polypeptid enthält, wobei das homologe Polypeptid selbst eine Fusion darstellt, und zwar aus etwa den ersten sechs Aminosäuren des trp-Leader-Polypeptids und der Aminosäuresequenz, die durch mindestens etwa dem distalen Drittel des trpE-Polypeptidgens codiert wird.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Schaffung eines Expressionsplasmids für die Expression eines heterologen Gens, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in Phase die folgenden Elemente gleichzeitig verknüpft werden:

- 12 - 243408 3

- a) ein erstes lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das ein Replikon enthält und ein Gen, das eine selektierbare Eigenschaft exprimiert, wenn es unter die Steuerung eines bakteriellen Promoters gestellt wird, wobei das Fragment keinen derartigen Promoter aufweist
- b) ein zweites lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das das genannte heterologe Gen aufweist
- c) ein drittes doppelsträngiges DNA-Fragment, das einen bakteriellen Promoter aufweist

wobei die verknüpfbaren Enden der genannten Fragmente so gestaltet sind, daß nach dem Verknüpfen zum Bilden eines sich replizierenden Plasmids sowohl das Gen für die selektierbare Eigenschaft als auch das heterologe Gen unter die Steuerung des Promoters kommen, wodurch die Verwendung der selektierbaren Eigenschaft bei der Selektion von transformierten Bakterienkolonien möglich ist, welche zur Expression der heterologen Gene fähig sind.

Die selektierbare Eigenschaft kann eine Antibiotikum-resistenz sein.

Die selektierbare Eigenschaft kann eine Tetracyclin-Resistenz sein und der bakterielle Promoter der trp-Promoter.

Das Verfahren wird in vorteilhafter Weise so ausgeführt, daß die Verknüpfung ebenso ein Operon für die Expression von Ampicillin-Resistenz wiederherstellt.

Beschrieben wird weiterhin ein Verfahren zum Schneiden doppelsträngiger DNA. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß

zum Schneiden an jeder beliebigen Stelle

- a) die doppelsträngige DNA in einem die zu schneidende Stelle umgebenden Bereich in einzelsträngige DNA umgewandelt wird
- b) an die in Schritt a) gebildete Einzelstrangregion ein komplementäres Primerstück von einzelsträngiger DNA hybridisiert wird, wobei das 5'-Ende des Primers gegenüber demjenigen Nukleotid liegt, das an die beabsichtigte Schnittstelle angrenzt
- c) derjenige Teil des zweiten, in Schritt a) eliminierten Strangs wiederhergestellt wird, der in 3'-Richtung des Primers liegt, und zwar durch eine Reaktion mit DNA-Polymerase in Anwesenheit von Adenin-, Thymin-, Guanin- und Cytosin-enthaltenden Desoxynukleotidtriphosphaten
- d) das verbleibende DNA-Einzelstrangstück, das über die beabsichtigte Schnittstelle vorsteht, verdaut wird.

Dabei werden die Schritte c) und d) gleichzeitig durchgeführt durch Reaktion mit einer DNA-Polymerase, die in 5' \longrightarrow 3'-Richtung polymerisiert, die Exonukleasewirkung in 3' \longrightarrow 5'-Richtung aufweist, jedoch keine Nuklease-wirkung in 5' \longrightarrow 3'-Richtung zeigt.

Vorteilhaft ist die Polymerase, die Klenow-Polymerase I ist.

Das Verfahren ist besonders vorteilhaft, wenn das heterologe Polypeptid ein wiedergewinnbares Polypeptid ist, das aus einer Gruppe von Polypeptiden ausgewählt wird, die menschliches Wachstumshormon, menschliches

Proinsulin, Somatostatin, Thymosin α 1, die A-Kette des menschlichen Insulins sowie die B-Kette des menschlichen Insulins enthält.

Ebenso ist der Vektor besonders vorteilhaft, wenn er ein heterogenes Polypeptid der oben beschriebenen Art enthält.

Mit der vorliegenden Erfindung werden für das Herstellen von heterologen Polypeptid-Produkten in Bakterien neue, von Plasmiden abgeleitete Expressionsvektoren zur Verfügung gestellt. Die Vektoren haben eine Sequenz von doppelsträngiger DNA, die in Phase von einem ersten 5'- zu einem zweiten 3'-Ende des codierenden Stranges folgende Bestandteile enthält: einen trp-Promoter-Operator, Nukleotide, die für die trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle codieren und Nukleotide, die für die Translationsinitiation zur Expression eines Strukturgens codieren, welches für die Aminosäuresequenz eines heterologen Polypeptids codiert. Diese beschriebene DNA-Sequenz enthält weder eine trp-Attenuator-Region noch Nukleotide, die für die trpE-Ribosomen-Bindestelle codieren. Stattdessen wird die trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle wirkungsvoll dazu verwendet, die Expression von Information zu bewirken, die durch inserierte Gene codiert wird.

Mit einem einen trp-Promoter-Operator enthaltenden erfindungsgemäßen Plasmid, das keinen Attenuator aufweist, werden Zellen transformiert und in Gegenwart von zugegebenem Tryptophan kultiviert. Mit der Verwendung von Tryptophan-reichem Medium steht ausreichend Tryptophan zur Verfügung, um im wesentlichen vollständig den trp-Promoter-Operator durch trp/Repressorinteraktionen zu reprimieren, so daß das Zellwachstum, ungehemmt durch vorzeitige Expression großer Mengen von heterologen Polypeptiden, fort-

schreiten kann, wobei dieses Polypeptid durch eine Insertion codiert wird, die ansonsten unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems steht. Sobald einerseits die Kultur der Rekombinanten zu einer Dichte angewachsen ist, die für eine industrielle Herstellung des Polypeptids geeignet ist und andererseits das von außen zugeführte Tryptophan entfernt wurde, läßt man die Zellen lediglich mit dem Tryptophan wachsen, das sie selbst produzieren. Das Ergebnis ist eine schwache Tryptophanlimitierung, wodurch folglich der Syntheseweg dereprimiert wird und eine überaus wirksame Expression der heterologen Insertion auftritt, unbehindert durch Attenuierung, da die Attenuator-Region aus dem System entfernt wurde. Auf diese Weise wird den Zellen niemals ernstlich Tryptophan entzogen, und alle Proteine, ob sie Tryptophan enthalten oder nicht, können in einem ausreichenden Umfang produziert werden.

Es werden Mittel zur Verfügung gestellt, um doppelsträngige DNA an jeder beliebigen gewünschten Stelle zu schneiden, auch wenn eine Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym fehlt, eine Technik, die unter anderem für das Herstellen eines trp-Operons brauchbar ist, welches Attenuator-Deletionen aufweist, die sich von denjenigen unterscheiden, die man früher durch Selektion von Mutanten erhalten hat.

Schließlich werden eine Vielzahl von brauchbaren Zwischenprodukten und Endprodukten zur Verfügung gestellt, einschließlich spezifisch spaltbarer, heterolog-homologer Fusionsproteine, die unter Expressionsbedingungen gegen Abbau stabil sind.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert. In der beiliegenden Zeichnung zeigen

- Fig. 1 das Schema einer bevorzugten Ausführung der Bildung eines Plasmids, das fähig ist, heterologe
- Fig. 2: Gene als Fusionen mit einem Teil des trpD-Polypeptids zu exprimieren, von dem sie später abgespalten werden können
- Fig. 3: das Ergebnis einer Polyacrylamid-Gel-Trennung von Zellprotein, das homolog(trpD')-heterologe (Somatostatin oder Thymosin α 1) Fusionsproteine enthält
- Fig. 4, aufeinanderfolgende Stufen in einem bevorzugten
- Fig. 5 Schema für die Herstellung eines Plasmids, das und fähig ist, direkt unter der Kontrolle eines trp-
- Fig. 6: Promoter-Operator-Systems ein heterologes Gen (menschliches Wachstumshormon) zu exprimieren
- Fig. 7: das Ergebnis einer Polyacrylamid-Gel-Trennung von Zellprotein, das menschliches Wachstumshormon enthält, welches direkt unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems exprimiert wurde
- Fig. 8, aufeinanderfolgende Stufen in einem bevorzugten
- Fig. 9a, Schema für die Herstellung eines Plasmids, das
- Fig. 9b fähig ist, heterologe Gene (in dem dargestellten und Fall für Somatostatin) fusioniert mit einem Teil
- Fig. 10: des trpE-Polypeptids zu exprimieren, wobei die Fusion später gespalten werden kann
- Fig. 11: das Ergebnis einer Polyacrylamid-Gel-Trennung von Zellprotein, das homolog(trpE)-heterologe

Fusionsproteine zum Herstellen von Somatostatin bzw. Thymsin α 1, menschlichem Proinsulin und der A- und B-Ketten des menschlichen Insulins enthält

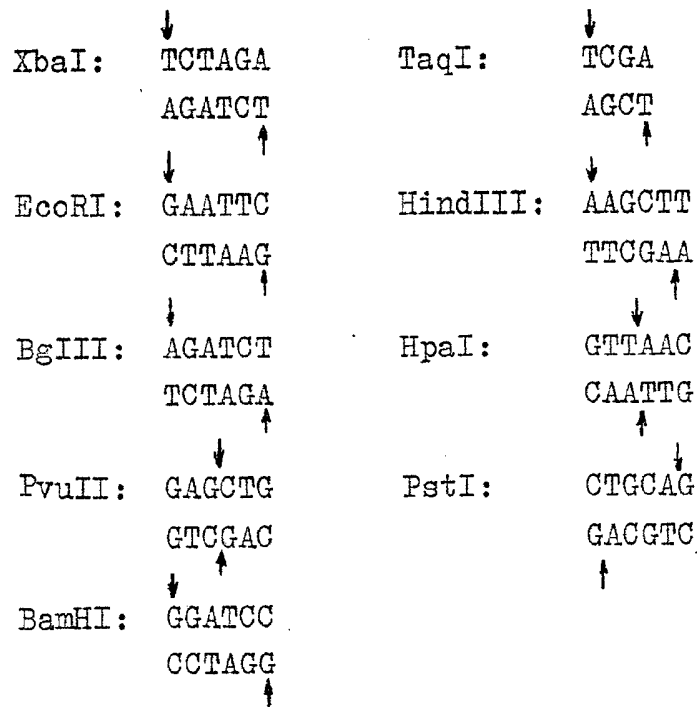
Fig. 12 aufeinanderfolgende Stufen der Art und Weise, und auf welche das Plasmid, das durch die Schemata Fig. 13: der Fig. 8 bis einschließlich 10 konstruiert wurde, manipuliert wird, um ein System zu bilden, in dem andere heterologe Gene als Fusion mit trpE-Polypeptidsequenzen austauschbar exprimiert werden können.

In den Figuren werden aus Gründen der Klarheit der Darstellung in den meisten Fällen nur der codierende Strang des doppelsträngigen Plasmids und lineare DNA-Stränge gezeichnet. Gene, die für die Resistenz gegen ein Antibiotikum codieren, werden als ap^R (Ampicillin-Resistenz) und tc^R (Tetracyclin-Resistenz) bezeichnet. Die Bezeichnung tc^S bedeutet ein Gen für Tetracyclin-Resistenz, das nicht unter der Kontrolle eines Promoter-Operator-Systems steht, so daß Plasmide, die dieses Gen enthalten, dennoch Tetracyclin-sensitiv sind. Die Bezeichnung ap^S bezeichnet eine Ampicillin-Sensitivität, die durch die Deletion eines Teils des Gens entstanden ist, das für Ampicillin-Sensitivität codiert. Promotoren und Operatoren des Plasmids werden mit p und o bezeichnet. Die Buchstaben A, T, G bzw. C bezeichnen die Nukleotide, die die Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin enthalten. Weitere Legenden der Figuren werden aus dem Text ersichtlich.

Eine im folgenden beschriebene bevorzugte Ausführungsform der Erfindung schließt die Verwendung einer Anzahl allgemein erhältlicher Restriktionsendonukleasen ein, die in

- 18 - 243408 3

folgenden bezeichnet und mit ihrer zugehörigen Erkennungssequenz sowie dem Schneidemuster (angezeigt durch Pfeile) beschrieben sind.



Wo die Schnittpunkte auf den entsprechenden Strängen voneinander entfernt sind, werden die geschnittenen Enden "sticky", d. h. überstehend, und insofern in der Lage sein, sich wieder neu zu verbinden, bzw. diese "sticky-ends" können mit einer anderen, komplementären "sticky-end"-DNA durch Watson-Crick-Basenpaarung (A mit T und G mit C) korrekt miteinander verzapft werden. Einige Restriktionsenzyme, beispielsweise die oben beschriebenen HpaI und PvuII, hinterlassen nach dem Schnitt stumpfe Enden. Die oben gezeigten Nukleotidsequenzen sind gemäß einer diesbezüglichen Übereinkunft in der folgenden Weise dargestellt: Der obere Strang ist der Protein-codierende Strang, und man bewegt sich fortschreitend von links nach rechts vom 5'- zum 3'-Ende dieses Strangs, d. h. in Rich-

tung der Transkription von einem proximalen zu einem distalen Punkt.

Schließlich bezeichnet, im Hinblick auf die Übereinkunft, das Symbol " Δ " eine Deletion. Daher bezeichnet eine Benennung eines Plasmids, wie beispielsweise " Δ EcoRI-XbaI", dasjenige Plasmid, aus welchem die Nukleotidsequenz zwischen den EcoRI- und XbaI-Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme durch Verdauung durch diese Enzyme entfernt wurde. Der Einfachheit halber wurden verschiedene Deletionen durch Zahlen bezeichnet. Die Bezeichnung " Δ 1" bedeutet daher, beginnend vom ersten Basenpaar (Bp) der EcoRI-Erkennungsstelle, die auf das Gen für Tetracyclin-Resistenz in dem Elternplasmid pBR322 folgt, eine Deletion vom Bp 1-30 (d. h. Δ EcoRI-HindIII) und daraus folgend ein Ausschalten des Tetracyclin-Promoter-Operator-Systems. Als " Δ 2" wird eine Deletion der Bp 1-375 verstanden (d. h. Δ EcoRI-BamHI) und infolgedessen ein Entfernen sowohl des Tetracyclin-Promoter-Operators und der Strukturgene, die für Tetracyclin-Resistenz codieren. Die Bezeichnung " Δ 3" bedeutet eine Deletion der Bp3611-4359 (d. h. Δ PstI-EcoRI) und die Eliminierung der Ampicillin-Resistenz. " Δ 4" wird verwendet, um das Entfernen der Bp ~900-~1500 vom trp-Operon-Fragment 5 (Fig. 1) zu bezeichnen, in dem die Strukturgene für das trpD-Polypeptid eliminiert sind.

Die trp-Leader-Sequenz ist aus den Basenpaaren (Bp) 1-162 aufgebaut, angefangen vom Startpunkt für die trp-mRNA. Ein auf 14 Aminosäuren geschätztes trp-Leader-Polypeptid wird durch die Bp 27-71 codiert, die den ATG-Nukleotiden folgen, die für das Translations-Startsignal codieren. Die trp-Attenuator-Region enthält aufeinanderfolgend GC-reiche und

AT-reiche Sequenzen, die zwischen den Bp 114 und 156 liegen. Die Attenuierung wird offensichtlich durch mRNA-Nukleotide bewirkt, die durch die Bp ~134-141 der Leader-Sequenz codiert werden. Um heterologe Polypeptide unter dem Einfluß der trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle zu exprimieren und gleichzeitig die Attenuierung zu verhindern, müssen die folgenden Kriterien beachtet werden:

1. Die Basenpaare 134-141 oder noch mehr über das Bp 141 hinaus müssen deletiert werden,
2. das ATG-Codon des inserierten Gens muß, wie bekannt, in der richtigen Lage zu einer Ribosomen-Bindestelle ausgerichtet sein (siehe z. B. J. A. Steitz "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA" in Biological Regulation and Control (ed. R. Goldberger) Plenum Press, N.Y. (1978)),
3. wo ein homolog-heterologes Fusionsprotein produziert werden soll, sollte das Translations-Startsignal einer homologen Polypeptidsequenz verfügbar bleiben, und die Codons für den homologen Teil des Fusionsproteins müssen in Phase ohne dazwischenliegende Translations-Stopsignale inseriert werden.

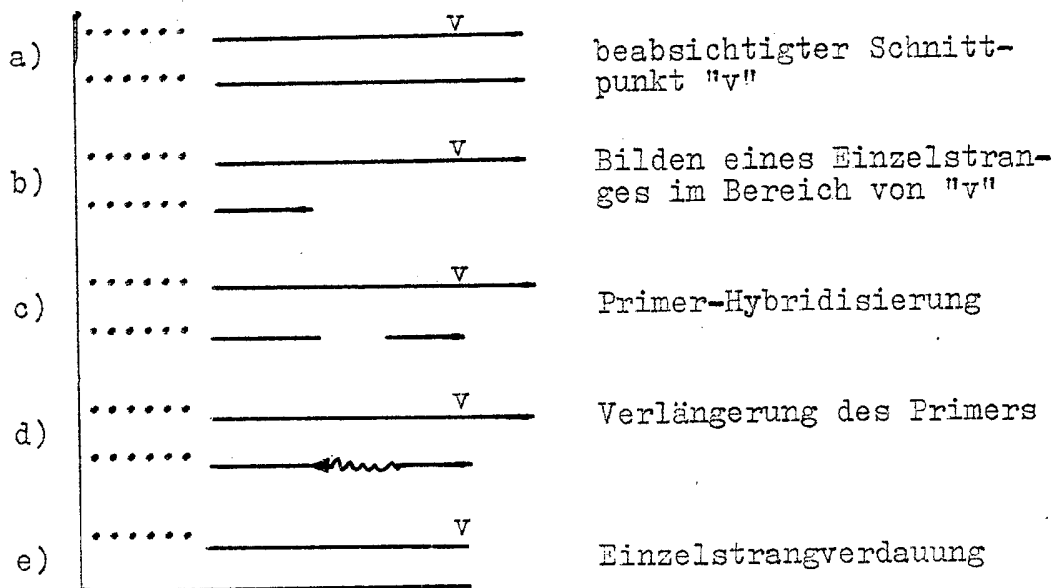
Wenn beispielsweise alle Basenpaare innerhalb der Leader-Sequenz distal vom Bp 70 deletiert werden, wird die Attenuator-Region entfernt, die ATG-Sequenz, die für das Translations-Startsignal codiert, verbleibt und der dazwischenliegende Translations-Stop, codiert durch TCA (Bp 69-71), wird entfernt durch Eliminieren von A und die darauffolgenden Nukleotide. Eine derartige Deletion hätte als Ergebnis die Expression eines Fusionsproteins, das mit dem Leader-Polypeptid beginnt und mit demjenigen Polypeptid endet, das durch irgendeine heterologe Insertion

codiert wird. Von diesen Polypeptiden wird eine distale Region eines an die Leader-Sequenz anschließenden trp-Operon-Polypeptids eingeschlossen, die durch das Ausmaß der Deletion in der 3'-Richtung bestimmt wird. Eine in das Gen E hineinreichende Deletion würde daher zur Expression eines homologen Vorläufers führen, der die L-Sequenz und die distale Region des Gens E (jenseits des Endpunkts der Deletion) enthält, verbunden mit der Sequenz, die durch irgendeine folgende Insertion codiert wird, usw.

Zwei besonders brauchbare Plasmide, aus denen die Attenuator-Region entfernt wurde, sind die Plasmide pGM1 und pGM3 (G. F. Miozzari et al., J. Bacteriology 133, 1457 (1978)). Diese Plasmide tragen die Deletionen trp Δ LE 1413 und trp Δ LE 1417 und exprimieren (unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operators) ein Polypeptid, das ungefähr die ersten sechs Aminosäuren des trp-Leaders und distale Regionen des E-Polypeptids enthält. In dem besonders bevorzugten Fall des Plasmids pGM1 wird lediglich etwa das letzte Drittel des E-Polypeptids exprimiert, wohingegen pGM3 nahezu die gesamte distale Hälfte des E-Polypeptid-Codons exprimiert. Der Stamm E.coli K-12 W3110 tna 2⁻trp⁻ Δ 102, der pGM1 enthält, ist bei der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Nummer 31622 hinterlegt. Das Plasmid pGM1 kann auf herkömmliche Weise aus dem genannten Stamm zur Verwendung in den unten beschriebenen Verfahren entfernt werden.

Eine Möglichkeit, um mit den durch die Erfindung bereitgestellten Mitteln Deletionen einzuführen, ist das spezifische Schneiden von doppelsträngiger DNA an jeder gewünschten Stelle. Ein Beispiel dieser Schneidetechnik ist unten im Teil IV der Beschreibung der Experimente darge-

legt. Dabei wird doppelsträngige DNA in einem den beabsichtigten Schneidepunkt umgebenden Bereich durch Reaktion mit λ -Exonuklease in einzelsträngige DNA umgewandelt. Daraufhin wird ein synthetischer oder anderer Einzelstrang-DNA-Primer an das vorher gebildete Einzelstrangstück durch Watson-Crick-Basenpaarung hybridisiert. Dabei muß sichergestellt sein, daß das 5'-Ende der Primersequenz exakt gegenüber demjenigen Nukleotid auf dem ersten Strang endet, das genau vor dem beabsichtigten Schneidepunkt liegt. Als nächstes wird der Primer durch Reaktion mit DNA-Polymerase in 3'-Richtung verlängert, wodurch derjenige Teil der ursprünglich doppelsträngigen DNA, der vor dem beabsichtigten Schnittpunkt liegt, wieder hergestellt wird, der im ersten Schritt verlorengegangen war. Gleichzeitig oder danach wird derjenige Teil des ersten Stranges, der jenseits des beabsichtigten Schnittpunkts liegt, wegverdaut. Das nachfolgende Schema veranschaulicht diesen Vorgang noch einmal, wobei "v" den beabsichtigten Schnittpunkt kennzeichnet:



In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Schritte (d) und (e) gleichzeitig ausgeführt, wobei eine Polymerase verwendet wird, die gleichzeitig die vorstehenden Einzelstrangenden in der $3' \rightarrow 5'$ -Richtung verdaut und den Primer (in Anwesenheit von dATP, dGTP, dTTP und dCTP) in der $5' \rightarrow 3'$ -Richtung verlängert. Besonders geeignet für diese Zwecke ist die Klenow-Polymerase I, d. h. dasjenige Fragment, das durch proteolytisches Spalten der DNA-Polymerase I erhalten wird und die $5' \rightarrow 3'$ -Polymerisierungsaktivität sowie die $3' \rightarrow 5'$ -Exonukleaseaktivität des Elternenzym aufweist, dagegen seine $5' \rightarrow 3'$ -Exonukleaseaktivität verloren hat (A. Kornberg, DNA Synthesis, 98, W. H. Freeman und Co., SFO (1974)).

Bei Verwendung des eben beschriebenen Verfahrens können Attenuator-Deletionen in einem ein trp-Operon enthaltenden Plasmid auf jede nur gewünschte Weise eingeführt werden. Das Plasmid wurde vorher in die lineare Form überführt, beispielsweise durch einen Schnitt an einer Restriktionserkennungsstelle stromabwärts von dem beabsichtigten Schnittpunkt, an dem das Molekül stumpfendig sein soll (siehe Bereich "v" im oben gezeigten Schema). Nach dem Deletieren der Attenuator-Region wird das Plasmid wieder in die Ringform gebracht. Dies kann beispielsweise durch Verbinden der stumpfen Enden oder auch durch andere Methoden geschehen, die dem Fachmann bekannt sind.

Obwohl die Erfindung die direkte Expression heterologer Polypeptide unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operators umfaßt, ist der bevorzugte Fall die Expression von fusionierten Proteinen, die sowohl homologe als auch heterologe Sequenzen enthalten, wobei letztere vorzugsweise durch extrazelluläre Maßnahmen spezifisch von den homologen Proteinen abspaltbar sind. Ganz besonders bevorzugt sind

- 24 - 243408 3

Fusionen, in denen der homologe Teil eine oder mehrere Aminosäuren des trp-Leader-Polypeptids enthält und etwa ein Drittel oder mehr der trpE-Aminosäuresequenz (distales Ende). So erhaltene Fusionsproteine scheinen unter Expressionsbedingungen bemerkenswert stabil gegen Abbau zu sein.

Das Bakterium E.coli K-12, Stamm W3110 tna 2⁻ trp⁻ Δ 102 (pGM1), ATCC Nummer 31622, kann dazu verwendet werden, den Vorrat des Plasmids pGM1 zu vervielfachen, das bevorzugt für die Konstruktion des Attenuator-freien trp-Promoter-Operator-Systems der Erfindung verwendet wird. Dieser Stamm ist in Gegenwart von Anthranilat phänotypisch trp⁺ und kann in Minimalmedium, beispielsweise LB, das mit 50 μ g/ml Anthranilsat supplementiert wurde, wachsen.

Alle Bakterienstämme, die im Zusammenhang mit der Erfindung für die trp-Promoter-Operator dirigierte Expression verwendet werden, sind trp Repressor⁺ (trp R⁺) wie im Fall des Wildtyp E.coli, so daß die Repression sichergestellt ist, bis die heterologe Expression angestrebt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DNA-Rekombination in E.coli K-12, Stamm 294 (end A, thi⁻, hsr⁻, hsm_k⁺), ATCC Nummer 31446, durchgeführt, einem Bakterienstamm, dessen Membraneigenschaften die Transformation erleichtern. Plasmide, die heterologe Polypeptide produzieren und im Stamm 294 gewachsen sind, werden auf die übliche Weise extrahiert und in Lösung gehalten (beispielsweise 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei Temperaturen von etwa -20 °C bis 4 °C. Für die Expression unter industriellen Bedingungen wird andererseits jedoch bevorzugt ein widerstandsfähigerer Stamm verwendet, nämlich

E. coli K-12 λ -F⁻RV 308 str^r, gal 308⁻, ATCC Nummer 31608. RV 308 ist ernährungsmäßig Wildtyp und wächst gut in Minimalmedium, in dem alle nötigen Macromoleküle aus einer üblichen Mischung von Ammonium-, Phosphat- und Magnesiumsalzen, Spurenelementen und Glukose synthetisiert werden. Nach der Transformation einer RV 308-Kultur mit dem aus dem Stamm 294 abgeleiteten Plasmid wird die Kultur auf einem Medium plattiert, das für einen Marker selektiv ist (beispielsweise Resistenz gegen ein Antibiotikum), den das Plasmid trägt. Eine Transformantenkolonie wird abgeimpft und in einer Flaschenkultur gezüchtet. Aliquots dieser Flaschenkultur werden in 10 % DMSO oder Glycerinlösung (in sterilen Wheaton-Fläschchen) in einem Äthanol-Trockeneisbad schockgefroren und auf -80 °C tiefgefroren. Um das codierte heterologe Polypeptid zu produzieren, werden Proben der Kultur in einem Medium gezüchtet, das Tryptophan enthält, um den trp-Promoter-Operator zu reprimieren. Anschließend wird dem System das zugegebene Tryptophan entzogen, um die Expression zu ermöglichen.

Für die erste Wachstumsstufe kann beispielsweise LB-Medium verwendet werden (J.H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, 433, Cold Spring Harbor Laboratory (1972)), das pro Liter wässriger Lösung 10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt und 10 g NaCl enthält. Vorzugsweise läßt man die beimpfte Kultur bis zu einer optischen Dichte (o.D.) von 10 oder mehr (bei 550 nm), insbesondere zu einer o.D. von 20 oder mehr, besonders bevorzugt jedoch zu einer o.D. von 30 oder mehr wachsen, jedoch nicht bis zur stationären Phase.

Für die Derepression und Expression wird die beimpfte Kultur als nächstes unter Bedingungen gezüchtet, unter denen der Zelle das zugegebene Tryptophan entzogen wird.

- 26 - 243408 3

Ein geeignetes Medium für ein derartiges Wachstum ist M9 (J. H. Miller, Seite 431, a.a.O.), das wie folgt hergestellt wird (pro Liter):

KH_2PO_4	3 g
Na_2HPO_4	6 g
NaCl	0,5 g
Na_4Cl	1 g

Nach dem Autoklavieren wird dieser Mischung zugegeben:

10 ml	0,01 M	CaCl_2
1 ml	1 M	MgSO_4
10 ml	20 %	Glukose
Vitamin B1	1,ug/ml	
"Humko Hycase Amino"		
oder DIFCO Kasein-Aminosäuren 40,ug/ml.		

Das Aminosäuresupplement ist ein Hydrolysat von Kasein, dem Tryptophan fehlt.

Um die Expression des heterologen Polypeptids zu starten, kann man beispielsweise die in einem Tryptophan-reichen Medium gewachsene Impfkultur in einem größeren Volumen eines Mediums verdünnen, das kein zusätzliches Tryptophan enthält (beispielsweise in einer 2- bis 10fachen Verdünnung). Man läßt die Kultur dann bis zu einer gewünschten Dichte wachsen (vorzugsweise bis kurz vor die stationäre Wachstumsphase) und erhält das angestrebte Produkt auf übliche Weise durch Lyse, Zentrifugieren und Reinigen. In dem Wachstumsstadium des Tryptophanentzugs läßt man die Zellen vorzugsweise bis zu einer o.D. von mehr als 10,

insbesondere von mehr als 20 und besonders bevorzugt bis zu oder über eine o.D. von 30 (jeweils bei 550 nm) wachsen, ehe das angestrebte Produkt isoliert wird.

Alle DNA-Rekombinations-Experimente, die in dem folgenden experimentellen Teil beschrieben werden, wurden bei Genentech Inc. in Übereinstimmung mit den Richtlinien des National Institutes of Health (NIH) bezüglich der Forschung mit rekombinanter DNA durchgeführt.

I. Expression des D-Polypeptid-Fusionsproteins

Mit Bezug auf die Fig. 1 bis 3 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Expression von Fusionsproteinen beschrieben, die das gewünschte Polypeptid enthalten und, daran angebunden, einen Teil der Aminosäuresequenz des trpD-Polypeptids, das in vitro mittels einer Aminosäure Methionin, die spezifisch für ein CNBr-Spalten sensitiv ist, abgetrennt werden kann.

A) Konstruktion von pBRHtrp

Das Plasmid pGM1 (1, Fig. 1) trägt das E.coli-Tryptophan-Operon, das die Deletion Δ LE 1413 enthält (G. F. Miozzari et al., (1978), J. Bacteriology 1457-1466) und exprimiert somit ein Fusionsprotein, das die ersten sechs Aminosäuren des trp-Leaders und annähernd das letzte Drittel des trpE-Polypeptids (im nachfolgenden als die Verbindung LE' bezeichnet) ebenso wie das vollständige trpD-Polypeptid, enthält, alle unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems. 20 μ g des Plasmids werden mit dem Restriktionsenzym PvuII verdaut, das das Plasmid an fünf Stellen schneidet. Das Gen-

- 28 - 243408 3

fragment 2 (Fig. 1) wird als nächstes mit einer EcoRI-Verbindungsstelle, einem sogenannten Linker (bestehend aus einem in sich selbst komplementären Oligonukleotid 3 (Fig. 1) der Sequenz pCATGAATTCATG) kombiniert, wodurch eine EcoRI-Schnittstelle für ein späteres Clonen in ein Plasmid 20 (Fig. 6), das eine EcoRI-Erkennungsstelle enthält, zur Verfügung gestellt wird. Die durch das Plasmid pGM1 erhaltenen 20 µg des DNA-Fragments 2 (Fig. 1) werden mit 10 Einheiten T₄-DNA-Ligase in Anwesenheit von 200 Picomolen des 5'-phosphorylierten, synthetischen Oligonukleotids 3 (Fig. 1) mit der Sequenz pCATGAATTCATG und in 20 µl T₄-DNA-Ligase-Puffer (20 mM Tris, pH 7,6; 0,5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol) bei 4 °C über Nacht behandelt. Die Lösung wird daraufhin 10 Minuten lang bei einer Temperatur von 70 °C erhitzt, um die Ligasebindung zu stoppen. Die Linker werden durch EcoRI-Verdauung geschnitten, und die Fragmente, die nun EcoRI-Enden enthalten, werden mittels 5 %iger Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (im folgenden PAGE genannt) voneinander getrennt. Die drei größten Fragmente werden sodann aus dem Gel isoliert, indem sie zuerst mit Äthidiumbromid markiert, danach die Fragmente mit Ultraviolett-Licht lokalisiert und schließlich die interessierenden Teile aus dem Gel herausgeschnitten werden. Jedes Gelfragment wird mit 300 Mikrolitern 0,1 x TBE in einen Dialyseschlauch überführt und in einem 0,1 x TBE-Puffer bei 100 V eine Stunde lang einer Elektrophorese unterworfen (der TBE-Puffer enthält 10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure, 0,09 g Na₂EDTA in 1 l H₂O). Die wässrige Lösung wird aus dem Dialyseschlauch gesammelt, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert, und 0,2 Natriumchlorid-molar gemacht und die DNA in Wasser

- 29 - 243408 3

überführt, nachdem sie mit Äthanol gefällt wurde. (Sämtliche DNA-Fragment-Isolierungen, die im folgenden beschrieben werden, wurden unter Verwendung von PAGE, gefolgt von der eben beschriebenen Methode des Elektroeluisierens, durchgeführt.) Das Gen 5 (Fig. 1), das den trp-Promoter-Operator enthält sowie überstehende EcoRI-Enden aufweist, wird in einem Verfahren identifiziert, das als nächstes beschrieben werden wird, welches das Einfügen von Fragmenten in ein Tetracyclin-sensitives Plasmid 6 (Fig. 1) zur Folge hat, das, infolge der Promoter-Operator-Insertion, Tetracyclin-resistent wird.

- B) Herstellen des Plasmids pBRHtrp, das unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operators Tetracyclin-Resistenz exprimiert sowie Identifizieren und Vervielfältigen des im obigen Abschnitt A) isolierten DNA-Fragments 5 (Fig. 1), das den trp-Promoter-Operator enthält.

Das Plasmid 6 (Fig. 1) mit der Bezeichnung pBRH1 (R. I. Rodriguez et al., Nucleic Acids Research 6, 3267-3287 (1979)) exprimiert Ampicillin-Resistenz und enthält das Gen für Tetracyclin-Resistenz, welches allerdings, da kein dazugehöriger Promoter vorhanden ist, diese Resistenz nicht exprimiert. Dementsprechend ist das Plasmid Tetracyclin-sensitiv. Durch Einführen eines Promoter-Operator-Systems in die EcoRI-Erkennungsstelle kann das Plasmid Tetracyclin-resistent gemacht werden. Das Plasmid pBRH1 wird mit EcoRI verdaut, worauf das Enzym durch Phenol-Extraktion entfernt wird, gefolgt durch eine Chloroform-Extraktion und Wiederaufnahme in Wasser nach

einer Äthanol-fällung. Das entstandene DNA-Molekül 7 (Fig. 1) wird, in getrennten Reaktionsmischungen, mit jedem der drei DNA-Fragmente, die im oben geschilderten Teil A) erhalten wurden, kombiniert und mit T₄-DNA-Ligase, wie vorstehend beschrieben, verbunden. Die in der Reaktionsmischung vorhandene DNA wird durch Standardtechniken (V. Hershfield et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 71, 3455-3459 (1974)) dazu verwendet, um einen kompetenten E.coli K-12, Stamm 294 (K. Backman et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 73, 4174-4198 (1976)) (ATCC Nummer 31448) zu transformieren, worauf die Bakterien auf LB-Platten, die 20 µg/ml Ampicillin und 5 µg/ml Tetracyclin enthalten, plattiert werden. Es werden einige Tetracyclin-resistente Kolonien selektiert, die Plasmid-DNA isoliert und die Anwesenheit des gewünschten Fragments durch eine Restriktionsenzym-Analyse sichergestellt. Das resultierende Plasmid 8 (Fig. 1), mit der Bezeichnung pBRHtrp, exprimiert β-Lactamase, verleiht Ampicillin-Resistenz, und es enthält ein DNA-Fragment, das den trp-Promoter-Operator einschließt und für ein erstes Protein codiert, das aus einer Fusion der ersten sechs Aminosäuren des trp-Leaders und annähernd des letzten Drittels des trpE-Polypeptids (dieses Polypeptid wird LE' genannt) besteht, sowie für ein zweites Protein, entsprechend der ungefähr ersten Hälfte des trpD-Polypeptids (dieses Polypeptid wird D' genannt) und weiterhin für ein drittes Protein, für das das Gen für Tetracyclin-Resistenz codiert.

- C) Clonierende Gene für verschiedene Endprodukt-Polypeptide und die Expression dieser Gene als Fusionsproteine, die das Endprodukt und einen spezifisch spaltbaren trpD-Polypeptid-Vorläufer enthalten (Fig. 2).

Aus dem Plasmid pBRHtrp 8 erhält man ein den trp-Promoter-Operator und Codons für die LE'- und D'-Polypeptide aufweisendes DNA-Fragment, das in Plasmide inseriert wird, die Strukturgene für verschiedene gewünschte Polypeptide enthalten, im folgenden beispielhaft dargestellt für den Fall des Somatostatin (Fig. 2).

Das Plasmid pBRHtrp 8 wird mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und das so entstandene Fragment 5 (Fig. 2) durch PAGE und Elektroelution isoliert. Das EcoRI-verdaute Plasmid pSom11 (K. Itakura et al., Science 198, 1056 (1977)); GB-PS 2 007 676 A) wird mit Fragment 5 (Fig. 2) vereint. Die Mischung wird, wie oben beschrieben, mit T_4 -DNA-Ligase verbunden, und mit der resultierenden DNA wird E.coli K-12, Stamm 294, wie bereits geschildert, transformiert. Transformierte Bakterien werden auf Ampicillin enthaltenden Platten selektiert. So erhaltene Ampicillin-resistente Kolonien werden durch Hybridisieren der Kolonien geprüft (M. Gruenstein et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 72, 3951-3965 (1975)), wobei als Vergleich das aus dem Plasmid pBRHtrp 8 isolierte, den trp-Promoter-Operator enthaltende Fragment 5 (Fig. 2) verwendet wird, das mit P^{32} radioaktiv markiert wurde. Verschiedene Kolonien, die sich bei der Hybridisierung der Kolonien als positiv herausgestellt haben, werden selektiert, die Plasmid-DNA wird isoliert und die Orientierung des inserierten Fragments durch Restriktionsanalyse bestimmt, wobei die Restriktionsenzyme BglIII und BamHI in einer Doppelverdauung verwendet werden. Der Stamm E.coli 294, der das Plasmid 11 (Fig. 2) mit der Bezeichnung pSom7 Δ 2 enthält, welches das trp-Promoter-Operator-Fragment in der

gewünschten Orientierung aufweist, wird in LB-Medium gezüchtet, das 10 µg/ml Ampicillin enthält. Man läßt die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1 wachsen (bei 550 nm), sammelt sie durch Zentrifugieren und resuspendiert sie in M9-Medium in zehnfacher Verdünnung. Man läßt die Zellen daraufhin zwei bis drei Stunden lang wachsen, bis sie wieder eine optische Dichte von 1 aufweisen, lysiert sie und analysiert das vollständige zelluläre Protein mit SDS (Natriumdodecylsulfat), Harnstoff (15 %) und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (J. V. Maizel Jr. et al., Meth Viral 5, 180-246 (1971)).

In Fig. 3 ist eine Protein-Gel-Analyse dargestellt, bei der sämtliches Protein von verschiedenen Kulturen der Größe nach getrennt wurde. Die Dichte der einzelnen Banden gibt die Menge wieder, in der die entsprechenden Proteine vorliegen. In der Abbildung der Fig. 3 sind die Spalten 1 und 7 Kontrollen, die eine Vielzahl von Proteinen enthalten, deren Größe vorher bestimmt wurde und die als Referenz dienen. In den Spalten 2 und 3 ist zelluläres Protein von Kolonien des Stammes E.coli 294 gewandert, der mit dem Plasmid pSom7Δ2 11 transformiert wurde und entweder in LB-Medium (Spalte 2) oder in M9-Medium (Spalte 3) gezüchtet wurde. Die Spalten 4 und 5 enthalten zelluläres Protein, das aus ähnlichen Zellen erhalten wurde, die mit dem Plasmid pThα7Δ2 transformiert wurden. Hierbei handelt es sich um ein Thymosin-exprimierendes Plasmid, das durch ein im wesentlichen mit dem bereits beschriebenen identischen Verfahren erhalten wird, wobei von dem Plasmid pThα1 ausgegangen wird (siehe die gemeinsam von

Roberto Crea und Ronald B. Wetzel auf die Anmelderin übergegangene US-Patentanmeldung, eingereicht am 28. Februar 1980 bezüglich der Thymosin α 1-Produktion; durch dieses Zitat ist die Patentanmeldung in die Offenbarung mit einbezogen). Die Spalte 4 enthält zelluläres Protein von E.coli 294/pTh α 7 Δ 2, das in LB-Medium gewachsen ist, wohingegen die Spalte 5 Zellprotein aus derselben Transformanten enthält, die jedoch in M9-Medium gewachsen ist. Spalte 6, eine weitere Kontrolle, ist das Proteinpuster von E.coli 294/pBR322, gewachsen in LB-Medium.

Ein Vergleich mit den Kontrollen zeigt, daß die oberste der beiden am stärksten hervortretenden Banden in den Spalten 3 und 5 Proteine derjenigen Größe enthalten, die im Fall der Expression eines Fusionsproteins erwartet wird, das das D'-Polypeptid und Somatostatin bzw. Thymosin enthält (die andere ausgeprägte Bande enthält das LB'-Polypeptid als Ergebnis der Deletion des Attenuators). Fig. 3 bestätigt, daß die Expression in Tryptophan-reichem Medium reprimiert ist, jedoch unter Tryptophan-Mangelbedingungen dereprimiert ist.

D) Bromcyan-Spaltung und Radioimmunoassay des Hormonprodukts

Sowohl im Fall des Thymosins als auch des Somatostatins wird das vollständige zelluläre Protein mit Bromcyan gespalten, das Spaltprodukt wiedergewonnen und nach dem Trocknen in Puffer resuspendiert und durch Radioimmunoassay analysiert, wodurch sichergestellt wird, daß das Expressionsprodukt immunologisch identisch ist mit Somatostatin bzw.

Thymosin. Das Spalten mit Bromcyan ist beschrieben bei D. V. Goeddel et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 76, 106-110 (1979).

II. Konstruktion von Plasmiden für die direkte Expression heterologer Gene unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems

Die Strategie für eine direkte Expression hat die Schaffung eines Plasmids zur Folge, das distal von allen Kontrollelementen des trp-Operons eine einzige Restriktionserkennungsstelle aufweist, in welche heterologe Gene anstelle der trp-Leader-Sequenz und in richtigem, räumlichem Verhältnis zu der trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle des Polypeptids geclont werden können. Die Durchführung der direkten Expression wird im folgenden für den Fall der Expression des menschlichen Wachstumshormons beispielhaft beschrieben.

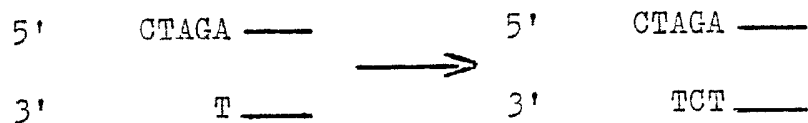
10 µg des Plasmids pSom7Δ2 11 werden mit EcoRI geschnitten und das DNA-Fragment 5 (Fig. 4), das die genetischen Bestandteile für Tryptophan enthält, wird durch PAGE und Elektroelution isoliert. 2 µg dieses Fragments werden mit zwei Einheiten der Restriktionsendonuklease TaqI verdaut, und zwar 10 Minuten bei 37 °C, so daß im Durchschnitt nur eine der vermutlich fünf TaqI-Erkennungsstellen in jedem Molekül geschnitten wird. Diese teilweise verdaute Fragmentmischung wird durch PAGE getrennt und ein annähernd 300 Basenpaare langes DNA Fragment 12 (Fig. 4), das ein EcoRI-Ende und ein TaqI-Ende enthält, wird durch Elektroelution isoliert. Die korrespondierende TaqI-Erkennungsstelle ist zwischen den Startstellen für die Transkription und die Translation angeordnet und liegt 5 Nukleotide

stromaufwärts vom ATG-Codon des trp-Leader-Peptids. Die DNA-Sequenz dieses Bereichs ist in Fig. 4 gezeigt. Wenn man wie beschrieben verfährt, kann ein Fragment isoliert werden, das alle Kontrollelemente des trp-Operons enthält, d. h. das Promoter-Operator-System, das Transkriptions-Initiationssignal und die trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle.

Als nächstes wird der dem Translations-Startsignal für die trp-Leader-Sequenz benachbarte TaqI-Rest am 3'-Ende des erhaltenen Fragments in eine XbaI-Erkennungsstelle umgewandelt, wie Fig. 5 zeigt. Dies erfolgt durch Anknüpfen des oben erhaltenen Fragments 12 an ein Plasmid, das nur eine einzige EcoRI- und eine einzige XbaI-Erkennungsstelle enthält. Für diese Zwecke kann man im wesentlichen jedes Plasmid verwenden, das aufeinanderfolgend ein Replikon, einen selektierbaren Marker, beispielsweise eine Antibiotikum-Resistenz, und EcoRI-, XbaI- und BamHI-Erkennungsstellen enthält. Hierzu kann beispielsweise eine XbaI-Erkennungsstelle zwischen die EcoRI- und BamHI-Erkennungsstelle auf dem Plasmid pBR322 eingefügt werden (F. Boliver et al., Gene 2, 95-119 (1977)), und zwar beispielsweise in der Weise, daß an der einzigen HindIII-Erkennungsstelle des Plasmid mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten wird, gefolgt von einer Einzelstrang-spezifischen Nukleaseverdauung der so entstandenen überstehenden Enden und Verknüpfen der stumpfen Enden eines sich selbst fest verbindenden doppelsträngigen, synthetischen Nukleotids, das beispielsweise eine Erkennungsstelle CCTCTAGAGG enthält. Andererseits können auf natürliche Weise erhaltene DNA-Fragmente verwendet werden, wie im vorliegenden Fall, die eine einzelne XbaI-Erkennungsstelle zwischen EcoRI- und BamHI-Schneideresten enthalten.

- 36 - 243408 3

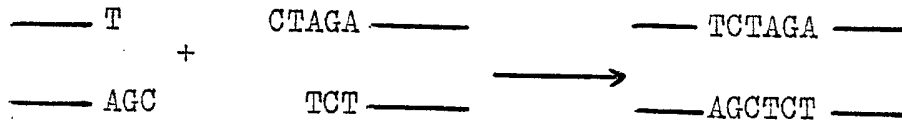
Mit üblichen Mitteln wurde somit ein EcoRI- und BamHI-Verdauungsprodukt des Genoms des Hepatitis B-Virus hergestellt und zwischen die EcoRI- und BamHI-Erkennungsstellen des Plasmids pGH6 eingefügt (D. V. Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)), wodurch das Plasmid pHS32 gebildet wird. Das Plasmid pHS32 wird mit XbaI geschnitten und aufeinanderfolgend mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt. Es wird dann mit 1 μ l E.coli-Polymerase I, Klenow-Fragment in 30 μ l Polymerase-Puffer (50 mM Calciumphosphat pH 7,4, 7 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoäthanol), enthaltend 0,1 mM dTTP und 0,1 mM dCTP, vorerst 30 Minuten lang bei 0 °C und dann 2 Stunden bei 37 °C behandelt. Diese Behandlung hat zur Folge, daß zwei der vier, zu der am 5'-Ende überstehenden XbaI-Schneidestelle komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden:



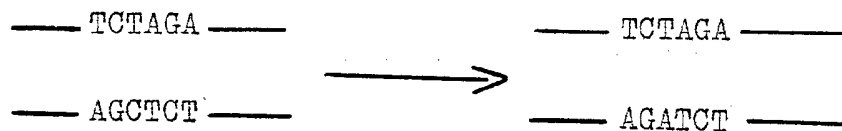
Zwei Nukleotide, dC und dT, werden auf diese Weise eingebaut, wodurch ein Ende mit zwei 5'-überstehenden Nukleotiden entsteht. Dieser lineare Rest des Plasmids pHS3213 wird (nach Phenol- und Chloroformextraktion und Wiederaufnahme in Wasser nach Äthanol-fällung) mit EcoRI geschnitten. Das große Plasmidfragment 13 (Fig. 5) wird von dem kleineren EcoRI-XbaI-Fragment durch PAGE getrennt und nach Elektroelution isoliert. Dieses DNA-Fragment 13 von pHS32 (~0,2 μ g) wird, unter ähnlichen Bedingungen wie oben beschrieben, an das EcoRI-TaqI-Fragment des Tryptophan-Operons (0,01 μ g) angeknüpft, wie in Fig. 5 dargestellt. Bei diesem Verfahren wird das überstehende TaqI-Ende mit dem verbleibenden überstehenden XbaI-Ende verknüpft, wobei sogar vermutet

- 37 - 243408 3

wird, daß nicht überall Watson-Crick-Basenpaarung vorliegt:



Ein Teil dieser Verknüpfungs-Reaktionsmischung wird in *E. coli* 294-Zellen transformiert, wie oben in Abschnitt I beschrieben, hitzebehandelt und auf LB-Platten, die Ampicillin enthalten, plattiert. 24 Kolonien werden selektiert, in 3 ml LB-Medium gezüchtet und das Plasmid isoliert. Sechs dieser Plasmide zeigten via *E. coli* katalysierter DNA-Reparatur und -Replikation eine völlig wiederhergestellte XbaI-Erkennungsstelle:



Diese Plasmide wurden auch sowohl durch EcoRI als auch HpaI geschnitten und ergaben die erwarteten Restriktionsfragmente. Ein Plasmid 14 (Fig. 5), genannt pTrp 14, wurde für die Expression heterologer Polypeptide verwendet, wie im folgenden diskutiert werden wird.

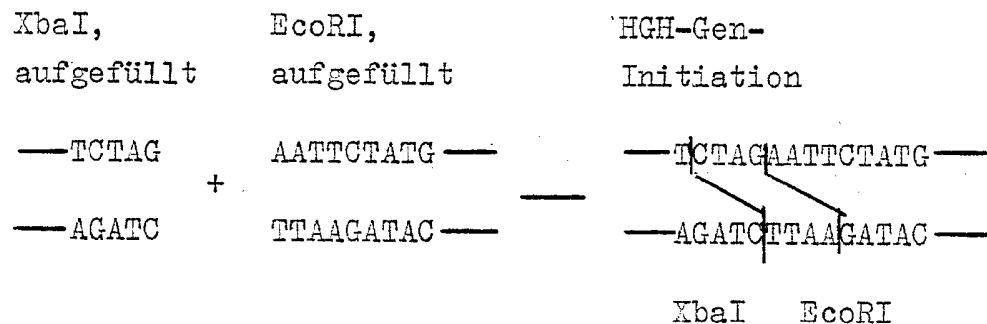
Das Plasmid pGH107, mit dem Bezugszeichen 18 in Fig. 6 (D. V. Goeddel et al., Nature, 281, 544 (1979)) enthält ein Gen für menschliches Wachstumshormon, bestehend aus 23 Aminosäurecodons, hergestellt aus synthetischen DNA-Fragmenten und weiteren 163 Aminosäurecodons, erhalten aus komplementärer DNA, die mittels reverser Transkription der m-RNA des menschlichen Wachstumshormons erhalten wurde. Dieses Gen 21 (Fig. 6) enthält, obwohl ihm

die "pre"-Sequenz des menschlichen Wachstumshormons fehlt, ein ATG-Translations-Initiationscodon. Das Gen wird aus 10 µg pHGH107 nach Behandlung mit EcoRI und nachfolgend mit E.coli-Polymerase-I-Klenow-Fragment und dTTP und dATP, wie beschrieben, isoliert. Nach einer Phenol- und Chloroformextraktion und Äthanol-fällung wird das Plasmid mit BamHI behandelt, siehe dazu Fig. 6. Das Fragment 21, welches das Gen für menschliches Wachstumshormon (HGH) enthält, wird durch PAGE, gefolgt durch Elektroelution, isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment enthält weiterhin die ersten 350 Nukleotide des Strukturgens für Tetracyclin-Resistenz, nicht dagegen das Tetracyclin-Promoter-Operator-System, so daß - wenn es anschließend in einem Expressionsplasmid geclont wird - Plasmide, die die Insertion tragen, dadurch gefunden werden können, daß die Tetracyclin-Resistenz wieder hergestellt ist. Da das EcoRI-Ende des Fragments 21 (Fig. 6) durch die Behandlung mit der Klenow-Polymerase-I aufgefüllt wurde, weist das Fragment ein stumpfes und ein überstehendes Ende auf, wodurch beim späteren Einfügen in ein Expressionsplasmid die korrekte Orientierung sichergestellt ist, siehe dazu Fig. 6.

Als nächstes wird das Expressionsplasmid pTrp1414 vorbereitet, um das vorstehend hergestellte, das HGH-Gen 21 enthaltende Fragment aufzunehmen. Dazu wird das Plasmid pTrp1414, XbaI-verdaut, und die erhaltenen überstehenden Enden werden mit dem Klenow-Polymerase-I-Verfahren unter Verwendung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP aufgefüllt. Nach Phenol- und Chloroformextraktion und Äthanol-fällung wird die resultierende DNA 16 (Fig. 6) mit BamHI behandelt und das so erhaltene große Plasmidfragment 17 (Fig. 6) durch PAGE und Elektroelution isoliert. Das

von pTrp14 abgeleitete Fragment 17 (Fig. 6) hat ein stumpfes und ein überstehendes Ende, wodurch Rekombination mit dem das HGH-Gen 21 enthaltenden Fragment, das oben beschrieben wurde, in korrekter Orientierung sichergestellt ist.

Das HGH-Genfragment 21 (Fig. 6) und das pTrp14 Xba-BamHI-Fragment 17 (Fig. 6) werden unter ähnlichen Bedingungen wie oben beschrieben zusammengefügt und miteinander verknüpft. Die aufgefüllten XbaI- und EcoRI-Enden werden durch stumpfendige Verknüpfung miteinander verbunden, wodurch sowohl die XbaI- als auch die EcoRI-Erkennungsstellen wieder hergestellt werden:



Diese Konstruktion stellt auch das Gen für Tetracyclin-Resistenz wieder her. Da das Plasmid pHGH107 die Tetracyclin-Resistenz von einem Promoter aus exprimiert, der stromaufwärts vom HGH-Gen 21 liegt (dem lac-Promoter), erlaubt diese Konstruktion 22 (Fig. 6), genannt pHGH207, die Expression des Gens für Tetracyclin-Resistenz unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators. Dazu wird E.coli 294 mit der Verknüpfungsmischung transformiert und die Kolonien auf LB-Platten, die 5 µg/ml Tetracyclin enthalten, selektiert.

Um die direkte Expression des menschlichen Wachstumshormons vom Plasmid pHGH207,22, nachzuweisen, wird das gesamte zelluläre Protein aus der Kultur *E.coli* 294/pHGH207 gewonnen, nachdem die Kultur bis zu einer optischen Dichte von 1 in LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin gezüchtet, danach in M9-Medium 1:10 verdünnt und wieder bis zu einer optischen Dichte von 1 gezüchtet wurde. Das gesamte zelluläre Protein wird einer SDS-Gel-Elektrophorese, wie im obigen Abschnitt I geschildert, unterworfen und mit ähnlichen Elektrophoresedaten für menschliches Wachstumshormon verglichen, die früher von anderen gefunden wurden (D. V. Goeddel et al., Nature, 281, 544 (1979)). Fig. 7 ist eine Fotografie des so erhaltenen, gefärbten Gels. Die Spalten 1 und 7 enthalten Vergleichsproteine verschiedener bekannter Größen; die Spalte 2 ist eine Kontrolle mit dem gesamten zellulären Protein des Stammes *E.coli* 294/pBR322; die Spalte 3 enthält Protein von *E.coli* 294/pHGH107, gewachsen in LB-Medium; die Spalte 4 enthält Protein von *E.coli* 294/pHGH107, gewachsen in M9-Medium; die Spalte 5 enthält Protein von *E.coli* 294/pHGH207, gewachsen in LB-Medium; und Spalte 6 enthält Protein *E.coli* 294/pHGH207, gewachsen in M9-Medium. Die dichte Bande in Spalte 6 ist menschliches Wachstumshormon, wie durch den Vergleich zu den ähnlichen Banden in den Spalten 2 bis 4 gezeigt ist. Wie durch die Erfindung vorausgesagt, produziert der Organismus *E.coli* 294/pHGH207, wenn er in Tryptophan-reichem LB-Medium wächst, weniger Wachstumshormon aufgrund der Tryptophan-Repressor-Operator-Interaktion, und, gezogen in M9-Medium, beträchtlich mehr HGH als *E.coli* 294/pHGH107, bedingt durch die Induktion des im Gegensatz zum lac-Promoter-Operator-System in pHGH107 stärkeren Tryptophan-Promoter-Operator-Systems.

III. Herstellen eines allgemeinen Expressionsplasmids für die direkte Expression heterologer Gene unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators

Das im vorstehenden Abschnitt hergestellte Plasmid pGH207,22, wird als nächstes dazu verwendet, um ein DNA-Fragment zu erhalten, das die Kontrollelemente des Tryptophan-Operons enthält (mit Ausnahme des Attenuators) und einen Plasmid-Expressions-Vektor herzustellen, der für die direkte Expression verschiedener, inserierter Strukturgene geeignet ist. Zur Strategie des Herstellens des allgemeinen Expressionsplasmids gehört das Entfernen der Tryptophan-Kontrollregion von pGH207 durch EcoRI-Verdauung und Inserieren in das EcoRI-verdaute Plasmid pBRH1, das oben in Abschnitt I verwendet wurde. pBRH1 ist, wie bereits erwähnt, ein Ampicillin-resistentes Plasmid, das die Gene für Tetracyclin-Resistenz enthält, jedoch Tetracyclin-sensitiv ist, da ein geeignetes Promoter-Operator-System fehlt.

Das so erhaltene Plasmid, pHKY1,24, dessen Konstruktion unten detailliert beschrieben wird und in Fig. 8 dargestellt ist, ist sowohl Ampicillin- als auch Tetracyclin-resistent, enthält das Tryptophan-Promoter-Operator-System, enthält nicht den Tryptophan-Attenuator und enthält eine einzige XbaI-Erkennungsstelle, die distal vom Tryptophan-Promoter-Operator liegt. Der Tryptophan-Promoter-Operator und die einzige XbaI-Erkennungsstelle sind von EcoRI-Erkennungsstellen eingefasst, so daß das Fragment, das den Tryptophan-Promoter-Operator und die XbaI-Erkennungsstelle enthält, zum Zwecke des Einfügens in andere Strukturgene enthaltende Plasmide entfernt werden kann.

Andererseits können heterologe Strukturgene entweder in die XbaI-Erkennungsstelle oder (nach teilweiser EcoRI-Verdauung) in die EcoRI-Erkennungsstelle distal von der Tryptophan-Kontrollregion eingefügt werden, in jedem Fall mit dem Ziel, die Strukturgene der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operator-Systems zu unterwerfen.

Das Plasmid pHG207,22, wird EcoRI-verdaut und das den trp-Promoter enthaltende EcoRI-Fragment 23 (Fig. 8) wird durch PAGE, gefolgt von Elektroelution, wiedergewonnen.

Das Plasmid pBRH1,6, wird EcoRI-verdaut und die geschnittenen Enden mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) behandelt (1 µg, in 50 mM Tris pH8 und 10 mM MgCl₂, 30 Minuten lang bei 65 °C), um die Phosphatgruppen an den überstehenden EcoRI-Enden zu entfernen. Der Überschuss an bakterieller alkalischer Phosphatase wird durch Phenolextraktion, Chloroformextraktion und Äthanol-fällung entfernt. Die resultierende lineare DNA 7a (Fig. 8) wird, da an ihren überstehenden Enden Phosphate fehlen, bei einer Verknüpfung nur Insertionen annehmen, deren komplementäre überstehende Enden phosphoryliert sind, und wird nicht in sich selbst rezirkularisieren, wodurch das Ausschleichen nach Plasmiden, die die Insertion tragen, erleichtert wird. Das von Plasmid pHG207,22, abgeleitete EcoRI-Fragment und die vom Plasmid pBRH1,6, erhaltene lineare DNA wurden in Anwesenheit von T₄-Ligase, wie bereits beschrieben, vermischt und verknüpft. Mit einem Teil der so erhaltenen Mischung wird der Stamm E.coli 294, wie bereits beschrieben, transformiert, auf LB-Medium, enthaltend 5 µg/ml Tetracyclin, plattiert, und es werden zwölf

Tetracyclin-resistente Kolonien selektiert. Aus jeder Kolonie wird das Plasmid isoliert und auf die Anwesenheit einer DNA-Insertion durch Restriktionsendonuklease-Analyse unter Verwendung von EcoRI und XbaI überprüft. Ein Plasmid 24, das die Insertion enthielt, wurde pHKY1 genannt.

- IV. Herstellen eines Plasmids, das das Tryptophan-Operon enthält, fähig zur Expression eines spezifisch spaltbaren Fusionsproteins, das aus sechs Aminosäuren des trp-Leader-Peptids, dem letzten Drittel des trpE-Polypeptids (genannt LE') sowie einem heterologen Strukturgen-Produkt besteht

Die Strategie für das Herstellen eines Plasmids, das ein LE'-Fusionsprotein exprimiert, beinhaltet folgende Schritte:

- a) Bereitstellen eines Genfragments, das aus Codons für die distale Region des LE'-Polypeptids besteht und überstehende Enden einer BglIII-Erkennungsstelle am 5'-Ende und einer EcoRI-Erkennungsstelle am 3'-Ende des codierenden Strangs aufweist
- b) Eliminieren der Codons von der distalen Region des LE'-Genfragments und derjenigen für die trpD-Gene aus dem Plasmid Som7Δ2 und Inserieren des in Stufe 1 gebildeten Fragments, wodurch die LE'-Codonsequenz unmittelbar stromaufwärts von der für das heterologe Gen für Somatostatin codierenden Codonsequenz wiederhergestellt wird.

- 44 - 243408 3

Fig. 9a zeigt die HindIII-Verdauung des Plasmids pSom7 Δ 2,11, gefolgt von einer λ -Exonuklease-Verdauung (einer 5' \longrightarrow 3'-Exonuklease) unter Bedingungen, die so gewählt werden, daß jenseits der BglIII-Restruktionserkennungsstelle innerhalb der LE' codierenden Region verdaut wird. 20 μ g des HindIII-verdauten pSom7 Δ 2 werden in Puffer gelöst (20 mM Glycinpuffer pH 9,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM β -Mercaptoäthanol). Das erhaltene Gemisch wird mit 5 Einheiten λ -Exonuklease 60 Minuten lang bei Raumtemperatur behandelt. Die so erhaltene Reaktionsmischung wird dann Phenol-extrahiert, Chloroform-extrahiert und mit Äthanol gefällt.

Um letztlich einen EcoRI-Rest am distalen Ende des LE' Genfragments herzustellen, wird mittels der bewährten Phosphotriester-Methode (R. Crea et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 75, 5765 (1978)) ein Primer ³²pCCTGTGCATGAT synthetisiert und an ein Einzelstrangende des LE'-Genfragments hybridisiert, das durch λ -Exonuklease-Verdauung erhalten wurde. Die Hybridisierung wird im folgenden beschrieben.

20 μ g des λ -Exonuklease behandelten HindIII-Verdauungsprodukts des Plasmids pSom7 Δ 2, 11, wird in 20 μ l H₂O gelöst und mit 6 μ l einer Lösung vereint, die etwa 80 Picomole der 5'-phosphorylierten Oligonukleotide, wie oben beschrieben, enthält. Das synthetische Fragment wird an das 3'-Ende der LE' codierenden Sequenz hybridisiert, und der verbleibende Einzelstrangteil des LE'-Fragments wird durch das Klenow-Polymerase-I-Verfahren, wie oben beschrieben, aufgefüllt, wobei dATP, dTTP, dGTP und dCTP verwendet werden.

Die Reaktionsmischung wird auf 50 °C erhitzt und langsam auf 10 °C abgekühlt, wonach 4 µl Klenow-Enzym zugegeben werden. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von 30 minütiger Inkubation bei 37 °C, wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,25 molarem EDTA gestoppt. Die Reaktionsmischung wird Phenol-extrahiert, Chloroform-extrahiert und mit Äthanol gefällt. Anschließend wird die DNA mit dem Restriktionsenzym BglIII geschnitten. Die Fragmente werden durch PAGE getrennt. Ein aus dem Gel erhaltenes Autoradiogramm zeigt ein ³²P-markiertes Fragment der erwarteten Länge von annähernd 470 Bp, das durch Elektroelution rückgewonnen wird. Wie bereits hervorgehoben, hat das Fragment IE'(d) ein BglIII- und ein stumpfes Ende, das mit dem Anfang des Primers übereinstimmt.

Das Plasmid pTh α 1, 30, das oben im Abschnitt I. (C) beschrieben wurde, enthält ein Strukturgen für Thymosin α 1, das an seinem 5'-Ende des codierenden Strangs in eine EcoRI-Erkennungsstelle und an seinem 3'-Ende in eine BamHI-Erkennungsstelle geclont ist. Wie in Fig. 9b gezeigt, enthält das Gen für Thymosin eine zusätzliche BglIII-Erkennungsstelle.

Das Plasmid pTh α 1 enthält weiterhin ein Gen für Ampicillin-Resistenz. Um ein Plasmid herzustellen, das in der Lage ist, das wie oben geschildert hergestellte IE'(d)-Fragment aufzunehmen, wird das Plasmid pTh α 1, 30, mit EcoRI verdaut, gefolgt von einer Klenow-Polymerase-I-Reaktion mit dTTP und dATP, um die EcoRI-Reste stumpfendig zu machen. Durch BglIII-Verdauung des so erhaltenen Produkts wird ein lineares DNA-Fragment 33 (Fig. 9b) hergestellt, das die Gene für Ampicillin-Resistenz und, jeweils an den entgegengesetzten Enden,

einen überstehenden BglIII-Rest und ein stumpfes Ende enthält. Das so erhaltene Produkt kann durch Reaktion mit dem LE'(d)-Fragment, das ein überstehendes BglIII-Ende und ein stumpfes Ende enthält, in der Gegenwart von T₄-Ligase rezirkularisiert werden, um das Plasmid pTrp24, 34, (Fig. 9b) zu bilden. Während dieses Vorgangs wird eine EcoRI-Erkennungsstelle an der Position wiederhergestellt, wo die Verknüpfung der stumpfen Enden erfolgte.

Im weiteren Verlauf wird, wie in Fig. 10 gezeigt, nacheinander das Plasmid pTrp24, 34, mit BglIII und EcoRI verdaut, danach PAGE behandelt und elektroeluiert, wodurch ein Fragment entsteht, das die Codons für das LE'(d)-Polypeptid mit einem überstehenden BglIII-Ende und einem überstehenden EcoRI-Ende, angrenzend an seinen 3'Terminus des codierenden Strangs aufweist. Das LE'(d)-Fragment 38 (Fig. 10) kann in die BglIII-Erkennungsstelle des Plasmids pSom7Δ2, 11, geclont werden, um ein LE'-Polypeptid/Somatostatin-Fusionsprotein zu bilden, das unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators exprimiert wird, wie in Fig. 10 gezeigt. Ein solches Verfahren erfordert erstens eine partielle EcoRI-Verdauung des Plasmids pSom7Δ2, 11, um die EcoRI-Erkennungsstelle distal vom Tryptophan-Promoter-Operator zu schneiden, wie in Fig. 10 gezeigt, und zweitens eine korrekte Wahl der Primer-Sequenz (Fig. 9), um den korrekten Codon-Leseraster zu erhalten und eine EcoRI-Schneidestelle wiederherzustellen.

Dazu werden 16 μg des Plasmids pSom7Δ2, 11, in 200 μl Puffer, bestehend aus 20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂,

0,02 % NP40 Detergens, 100 mM NaCl verdünnt und mit 0,5 Einheiten EcoRI behandelt. Nach 15 minütiger Behandlungszeit bei 37 °C wird die Reaktionsmischung Phenol-extrahiert, Chloroform-extrahiert und mit Äthanol gefällt und anschließend mit BglIII verdaut. Das größere, so erhaltene Fragment 36 (Fig. 10) wird durch die PAGE-Behandlung isoliert, gefolgt von Elektroluierung. Dieses Fragment 36 enthält die Codons LE'(p) für das proximale Ende des LE'-Polypeptids, d. h. diejenigen Codons, die stromaufwärts von der BglIII-Erkennungsstelle liegen. Das Fragment 36 (Fig. 10) wird als nächstes an das Fragment 38 (Fig. 10) in Anwesenheit von T₄-Ligase verknüpft, um das Plasmid pSom7Δ2Δ4, 39, zu bilden, das, nach Transformation in den Stamm E.coli 294, wie bereits beschrieben, wirksam unter die Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators ein Fusionsprotein produziert, das aus dem vollständig rekonstituierten LE'-Polypeptid und Somatostatin besteht. Das Fusionsprotein, von dem das Somatostatin dank der Anwesenheit eines Methionins am 5'-Ende der Somatostatinsequenz spezifisch gespalten werden kann, wird durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, wie bereits beschrieben, segregiert. Das Fusionsprotein-Produkt stellt die am deutlichsten sichtbare Bande in der Spalte 6 der Fig. 11 dar, wie im Detail im noch folgenden Abschnitt VI beschrieben werden wird.

- V. Herstellen eines Expressionssystems für trp-LE'-Polypeptid-Fusionsprodukte, wobei die Tetracyclin-Resistenz unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators steht.

Die Strategie für das Herstellen eines Expressionsvektors, der in der Lage ist, eine große Anzahl ver-

schiedener heterologer Gene für Polypeptide als trp-LE'-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Tryptophan-Operons zu exprimieren, erfordert die Konstruktion eines Plasmids, das die folgenden Charakteristika aufweist:

1. eine Tetracyclin-Resistenz, die im Falle des Herausschneidens des Promoter-Operator-Systems, das die Gene für diese Resistenz kontrolliert, verlorengehen würde
2. durch Wiedereinfügen des Promoter-Operator-Systems, das die Tetracyclin-Resistenz kontrolliert, und Rezirkularisieren durch dessen Verknüpfen mit einem heterologen Gen sowie einem Tryptophan-Promoter-Operator-System in richtiger Lesephase wird Tetracyclin-Resistenz wieder hergestellt und entsprechend die Identifizierung von Plasmiden, die den heterologen Geneinschluß erhalten, ermöglicht.

In Kürze gesagt und in Übereinstimmung mit der Natur der beabsichtigten Insertionen, soll ein lineares Stück DNA hergestellt werden, das einen Pst-Rest an seinem 3'-Ende und einen BglIII-Rest an seinem 5'-Ende aufweist, die an ein Gen angrenzen, das fähig ist, Tetracyclin-Resistenz zu spezifizieren, wenn es unter die Kontrolle eines Promoter-Operator-Systems gebracht wird.

Dazu wird, wie in Fig. 12 dargestellt, das Plasmid pBR322, 43, mit HindIII verdaut und das überstehende HindIII-Ende daraufhin mit S1-Nuklease verdaut. Die S1-Nuklease-Verdauung besteht aus der Behandlung von 10 µg eines HindIII-geschnittenen Plasmids pBR322 in 30 µl S1-Puffer (0,3 M NaCl), 1 mM ZnCl₂, 25 mM

Natriumacetat, pH 4,5) mit 300 Einheiten S1-Nuklease 30 Minuten lang bei 15 °C. Die Reaktion wird durch Zugeben von 1 µl von 30 X S1-Nuklease-Stoplösung (0,8 M Tris, 50 mM EDTA) gestoppt. Die Mischung wird Phenol-extrahiert, Chloroform-extrahiert und mit Äthanol gefällt, dann EcoRI-verdaut, wie bereits beschrieben, und das große Fragment 46 (Fig. 12) durch PAGE-Behandlung erhalten, worauf eine Elektroelution folgt. Das erhaltene Fragment hat ein erstes überstehendes EcoRI-Ende und ein zweites stumpfes Ende, dessen codierender Strang mit dem Nukleotid Thymidin beginnt. Wie im folgenden gezeigt wird, kann der S1-verdaute HindIII-Rest, der mit Thymidin beginnt, mit einem Klenow-Polymerase-I-behandelten BglII-Rest verbunden werden, so daß nach der Verknüpfung die BglII-Restriktionserkennungsstelle wieder hergestellt ist.

Das Plasmid pSom7Δ2, 11, das im obigen Abschnitt I vorbereitet wurde, wird BglII-verdaut und die so entstandenen überstehenden BglII-Enden mit dem Klenow-Polymerase-I-Verfahren doppelsträngig gemacht, wobei alle vier Desoxynukleotidtriphosphate verwendet werden. Das EcoRI-Schneiden des resultierenden Produkts, gefolgt durch PAGE und Elektroelution des kleinen Fragments 42 (Fig. 13), stellt ein lineares Stück DNA zur Verfügung, das den Tryptophan-Promoter-Operator und Codons der proximalen Sequenz des LE'-Proteins stromaufwärts der BglII-Erkennungsstelle (LE'(p)) enthält. Das DNA-Stück hat ein EcoRI-Ende und ein stumpfes Ende als Ergebnis des Auffüllens der BglII-Erkennungsstelle. Die BglII-Erkennungsstelle kann jedoch durch Anknüpfen des stumpfen Endes des Fragments 42 (Fig. 13) an das stumpfe Ende des Fragments 46 (Fig. 13) wieder hergestellt werden. Dazu werden die beiden Fragmente in Anwesenheit von T₄-DNA-Ligase verknüpft, um das

rezirkularisierte Plasmid pHKY10 47 (siehe Fig. 12) zu bilden, das durch Transformation in kompetente Zellen des Stammes *E. coli* 294 vermehrt wird. Tetracyclin-resistente Zellen, die das rekombinante Plasmid pHKY10 47 tragen, werden gezüchtet, die Plasmid-DNA extrahiert und nacheinander mit BglIII und Pst verdaut, daraufhin durch das PAGE-Verfahren isoliert und das große Fragment elektroeluiert, das als lineares Stück DNA vorliegt und überstehende Pst- und BglIII-Enden aufweist. Dieses DNA-Fragment 49 (Fig. 13) enthält den Origin (die Anfangsstelle) der Replikation und hat sich infolgedessen als erster Bestandteil bei der Konstruktion eines Plasmids als nützlich erwiesen, bei dem sowohl die Gene, die für das trp-LE'Polypeptid-Fusionsprotein codieren, als auch die Tetracyclin-Resistenz-Gene durch den trp-Promoter-Operator kontrolliert werden.

Das Plasmid pSom7A2A4, 39, das auf die in Abschnitt IV beschriebene Weise hergestellt werden kann, kann so manipuliert werden, daß es als zweite Komponente des Systems dient, das in der Lage sein soll, eine große Anzahl verschiedener heterologer Strukturgene aufzunehmen. Wie in Fig. 13 gezeigt, wird das Plasmid einer Teil-EcoRI-Verdauung unterworfen (siehe Abschnitt IV), gefolgt von einer Pst-Verdauung. Das so erhaltene Fragment 51 (Fig. 12) enthält den trp-Promoter-Operator und wird durch das PAGE-Verfahren isoliert, gefolgt von Elektroelution. Die Teil-EcoRI-Verdauung ist nötig, um ein Fragment zu erhalten, das unmittelbar anschließend an das 5'-Ende des Somatostatingens geschnitten wird, jedoch nicht an der EcoRI-Erkennungsstelle geschnitten wird, die zwischen dem Gen für Ampicillin-Resistenz und dem trp-Promoter-Operator

- 51 - 243408 3

liegt. Die durch den PstI-Schnitt im Gen für Ampicillin-Resistenz verlorengangene Ampicillin-Resistenz kann durch Verknüpfung mit Fragment 51 (Fig. 12) wieder hergestellt werden.

In einer ersten Ausführungsform kann der dritte Bestandteil, ein Strukturgen für Thymsin α 1 durch EcoRI- und BamHI-Verdauung des Plasmids pTh α 1 erhalten werden. Das so hergestellte Fragment 52 (Fig. 12) wird durch PAGE gereinigt und elektroeluiert.

Die drei Genfragmente 49, 51 und 52 können nun, wie in Fig. 12 dargestellt, in richtiger Orientierung miteinander verknüpft werden, um das Plasmid pTh α 7 Δ 1 Δ 4, 53, zu bilden, das aufgrund der Wiederherstellung der Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz selektiert werden kann. Wenn mit diesem Plasmid 53 der Stamm E.coli 294 transformiert wird und der Stamm unter Bedingungen gezüchtet wird, wie sie im Abschnitt I beschrieben wurden, wird ein trp-LE'-Polypeptid-Fusionsprotein exprimiert, von dem Thymsin α 1 durch Bromcyan-Behandlung spezifisch gespalten werden kann. Wenn andere heterologe Strukturgene, die EcoRI- und BamHI-Enden aufweisen, auf ähnliche Weise mit von pHKY10, 47, und pSon7 Δ 2 Δ 4, 39, abgeleiteten Bestandteilen verknüpft werden, können ähnlich wirksame trp-LE'-Polypeptid-Fusionsproteine erhalten werden, die jeweils diejenigen Polypeptide enthalten, für welche die heterologen Gene codieren. Fig. 11 zeigt eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-Trennung des totalen zellulären Proteins von E.coli 294-Transformanten, wobei die dunkelsten Banden in jedem Fall das Fusionsprotein repräsentieren, das unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operator-Systems

produziert wurde. Die Spalte 1 in Fig. 11 ist eine Kontrolle, die das vollständige zelluläre Protein des Stammes *E. coli* 294/pBR322 enthält. Die Spalte 2 enthält das Somatostatin-Fusionsprodukt des Plasmids pSom7A2A4, dessen Herstellung in Abschnitt IV beschrieben wurde. Spalte 3 ist das Somatostatin-enthaltende Expressionsprodukt des Plasmids pSom7A1A4. Spalte 4 enthält das Expressionsprodukt des Plasmids pTH \surd 7A1A4, wohingegen Spalte 5 das Produkt enthält, das durch ein Plasmid exprimiert wird, das erhalten wird, wenn die pHKY10-abgeleiteten und pSom7A2A4-abgeleiteten Fragmente, wie oben erörtert, mit einem EcoRI/BamHI-terminierten Strukturgen verknüpft werden, das für menschliches Proinsulin codiert, das teilweise bei der Anmelderin hergestellt wurde. Die Spalten 6 bzw. 7 enthalten, als dunkelste Banden, ein trp-LE'-Polypeptid-Fusionsprotein, von dem in dem einen Fall die B-Kette und in dem anderen Fall die A-Kette des menschlichen Insulins gespalten werden kann. Die B- und A-Strukturgene des Insulins werden durch EcoRI- und BamHI-Verdauung des Plasmids pIB1 bzw. pIA11 erhalten, deren Herstellung bei D. V. Goeddel et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 76, 106 (1979), beschrieben ist. Die Spalte 8 enthält Größenmarker, wie bereits beschrieben.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist unter Verwendung von *E. coli* beschrieben. Es können jedoch wahlweise andere Enterobacteriaceen als Wirtszellen für die Expression und als Quelle für die trp-Operons dienen, von denen beispielsweise *Salmonella typhimurium* und *Serratia marcescens* zu erwähnen sind. Somit ist die Erfindung nicht auf die geschilderten Ausführungsbeispiele beschränkt.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbaren neu zu konstruierenden Plasmide sind neue, in ihrer Struktur eindeutig definierbare chemische Substanzen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsplasmids für die Expression eines heterologen Gens, gekennzeichnet dadurch, daß in Phase die folgenden Elemente gleichzeitig verknüpft werden:

- a) ein erstes lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das ein Replikon enthält und ein Gen, das eine selektierbare Eigenschaft exprimiert, wenn es unter die Steuerung eines bakteriellen Promoters gestellt wird, wobei das Fragment keinen derartigen Promoter aufweist,
- b) ein zweites lineares doppelsträngiges DNA-Fragment, das das genannte heterologe Gen aufweist,
- c) ein drittes doppelsträngiges DNA-Fragment, das einen bakteriellen Promoter aufweist,

wobei die verknüpfbaren Enden der genannten Fragmente so gestaltet sind, daß nach dem Verknüpfen zum Bilden eines sich replizierenden Plasmids sowohl das Gen für die selektierbare Eigenschaft als auch das heterologe Gen unter die Steuerung des Promoters kommen, wodurch die Verwendung der selektierbaren Eigenschaft bei der Selektion von transformierten Bakterienkolonien möglich ist, welche zur Expression der heterologen Gene fähig sind.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die selektierbare Eigenschaft eine Antibiotikum-resistenz ist.

- ~~55~~ - 243408 3
54

3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß die selektierbare Eigenschaft Tetracyclin-Resistenz ist und der bakterielle Promoter der trp-Promoter ist.
4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß die Verknüpfung ebenso ein Operon für die Expression von Ampicillin-Resistenz wiederherstellt.

Hierzu 14 Seiten Zeichnungen

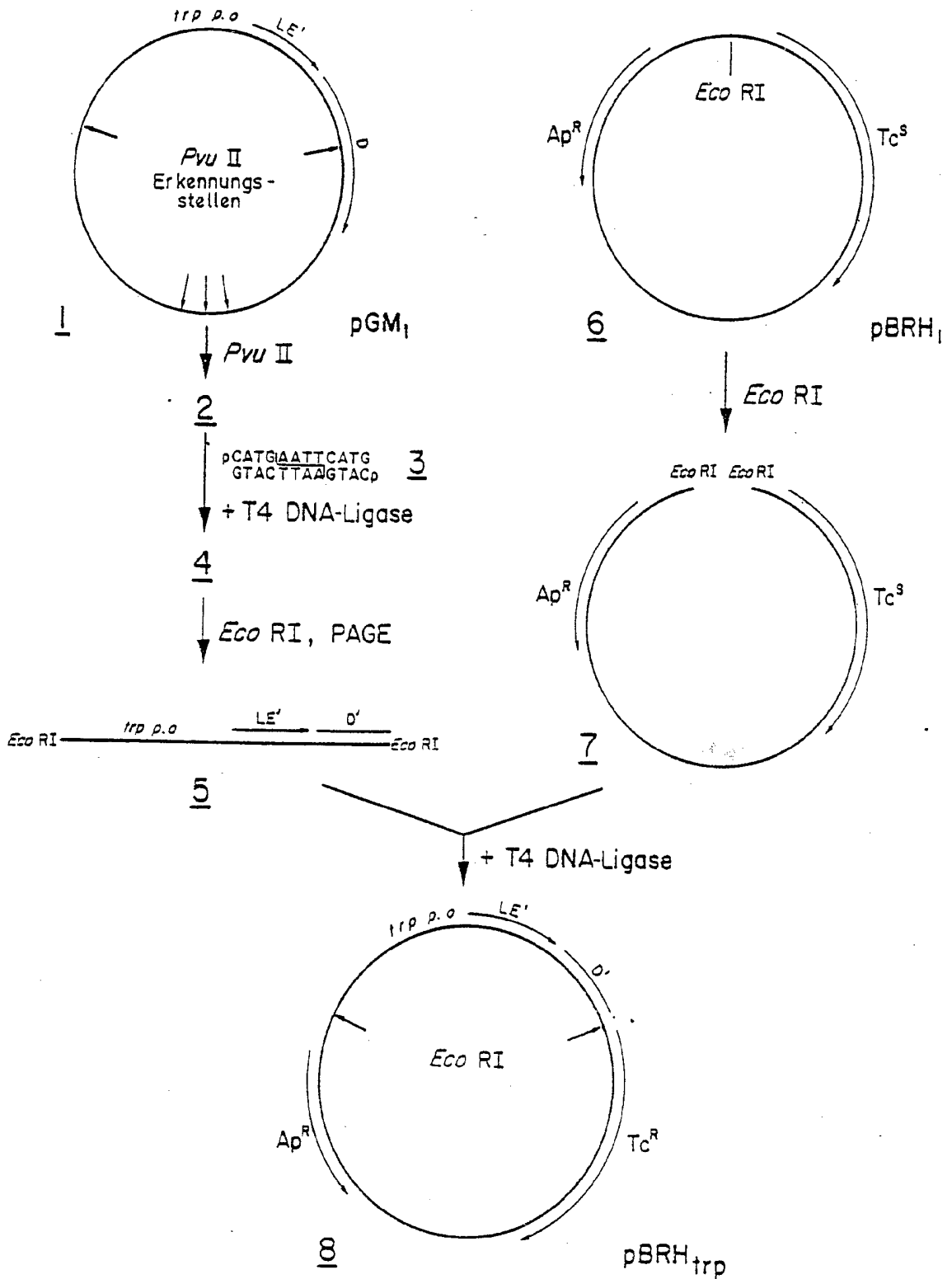


Fig. 1

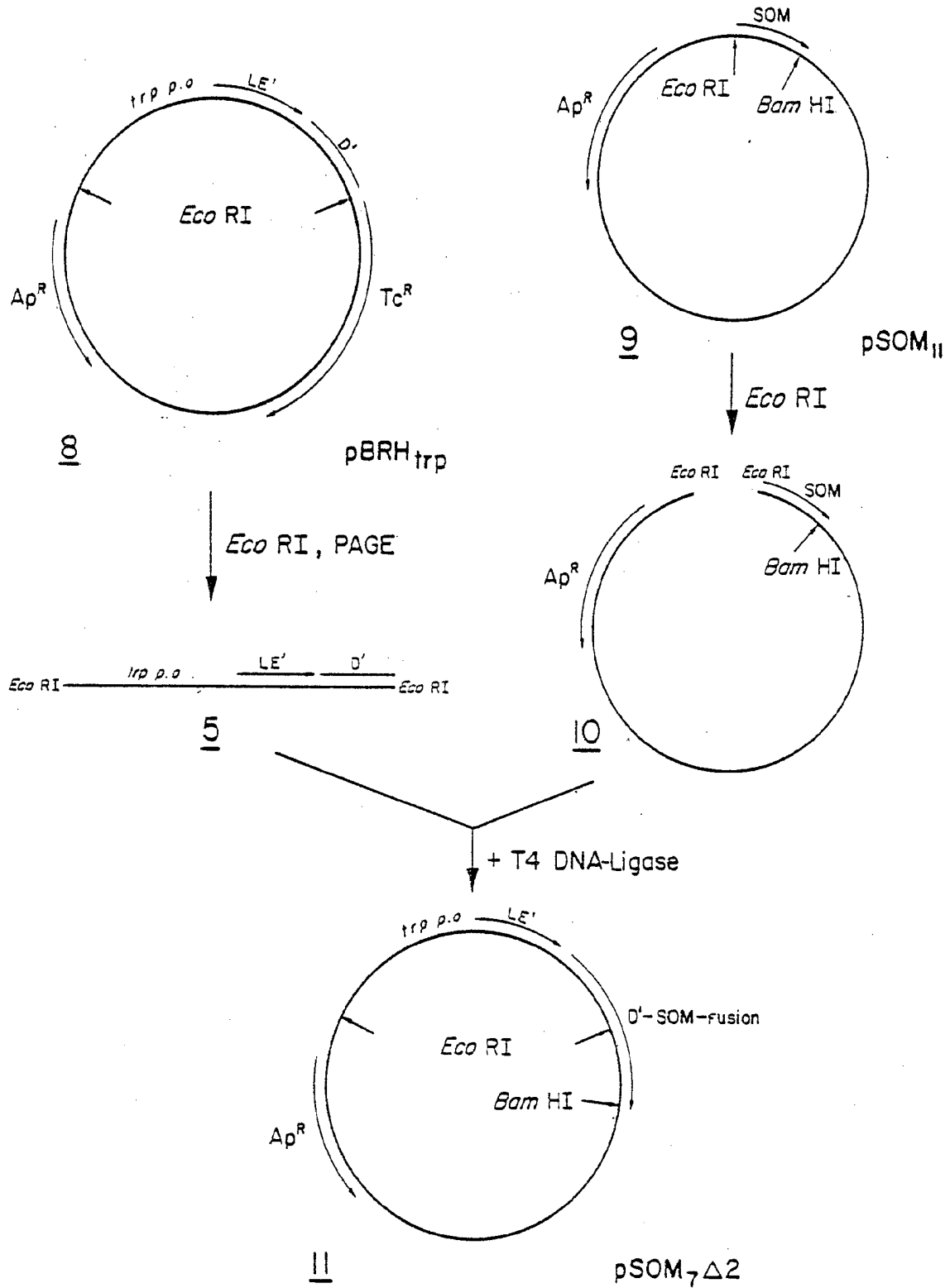


Fig. 2

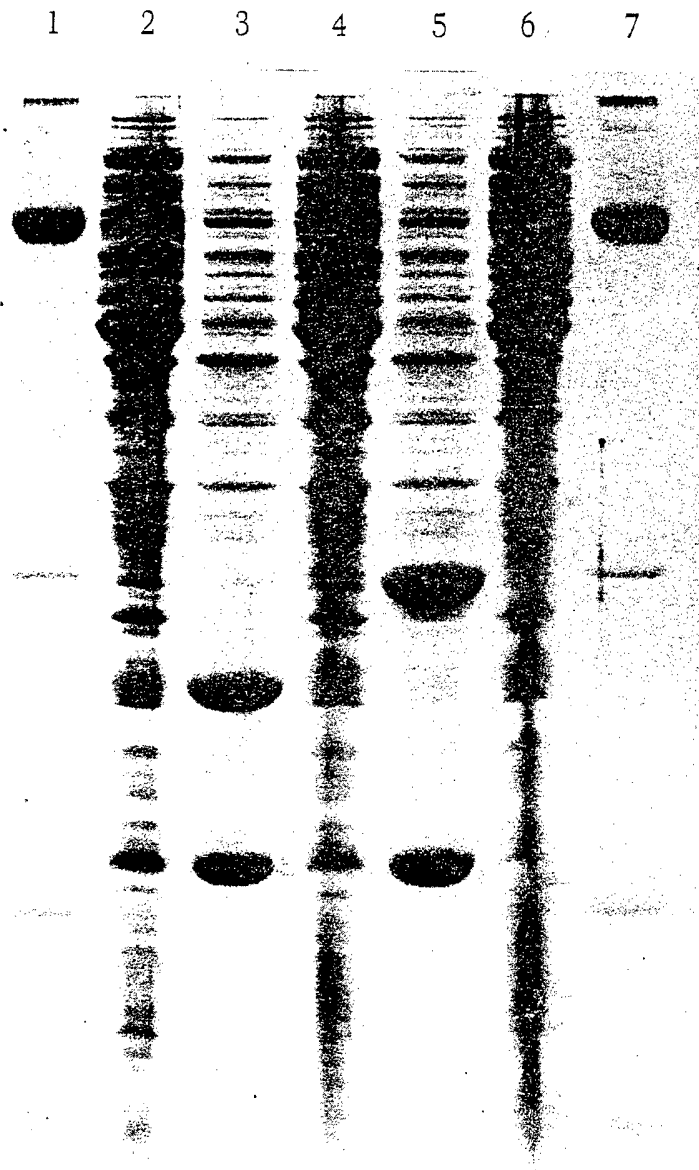
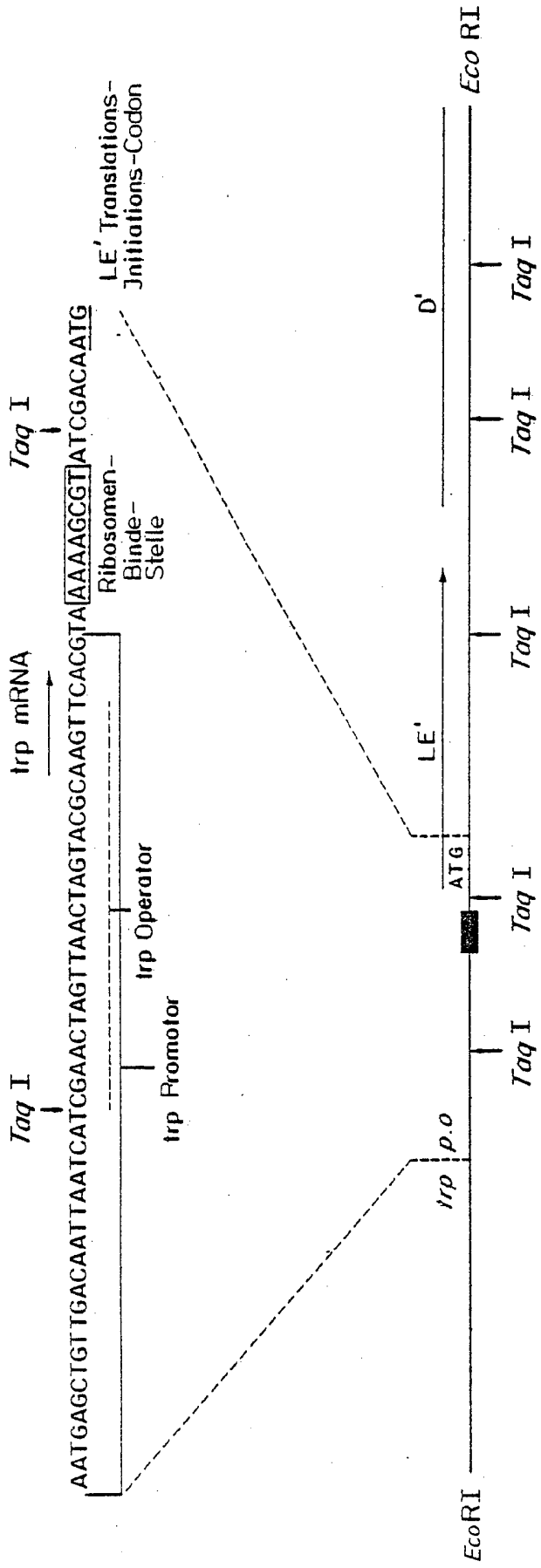


FIG. 3.



5

04 810 4000 4 0 25 2 2 1

Fig. 4

12

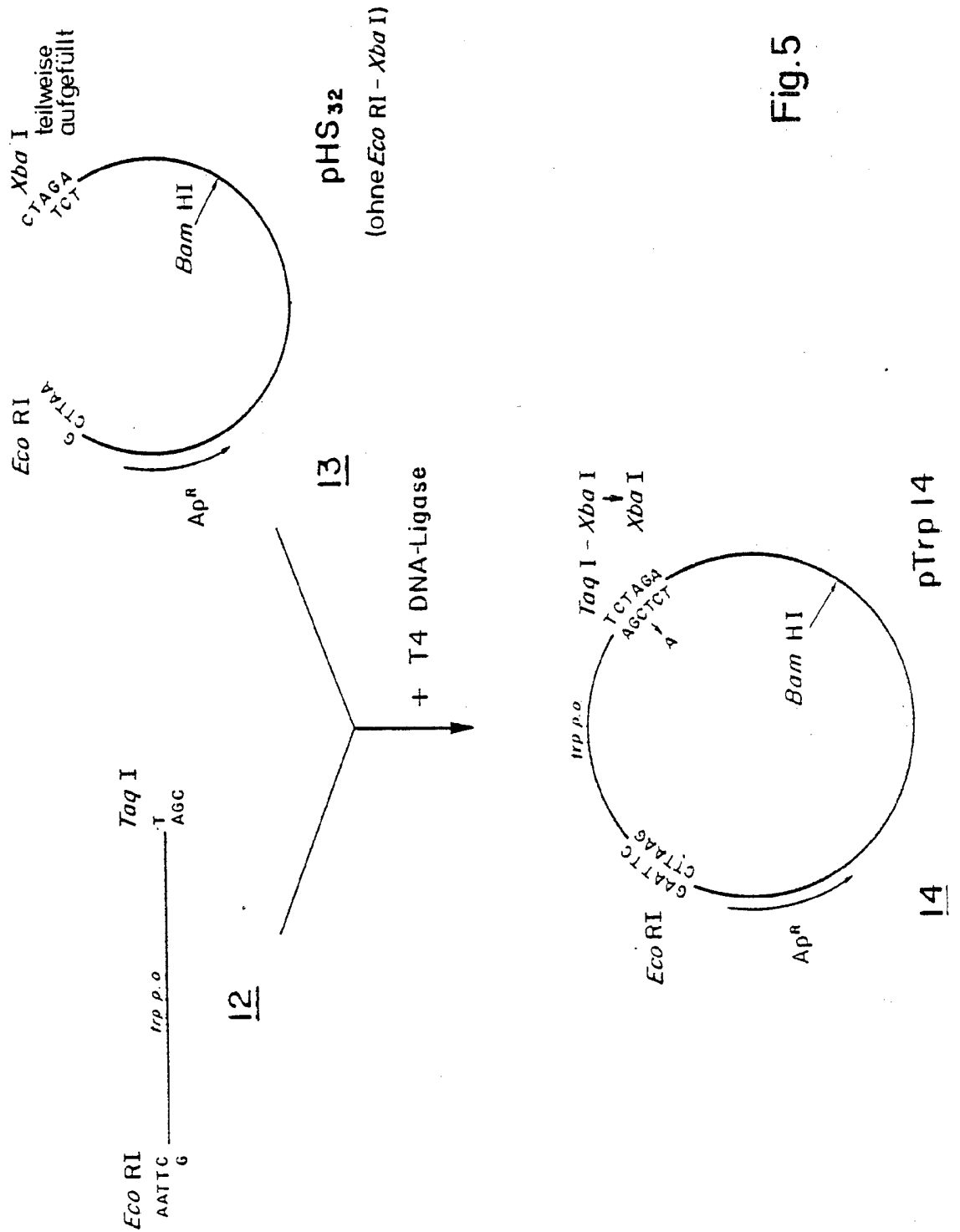


Fig.5

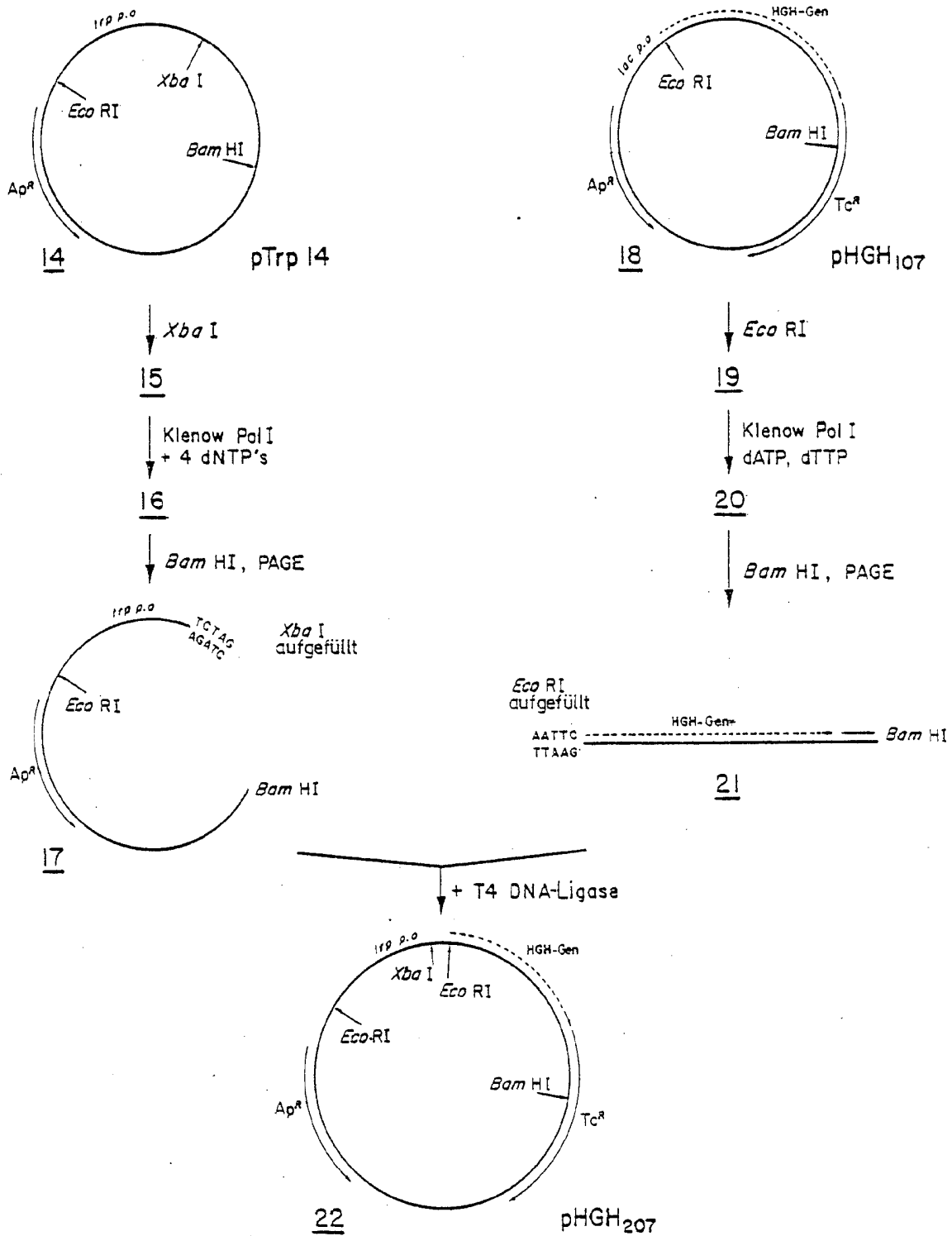


Fig.6

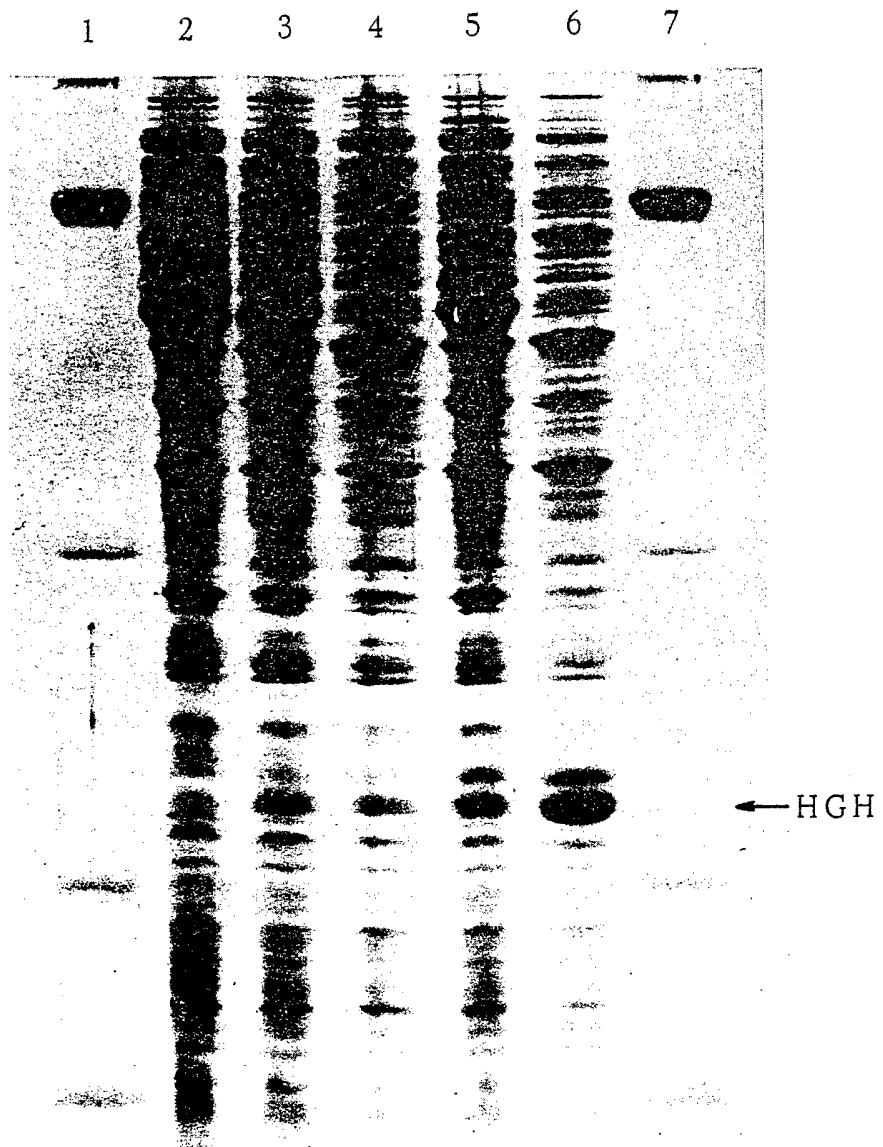


FIG. 7.

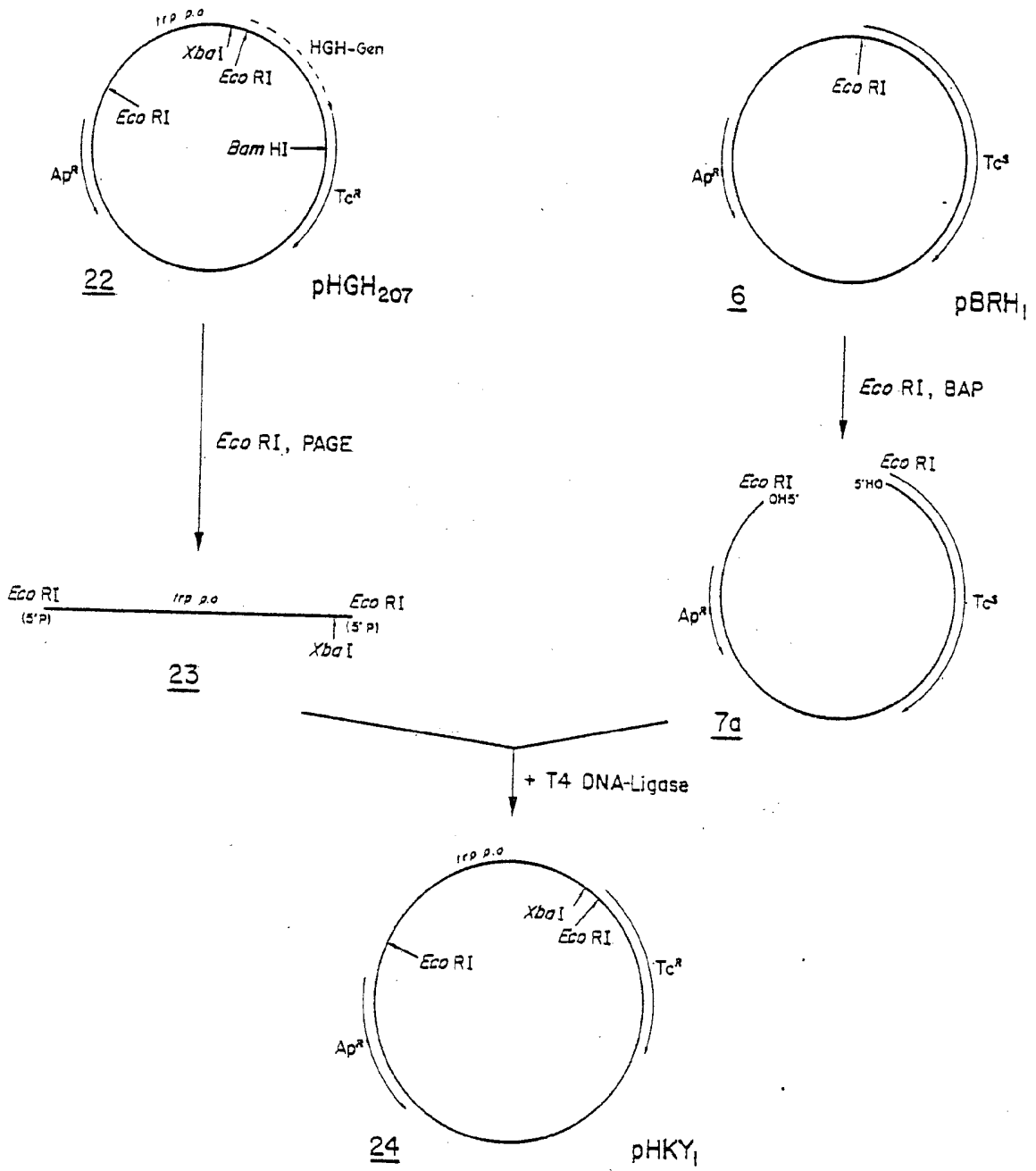


Fig.8

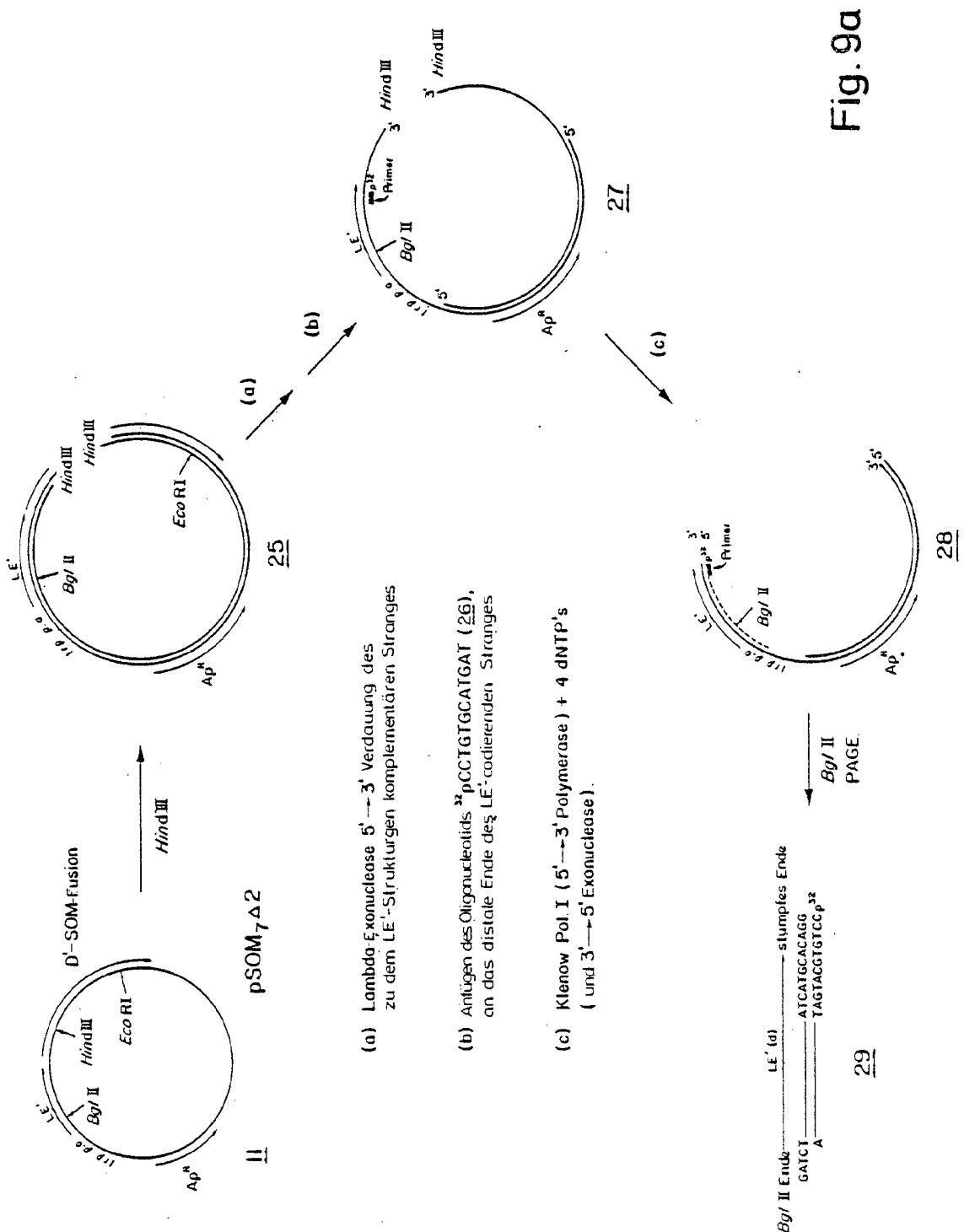
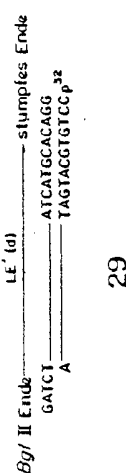


Fig. 9a

- (a) Lambda-Exonuclease 5' → 3' Verdauung des zu dem LE'-Strukturaltern komplementären Stranges
- (b) Anfügen des Oligonucleotids ³²pCCGTGTCATGAT (26), an das distale Ende des LE'-codierenden Stranges
- (c) Klenow Pol. I (5' → 3' Polymerase) + 4 dNTP's (und 3' → 5' Exonuclease).



22 21 19 19 * 0 1 1 2 2

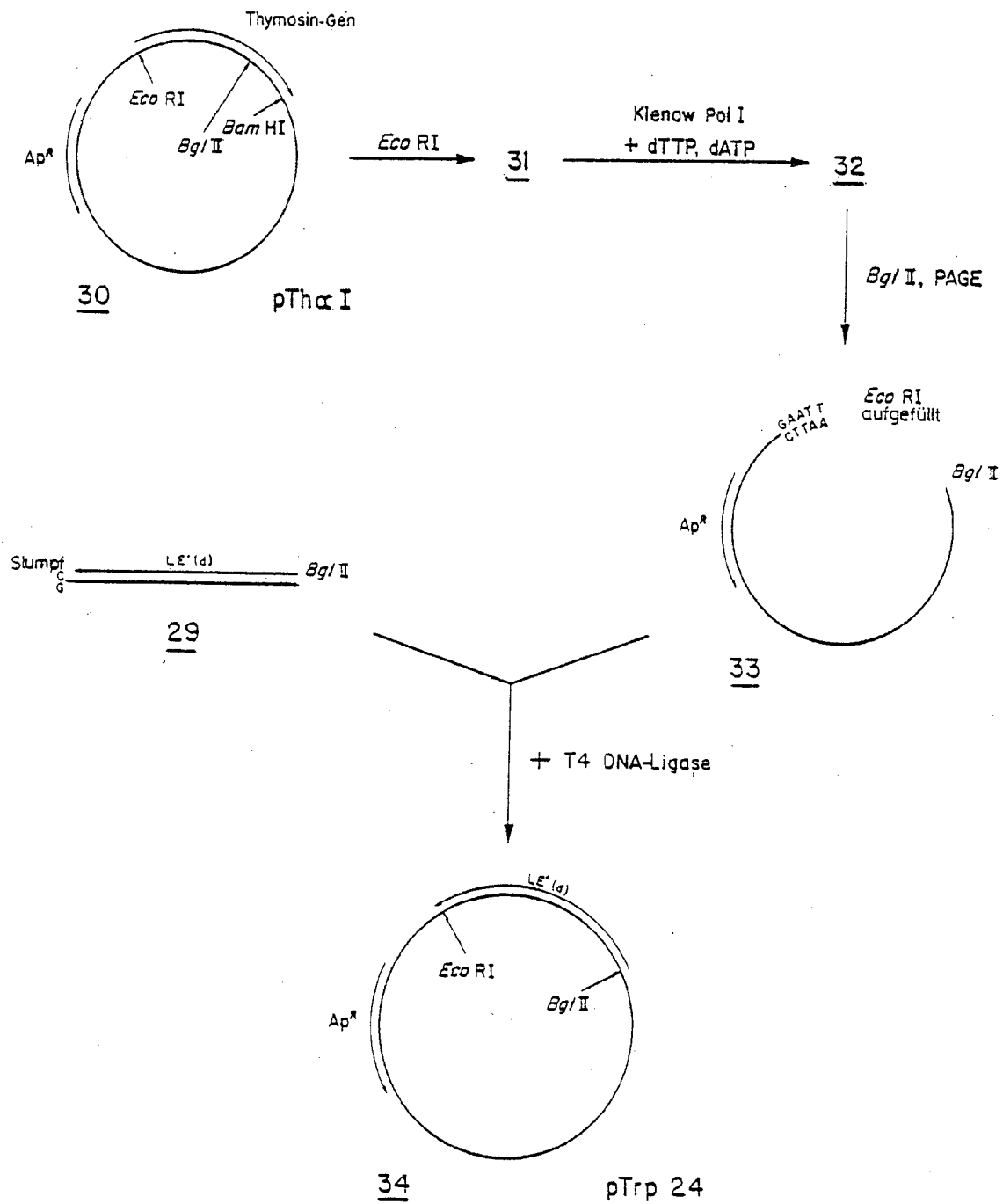


Fig. 9b

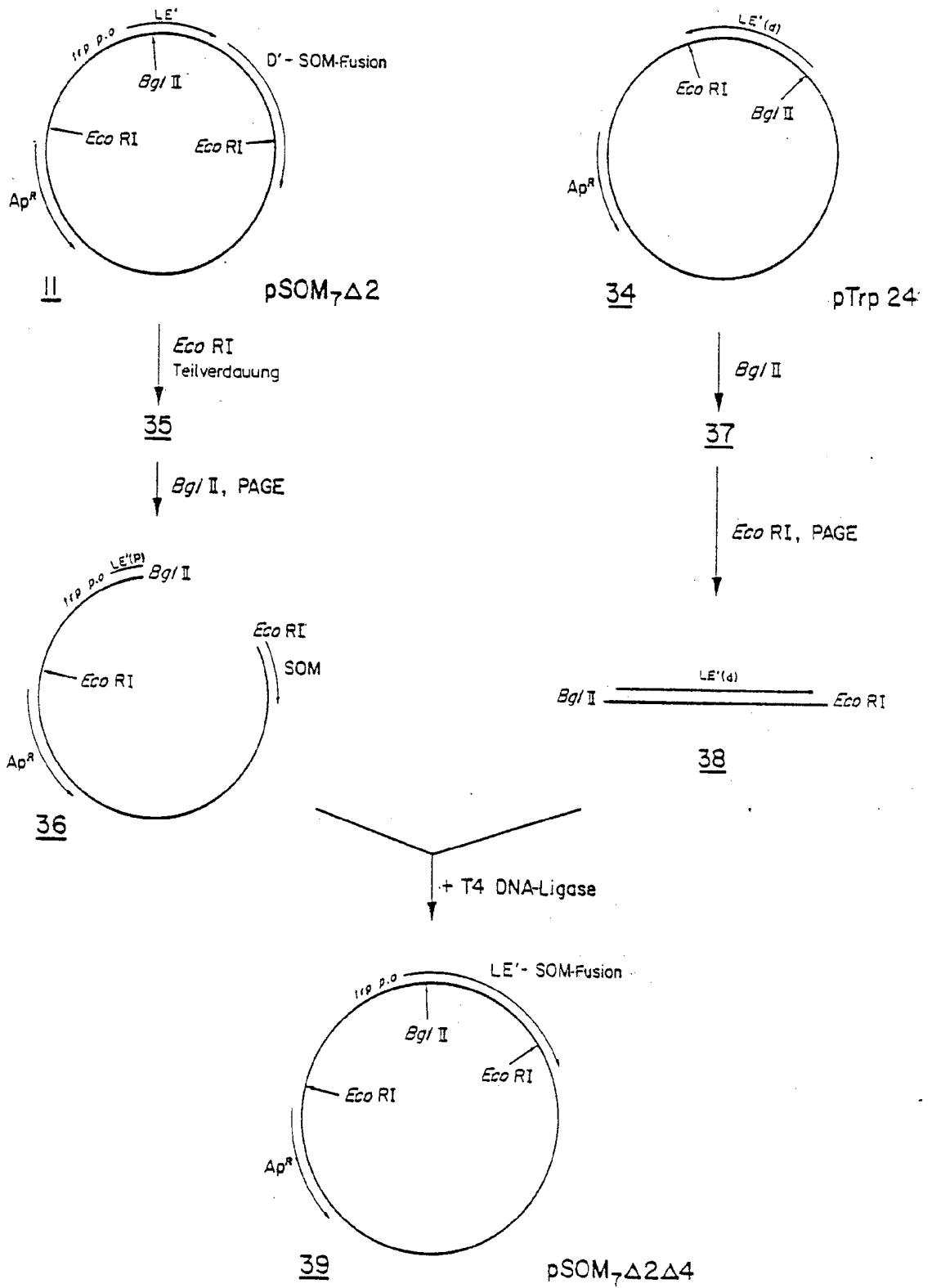


Fig. 10

1 2 3 4 5 6 7 8

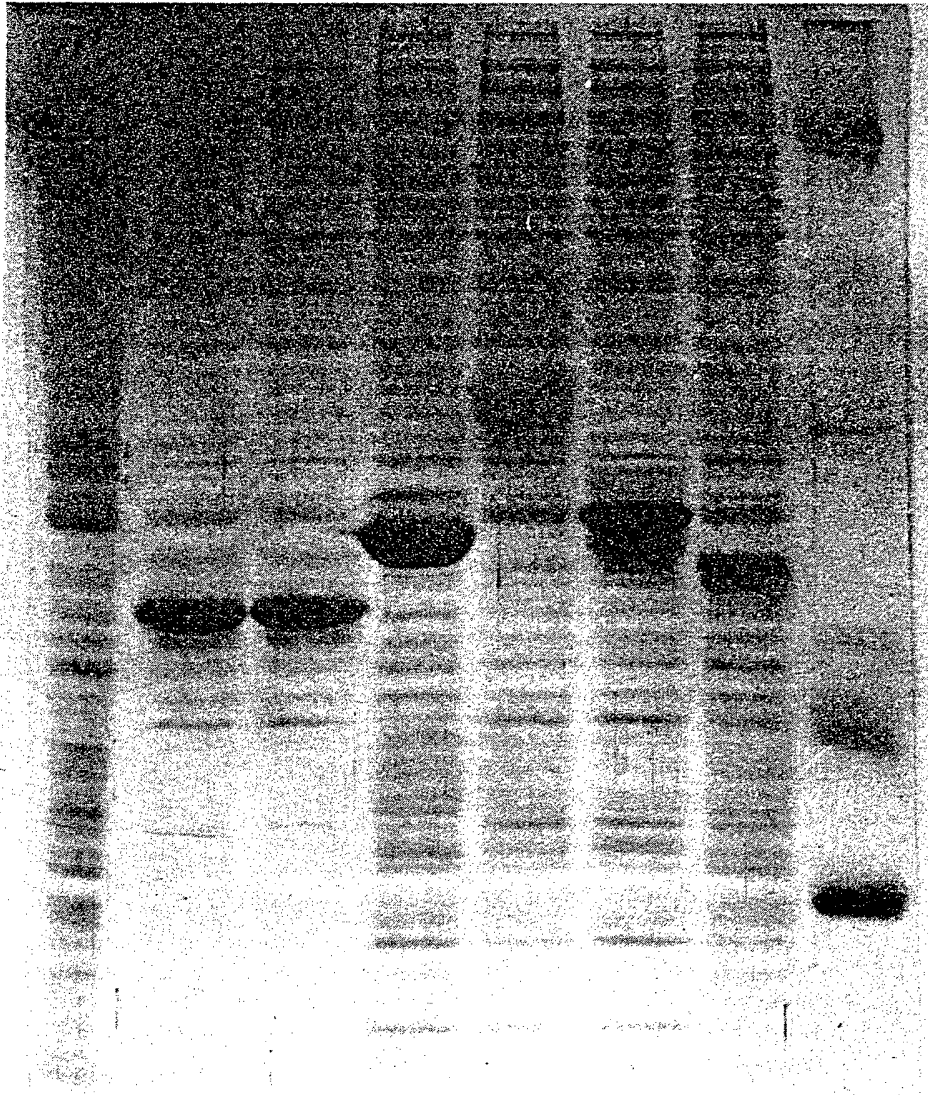


FIG. 11.

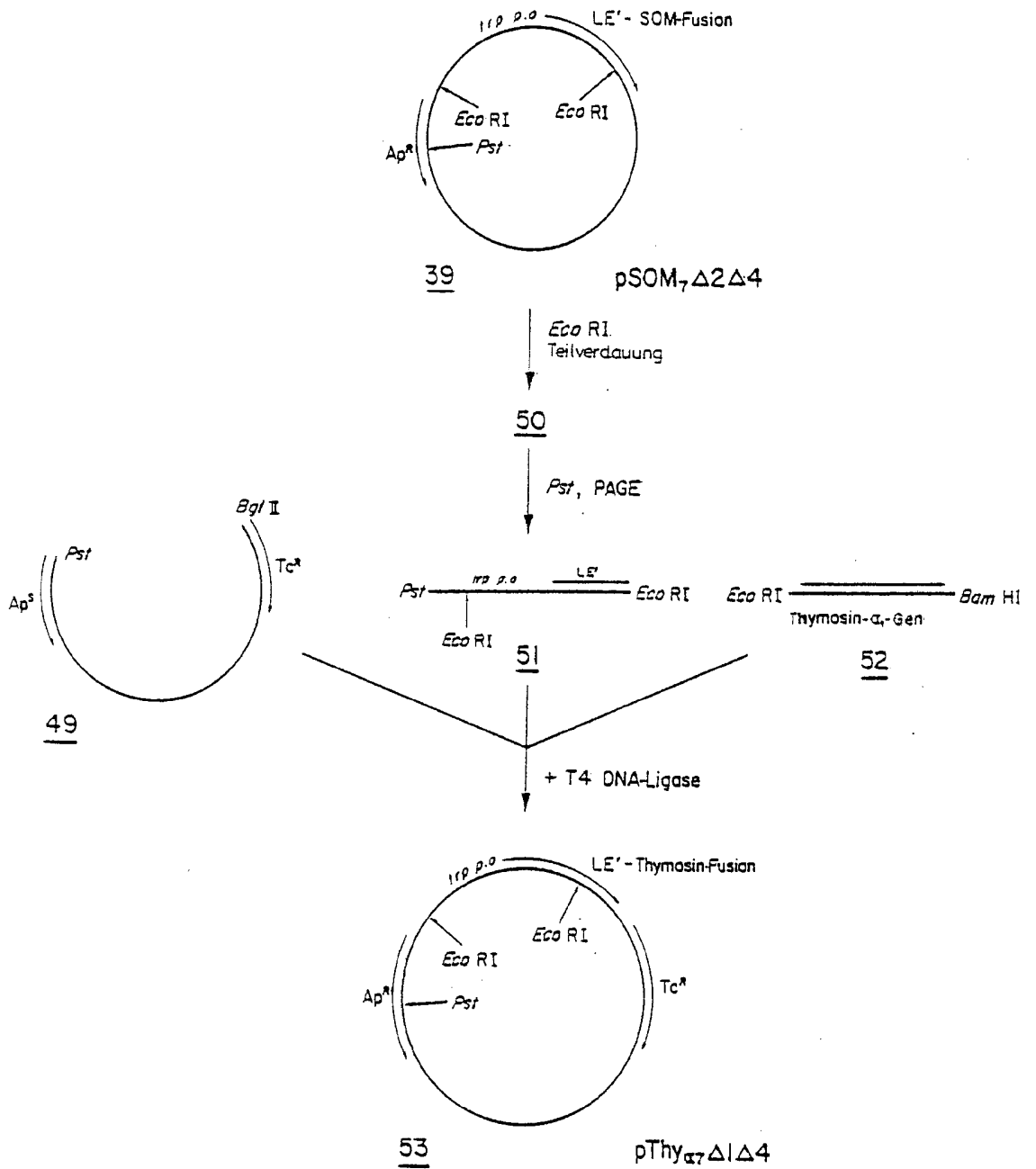


Fig. 12

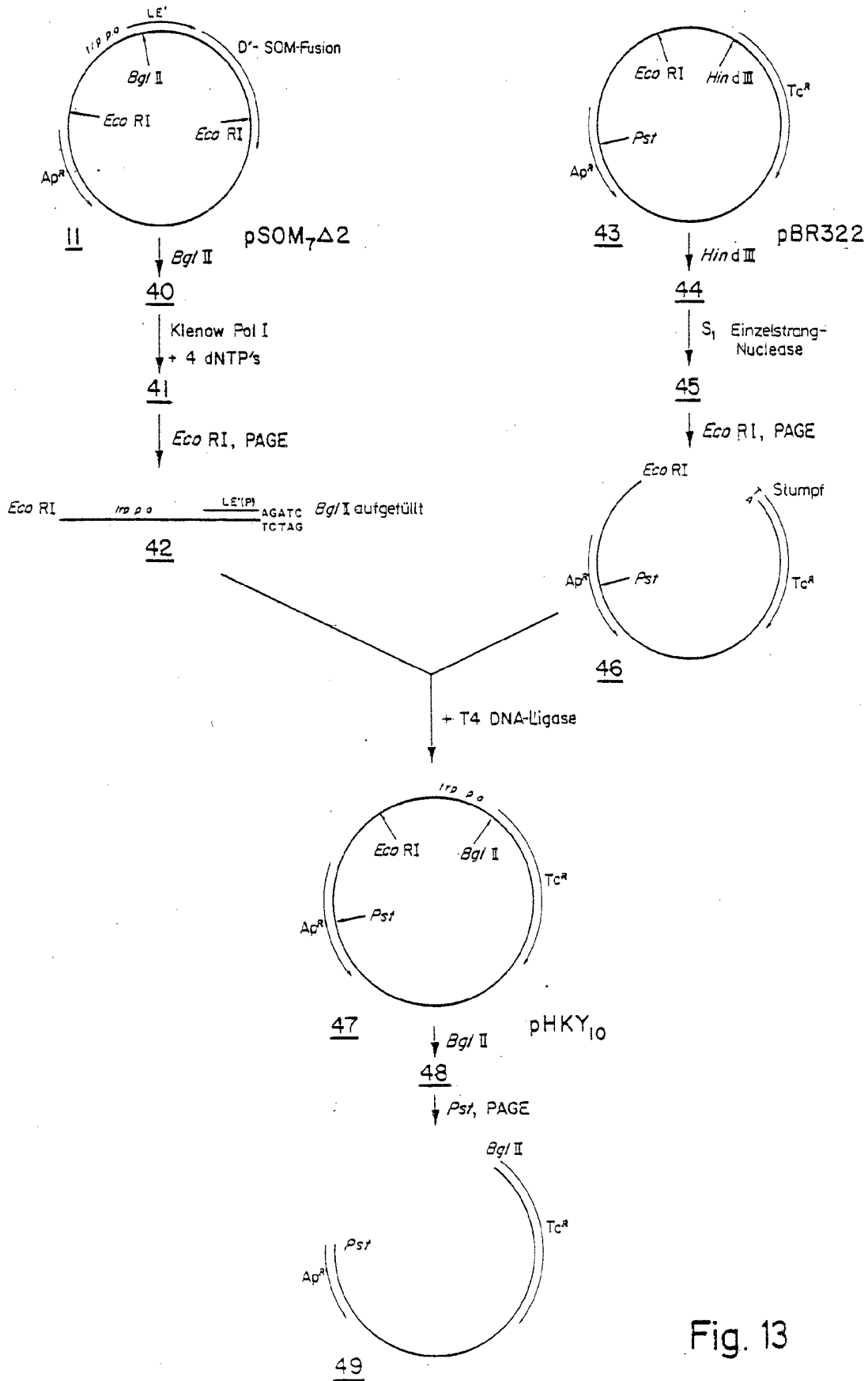


Fig. 13