



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **233 853 A5**

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 269 668 1
(31) 6422/83-5
1863/84-6

(22) 20.11.84
(32) 21.11.83
13.04.84

(44) 12.03.86
(33) CH

(71) siehe (73)

(72) Rink, Hans, CH; Liersch, Manfred, Dr.-Chem., CH; Sieber, Peter, CH; Rittel, Werner, Dr.-Chem., CH; Meyer, Francois, Dr.-Chem., CH; Seemüller, Ursula, Dr.-Pharm., DE; Fritz, Hans, Prof. Dr.-Chem., DE; Märki, Walter, Dr.-Biol., CH; Alkan, Sefik, Prof. Dr.-med., CH

(73) CIBA-GEIGY AG, 4002 Basel, CH

(54) Verfahren zur Herstellung von Eglin-Verbindungen

(57) Die Erfindung betrifft für ein Eglin kodierende DNA-Sequenzen, solche DNA-Sequenzen enthaltende Expressionsplasmide, mit solchen Expressionsplasmiden transformierte Wirte, von solchen transformierten Wirte produzierte neue Eglin-Verbindungen, monoklonale Antikörper gegen Egline, Hybridoma-Zellen, die solche Antikörper produzieren, und Test-Kits für Immunoassays, die solche Antikörper enthalten, ferner die Verfahren zu ihrer Herstellung und ein Verfahren zur Herstellung von Eglinen mit Hilfe der transformierten Wirte. Die erfindungsgemäß herstellbaren Egline weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Eglin-Verbindungen der Formel
(Met)_r-B-ProGluValValGlyLysThrValAspGlnAlaArgGlu
TyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValW_rPheLeuProGluGlySerProValThrLeuAsp
LeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnValValAsn-B'
(XIV),
worin B für eine direkte Bindung oder für einen Peptidrest steht, der 1–10 Aminosäurebausteine vom N-Terminus der natürlichen Egline umfaßt, z. B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe SerPhe-, LeuLysSerPhe-, SerGluLeuLysSerPhe-, PheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe-, und B' für keinen oder für einen Peptidrest steht, der 1–6 Aminosäurebausteine vom C-Terminus der natürlichen Egline umfaßt, z. B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe -HisVal-, -HisValProHis oder -HisValProHisValGly, W Tyr oder His bedeutet, und r 0 oder 1 ist, wobei in Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist, die N-terminale Aminosäure gegebenenfalls N-acetyliert ist, Salzen solcher Verbindungen und von pharmazeutischen Präparaten, die solche Verbindungen enthalten, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für ein Eglin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierter Wirt in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert wird und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, oder zur Herstellung von Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist und die N-terminale Aminosäure N-acetyliert ist, eine Verbindung der Formel XIV mit freier N-terminaler Aminogruppe acetyliert wird, und, falls gewünscht, eine erhaltliche Eglin-Verbindung der Formel XIV in eine andere Eglin-Verbindung der Formel XIV überführt wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhaltliches Gemisch von Verbindungen der Formel XIV in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid oder ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird, und, falls gewünscht, eine erhaltliche Verbindung der Formel XIV oder ein Salz davon zu einem pharmazeutischen Präparat verarbeitet wird.
2. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Verbindungen der Formel XIV herstellt, worin B für einen Peptidrest ausgewählt aus der Gruppe LeuLysSerPhe-, SerGluLeuLysSerPhe- oder ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- und B' für den Rest -HisValProHisValGly steht, W Tyr ist und r 0 ist, wobei in Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist, die N-terminale Aminosäure gegebenenfalls N-acetyliert ist, und von Salzen solcher Verbindungen.
3. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Verbindungen der Formel XIV herstellt, worin B für N-Acetyl-SerGluLeuLysSerPhe-, ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder N-Acetyl-ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- und B' für -HisValProHisValGly steht, W Tyr ist und r 0 ist, und von Salzen solcher Verbindungen.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Eglin C oder N^ε-Acetyl-eglin C herstellt.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Überführung einer Verbindung der Formel XIV, worin r 0 ist und die N-terminale Aminogruppe in freier Form vorliegt, in eine entsprechende Verbindung der Formel XIV, worin die N-terminale Aminosäure N-acetyliert ist, auf enzymatischem Weg erfolgt.
6. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man in einer erhaltlichen Verbindung der Formel XIV, die einen N-terminalen Methionyl-Rest besitzt, den Methionyl-Rest mit Bromcyan abspaltet.
7. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß man in einer erhaltlichen Verbindung der Formel XIV, die eine N-terminale acetylierte Aminogruppe besitzt, den Acetylrest enzymatisch abspaltet.

Hierzu 6 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Eglinen mit Hilfe von transformierten Mikroorganismen.

Bekannte technische Lösungen

Aus der DE-OS 2808396 sind zwei aus Blutegeln (*Hirudo medicinalis*) isolierte Protease-Inhibitoren, die als Eglin B und Eglin C bezeichnet werden, bekannt. Diese Polypeptide bestehen aus je 70 Aminosäuren, haben ein Molekulargewicht von ca. 8 100 und sind starke Inhibitoren für Chymotrypsin, Subtilisin, für die tierischen und menschlichen Granulozyten-Proteasen Elastase und Cathepsin G sowie für die Mastzell-Protease Ghyrase (1). Weniger stark gehemmt werden Trypsin-ähnliche Proteasen.

Eglin C hat die folgende Primärstruktur (2):

ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeu
ProGluGlySerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyr
AsnProGlyThrAsnValValAsnHisValProHisValGly

Eglin C enthält im Gegensatz zu den meisten bekannten Proteinase-Hemmern keine Disulfid-Brücke, es erweist sich auch für ein Miniprotein als ungewöhnlich stabil gegenüber Denaturierung durch Säure, Lauge oder Wärme und gegenüber proteolytischem Abbau. Die Primärstruktur von Eglin B unterscheidet sich von derjenigen von Eglin C durch Ersatz der Aminosäure 35, Tyrosin, durch Histidin.

Die Egline gehören zu den stärksten heute bekannten Hemmern von humaner und tierischer Granulozyten-Elastase, sowie von humanem Granulozyten-Cathepsin G und von bakteriellen Proteasen vom Typ des Subtilisins. Unkontrollierte bzw. übermäßige Freisetzung dieser zellulären Proteasen im Organismus kann einen Entzündungsvorgang verstärken und Gewebeabbau durch unspezifische Proteolyse hervorrufen. Dies insbesondere deshalb, da diese für die intrazelluläre Verdauung zuständigen Enzyme im physiologischen (neutralen bis schwach alkalischen) Milieu optimal wirksam sind und native Gewebesubstanzen (z. B. Elastin) und humorale Faktoren (z. B. Blutgerinnungs- und Komplementfaktoren) rasch zu zerstören und zu inaktivieren vermögen. Auf Grund ihrer bis anhin bekannten Eigenschaften sind die Egline daher für die Anwendung in der medizinischen Therapie (Antiinflammation, Antiphlogistik, septischer Schock, Lungenemphyse, Mucoviscidose etc.) von großem Interesse. Im Blutegel werden die Egline nur in sehr geringen Mengen (ca. 16 µg/Egel) gebildet. Die Isolierung und Reinigung der Egline aus Blutegeln gestaltet sich daher sehr zeit- und kostenaufwendig und ist im kommerziellen Maßstab nicht durchführbar. Auf Grund der großen Fortschritte in der sogenannten gekombinierten DNA-Technologie (oder Gentechnologie) ist es neuerdings möglich, die unterschiedlichsten physiologisch aktiven Polypeptide unter Verwendung dieser Technologie

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, Eglins für die therapeutische Anwendung bereitzustellen.

Wesen der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit Hilfe von gentechnologischen Mitteln Expressionssysteme zur Verfügung zu stellen, das die mikrobielle Herstellung von Eglins im industriellen Maßstab erlaubt. Diese Aufgabe wird in der vorliegenden Erfindung gelöst durch die Bereitstellung von Hybridvektoren, die eine für ein Egin kodierende DNA-Sequenz enthalten, welche von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, daß ein Egin in einem mit diesen Hybridvektoren transformierten Wirt exprimiert wird.

Herstellung von DNA-Sequenzen, die für ein Egin kodieren

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, welche für ein Egin, z. B. Egin B und insbesondere Egin C, oder für ein modifiziertes Egin, z. B. modifiziertes Egin B oder insbesondere modifiziertes Egin C, kodieren, wobei die Modifizierung in einer Verkürzung der Primärstruktur des Eglins unter Aufrechterhaltung der Egin-Aktivität besteht, und Fragmente davon.

Unter der allgemeinen Bezeichnung „Egline“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn nicht spezifischer definiert, Polypeptide mit Proteinaseinhibitor-Aktivität verstanden, deren Primärstruktur mit den Primärstrukturen von Egin B oder C weitgehend (Strukturhomologie im allgemeinen bis zu 80%) übereinstimmen, die aber auch N-terminal abgeändert, z. B. am Threonin N^α-acetyliert, N^α-methionyliert oder N^α-acetylmethionyliert sein können.

Bei modifizierten Eglins besteht die Modifizierung vorzugsweise in einer Verkürzung der Primärstruktur der natürlichen Egline, z. B. um 1 bis 10, insbesondere 1 bis 6, Aminosäurebausteine am N-Terminus und/oder um 1 bis 6, insbesondere 2, Aminosäurebausteine am C-Terminus, wobei auch hier am N-Terminus abgeänderte, z. B. acetylierte und methionylierte oder N-acetylmethionylierte Derivate einbezogen sind.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für ein Egin, z. B. Egin B und insbesondere Egin C, oder für ein modifiziertes Egin, z. B. modifiziertes Egin B oder insbesondere modifiziertes Egin C, kodieren, und von Fragmenten davon, gekennzeichnet dadurch, daß man aus genomischer Egin-DNA das Egin-Strukturgen isoliert, oder aus Egin-mRNA eine komplementäre doppelsträngige Egin-DNA (Egin-ds cDNA) herstellt, und zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für ein modifiziertes Egin kodieren, das genomische Egin-Strukturgen oder die Egin-ds cDNA mit geeigneten Nucleasen behandelt, oder daß man ein entsprechendes (modifiziertes) Egin-Strukturgen oder Fragment davon mittels chemischer und enzymatischer Verfahren herstellt.

Die Gewinnung von genomischer Egin-DNA und von Egin-ds cDNA erfolgt beispielsweise nach an sich bekannten Methoden. So gewinnt man genomische Egin-DNA beispielsweise aus einer Egin-Genbank, welche das Egin-Gen enthält, indem man die Egin-DNA-Fragmente in einem Mikroorganismus kloniert und Klone, die Egin-DNA enthalten, identifiziert, beispielsweise durch Kolonie-Hybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten Egin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids, welches mindestens 15, vorzugsweise 15 bis 30, Desoxynucleotide enthält. Die so erhaltenen DNA-Fragmente enthalten neben dem Egin-Gen in der Regel weitere unerwünschte DNA-Bestandteile, welche durch Behandlung mit geeigneten Exo- oder Endonucleasen abgespalten werden können.

Doppelsträngige Egin-cDNA kann beispielsweise hergestellt werden, indem man aus geeigneten, vorzugsweise zur Egin-Bildung induzierten Eginzellen mRNA gewinnt, das so erhaltene mRNA-Gemisch in an sich bekannter Weise an Egin-mRNA anreichert, diese mRNA als Template für die Herstellung von einsträngiger cDNA verwendet, daraus mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die ds cDNA synthetisiert und diese in einen geeigneten Vektor kloniert. Klone, die Egin-cDNA enthalten, werden beispielsweise, wie oben beschrieben, durch Koloniehybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten, Egin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids identifiziert.

Zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für modifizierte Egline kodieren, kann die erhältliche genomische Egin-DNA oder Egin-cDNA mit geeigneten Exo- und/oder Endonucleasen behandelt werden, welche die für die N- bzw. C-terminalen Egin-Aminosäuren kodierenden DNA-Abschnitte abspalten.

Die auf diese Weise gewonnene genomische Egin-DNA oder die Egin-cDNA werden vorzugsweise am 5'- und am 3'-Ende mit chemisch synthetisierten Adapter-Oligodesoxynucleotiden verknüpft, welche die Erkennungssequenz für eine oder verschiedene Restriktionsendonuclease(n) enthalten und damit den Einbau in geeignete Vektoren erleichtern. Zusätzlich muß das Adaptermolekül für das 5'-Ende der Egin-DNA bzw. -cDNA noch das Translationsstartsignal (ATG) enthalten. Das Translationsstartsignal muß derart angeordnet sein, daß ihm das Codon für die erste Aminosäure des Eglins direkt folgt. Da die Struktur des natürlichen Egin-Gens nicht bekannt ist und die chemische Synthese eines Eglins-Gens auf Grund der modernen Synthesemöglichkeiten Vorteile, insbesondere in zeitlicher Hinsicht, bietet, stellt letztere eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

Chemische Synthese eines Egin-Gens

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung eines Strukturgens für ein Egin oder für ein modifiziertes Egin oder von Fragmenten davon, dadurch gekennzeichnet, daß man Segmente des kodierenden und des komplementären Stranges eines Egin- oder modifizierten Egin-Gens chemisch synthetisiert und erhältliche Segmente enzymatisch in ein Strukturgen des Eglins oder des modifizierten Eglins oder in Fragmente davon überführt.

Die Erfindung betrifft ferner doppelsträngige DNAs, die für Egline, beispielsweise Egin B oder Egin C, modifizierte Egline, beispielsweise modifiziertes Egin B oder modifiziertes Egin C, oder Fragmente davon kodieren.

Die erfindungsgemäßen DNAs enthalten zusätzlich zu den Codons für die Egline bzw. modifizierten Egline-Translations-Startsignale und Translations-Signale, die eine Expression in geeigneten Wirtszellen, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen, ferner Nukleotidsequenzen an den Enden, die für einen Einbau in einen Vektor geeignet sind.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung umfaßt die DNA am 5'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz gefolgt vom Translations-Startsignal, Codons für ein Egin oder für ein modifiziertes Egin, die gegebenenfalls an einer oder mehreren Stellen das Schneiden durch ein Restriktionsenzym ermöglichen, ein Translations-Stopsignal und am 3'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz. Erfindungsgemäß anwendbare Restriktionsenzyme sind beispielsweise EcoRI, BamHI, HpaI, PstI, Aval oder HindIII.

Insbesondere umfaßt die Erfindung eine für ein Eglin kodierende, doppelsträngige DNA bestehend aus einer Nukleotidsequenz der Formel I und der komplementären Nukleotidsequenz

5' (X) _n	Met ATG	B D							
Pro CCX	Glu GAM	Val GTX	Val GTX	Gly GGX	Lys AAM	Thr ACX	Val GTX	Asp GAY	Gln CAM
Ala GCX	Arg LGN	Glu GAM	Tyr TAY	Phe TTY	Thr ACX	Leu YTZ	His CAY	Tyr TAY	Pro CCX
Gln CAM	Tyr TAY	Asp GAY	Val GTX	W YAY	Phe TTY	Leu YTZ	Pro CCX	Glu GAM	Gly GGX
Ser QRS	Pro CCX	Val GTX	Thr ACX	Leu YTZ	Asp GAY	Leu YTZ	Arg LGN	Tyr TAY	Asn AAY
Arg LGN	Val GTX	Arg LGN	Val GTX	Phe TTY	Tyr TAY	Asn AAY	Pro CCX	Gly GGX	Thr ACX
Asn AAY (I),	Val GTX	Val GTX	Asn AAY	B' D'	NON TMK	(X) _m ^{3'}			

worin die Nukleotidsequenz beginnend mit dem 5'-Ende dargestellt und zum besseren Verständnis die Aminosäuren, für die jedes Triplett kodiert, angegeben sind, und worin D für eine direkte Bindung oder für eine für N-terminale Aminosäuren des Eglins kodierende Nukleotidsequenz und B für eine direkte Bindung oder für die entsprechenden N-terminalen Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe

Ser QRS	Phe TTY,	Leu YTZ	Lys AAM	Ser QRS	Phe TTY,	Ser QRS	Glu GAM	Leu YTZ	Lys AAM
Ser QRS	Phe TTY,	Phe TTY	Gly GGX	Ser QRS	Glu GAM	Leu YTZ	Lys AAM	Ser QRS	Phe TTY

oder

Thr ACX	Glu GAM	Phe TTY	Gly GGX	Ser QRS	Glu GAM	Leu YTZ	Lys AAM	Ser QRS	Phe TTY
------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

steht und D' für eine direkte Bindung oder für eine für C-terminale Aminosäuren des Eglins kodierende Nukleotidsequenz und B' für eine direkte Bindung oder für die entsprechenden C-terminalen Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

His CAY	Val GTX,	His CAY	Val GTX	Pro CCX	His CAY	oder
His CAY	Val GTX	Pro CCX	His CAY	Val GTX	Gly GGX	

steht, und worin bedeuten

A	Desoxyadenosyl,
T	Thymidyl,
G	Desoxyguanosyl,
C	Desoxycytidyl,
X	A, T, C oder G,
Y	T oder C,
Z	A, T, C oder G, wenn Y = C,
oder	Z = A oder G, wenn Y = T,
Q	T oder A,
R	C und S = A, T, C oder G, wenn Q = T,
oder	R = G und S = T oder C, wenn Q = A,
M	A oder G,
L	A oder C,
N	A oder G, wenn L = A,
oder	N = A, T, C oder G, wenn L = C,
K	A oder G, wenn M = A,
oder	K = A, wenn M = G,
W	Tyr oder His,

und (X)_n und (X)_m je beliebige Nukleotidsequenzen mit n und m größer als 3 und kleiner als 100, insbesondere größer als 5 und kleiner als 12, bedeuten, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden können, und Fragmente einer solchen doppelsträngigen DNA der Formel I.

Die Erfindung betrifft insbesondere für ein Eglin kodierende doppelsträngige DNA der Formel I, worin D für eine Nukleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe YTZ AAM QRS TTY, QRS GAM YTZ AAM QRS TTY und ACX GAM TTY GGX QRS GAM YTZ AAM QRS TTY und D' für die Nukleotidsequenz der Formel CAY GTX CCX CAY GTX GGX steht, und die übrigen

In erster Linie betrifft die Erfindung eine für ein Eglin kodierende doppelsträngige DNA der Formel I, worin D für die Nucleotidsequenz ACX GAM TTY GGX QRS GAM YTZ AAM QRS TTY und D' für die Nucleotidsequenz CAY GTX CCX CAY GTX GGX steht und die übrigen Symbole die unter Formel I angegebenen Bedeutungen haben.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Sequenz am 5'-Ende eine durch EcoRI spaltbare, in der Mitte eine durch HpaII spaltbare und am 3'-Ende eine durch BamHI spaltbare Nucleotidsequenz.

In erster Linie umfaßt die Erfindung eine doppelsträngige DNA, welche von *E. coli* bevorzugte Triplets, die für die Aminosäuren von Eglinen bzw. modifizierten Eglinen kodieren, enthält. Solche Triplets sind

für	Glycin (Gly)	GGT
	Alanin (Ala)	GCT
	Valin (Val)	GTT
	Leucin (Leu)	CTG
	Serin (Ser)	TCT
	Threonin (Thr)	ACT
	Phenylalanin (Phe)	TTC
	Tyrosin (Tyr)	TAC
	Methionin (Met)	ATG
	Asparaginsäure (Asp)	GAC
	Glutaminsäure (Glu)	GAA
	Lysin (Lys)	AAA
	Arginin (Arg)	CGT
	Histidin (His)	CAT
	Prolin (Pro)	CCG
	Glutamin (Gln)	CAG
	Asparagin (Asn)	AAC

In der vorliegenden Erfindung wird für Phenylalanin auch das Codon TTT und für Prolin CCA oder CCT verwendet, damit neben der Schnittstelle für EcoRI am 5'-Ende, für BamHI am 3'-Ende und einer Schnittstelle für HpaII keine weiteren Schnittstellen für die genannten Restriktionsenzyme enthalten sind. Bevorzugtes Stoppsignal (NON) ist der Codon TAG.

Eine bevorzugte Ausführungsform eines Gens für Eglin C in der oben dargestellten Weise ist die DNA der Formel IIa,

MetThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
 CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 (EcoRI)

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuProGluGly
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCGAGTACGACGTTTACTTCTGCCGGAAGGT
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCCTTCCA
 (HpaII)

SerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnVal
 TCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCTGTTTCTACAACCCAGGTACTAACGTT
 AGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCATGATTGCAA

ValAsnHisValProHisValGlyNON
 GTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
 CAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC
 (BamHI)
 (IIa),

eine bevorzugte Ausführungsform eines Gens für Eglin B ist die DNA der Formel IIb)

MetThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
 CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 (EcoRI)

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValHisPheLeuProGluGly
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCGAGTACGACGTTTACTTCTGCCGGAAGGT
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAGTAAAGGACGGCCTTCCA
 (HpaII)

SerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnVal
 TCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCTGTTTCTACAACCCAGGTACTAACGTT
 AGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCATGATTGCAA

ValAsnHisValProHisValGlyNON
 GTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
 CAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC
 (BamHI)
 (IIb),

und bevorzugte Ausführungsform von Genen für modifizierte (N-terminal verkürzte) Eglin C-Polypeptide sind die DNAs der Formeln IIc und II d

MetSerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
CTGGAATTCATGCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAAGTGT
GACCTTAAGTACAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
(EcoRI)

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuProGluGly
GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGGAAGGT
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCCTTCCA
(HpaII)

SerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnVal
TCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCGTGTTTTCTACAACCCAGGTACTAACGTT
AGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCATGATTGCAA

ValAsnHisValProHisValGlyNON
GTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
CAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC
(BamHI)
(IIc),
bzw.

MetLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
CTGGAATTCATGCTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAAGTGT
GACCTTAAGTACGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
(EcoRI)

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuProGluGly
GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGGAAGGT
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCCTTCCA
(HpaII)

SerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnVal
TCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCGTGTTTTCTACAACCCAGGTACTAACGTT
AGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCATGATTGCAA

ValAsnHisValProHisValGlyNON
GTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
CAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC
(BamHI)
(II d),

worin A, T, G, C die unter Formel I angegebenen Bedeutungen haben und zum besseren Verständnis die Aminosäuren, für die jedes Triplet kodiert, und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angegeben sind.

Weiterhin umfaßt die Erfindung doppelsträngige DNA-Fragmente von Eglin-Genen, deren Enden durch Restriktionsenzyme geschnitten und die zu vollständigen Eglin- oder modifizierten Eglin-Genen zusammengesetzt werden können. Solche doppelsträngigen DNA-Fragmente von Eglin-Genen haben insbesondere 30 bis 70 Basenpaare.

Beispielsweise umfaßt die Erfindung die DNA-Fragmente der Formel IIIa [$F_1(C)$], die DNA der Formel IIIa' [$F_1(C')$], die DNA der Formel IIIb [$F_1(B)$] und die DNA der Formel IV (F_2):

MetThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAAGTGT
GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuPro
GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCC
 $F_1(C)$ (IIIa)

MetSerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
CTGGAATTCATGCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAAGTGT
GACCTTAAGTACAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuPro
GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCC
 $F_1(C')$ (IIIa')

MetLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
CTGGAATTCATGCTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAAAGTGT
GACCTTAAGTACGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuPro
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAATGAAGGACGGCC
 F₁(C'') (III a'')

MetThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
 CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAACTGTT
 GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValHisPheLeuPro
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAGTAAAGGACGGCC
 F₁(B) (III b)

ProGluGlySerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGly
 CCGGAAGTTCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCTGTTTTCTACAACCCAGGT
 GGCTTCCAAGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCA

ThrAsnValValAsnHisValProHisValGlyNON
 ACTAACGTTGTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
 TGATTGCAACAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC
 F₂ (IV)

Die Erfindung umfaßt auch einsträngige DNA-Fragmente von Eglin- und modifizierten Eglin-Genen, insbesondere solche, die sich durch chemische und/oder enzymatische Methoden zu Eglin- bzw. modifizierten Eglin-Genen zusammenfügen lassen. In erster Linie betrifft die Erfindung einsträngige DNA-Fragmente mit mehr als zwanzig Nukleotiden, insbesondere mit 20 bis 70 Nukleotiden.

In allererster Linie betrifft die Erfindung die in den Beispielen beschriebenen einsträngigen und doppelsträngigen DNA-Fragmente.

Methoden der Synthese von DNA sind von S. A. Narang (11) zusammenfassend dargestellt worden. Die bekannten Synthesetechniken erlauben die Herstellung von Polynukleotiden mit einer Länge von gegen 20 Basen in guter Ausbeute, hoher Reinheit und in verhältnismäßig kurzer Zeit. Geeignet geschützte Nukleotide werden durch die Phosphodiester-Methode (12), die noch effizientere Phosphotriester-Methode (13) oder Phosphit-Triester-Methode (14) miteinander verknüpft. Eine Vereinfachung der Synthese der Oligo- und Polynukleotide wird mit der der Festphasen-Methode ermöglicht, bei der die Nukleotidketten an ein geeignetes Polymer gebunden sind. Itakura et al. (15) verwenden bei der Festphasen-Synthese anstelle einzelner Nukleotide durch Phosphotriester-Methode geknüpfte Trinukleotide, die so in kurzer Zeit und guten Ausbeuten beispielsweise zu einem Polynukleotid mit 31 Basen kondensiert werden können. Die eigentliche doppelsträngige DNA kann aus chemisch hergestellten kurzen Segmenten enzymatisch aufgebaut werden. Khorana et al. (16) verwenden dazu überlappende Polynukleotid-Sequenzen aus beiden DNA-Strängen, die durch Basen-Paarung in richtiger Anordnung zusammengehalten und dann durch das Enzym DNA-Ligase verknüpft werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, je eine Polynukleotid-Sequenz aus den beiden DNA-Strängen mit einem kurzen überlappenden Segment in Gegenwart der vier benötigten Desoxynukleosid-Triphosphate mit einer DNA-Polymerase, z. B. DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der Polymerase I, T₄ DNA-Polymerase, oder mit AMV (avian myeloblastosis virus) reverse Transcriptase, zu inkubieren. Dabei werden durch Basenpaarung die beiden Polynukleotid-Sequenzen in der richtigen Anordnung zusammengehalten und durch das Enzym mit den benötigten Nukleotiden zu einer vollständigen doppelsträngigen DNA ergänzt (17). Itakura et al. (18) beschreiben, wie basierend auf diesem Prinzip in Gegenwart von DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus 4 chemisch synthetisierten Fragmenten einer Länge von 39 bis 42 Basen ein 132 Basen-Paare langes Segment des humanen Leukozyten-Interferon α_2 -Gens aufgebaut werden kann, wobei 40% Einsparung an chemischer Synthese gegenüber der Methode, die nur Ligase verwendet, erzielt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft vor allem ein Verfahren zur Herstellung von DNAs, welche für Eglin oder modifizierte Eglin kodieren, die für eine Expression in Wirtszellen geeignet sind und deren Enden einen Einbau in Vektoren ermöglichen, und von Fragmenten davon, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) ein geeignet geschütztes Desoxynukleosid an einen festen Träger gebunden wird,
- b) geeignet geschützte Di-, Tri- oder Tetranukleotide nach der Phosphotriester- oder Phosphit-Methode hergestellt werden,
- c) ein an den Träger gebundenes Desoxynukleosid oder Oligodesoxynukleotid mit geeignet geschützten Mono- oder (gemäß b) hergestellten) Di-, Tri- oder Tetranukleotiden nach der Phosphotriester- oder der Phosphit-Methode verknüpft wird,
- d) nach c) erhältliche, an Träger gebundene Oligodesoxynukleotide mit einer Länge zwischen etwa 20 und etwa 70 Basen vom Träger abgespalten, gegebenenfalls gereinigt, von Schutzgruppen befreit und die freien 5'-terminalen Hydroxygruppen phosphoryliert werden,
- e1) 2 Oligodesoxynukleotide einer Länge von je etwa 20 bis etwa 70 Basen aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang und mit mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, überlappenden Basenpaaren anneliert und mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate zu doppelsträngigen DNA-Segmenten (Fragmenten des Eglin- oder modifizierten Eglin-Gens) ergänzt werden, und gegebenenfalls 2 doppelsträngige DNA-Segmente mit geeigneten gemäß d) phosphorylierten Enden mit einer Ligase zum Strukturgen des Eglins oder des modifizierten Eglins verknüpft werden, oder 2 erhältliche doppelsträngige DNA-Segmente in geeignete Vektoren subkloniert, anschließend gemäß d) phosphoryliert und mit einer Ligase zum Strukturgen des Eglins oder modifizierten Eglins verknüpft werden, oder
- e2) alternativ je 2 Oligodesoxynukleotide aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang mit einer Länge von z. B. 20 bis 70 Basen und mit je mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, überlappenden Basenpaaren anneliert, mit einer

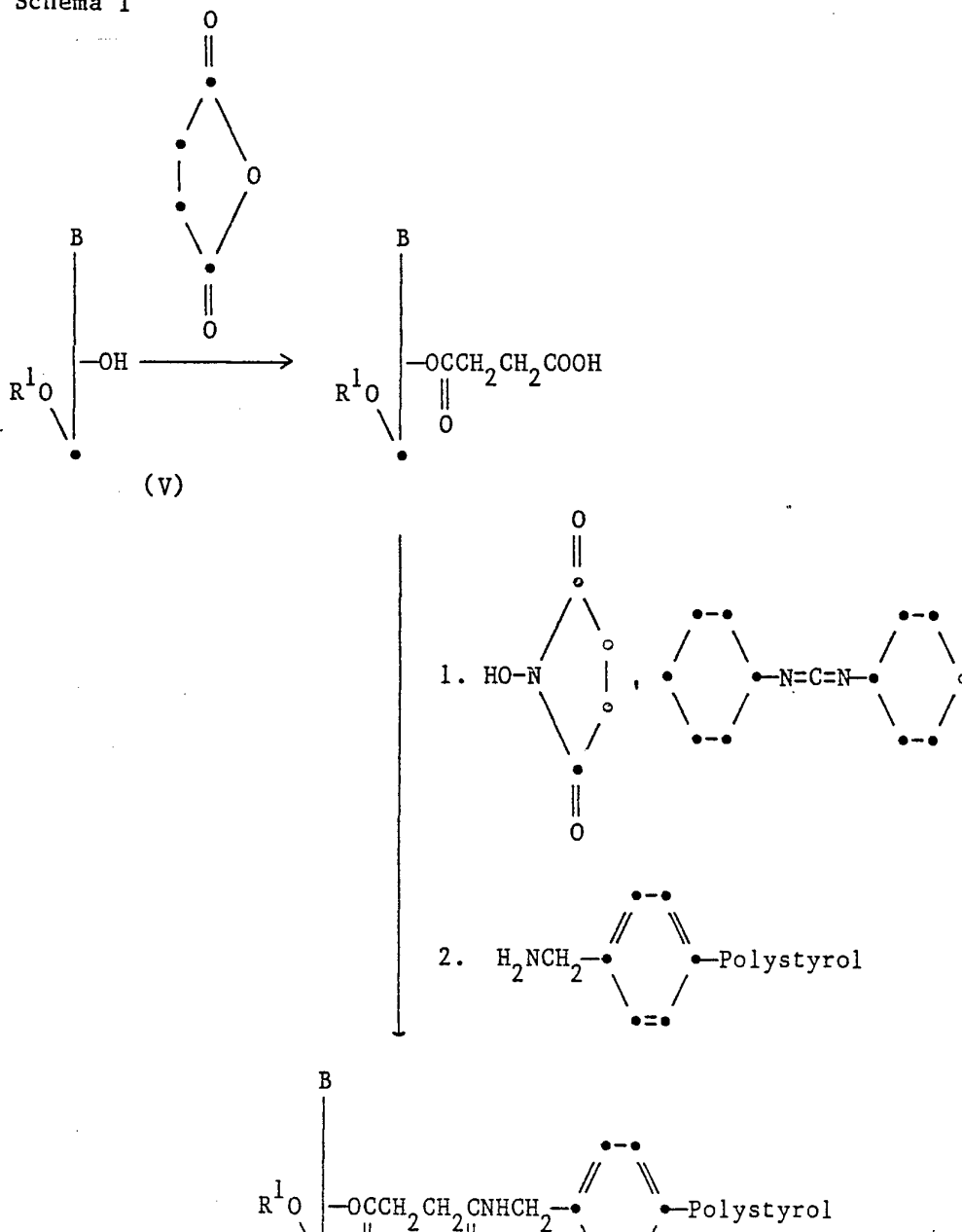
DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate aufgefüllt und mit Ligase zum Strukturgen des Eglins oder des modifizierten Eglins verknüpft werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist an sich bekannt, ermöglicht aber erst durch geeignete Kombination der Bedingungen und erfindungswesentliche Verbesserungen die Herstellung von für Eglin kodierenden DNAs.

In Schritt a) können eine Vielzahl von festen Trägermaterialien, wie Polystyrol verschiedener Vernetzung und Quellfähigkeit, Polyacrylamide, Polyacrylamid-Copolymere, auf anorganisches Material wie Kieselguhr, Kieselgel oder Alox aufgezugene Polyamide oder funktionalisierte Silane, verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als feste Trägermaterialien quervernetzte Polystyrole eingesetzt, die über „Spacer“, wie Alkylen-Gruppen mit 2 bis 12 C-Atomen unterbrochen von 1 bis 5 polaren zweiwertigen funktionellen Gruppen, wie Imino, Oxo, Thio, Oxocarbonyl oder Amidocarbonyl, auf an sich bekannte Weise mit der 5'-OH-Gruppe geeignet geschützter Desoxynukleoside verknüpft werden. Besonders bevorzugt ist die Reaktion von in 5'-Stellung und gegebenenfalls im Basenteil geschützten Nukleosiden der Formel V, worin R¹ eine durch Säure abspaltbare Schutzgruppe, wie eine Triarylmethylschutzgruppe, beispielsweise eine 4-Methoxytrityl- oder eine 4,4'-Dimethoxytritylgruppe, oder eine Triniederalkylsilylschutzgruppe, beispielsweise eine tert.-Butyldimethylsilylgruppe, und worin B eine gegebenenfalls geschützte Base ausgewählt aus Thymyl, Cytosyl, Adenyl oder Guanyl bedeutet, mit Bernsteinsäureanhydrid, gegebenenfalls in Gegenwart von Basen, wie Pyridin, Triethylamin oder Dimethylaminopyridin, gefolgt von der Reaktion mit aminomethyliertem Polystyrol, das durch 0,5 bis 2% Divinylbenzol quervernetzt ist, mit Hilfe von den Carbonsäure-Rest aktivierenden Reagentien, vorzugsweise N-Hydroxysuccinimid, oder p-Nitrophenol und wasserentziehenden Mitteln, wie Carbodiimiden, beispielsweise Dicyclohexylcarbodimid (Schema 1).

Die Umsetzung erfolgt in einem inerten nicht-protischen Lösungsmittel, z. B. Pyridin, Tetrahydrofuran, Dioxan, Essigsäureethylester, Chloroform, Methylenchlorid, Dimethylformamid oder Diethylacetamid oder in Mischungen davon, bei Raumtemperatur oder leicht erhöhter oder erniedrigter Temperatur, z. B. in einem Temperaturbereich von ca. -10°C bis ca. 50°C, bevorzugt bei Raumtemperatur, die Umsetzung in Gegenwart des wasserentziehenden Mittels auch bei niedrigerer Temperatur, z. B. bei ca. 0°C.

Schema 1



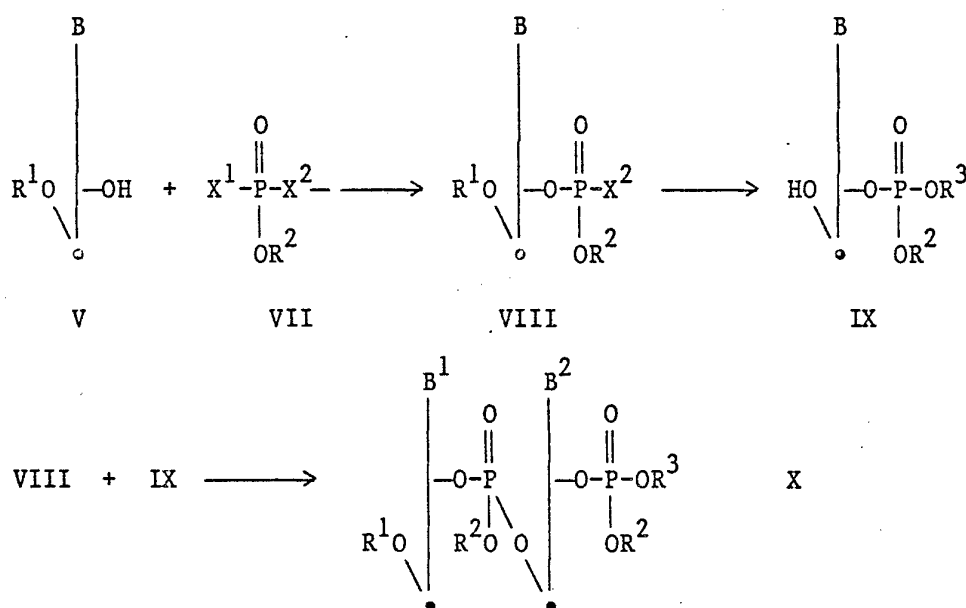
Bei der erfindungsgemäßen Herstellung von Di-, Tri- oder Tetranukleotiden gemäß Schritt b) werden in 5'-Stellung und gegebenenfalls im Basenteil geschützte Nukleoside der Formel V, worin R¹ und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit aktivierten Phosphorestern der Formel VII, worin X¹ und X² unabhängig voneinander Hydroxy oder davon abgeleitete Salze, Halogen, Imidazolyl, 1,2,4-Triazol-1-yl, Tetrazolyl oder 1-Benzotriazolyl- und X² zusätzlich auch 2-Cyanoethoxy, 2-Trihalogenethoxy, 2-Arylsulfonylethoxy, 2-Niederalkylthioethoxy, 2-Arylthioethoxy oder 2-(4-Nitrophenyl)-ethoxy und R² eine durch Base oder Nukleophile, wie Ammoniumhydroxid, Thiophenolat oder ein Arylaldoximat, abspaltbare Schutzgruppe, wie gegebenenfalls durch Halogen, Nitro und/oder Niederalkyl substituiertes Phenyl, Methyl oder gegebenenfalls durch Nitro substituiertes Benzyl, oder eine durch Metallionen abspaltbare Schutzgruppe, wie 8-Chinolyl oder 5-Chloro-8-chinolyl, bedeutet, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen umgesetzt.

Anschließend wird eine dermaßen gebildete Verbindung der Formel VIII, worin R¹, X² und R² die oben angegebenen Bedeutungen haben, zuerst gegebenenfalls mit einem 2-substituierten Ethanol umgesetzt, das den Rest X² in eine Gruppe OR³ umwandelt, worin R³ Cyanoethyl, 2-Trihalogenethyl, 2-Arylsulfonylethyl, 2-Niederalkylthioethyl, 2-Arylthioethyl oder 2-(4-Nitrophenyl)-ethyl bedeutet, und dann die Schutzgruppe R¹ abgespalten, und die dermaßen hergestellte Verbindung der Formel IX mit einer andern Verbindung der Formel VIII, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen, zu einem Dinukleotid X umgesetzt (Schema 2). Gegebenenfalls wird eine Verbindung der Formel VIII durch Reaktion mit Basen und Wasser in eine andere Verbindung der Formel VIII, worin X² Hydroxy oder davon abgeleitete Salze bedeutet, umgewandelt.

Die Umsetzungen erfolgen in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel bei Raumtemperatur oder leicht erhöhter oder erniedrigter Temperatur, z. B. bei Raumtemperatur.

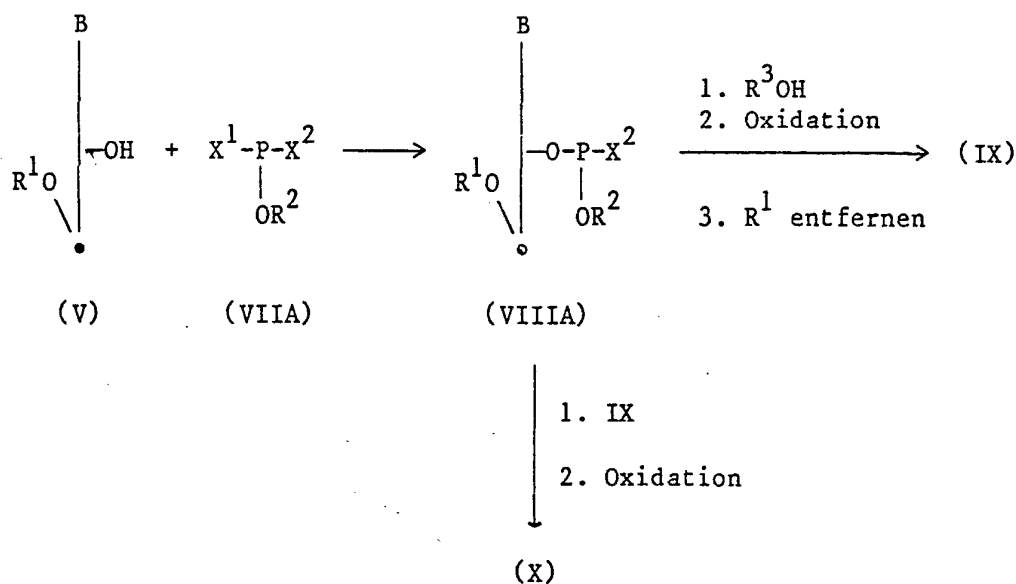
Die Abspaltung der Schutzgruppe R¹ wird z. B. mit Hilfe von Säuren, wie Mineralsäuren, z. B. Salzsäure oder Schwefelsäure, Carbonsäure, z. B. Essigsäure, Trichloressigsäure oder Ameisensäure, Sulfonsäure, z. B. Methan- oder p-Toluolsulfonsäure, oder insbesondere Lewis-Säure, z. B. Zinkchlorid, Zinkbromid, Aluminiumchlorid, Dialkylaluminiumhalogenid, z. B. Dibutyl- oder Diethylaluminiumchlorid, oder Bortrifluorid, bei 10°C bis 50°C, insbesondere bei Raumtemperatur, durchgeführt. Bei Verwendung eines Dialkylaluminiumhalogenid erfolgt die Abspaltung in einem lipophilen Lösungsmittel, insbesondere in Toluol, und bei Verwendung einer anderen der genannten Lewis-Säuren in einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus einem Halogenkohlenwasserstoff, z. B. Methylenchlorid, und einem Niederalkanol, z. B. Ethanol oder Isopropanol.

Schema 2



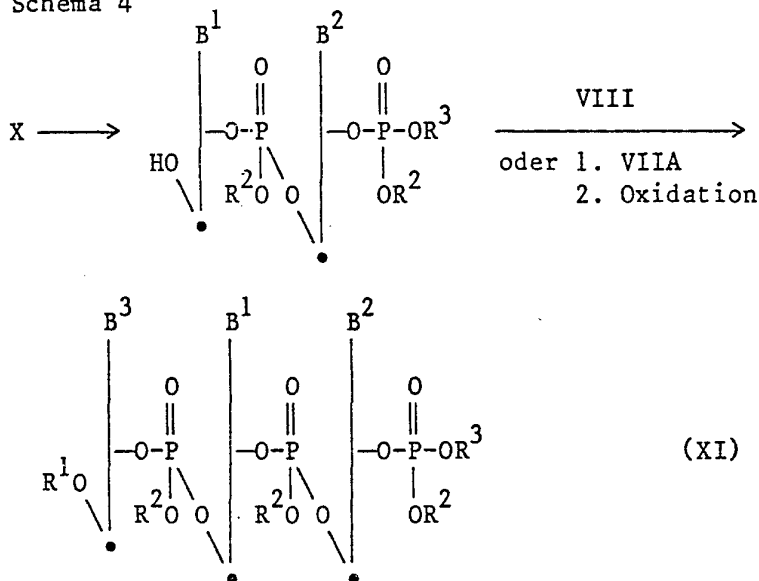
Die erfindungsgemäße Herstellung von Dinukleotiden der Formel X umfaßt auch die Reaktion von Nukleosiden der Formel V, worin R¹ und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit Phosphiten der Formel VIIA, worin X¹ Halogen, insbesondere Chlor, X² Halogen, insbesondere Chlor, oder Diniederalkylamino, insbesondere Dimethylamino oder Diisopropylamino, oder Morpholino, Piperidino oder Pyrrolidino, bedeuten und R² die für VII oben angegebene Bedeutung, insbesondere Methyl, hat, gegebenenfalls in Gegenwart einer geeigneten Base. Die erfindungsgemäß erhältlichen Verbindungen der Formel VIIIA werden einerseits mit einem 2-substituierten Ethanol umgesetzt, das den Rest X² in eine Gruppe OR³ umwandelt, worin R³ die oben angeführten Bedeutungen hat, dann mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, zum Phosphat oxidiert und die Schutzgruppe R¹ abgespalten, wobei eine Verbindung der Formel IX entsteht, andererseits mit einer Verbindung der Formel IX umgesetzt, dann mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, zu einer Verbindung der Formel X oxidiert (Schema 3).

Schema 3



Zur erfindungsgemäßen Herstellung von Trinukleotiden wird in Dinukleotiden der Formel X, worin R^1 , R^2 und R^3 die oben angegebenen Bedeutungen haben und worin B^1 und B^2 unabhängig voneinander Thymyl, Cytosyl, Adenyl oder Guanyl bedeuten, die Schutzgruppe R^1 abgespalten und die erhaltene Verbindung mit einer Verbindung der Formel VIII, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen, oder mit einer Verbindung der Formel VIIA und nachfolgender Oxidation umgesetzt, wobei eine Verbindung der Formel XI entsteht (Schema 4). Die Abspaltung der Schutzgruppe R^1 und die Kondensation zu den Trinukleotiden der Formel XI erfolgt in gleicher Weise, wie bei der Herstellung der Dinukleotide der Formel X beschrieben.

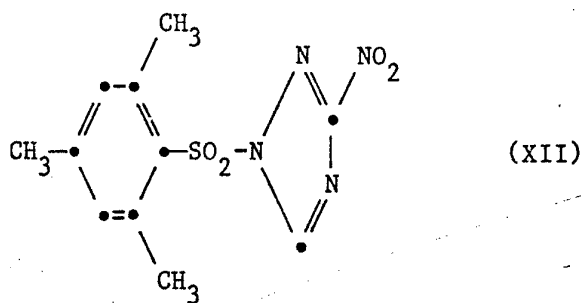
Schema 4



Zur erfindungsgemäßen Herstellung von Tetranukleotiden werden Trinukleotide der Formel XI so zur Reaktion gebracht, wie oben für Dinukleotide der Formel X beschrieben.

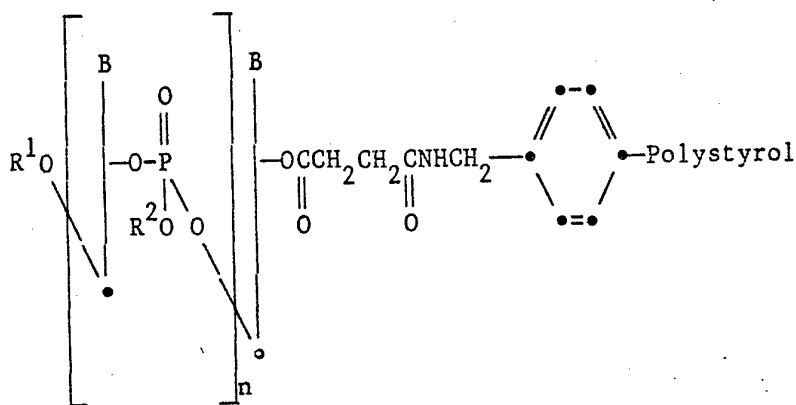
In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird als Schutzgruppe R^1 die 4-Methoxytritylgruppe, als Schutzgruppe R^2 eine durch Chlor substituierte Phenylgruppe, insbesondere 2-Chlorphenyl, und als Schutzgruppe R^3 die 2-Cyanoethylgruppe verwendet. Bevorzugter Rest X^1 und X^2 in der Verbindung der Formel VII ist der 1-Benzotriazolyl-oxy-Rest.

Trinukleotide der Formel XI werden vorzugsweise hergestellt, indem in Dinukleotiden der Formel X die Schutzgruppe R^1 abgespalten und die erhaltene Verbindung mit Verbindungen der Formel VIII, worin X^2 Hydroxyl oder davon abgeleitete Salze bedeutet, in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels umgesetzt wird (Schema 4). Erfindungsgemäße wasserentziehende Mittel sind beispielsweise 2,4,6-Trimethyl- oder Triisopropylbenzolsulfonyl-chlorid, -imidazolid, -tetrazolid oder -1,2,4-triazolid gegebenenfalls substituiert durch Nitro. Bevorzugtes wasserentziehendes Mittel ist 2,4,6-Trimethylbenzolsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid der Formel XII



Vorzugsweise werden Nukleoside eingesetzt, deren freie Aminogruppe im Basenteil geschützt ist. Bevorzugte Schutzgruppen sind Benzoyl für Adenin, Benzoyl oder 4-Methoxybenzoyl für Cytosin, Isobutyryl oder Diphenylacetyl für Guanin. Thymin wird vorzugsweise ohne Schutzgruppe eingesetzt.

Bei der erfindungsgemäßen Herstellung von Oligonukleotiden gemäß Schritt c) wird eine an sich bekannte Apparatur mit halbautomatischem oder vollautomatischem, mikroprozessorgesteuertem Zuführungssystem für Lösungsmittel und Reagentien verwendet. In einer gemäß Schritt a) hergestellten Verbindung der Formel VI wird die Schutzgruppe R^1 , wie oben beschrieben, abgespalten und anschließend entweder mit einer Verbindung der Formel VIII, oder mit einer Verbindung der Formel VIII A, oder mit einer Verbindung der Formel X oder XI, in der vorgängig die Schutzgruppe R^3 mit Basen abgespalten worden ist (eine Gruppe 2-Cyanoethyl als R_3 beispielsweise mit einem Triniederalkylamin, z. B. Triethylamin, in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische bei 10°C bis 40°C, insbesondere bei Raumtemperatur), gegebenenfalls in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels oder in Gegenwart einer Base umgesetzt. Die Erfindung umfaßt auch Reaktionen, bei denen anstelle eines Dinukleotids der Formel X oder eines Trinukleotids der Formel XI ein gemäß Schritt (b) hergestelltes Tetranukleotid eingesetzt wird. Wird ein Phosphit der Formel VIII A verwendet, so wird anschließend mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, nachbehandelt. Die dermaßen hergestellte Verbindung der Formel XIII, worin R^1 , R^2 und B die oben angegebenen Bedeutungen haben und n eine ganze Zahl von 1 bis 4 ist, wird so oft den für die Verbindung der Formel VI beschriebenen Reaktionsschritten (Abspaltung von R^1 , Reaktion mit VIII, VIII A, X, XI oder dem entsprechenden Tetranukleotid, gegebenenfalls mit oxidativer Nachbehandlung) unterworfen, bis eine Verbindung der Formel XIII entsteht, in der n eine beliebige ausgewählte Zahl zwischen etwa 19 und etwa 69 ist.



XIII

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Schutzgruppe R^1 4-Methoxytrityl verwendet und die Abspaltung mit Zinkbromid in Gegenwart einer CH- oder NH-aciden Verbindung, insbesondere 1,2,4-Triazol oder Tetrazol, durchgeführt. Die Verwendung von z. B. 1,2,4-Triazol bei der Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe ist neu und führt überraschenderweise dazu, daß die Abspaltung schnell, mit hohen Ausbeuten und ohne Nebenreaktionen abläuft. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Zinkbromid und 1,2,4-Triazol in einem molaren Verhältnis zwischen 20:1 und 100:1 in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus einem aprotischen Lösungsmittel und einem Alkohol, beispielsweise Methylenchlorid und 2-Propanol.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Verbindung der Formel VI oder der Formel XIII, in der die Schutzgruppe R^1 abgespalten worden ist, mit einem Trinukleotid der Formel XI, in dem die Schutzgruppe R^3 abgespalten worden ist, umgesetzt in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels, wie beispielsweise 2,4,6-Trimethyl- oder Triisopropylbenzolsulfonyl-chlorid, -imidazolid, -tetrazolid oder -1,2,4-triazolid gegebenenfalls substituiert durch Nitro. Besonders bevorzugt ist 2,4,6-Trimethylbenzolsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid der Formel XII.

Die besonders bevorzugte Kombination, darin bestehend, daß als Schutzgruppe R^1 die 4-Methoxytritylgruppe verwendet, zur Abspaltung von R^1 Zinkbromid in Gegenwart von 1,2,4-Triazol eingesetzt und als wasserentziehendes Mittel für die Reaktion von entschütztem Oligonukleotid-Polystyrol-Harz der Formel XIII mit einem entschütztem Trinukleotid der Formel XI das Triazolid der Formel XII verwendet wird, ermöglicht es, daß überraschenderweise auch lange Nukleotidketten mit etwa 40 bis etwa 70 Basen in kurzer Zeit, in hohen Ausbeuten und mit hoher Reinheit hergestellt werden können.

Zur erfindungsgemäßen Abspaltung der Oligodesoxynukleotide vom Träger und zur Entfernung der Schutzgruppen gemäß Schritt d) werden an sich bekannte Verfahren verwendet. Besonders bevorzugtes Reagens zur Abspaltung vom Träger und zur Entfernung der bevorzugten 2-Chlorphenyl-Schutzgruppe ist ein Arylaldoximat, beispielsweise das 1,1,3,3-Tetramethylguanidinium-2-nitrobenzaldoximat. Die Reaktion erfolgt in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel, dem

etwas Wasser beigelegt wird, z.B. in 95%igem Pyridin, bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit wässrigem Ammoniak bei Raumtemperatur oder erhöhter Temperatur, z.B. bei 20°C bis 70°C, insbesondere bei 50°C, umgesetzt.

Zur Ligation der erfindungsgemäßen Oligodesoxynukleotide wird an der 5'-terminalen Hydroxygruppe ein Phosphatrest eingeführt. Die Einführung des Phosphatrestes (Phosphorylierung) erfolgt in an sich bekannter Weise mit Hilfe von T₄ Polynucleotid-Kinase in Gegenwart von ATP.

Erfindungsgemäß hergestellte Oligodesoxynukleotide aus dem kodierenden und aus dem komplementären DNA-Strang enthalten überlappende Sequenzen, bestehend aus mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15 überlappende Basenpaaren. Solche Oligodesoxynukleotid-Paare werden beim Mischen durch Wasserstoffbrückenbindung zusammengehalten. Die überhängenden einsträngigen Enden dienen gemäß Schritt e1) und e2) als Matrix (Templat) für den Aufbau des zweiten (komplementären) Stranges durch eine DNA-Polymerase, z.B. DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I oder T₄ DNA-Polymerase oder mit AMV reverse Transcriptase, in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und TTP). Die bei der Komplementierung entstehenden Duplex-DNAs, bei denen es sich insbesondere um Fragmente des (modifizierten) Eglin-Gens (Verfahren e1) oder um das komplette (modifizierte) Eglin-Gen (Verfahren e2) handelt, besitzen flache Enden.

Die gemäß Verfahrensschritt e1) erhältlichen Fragmente des (modifizierten) Eglin-Gens erhalten an den Enden Nukleotidsequenzen, die von Restriktionsendonucleasen erkannt und gespalten werden können. Je nach Wahl der Nukleotidsequenzen und dementsprechend der Restriktionsendonucleasen entstehen bei der Spaltung vollständig basengepaarte (flache) Enden („blunt ends“) oder Enden mit einem überhängenden DNA-Strang („staggered ends“). Die Restriktions-Erkennungssequenzen werden so gewählt, daß die Ligation der DNA-Fragmente, die mit einer flachen Enden bildenden Restriktionsendonuclease behandelt worden sind, bzw. die Basenpaarung der kohäsiven Enden und die anschließende Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Strängen das vollständige (modifizierte) Eglin-Strukturen ergibt. Die Ligation zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente erfordert eine 5'-terminale Phosphatgruppe am Donor-Fragment und eine freie 3'-terminale Hydroxygruppe am Akzeptor-Fragment. Die anfallenden DNA-Fragmente sind bereits 5'-terminal phosphoryliert und werden in an sich bekannter Weise mit einer Ligase, insbesondere T₄ DNA-Ligase, verknüpft.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden auf dem beschriebenen Wege zwei Fragmente des Eglin C- oder G-Gens, im Falle des Eglin C-Gens insbesondere die Fragmente F₁(C) und F₂ gemäß Formel IIIa bzw. IV, und im Falle des Eglin B-Gens insbesondere die Fragmente F₁(B) und F₂ gemäß Formel IIIb bzw. IV, hergestellt. Die Fragmente, welche erforderlichenfalls in einem geeigneten Vektor subkloniert werden können, enthalten vorzugsweise an den Verknüpfungsenden jeweils die Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuclease, insbesondere HpaI, weswegen nach Spaltung mit besagtem Restriktionsenzym und Ligation der beiden Fragmente die korrekt kodierende Eglin-DNA-Sequenz entsteht. Zusätzlich enthält das Teilstück 1 vor dem Translationsstartsignal (ATG) und das Teilstück 2 nach dem Translationsstoppsignal (z.B. TAG) zusätzlich „terminale“ Restriktionsstellen, die den Einbau des (modifizierten) Eglin-Gens bzw. der (modifizierten) Eglin-Gen-Teilstücke in einen geeigneten Vektor erlauben.

Insbesondere betrifft die Erfindung die Herstellung des Eglin C-Gens in zwei Teilstücken F₁(C) und F₂ der Formel IIIa bzw. IV, welche nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym HpaI und Ligation die korrekte Eglin C-DNA-Sequenz ergeben und worin F₁(C) vor dem Translationsstartsignal eine EcoRI-Restriktionsstelle und F₂ nach dem Translationsstoppsignal eine BamHI-Restriktionsstelle aufweist.

In einer anderen Ausführungsform (Schritt e2) werden je zwei Oligodesoxynukleotide, die alternativ aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang stammen, mittels mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15 komplementären Basen anelliert, mit einer DNA-Polymerase, z.B. eine der oben genannten, aufgefüllt und mit T₄ DNA-Ligase zum (modifizierten) Eglin-Strukturgen ligiert.

Herstellung von Expressionsvektoren, welche ein Eglin-Gen enthalten

Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionsvektoren, welche eine für ein Eglin oder für ein modifiziertes Eglin kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, daß in einem mit diesen Expressionsvektoren transformierten Wirt Polypeptide mit Eglin-Aktivität exprimiert werden.

Die Expressionsvektoren gemäß vorliegender Erfindung enthalten eine für Eglin B, modifiziertes Eglin B, modifiziertes Eglin C oder insbesondere Eglin C kodierende Sequenz.

Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden z.B. hergestellt, indem man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für ein Eglin oder ein modifiziertes Eglin kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, daß die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus den zur Transformation vorgesehenen Wirtszellen. Geeignete Wirte sind beispielsweise Mikroorganismen, wie Hefen, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, und insbesondere Bakterienstämme, die über kein Restriktions- oder Modifikationsenzym verfügen, vor allem Stämme von *Escherichia coli*, z.B. *E. coli* X1776, *E. coli* HB101, *E. coli* W310, *E. coli* HB101/LM1035, *E. coli* JA221(37) oder *E. coli* K12 Stamm 294, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Streptococcus* und andere, ferner Zellen höherer Organismen, insbesondere etablierte humane oder tierische Zelllinien. Bevorzugt als Wirtsmikroorganismus sind die genannten Stämme von *E. coli*, z.B. *E. coli* HB101 und *E. coli* JA221, ferner *Saccharomyces cerevisiae*.

Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, welche die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in dem gewählten Wirt replizieren und exprimieren.

Beispiele für Vektoren, die zur Expression eines Eglin- oder modifizierten Eglin-Gens in einem *E. coli*-Stamm geeignet sind, sind Bacteriophagen, z.B. Derivate des Bacteriophagen λ , oder Plasmide, wie insbesondere das Plasmid colEI und seine Derivate, z.B. pMB9, pSF2124, pBR317 oder pBR322. Die bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung leiten sich von Plasmid pBR322 ab. Geeignete Vektoren beinhalten ein vollständiges Replicon und ein Markierungsgen, welches die Selektion und Identifizierung der mit den Expressionsplasmiden transformierten Wirte auf Grund eines phänotypischen Merkmals ermöglicht. Geeignete Markierungsgene verleihen dem Wirt beispielsweise Resistenz gegenüber Schwermetallen, Antibiotika und dergleichen. Weiterhin enthalten bevorzugte Vektoren der vorliegenden Erfindung außerhalb der Replicon- und Markierungsgen-Regionen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, so daß an diesen Stellen das Eglin-Gen und gegebenenfalls die Expressions-Kontrollsequenz eingefügt werden können. Der bevorzugte Vektor, das Plasmid pBR322, enthält ein intaktes

Replicon, gegen Tetracyclin und Ampicillin Resistenz verleihende Markierungsgene (tet^R und amp^R) und eine Reihe von nur einmal vorkommenden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen, z. B. PstI (schneidet im amp^R -Gen, das tet^R -Gen bleibt intakt), BamHI, HindIII, Sall (schneiden alle im tet^R -Gen, das amp^R -Gen bleibt intakt), NruI und EcoRI.

Mehrere Expressionskontrollsequenzen können zur Regulation der Genexpression eingesetzt werden. Insbesondere werden Expressionskontrollsequenzen stark exprimierter Gene des zu transformierenden Wirtes verwendet. Im Falle von pBR322 als Hybridvektor und *E. coli* als Wirtsmikroorganismus sind beispielsweise die Expressionskontrollsequenzen (welche unter anderem den Promotor und die ribosomale Bindungsstelle enthalten) des Lactoseoperons, Tryptophanoperons, Arabinoseoperons und dergleichen, des β -Lactamasegens, die entsprechenden Sequenzen des Phage λ N-Gens oder des Phage fd-Schichtproteingens und andere geeignet. Während der Promotor des β -Lactamasegens (β -lac-Gen) bereits im Plasmid pBR322 enthalten ist, müssen die übrigen Expressionskontrollsequenzen in das Plasmid eingeführt werden. Bevorzugt als Expressionskontrollsequenz in der vorliegenden Erfindung ist diejenige des Tryptophanoperons (*trp po*).

Zur Replikation und Expression in Hefe geeignete Vektoren enthalten einen Hefe-Replikationsstart und einen selektiven genetischen Marker für Hefe. Hybridvektoren, die einen Hefe-Replikationsstart enthalten, z. B. das chromosomale autonom replizierende Segment (*ars*), bleiben nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extrachromosomal erhalten und werden bei der Mitose autonom repliziert. Ferner können Hybridvektoren, die der Hefe- 2μ -Plasmid-DNA homologe Sequenzen enthalten, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden durch Rekombination innerhalb der Zelle bereits vorhandenen 2μ -Plasmiden einverleibt oder replizieren autonom. 2μ -Sequenzen sind besonders für Plasmide mit großer Transformationshäufigkeit geeignet und gestatten eine hohe Kopienzahl. Geeignete Markierungsgene für Hefe sind vor allem solche, die dem Wirt antibiotische Resistenz verleihen oder, im Fall von auxotrophen Hefemutanten, Gene, die Wirtsdefekte komplementieren. Entsprechende Gene verleihen z. B. Resistenz gegen das Antibiotikum Cycloheximid oder sorgen für Prototrophie in einer auxotrophen Hefemutante, z. B. das **URA3**-, **LEU2**-, **HIS3**- oder vor allem das **TRP1**-Gen. Vorzugsweise enthalten Hefe-Hybridvektoren weiterhin einen Replikationsstart und ein Markierungsgen für einen bakteriellen Wirt, insbesondere *E. coli*, damit die Konstruktion und die Klonierung der Hybridvektoren und ihrer Vorstufen in einem bakteriellen Wirt erfolgen kann. Für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise diejenigen des **TRP1**-, **ADHI**-, **ADHI**-, **PHO3**- oder **PHO5**-Gens, ferner im glykolytischen Abbau involvierte Promoter, z. B. der **PGK**- und der **GAPDH**-Promoter.

Insbesondere betrifft die Erfindung zur Replikation und phänotypischen Selektion befähigte Expressionsvektoren, welche eine Expressionskontrollsequenz und eine für ein Eglin oder ein modifiziertes Eglin kodierende DNA-Sequenz enthalten, wobei besagte DNA-Sequenz mitsamt Transkriptionsstartsignal und -terminationssignal sowie Translationsstartsignal und -stoppsignal in besagtem Expressionsplasmid unter Regulation besagter Expressionskontrollsequenz so angeordnet ist, daß in einem mit besagtem Expressionsplasmid transformierten Wirt Polypeptide mit Eglin-Aktivität exprimiert wird.

Um eine effektive Expression zu erreichen, muß das Strukturgen richtig (in „Phase“) mit der Expressionskontrollsequenz angeordnet sein. Es ist vorteilhaft, die Expressionskontrollsequenz in den Bereich zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ATG der Genkodiersequenz, welche natürlich mit der Expressionskontrollsequenz verknüpft ist (z. B. die β -lac-Kodiersequenz bei Verwendung des β -lac-Promotors), mit dem Eglin-(bzw. modifiziertes Eglin)-Gen, welches vorzugsweise sein eigenes Translationsstartsignal (ATG) und Translationstoppsignal (z. B. TAG) mitbringt, zu verknüpfen. Dadurch wird eine effektive Transkription und Translation gewährleistet.

Beispielsweise wird ein Vektor, insbesondere pBR322, mit einer Restriktionsendonuclease geschnitten und, gegebenenfalls nach Modifikation des so gebildeten linearisierten Vektors, eine mit entsprechenden Restriktionsenden versehene Expressionskontrollsequenz eingefügt. Die Expressionskontrollsequenz enthält am 3'-Ende (in Translationsrichtung) die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuclease, so daß der die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltende Vektor mit besagtem Restriktionsenzym verdaut und das mit passenden Enden versehene Eglin- (oder modifizierte Eglin-) Strukturgen eingesetzt werden kann. Dabei entsteht ein Gemisch von zwei Hybridplasmiden, welche das Gen in richtiger bzw. in falscher Orientierung enthalten. Vorteilhaft ist es, den die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltenden Vektor noch mit einer zweiten Restriktionsendonuclease innerhalb der Vektor-DNA zu spalten und in das entstandene Vektor-Fragment das mit richtigen Enden versehene Strukturgen einzusetzen. Alle Operationen am Vektor erfolgen vorzugsweise in einer Weise, daß die Funktion des Replicons und zumindest eines Markierungsgens nicht beeinträchtigt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, welcher ein Expressionskontrollsequenz, insbesondere diejenige vom Tryptophan-Operon (*trp po*), enthält, die am 3'-Ende (zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ersten ATG) die Erkennungssequenz für eine, vorzugsweise kohäsive Enden bildende, Restriktionsendonuclease, z. B. EcoRI, trägt, mit der genannten Restriktionsendonuclease und im Vektor-DNA-Teil mit einer zweiten Restriktionsendonuclease, welche flache oder bevorzugt kohäsive Enden bildet, z. B. BamHI, verdaut, wonach der so linearisierte Vektor mit dem entsprechende Enden aufweisenden Eglin (oder modifizierten Eglin)-Gen (z. B. mit einem EcoRI-Ende vor dem ATG-Start und einem BamHI-Ende nach dem Translations-Codon) verknüpft. Die Verknüpfung erfolgt in bekannter Weise durch Paarung der komplementären (kohäsiven) Enden und Ligierung, z. B. mit T_4 -DNA-Ligase.

Das über den mRNA-Weg, aus genomischer DNA oder synthetisch gewonnene, mit entsprechenden kohäsiven (insbesondere EcoRI- und BamHI-) Enden versehene Eglin- (oder modifizierte Eglin-) Gen kann vor dem Einbringen in ein Expressionsplasmid auch in einen Vektor, z. B. pBR322, kloniert werden, um größere Mengen an Strukturgen, beispielsweise für die Sequenzanalyse, zu gewinnen. Die Isolierung der Klonen, welche das Hybridplasmid enthalten, wird beispielsweise mit einer Eglin-spezifischen, radioaktiv-markierten Oligodesoxy-nucleotid-Probe (siehe oben) durchgeführt. Die Charakterisierung des Eglin-(bzw. modifizierten Eglin-)Gens erfolgt beispielsweise nach dem Verfahren von Maxam und Gilbert (3).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zwei Teilstücke eines Eglin- oder modifizierten Eglin-Gens, beispielsweise zwei Teilstücke des Eglin C-Gens, synthetisiert. Teilstück 1, welches den 1. Teil des Gens umfaßt, enthält vor dem ATG und am Ende jeweils die Erkennungssequenz für kohäsive Enden bildende Restriktionsendonucleasen, z. B. vor dem ATG EcoRI und am Ende HpaII. Teilstück 2, welches den hinteren Teil des Gens umfaßt, besitzt entsprechende Erkennungssequenzen, am Anfang z. B. HpaII und nach dem Translationsstoppsignal (z. B. TAG) BamHI. Die Teilstücke werden an den äußeren Erkennungssequenzen gespalten (Teilstück 1 z. B. mit EcoRI und Teilstück 2 entsprechend mit BamHI) und in einen entsprechend zugeschnittenen Vektor (z. B. pBR322) subkloniert. Die Identifizierung der Klone, welche die Teilstücke enthalten, und die Charakterisierung der Teilstücke erfolgt wie oben beschrieben. Die Teilstücke werden dann mit den entsprechenden

Restriktionsendonucleasen aus den Hybridvektoren herausgeschnitten (Teilstück 1 z. B. mit EcoRI und HpaII und Teilstücke 2 z. B. mit HpaII und BamHI) und über ihre kohäsiven Enden, insbesondere HpaII-Enden, ligiert, wobei das komplette Eglin-(bzw. modifizierte Eglin-)Gen entsteht, das wie angegeben in eine Vektor-DNA eingefügt wird.

Transformation der Wirtszellen

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines transformierten Wirtes, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen Wirt mit einem Expressionsplasmid, das eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für ein Eglin oder für ein modifiziertes Eglin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

Geeignete Wirte sind beispielsweise die oben genannten Mikroorganismen, wie Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* und insbesondere *Escherichia coli*. Die Transformation mit den erfindungsgemäßen Expressionsplasmiden erfolgt beispielsweise wie in der Literatur beschrieben, so für *S. cerevisiae* (4), *B. subtilis* (5) und *E. coli* (6). Die Isolierung des transformierten Wirtes erfolgt vorteilhaft aus einem selektiven Nährmedium, dem das Biocid zugesetzt wird, gegen welches das im Expressionsplasmid enthaltene Markierungsgen Resistenz verleiht. Wenn, wie bevorzugt, die Expressionsplasmide das amp^R -Gen enthalten, wird dem Nährmedium demgemäß Ampicillin zugesetzt. Zellen, welche das Expressionsplasmid nicht enthalten, werden in einem solchen Medium abgetötet.

Die Erfindung betrifft ebenfalls den auf dem genannten Weg erhältlichen transformierten Wirt.

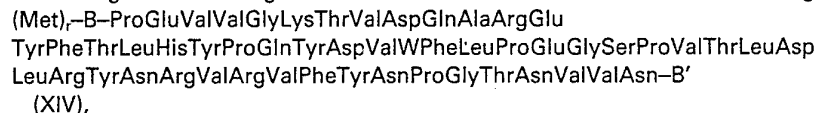
Kultivierung des transformierten Wirtes und Gewinnung von Eglinen

Der transformierte Wirt kann zur Herstellung von Eglinen und modifizierten Eglinen verwendet werden. Das Verfahren zur Herstellung von Eglinen und modifizierten Eglinen ist dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirt kultiviert und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, daß die erfindungsgemäßen, transformierten Wirte Gemische von Polypeptiden mit Eglin-Aktivität produzieren. Aus den Gemischen lassen sich natürliche Eglin, Methionyl-eglin und N-terminal acetylierte Eglin isolieren. Transformierte Stämme von *E. coli* produzieren insbesondere Polypeptide mit Eglin-Aktivität, welche sich von den natürlichen Eglinen B und C durch einen N-Acetylrest an der N-terminalen Aminosäure Threonin unterscheiden, andere transformierte Wirte überwiegend die natürliche Eglin und dritte drücken vor allem Polypeptide aus, welche exakt den in den Wirt eingeführten Eglin-DNAs entsprechen, d. h. als N-terminale Aminosäure Methionin aufweisen. Insbesondere ist die Produktion N^α-acetylierter Produkte überraschend. Die Produktion derartiger Polypeptide mittels gentechnologischer Methoden ist nämlich bisher noch nicht beobachtet worden. So wird selbst α -Thymosin, welches natürlich N-terminal acetyliert ist, von entsprechenden genetisch modifizierten Wirten in nichtacetylierter Form exprimiert (35).

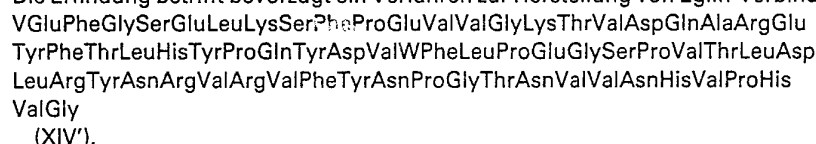
Die Produktion N-terminal acetylierter Eglin ist von großem Vorteil, weil solche Verbindungen eine erhöhte Stabilität gegenüber den in den Wirtszellen vorhandenen Aminopeptidasen besitzen, wodurch der (partielle) proteolytische Abbau ausgehend vom N-Terminus verhindert und infolgedessen die Ausbeute erhöht wird. Weiterhin wird dadurch das Reinigungsverfahren erheblich vereinfacht, weil die gewünschten Produkte nicht mit durch proteolytischen Abbau entstandenen Fragmenten verunreinigt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Eglin-Verbindungen der Formel



worin B für eine direkte Bindung oder für einen Peptidrest steht, der 1–10 Aminosäurebausteine vom N-Terminus der natürlichen Eglin umfaßt, z. B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe SerPhe-, LeuLysSerPhe-, SerGluLeuLysSerPhe-, PheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe-, und B' für keinen oder für einen Peptidrest steht, der 1–6 Aminosäurebausteine vom C-Terminus der natürlichen Eglin umfaßt, z. B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe -HisVal-, -HisValProHis oder -HisValProHisValGly, W Tyr oder His bedeutet, und r 0 oder 1 ist, wobei in Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist, die N-terminale Aminosäure gegebenenfalls N-acetyliert ist, und von Salzen solcher Verbindungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für ein Eglin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierter Wirt in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert wird und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, oder zur Herstellung von Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist und die N-terminale Aminosäure N-acetyliert ist, eine Verbindung der Formel XIV mit freier N-terminaler Aminogruppe acetyliert wird, und, falls gewünscht, eine erhältliche Eglin-Verbindung der Formel XIV in eine andere Eglin-Verbindung der Formel XIV überführt wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen der Formel XIV in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

Die Erfindung betrifft bevorzugt ein Verfahren zur Herstellung von Eglin-Verbindungen der Formel



worin V für Thr, N-Acetyl-Thr oder für Met-Thr steht und W Tyr oder His bedeutet, und von Salzen solcher Verbindungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für ein Eglin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierter Wirtsmikroorganismus in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert und das Eglin aus den Mikroorganismen-Zellen freigesetzt und isoliert wird, und falls gewünscht, ein erhältliches Eglin, worin V für N-Acetyl-Thr oder für Met-Thr steht und W obige Bedeutung hat, in ein Eglin überführt wird, worin V Thr bedeutet, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen der Formel XIV in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid oder ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von Eglin C-Verbindungen der Formel XIV, worin B für einen Peptidrest ausgewählt aus der Gruppe LeuLysSerPhe-, SerGluLeuLysSerPhe- oder ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- und B'

-HisValProHisValGly steht, W Tyr ist und r 0 oder 1 ist, ferner auch Verfahren zur Herstellung von Eglin B-Verbindungen der Formel XIV, worin B für den Peptidrest ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- und B' für den Peptidrest -HisValProHisValGly steht, W His bedeutet und r 0 oder 1 ist, wobei in Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist, die N-terminale Aminosäure gegebenenfalls N-acetyliert ist, und von Salzen solcher Verbindungen.

In den Verbindungen der Formel XIV hat W bevorzugt die Bedeutung Tyr (Eglin C-Verbindungen).

In erster Linie betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Eglin C-Verbindungen der Formel XIV, worin B für den N-Acetyl-SerGluLeuLysSerPhe-, ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder N-Acetyl-ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe-Rest und B' für den Rest -HisValProHisValGly steht, W Tyr ist und r 0 ist, und von Salzen solcher Verbindungen.

Die Erfindung betrifft speziell ein Verfahren zur Herstellung von Eglin C, Eglin B, N^α-Acetyl-Eglin C und der modifizierten Eglin C-Verbindungen Eglin C' und Eglin C''.

Für die Kultivierung der erfindungsgemäßen, transformierten Wirte können verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet werden. Beispiele bevorzugter Kohlenstoffquellen sind assimilierbare Kohlenhydrate, wie Glucose, Maltose, Mannit oder Lactose, oder ein Acetat, das entweder allein oder in geeigneten Gemischen verwendet werden kann. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Aminosäuren, wie Casaminoäuren, Peptide und Proteine und ihre Abbauprodukte, wie Trypton, Pepton oder Fleischextrakte; weiterhin Hefeextrakte, Malzextrakt, wie auch Ammoniumsalze, z. B. Ammoniumchlorid, -sulfat oder -nitrat, die entweder allein oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Anorganische Salze, die ebenfalls verwendet werden können, sind z. B. Sulfate, Chloride, Phosphate und Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium.

Weiterhin enthält das Medium z. B. wachstumsfördernde Substanzen, wie Spurenelemente, z. B. Eisen, Zink, Mangan und dergleichen, und vorzugsweise Substanzen, die einen Selektionsdruck ausüben und das Wachstum von Zellen, die das Expressionsplasmid verloren haben, verhindern. So wird dem Medium beispielsweise Ampicillin zugesetzt, wenn das Expressionsplasmid ein amp^r-Gen enthält. Ein solcher Zusatz von antibiotisch wirksamen Substanzen bewirkt auch, daß kontaminierende, Antibiotika-empfindliche Mikroorganismen abgetötet werden.

Die Kultivierung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren. Die Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationszeit, werden so ausgewählt, daß maximale Eglin-Titer erhalten werden. So wird ein *E. coli*-Stamm bevorzugt unter aeroben Bedingungen in submerser Kultur unter Schütteln oder Rühren bei einer Temperatur von etwas 20 bis 40°C, vorzugsweise etwa 30°C, und einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise bei pH 7, während etwa 4 bis 20 h, vorzugsweise 8 bis 12 h, kultiviert. Dabei sammelt sich das Expressionsprodukt (Eglin) intrazellulär an.

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultivierung abgebrochen und das Eglin aus den Zellen des Wirtes freigesetzt. Zu diesem Zweck werden die Zellen zerstört, z. B. durch Behandlung mit einem Detergens, wie SDS oder Triton, oder mit Lysozym oder einem gleichartig wirkenden Enzym lysiert. Alternativ oder zusätzlich kann man mechanische Kräfte, wie Scherkräfte (z. B. X-Pressen, French-Pressen, Dyno-Mill) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z. B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z. B. auf 30° bis 40°C, sowie Ultraschall zum Brechen der Zellen anwenden. Die resultierende Mischung, die Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile enthält, wird nach der Zentrifugation in an sich bekannter Weise an Proteinen, inklusive Eglin, angereichert. So wird z. B. der größte Teil der Nicht-Protein-Bestandteile durch Polyethylenimin-Behandlung abgetrennt und die Proteine einschließlich Eglin z. B. durch Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen ausgefällt. Bakterielle Proteine können auch mittels Ansäuern mit Essigsäure (z. B. 0,1%, pH 4–5) ausgefällt werden. Eine weitere Anreicherung an Eglin kann durch Extraktion des essigsäuren Überstandes mit n-Butanol erreicht werden. Weitere Reinigungsschritte umfassen beispielsweise Gelelektrophorese, chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Größen-Exklusionschromatographie, HPLC, Umkehrphasen-HPLC und dergleichen, Auftrennung der Mischungsbestandteile nach Molekülgrößen mittels einer geeigneten Sephadex-Säule, Dialyse, Affinitätschromatographie, z. B. Antikörper-, insbesondere monoklonale Antikörper-Affinitätschromatographie oder Affinitätschromatographie an einer Anhydrochymotrypsinsäule, und weitere, insbesondere aus der Literatur, bekannte Verfahren.

Beispielsweise umfaßt die Isolierung des exprimierten Eglins die folgenden Stufen:

Abtrennung der Zellen aus der Kulturlösung mittels Zentrifugation; Herstellung eines Rohextrakts durch Zerstören der Zellen, z. B. durch Behandlung mit einem lysierenden Enzym und/oder abwechselndem Einfrieren und Wiederauftauen;

Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile,

Ausfällen der DNA durch Zugabe von Polyäthylenimin;

Fällung der Proteine einschließlich Eglin durch Ammoniumsulfat;

Affinitätschromatographie des gelösten Niederschlags an einer monoklonalen Anti-Eglin-Antikörper-Säule oder einer Anhydrochymotrypsin-Säule;

Entsalzung der so gewonnenen Lösung mittels Dialyse oder Chromatographie an Sephadex G25.

Alternativ können nach Abtrennen der DNA die bakteriellen Proteine mittels 0,1%iger Essigsäure ausgefällt werden, aus dem sauren Überstand das Eglin mit n-Butanol extrahiert oder der saure Überstand direkt der Ionenaustausch-Chromatographie (z. B. an Carboxymethylcellulose) unterworfen werden. Weitere Reinigungsschritte schließen Gelfiltration an Sephadex G50 (oder G75), und Umkehrphasen-HPLC ein. Entsalzung erfolgt wieder an Sephadex G25.

Zum Nachweis der Eglin-Aktivität kann der Test mit Anti-Eglin-Antikörpern (z. B. aus Kaninchen erhaltliche, oder aus Hybridomazellen erhaltliche monoklonale Antikörper) oder die Hemmung der Proteasen Humanleukozyten-Elastase (HLE) oder Cathepsin G (Cat G) (1) durch Eglin herangezogen werden.

Die Überführung einer Verbindung der Formel XIV, worin r 0 ist und die N-terminale Aminogruppe in freier Form vorliegt, in eine entsprechende Verbindung der Formel XIV, worin die N-terminale Aminosäure N-acetyliert ist, erfolgt insbesondere auf enzymatischem Weg. So kann die Einführung der Acetylgruppe beispielsweise mit Hilfe einer N^α-Acetyl-transferase (in reiner Form, als Extrakt oder Lysat eines geeigneten Mikroorganismus oder als Organextrakt), beispielsweise aus *E. coli*, aus Kaninchen-Retikulozyten oder Weizenkeimlingen (8), in Gegenwart von Acetyl-Coenzym A erfolgen.

Verfahrensgemäß erhaltliche Verbindungen der Formel XIV können in an sich bekannter Weise in andere Verbindungen der Formel XIV überführt werden.

So kann in erhaltlichen Verbindungen der Formel XIV mit Methionin als N-terminale Aminosäure oder mit einer N-terminal acetylierten Aminogruppe Methionin oder der Acetylrest abgespalten werden. Beispielsweise können erfindungsgemäß erhaltliche Eglin-Verbindungen mit einem N-terminalen Methionylrest in Eglins ohne einen derartigen Rest übergeführt werden.

indem man den terminalen Methionylrest in üblicher Weise mittels Bromcyan abspaltet. Die Reaktion mit Bromcyan erfolgt z.B. in einem wäßrig-sauren Medium, z.B. in stark verdünnter Salzsäure, beispielsweise in 0,1–0,3 N Salzsäure, oder in einer starken organischen Säure, z.B. in 50–70%iger Ameisensäure, bei Raumtemperatur oder geringfügig erhöhter und erniedrigter Temperatur, z.B. bei ca. 15° bis etwa 25°C über einen Zeitraum von etwa 24 Stunden. Entsprechend kann in verfahrensgemäß erhältlichen Verbindungen der Formel XIV mit einer N-terminal acetylierten Aminogruppe der Acetylrest abgespalten werden. Die Abspaltung des Acetylrestes kann beispielsweise enzymatisch erfolgen, wie mit geeigneten Acylasen, z.B. aus Schweinenieren oder aus geeigneten Mikroorganismen, oder mit geeigneten Acetyltransferasen in Gegenwart von Coenzym A, wobei anstelle reiner Enzympräparate auch Extrakte oder Lysate von Mikroorganismen bzw. Organextrakte verwendet werden können, die solche Enzyme enthalten (bei Verwendung von *E. coli* HB 101 als N^a-Acetyl-Eglin B oder C produzierenden Stamm beispielsweise ein *E. coli* HB101-Lysat).

Ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen der Formel XIV, beispielsweise bestehend aus Verbindungen der Formel XIV, worin V entweder Thr oder Acetyl-Thr bedeutet, kann in an sich bekannter Weise in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Geeignete Trennverfahren sind beispielsweise chromatographische Verfahren, z.B. Adsorptions-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC oder reversed-phase HPLC, ferner multiplikative Verteilung oder elektrophoretische Methoden, z.B. Elektrophorese an Celluloseacetat oder Gelelektrophorese, insbesondere Polyacrylamid-Gelelektrophorese („PAGE“).

Die Erfindung betrifft auch die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen neuen Peptide mit Eglin-Aktivität, Mischungen von solchen Peptiden und Salze von solchen Verbindungen.

Die Erfindung betrifft weiterhin die neuen Verbindungen der Formel

(Met)_r-B-ProGluValValGlyLysThrValAspGlnAlaArgGlu

TyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValWPheLeuProGluGlySerProValThrLeuAsp

LeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnValValAsn-B'

(XIV)

worin r 1 ist, B für eine direkte Bindung oder für einen Peptidrest steht, der 1–10 Aminosäurebausteine vom N-Terminus der natürlichen Eglins umfaßt, z.B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe SerPhe-, LeuLysSerPhe-, SerGluLeuLysSerPhe-, PheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe-, und B' für keinen oder für einen Peptidrest steht, der 1–6 Aminosäurebausteine vom C-Terminus der natürlichen Eglins umfaßt, z.B. ein solcher ausgewählt aus der Gruppe -HisVal-, -HisValProHis oder -HisValProHisValGly, und W Tyr oder His bedeutet, oder worin r 0 ist, B für einen N-terminal acetylierten Peptidrest steht, z.B. ausgewählt aus der Gruppe N-Acetyl-SerPhe-, N-Acetyl-LeuLysSerPhe-, N-Acetyl-SerGluLeuLysSerPhe-, N-Acetyl-PheGlySerGluLeuLysSerPhe- oder N-Acetyl-ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe-, und B' die angegebene Bedeutung hat, und W Tyr oder His ist, und Salze von solchen Verbindungen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verbindungen der Formel XIV, worin r 0 ist, B für den Peptidrest N-Acetyl-SerGluLeuLysSerPhe- oder N-Acetyl-ThrGluPheGlySerGluLeuLysSerPhe- und B' für den Peptidrest -HisValProHisValGly steht und W Tyr ist, und Salze von solchen Verbindungen.

Die Erfindung betrifft bevorzugt Eglin-Verbindungen der Formel

VGluPheGlySerGluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrValAspGlnAlaArgGlu

TyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValWPheLeuProGluGlySerProValThrLeuAsp

LeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGlyThrAsnValValAsnHisValProHis

ValGly

(XIV'),

worin V für N-Acetyl-Thr oder Met-Thr steht und W Tyr oder His ist, und Salze von solchen Verbindungen.

Die Erfindung betrifft insbesondere N^a-Acetyl-Eglin C und Salze davon.

Die erfindungsgemäß herstellbaren Verbindungen bzw. die neuen Verbindungen der Formel XIV können nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen bzw. Guanidinogruppen enthalten, können die erfindungsgemäßen Verbindungen z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren (wie die Chlorwasserstoffsäure), aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster Linie Sulfonsäuren (wie die Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure) sowie Carbonsäuren, wie Essigsäure, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure, geeignet. Da die Eglin-Verbindungen auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, die dem ganzen Peptid sauren Charakter verleihen, können sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber zugleich freie Carboxylgruppen und freie Amino (und Amidino)-Gruppen enthalten, können sie auch als inneres Salz vorliegen.

Je nach Arbeitsweise erhält man die erfindungsgemäßen Verbindungen in freier Form oder in Form von Säureadditionssalzen, inneren Salzen oder Salzen mit Basen. Aus den Säureadditionssalzen können in an sich bekannter Weise die freien Verbindungen gewonnen werden. Von letzteren wiederum lassen sich durch Umsetzen mit Säuren oder Basen, z.B. mit solchen, die die obengenannten Salze bilden, und Eindampfen oder Lyophilisieren therapeutisch annehmbare Säureadditionssalze oder Metallsalze gewinnen. Die inneren Salze können durch Einstellen des pH auf einen geeigneten Neutralpunkt gewonnen werden.

Monoklonale Antikörper gegen Egline und Test-Kits, die solche Antikörper enthalten.

Die Eigenschaft von Antikörpern, spezifische Antigene zu binden, findet außerhalb des Körpers praktische Anwendung bei der quantitativen Bestimmung (Immuno-Assay) und bei der Reinigung der Antigene (Immunoaffinitätschromatographie). Serum immunisierter Tiere enthält normalerweise eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die mit dem gleichen Antigen an verschiedenen Bindungsstellen mit verschiedener Affinität reagieren, dazu aber auch Antikörper gegen andere Antigene, die die früheren Erfahrungen des Individuums widerspiegeln. Die erfolgreiche Anwendung von Antikörpern zur Bestimmung und Reinigung von Antigenen erfordert aber hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit.

Homogene Antikörper, die diese Anforderungen erfüllen, sind durch die von Köhler und Milstein (26) beschriebene Hybridomatechnik zugänglich geworden. Prinzipiell besteht die Technik darin, daß Antikörper ausscheidende B-Lymphozyten, z.B. aus der

Milz, immunisierter Tiere mit Tumorzellen verschmolzen („fusioniert“) werden. Die gebildeten Hybridomazellen kombinieren die Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung durch Teilung mit der Fähigkeit, einen einheitlichen Typ Antikörper zu bilden und auszuschcheiden. Durch Kultivierung in einem selektiven Medium, in dem nicht fusionierte Tumorzellen absterben, Hybridomazellen sich aber vermehren, und durch geeignete Manipulationen können Klone, d. h. Zellpopulationen, die sich von einer einzigen Hybridomazelle ableiten und genetisch identisch sind, gewonnen und kultiviert und die durch die Zellen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Eglin oder modifizierte Eglin, Hybridomazellen, die solche Antikörper produzieren und Verfahren zu ihrer Herstellung. Bevorzugt sind Hybridomazelllinien und die von diesen ausgeschiedenen monoklonalen Antikörper, die spezifisch mit Eglin B oder Eglin C oder Derivaten davon, z. B. N^α-Acetyl-Eglin C oder B, oder N^α-Methionyl-Eglin C oder B, reagieren. Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Anti-Eglin-Antikörpern ist **dadurch gekennzeichnet**, daß man Mäuse mit einem Eglin oder modifiziertem Eglin immunisiert, B-Lymphozyten derart immunisierter Tiere mit Myelomazellen fusioniert, die gebildeten Hybridomazellen kloniert, dann in vitro oder durch Injektion in Mäusen kultiviert und aus den Kulturen Antikörper isoliert.

Die Erfindung betrifft ferner Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen und Test-Kits für Immunoassays, die diese Antikörper enthalten.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Mäuse, z. B. Balb/c-Mäuse, auf an sich bekannte aber spezifische Weise immunisiert. Überraschenderweise gelingt die Immunisierung, obwohl Eglin verhältnismäßig kleine Proteinmoleküle sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Lösung von 50 bis 500, bevorzugt 100 µg Eglin B oder C, insbesondere in komplettem und inkomplettem Freund's Adjuvans und in gepufferter Salzlösung, etwa wöchentlich oder auch in größeren Abständen während mehreren Wochen, beispielsweise 5 bis 12 Wochen, subcutan injiziert, bis sich eine genügende Zahl Antikörper-produzierender B-Lymphozyten gebildet hat.

B-Lymphozyten enthaltende Organe, z. B. Milzzellen, der immunisierten Mäuse werden entnommen und mit solchen Myelomazellen fusioniert, die aufgrund einer Mutation in einem selektiven Kulturmedium nicht wachsen. Solche Myelomazellen sind bekannt und sind beispielsweise jene mit der Bezeichnung X63-Ag8, X63-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 oder insbesondere SP2/0. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomazellen der Zelllinie SP2/0 fusioniert.

Die Fusion wird nach an sich bekannten Verfahren durch Mischen der B-Lymphozyten und der Myelomazellen unter Zugabe eines Zellfusionsagens, wie Polyethylenglykol, Sendai-Virus, Calciumchlorid oder Lysolecithin durchgeführt. Vorzugsweise wird in Gegenwart von Polyethylenglykol, beispielsweise mit einem Molekulargewicht von 500, fusioniert. Nach der Fusion werden die entstandenen Hybride nach einem an sich bekannten Verfahren in einem selektiven Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) komplementiert ist, kultiviert. Nicht fusionierte Myelomazellen können in diesem Medium nicht wachsen und sterben ebenso wie normale Lymphozyten.

Die Überstände der Hybridomakulturen können nach an sich bekannten Verfahren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern geprüft werden, beispielsweise mit einem Radio-Immunoassay oder durch Agglutinierung. Dabei wird überraschenderweise festgestellt, daß mit dem beschriebenen Verfahren Hybridomazellen gewonnen werden können, die Antikörper spezifisch gegen Eglin B oder Eglin C ausscheiden. Diese Antikörper reagieren auch mit N^α-Acetyleglin C und B und N^α-Methionyl-eglin C und B. Die Hybridomazellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, werden aus dem aus der Fusionierung hervorgegangenen Gemisch verschiedenster Hybridomazellen durch Klonieren herausselektioniert. Dazu werden nach einem an sich bekannten Verfahren, das „limiting dilution“ genannt wird, Kulturen ausgehend von einer einzigen wachsenden Zelle angesetzt.

Auf diese Weise können die drei Hybridomazelllinien gewonnen werden, die am Institut Pasteur, Paris, Frankreich, unter der Bezeichnung 299S18-20, 299S22-1 und 299S22-10 hinterlegt wurden.

Zur Massenproduktion werden die Hybridomazellklone, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, entweder in an sich bekannten Medien in vitro kultiviert oder zur Vermehrung in Mäuse injiziert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Hybridomazellen in mit Pristan vorbehandelte Mäuse injiziert, Aszitesflüssigkeit entnommen und daraus durch Fällung mit Ammoniumsulfatlösung Antikörper isoliert.

Die mit Hilfe dieser Hybridomazellen gewonnenen monoklonalen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein geeignetes Trägermaterial (suspendiert in einer Pufferlösung) mit einer Antikörperlösung versetzt, ungebundene Anteile werden anschließend ausgewaschen und unbesetzte Stellen des Trägermaterials blockiert.

Die mit Hilfe der Hybridomazellen gewonnenen monoklonalen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Test-Kits verwendet werden. Diese Test-Kits können auf verschiedenen Methoden beruhen, beispielsweise auf Radio-Immunodiffusion, Latex-Agglutinierung, Tüpfel-Tests, Kompetitive oder Sandwich-Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Immuno-Fluoreszenz oder immunochemischen Enzym-Tests, z. B. ELISA oder Tandem ELISA. Solche Kits können neben gewöhnlichen Antikörpern verschiedener Herkunft Antikörper-Konjugate mit Enzymen oder Fluoreszenzträgern enthalten, dazu ein Eglin oder modifiziertes Eglin, z. B. Eglin B, Eglin C oder N^α-Acetyleglin C, markiert mit radioaktiven Isotopen wie J¹²⁵, oder konjugiert mit Enzymen, beispielsweise mit Meerrettich-Peroxidase oder alkalischer Phosphatase, ferner Enzymsubstrate, geeignete Puffer, Gele, Latex, Polystyrol oder andere Füllmaterialien und Träger.

Die serologischen Tests können beispielsweise wie folgt ausgeführt werden:

Neben einem kompetitiven RIA kann ein direkter Bindungstest benutzt werden, um anti-Eglin C Antikörper-Aktivität festzustellen. Zu diesem Zweck wird Eglin C durch Inkubation über Nacht an Mikrotiterplatten-Vertiefungen fixiert (200 ng/Vertiefung), dann mit Hybridoma-Kulturflüssigkeit inkubiert und entweder mit radioaktiv markiertem [¹²⁵J]- (Festphasen RIA) oder mit durch alkalischer Phosphatase markiertem (Festphasen ELISA) Ziegen anti-Maus Ig-Antikörper sichtbar gemacht.

Die ausgewählten drei monoklonalen Antikörper eignen sich für einen nichtradioaktiven Tandem ELISA, mit dessen Hilfe Eglin in Körperflüssigkeiten quantitativ bestimmt werden können.

Die geeigneten Paare an Antikörpern wurden mittels eines kompetitiven RIA wie folgt ausgewählt: Die monoklonalen Antikörper 299S18-20, 299S22-1 und 299S22-10 (200–300 ng/Vertiefung erhalten durch Ammoniumsulfat-Ausfällung aus Ascitesflüssigkeit) und ein polyklonales Kaninchen anti-Eglin C Antikörper (200–300 ng/Vertiefung, erhalten aus Serum) werden in Vertiefungen von Mikrotiterplatten fixiert. Die Inhibierung der Bindung von ¹²⁵J-markiertem Eglin C wurde kreuzweise untersucht.

Die Versuche ergaben, daß sich die monoklonalen Antikörper 299S18-20 und 299S22-10 gegenseitig beim Binden an Eglin C inhibieren, woraus geschlossen wird, daß beide an die gleichen Epitope am Eglin C Molekül binden.

Die monoklonalen Antikörper 299S18-20 und 299S22-1 inhibieren sich gegenseitig nicht. Das bedeutet, sie binden an verschiedene Epitope des Eglin C-Moleküls.

Die relative Bindungskapazität, bestimmt durch die Menge an fixiertem radioaktiv markiertem Eglin C, die von fixierten Antikörpern gebunden wird, ist am größten bei 299S22-10 und am kleinsten bei 299S18-20.

Aufgrund von Tandem ELISA-Experimenten, in denen die monoklonalen Antikörper paarweise getestet wurden, wobei immer ein Antikörper als Festphase auf Mikrotiterplatten fixiert war und der andere als Flüssigphase mit einem Enzym, z. B. alkalischer Phosphatase, markiert war, wurde festgestellt, daß sich die nichtkreuzreaktiven Paare 299S18-20/299S22-1 und 299S22-1/299S22-10 für einen derartigen quantitativen Assay am besten eignen, wobei jeweils der erste der genannten monoklonalen Antikörperpaare, der schwach an Eglin C bindet, als Festphase benutzt werden muß.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, als Festphase, können auch mit einem polyklonalen anti-Eglin C Antikörper, z. B. vom Schaf, als Flüssigphase, zur quantitativen Bestimmung von Eglin C benutzt werden.

Die Empfindlichkeit des Tandem ELISA liegt bei etwa 1–10 ng Eglin C/ml einer Probe.

Pharmazeutische Präparate

Die gemäß der vorliegenden Erfindung erhältlichen bekannten (z. B. Eglin B und Eglin C) und neuen (z. B. N^α-Acetyl-Eglin B und -Eglin C, Methionyl-Eglin C und -Eglin B) Eglins und modifizierten Eglins weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf und können, wie die aus Blutegeln extrahierten Eglins (vgl. DE-OS 2808396), prophylaktisch oder insbesondere therapeutisch angewendet werden.

Die erfindungsgemäßen neuen Eglin-Verbindungen, wie N^α-Acetyl-eglin B und N^α-Acetyl-eglin C, zeichnen sich durch eine sehr starke und spezifische Hemmung von Humanleukozyten-Elastase (HLE), Leukozyten-Cathepsin G (H.Cat. G) und Chymotrypsin aus. In der folgenden Tabelle sind die Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten (k_{ass}) und die Gleichgewichts-Konstanten (K_i) der gebildeten Enzym-Inhibitor-Komplexe für die Reaktionen von N^α-Acetyl-eglin C und zweier natürlich vorkommender Protease-Inhibitoren, α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 PI, früher α_1 -Antitrypsin genannt) und α_2 -Makroglobulin (α_2 M), mit HLE und H.Cat. G zusammengestellt:

Tabelle: Kinetische Parameter für die Wechselwirkung ausgewählter Proteinasen mit den Inhibitoren N^α-Acetyl-eglin C, α_1 PI und α_2 M

Proteine	Inhibitor	$k_{ass} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$	$K_i [M]$
HLE	α_1 PI	$1.5 \cdot 10^7$	irreversibel
	α_2 M	$1.0 \cdot 10^7$	irreversibel
	N ^α -Acetyl-eglin C	$1.4 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^{-11}$
H.Cat. G	α_1 PI	$1.0 \cdot 10^6$	irreversibel
	α_2 M	$3.5 \cdot 10^6$	irreversibel
	N ^α -Acetyl-eglin C	$2.0 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-11}$

Bedingungen: Die Bestimmung der Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten erfolgte nach Bieth et al. (36). Die K_i -Werte für die Wechselwirkung von N^α-Acetyl-eglin C mit HLE und H. Cat. G. wurden aus „steady state“ Reaktionsgeschwindigkeiten unter der Annahme errechnet, daß diese Wechselwirkungen reversibel sind. Alle Werte wurden bei 37°C und pH 7,4 bestimmt.

Die Daten zeigen, daß die Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von N^α-Acetyl-eglin C sowie der natürlichen Inhibitoren α_1 PI und α_2 M mit HLE bzw. H. Cat. G. in der gleichen Größenordnung liegen. Die hohe Stabilität der N^α-Acetyl-eglin-Enzym-Komplexe (K_i -Werte!), die erwiesene, äußerst geringe Toxizität der Eglins, sowie deren Spezifität (signifikante Wechselwirkungen mit anderen Säugetier-Proteinasen, insbesondere mit solchen der Blutgerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplement-Systeme, werden nicht beobachtet), ihre auf Grund der N-terminalen Acetylgruppe erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau durch Aminopeptidasen und die im Vergleich zu den körpereigenen Faktoren α_1 PI und α_2 M leichte Zugänglichkeit größerer Mengen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens empfehlen diese Verbindungen für die pharmakologische Evaluierung bei Krankheitsbildern, die durch von HLE verursachte Gewebeerstörungen charakterisiert sind.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen erweist sich beispielsweise im experimentellen Emphysem-Modell. Eine Stunde vor Emphysem-Induktion durch intratracheale Applikation von 0,3 mg HLE im Hamster wurden 0,5 mg bzw. 2 mg N^α-Acetyl-eglin C (in je 8 Tieren) ebenfalls intratracheal appliziert. Bei nicht geschützten (nicht mit N^α-Acetyl-eglin C vorbehandelten) Tieren zeigten die nach zwei Monaten durchgeführten Lungenfunktionstests und histologischen Untersuchungen schwere Lungenobstruktionen und Emphysema. Im Gegensatz dazu wiesen alle mit N^α-Acetyl-eglin vorbehandelten Tiere normale Lungenfunktionen auf. Die histologische Untersuchung der Lungen ergab lediglich bei zwei der acht Tiere aus der Niedrigdosis-Gruppe (0,5 mg N^α-Acetyl-eglin C) geringfügige, lokale emphysematische Veränderungen; die übrigen Tiere zeigten keine Veränderungen, wodurch die Schutzwirkung des intratracheal applizierten N^α-Acetyl-eglin C und gleichzeitig dessen geringe Toxizität bewiesen sind.

Die erfindungsgemäßen neuen Eglin-Verbindungen, insbesondere die N^α-Acetyl-eglin-Verbindungen, können demgemäß zur Prophylaxe und für die therapeutische Behandlung von Lungenerkrankungen, z. B. durch Leukozyten-Elastase hervorgerufenen Lungenerkrankungen, wie Lungenemphysem und ARDS („acute respiratory distress syndrome“), Mucoviscidose, ferner bei

septischem Schock sowie als Antiphlogistika und Antiinflammatorika verwendet werden. Die Verwendung der erfindungsgemäßen neuen Eglin-Verbindungen und ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze bei der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung der genannten Krankheitsbilder ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, welche wenigstens eine der erfindungsgemäßen Verbindungen oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen, enthalten.

Diese Zusammensetzungen können insbesondere bei den oben angegebenen Indikationen Verwendung finden, wenn sie z. B. parenteral (wie intravenös oder intrapulmonal) oder topisch verabreicht werden. Die Dosierung hängt in erster Linie von der spezifischen Verarbeitungsform und vom Zweck der Therapie bzw. Prophylaxe ab.

Die Verabreichung erfolgt durch intravenöse Injektion oder intrapulmonal, durch Inhalation, z. B. mit einem Bird-Gerät.

Dementsprechend enthalten pharmazeutische Präparate zur parenteralen Verabreichung in Einzeldosis-Form in Abhängigkeit von der Applikationsart pro Dosis etwa 10 bis 50 mg der erfindungsgemäßen Verbindungen. Neben dem Wirkstoff enthalten diese pharmazeutischen Zusammensetzungen üblicherweise noch Natriumchlorid, Mannit oder Sorbit zur Einstellung der Isotonie. Sie können in gefriergetrockneter oder gelöster Form vorliegen, wobei Lösungen mit Vorteil ein antibakteriell wirkendes Konservierungsmittel, z. B. 0,2 bis 0,3% 4-Hydroxybenzoesäure-methylester oder -ethylester, enthalten können.

Ein Präparat für die topische Anwendung kann als wässrige Lösung, Lotion oder Gelee, ölige Lösung oder Suspension, oder fetthaltige oder insbesondere Emulsions-Salbe vorliegen. Ein Präparat in Form einer wässrigen Lösung erhält man beispielsweise dadurch, daß man die erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder ein therapeutisch annehmbares Salz davon in einer wässrigen Pufferlösung von pH 4 bis 7,5 löst und gewünschtenfalls einen weiteren Wirkstoff, z. B. ein Antiinflammatorikum, und/oder ein polymeres Haftmittel, z. B. Polyvinylpyrrolidon, und/oder ein Konservierungsmittel zufügt. Die Konzentration des Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in 10 ml einer Lösung bzw. 10 g eines Gelees.

Eine ölige Applikationsform für die topische Verabreichung erhält man beispielsweise durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder eines therapeutisch annehmbaren Salzes davon in einem Öl, gegebenenfalls unter Zusatz von Quellmitteln, wie Aluminiumstearat, und/oder grenzflächenaktiven Mitteln (Tensiden), deren HLB-Wert („hydrophilic-lipophilic-balance“) unter 10 liegt, wie Fettsäuremonoester mehrwertiger Alkohole, z. B. Glycerinmonostearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonostearat oder Sorbitanmonooleat. Eine fetthaltige Salbe erhält man z. B. durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer streichbaren Fettgrundlage, gegebenenfalls unter Zusatz eines Tensids vom HLB-Wert unter 10. Eine Emulsionssalbe erhält man durch Verreiben einer wässrigen Lösung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer weichen, streichbaren Fettunterlage unter Zusatz eines Tensids, dessen HLB-Wert unter 10 liegt. Alle diese topischen Applikationsformen können auch Konservierungsmittel enthalten. Die Konzentration des Wirkstoffes beträgt etwa 0,1 bis etwa 5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in etwa 10 g der Grundmasse. Inhalationspräparate für die Behandlung der Atemwege durch intrapulmonale Verabreichung sind z. B. Aerosole oder Sprays, welche den pharmakologischen Wirkstoff in Form von Tropfen einer Lösung oder Suspension verteilen können. Präparate, in welchen der pharmakologische Wirkstoff in Lösung vorliegt, enthalten außer diesem ein geeignetes Treibmittel, ferner, falls notwendig, ein zusätzliches Lösungsmittel und/oder einen Stabilisator. Anstelle des Treibgases kann auch Druckluft verwendet werden, wobei diese mittels einer geeigneten Verdichtungs- und Entspannungsvorrichtung nach Bedarf erzeugt werden kann. Besonders geeignet für die Verabreichung sind Bird-Beatmungsgeräte, welche in der Medizin eingeführt und bekannt sind; dabei wird eine Lösung des Wirkstoffs ins Gerät gegeben und mit leichtem Überdruck vernebelt und in die Lunge des beatmeten Patienten gebracht.

Je nach Alter, individuellem Zustand und Art der Erkrankung beträgt bei einem Warmblüter (Mensch oder Tier) von etwa 70 kg Gewicht die Dosierung bei intrapulmonaler Verabreichung etwa 10 bis etwa 30 mg pro Inhalation (ein- bis zweimal täglich) und bei intravenöser Verabreichung, z. B. auch durch Dauerinfusion, bei etwa 10 bis etwa 1000 mg pro Tag.

Therapeutisch wirksame Sputum- und Plasmakonzentrationen, welche mittels immunologischer Verfahren, wie ELISA, bestimmt werden können, liegen zwischen 10 und 100 µg/ml (ca. 1 bis 10 µg/mol/l).

Insbesondere betrifft die Erfindung die in den Beispielen beschriebenen, für ein Eglin oder modifiziertes Eglin kodierenden DNA-Sequenzen, solche DNA-Sequenzen enthaltende Expressionsplasmide, mit solchen Expressionsplasmiden transformierte Mikroorganismen, monoklonale Antikörper gegen Eglin, Hybridoma-Zellen, die solche Antikörper produzieren, und Test-Kits für Immunoassays, die solche Antikörper enthalten, die in den Beispielen beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Herstellung von Eglinen mit Hilfe der transformierten Mikroorganismen, sowie die in den Beispielen genannten neuen Eglin-Verbindungen.

Einige Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, die im nachfolgenden Experimentellen Teil beschrieben sind, werden anhand der begleitenden Zeichnungen veranschaulicht.

In Figur 1 ist die Synthese der Teilstücke F₁(C) und F₂ des Eglin C-Gens schematisch dargestellt.

Figur 2 zeigt die Herstellung des Plasmids pML 87, des Klonierungsvektors für das Teilstück F₁(C) des Eglin C-Gens.

Figur 3 zeigt dementsprechend die Herstellung des Plasmids pML 136, des Klonierungsvektors für das Teilstück F₂ des Eglin C- bzw. Eglin B-Gens.

In Figur 4 ist die Konstruktion des Klonierungsvektors pML 141, welcher die F₁(C)-F₂-DNA enthält, erläutert.

In Figur 5 ist die Herstellung des Vektors pHRi 148, welcher den trp-Promoter enthält, schematisch dargestellt.

Figur 6 zeigt schematisch die Herstellung des Expressionsplasmids pML 147, welches das Eglin C-Gen [F₁(C)-F₂-DNA] unter der Kontrolle des trp-Promoters enthält.

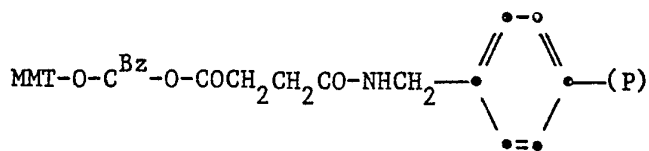
Die folgenden Beispiele dienen zur Illustration der Erfindung und sollen sie in keiner Weise einschränken.

Experimenteller Teil

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben die folgende Bedeutung:

TNE	Lösung, die 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 5 mM EDTA enthält,
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol (1,4-Dimercapto-2,3-butanediol)
BSA	Rinder-Serumalbumin
EtBr	Ethidiumbromid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Monohydrochlorid von Tris

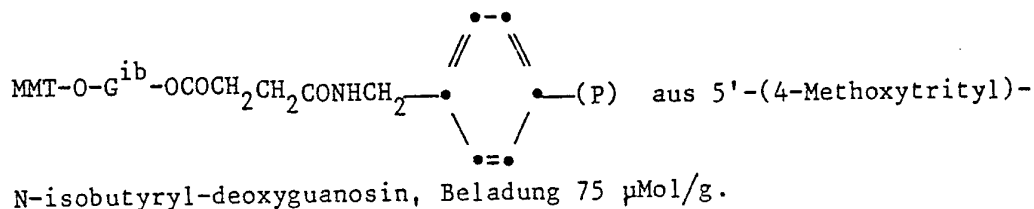
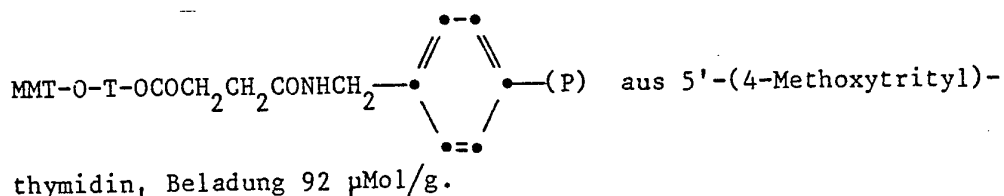
Beispiel 1: Herstellung des geschützten Nucleosid-Polystyrol-Harzes



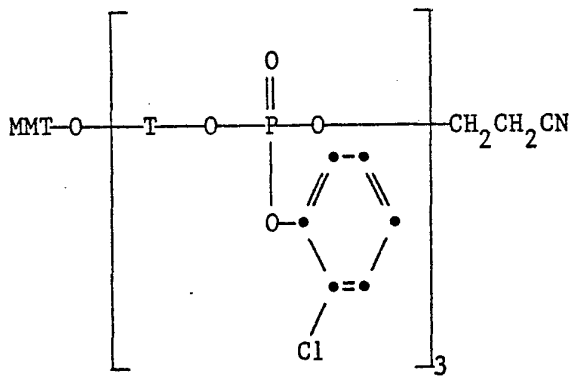
3,1 g (5 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-N-benzoyl-deoxycytidin in 20 ml abs. Pyridin werden mit 750 mg Bernsteinsäureanhydrid und 910 mg 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach Einengen der Pyridin-Lösung wird in 200 ml Essigsäureethylester aufgenommen, zweimal mit je 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10 ml gesättigter Kochsalz-Lösung ausgeschüttelt, nochmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet, eingeengt und Hexan zugetropft. Das ausgefallene Produkt wird abgetrennt und zweimal mit Äther zerrieben, dann in 300 ml Essigsäureethylester gelöst und bei 0°C mit 180 ml 0,1 M Kaliumhydrogensulfat von pH 2,5 ausgeschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wird die Essigesterlösung mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert, mit 0,5 ml Pyridin versetzt, eingeengt und tropfenweise mit Hexan verdünnt. Das ausgefallene Bernsteinsäurederivat wird abfiltriert.

1,17 g dieser Verbindung werden zusammen mit 190 mg N-Hydroxysuccinimid in 4 ml Essigsäureethylester und 2 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0°C mit 370 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank wird der ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäureethylester verdünnt, mit kaltem 0,1 M Natriumhydrogencarbonat und Wasser extrahiert, getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Essigsäureethylester an Kieselgel chromatographiert. DC: R_f 0,58 in Dichlormethan-Methanol (9:1). 88 mg dieses N-Succinimidoyl-bernsteinsäureesters werden mit 1 g Aminomethyl-polystyrol (Amingehalt 110 µMol/g) in 2 ml Dichlormethan und 4 ml Dimethylformamid 20 Stunden gerührt. Das Polymer-Harz wird abfiltriert und mit Dimethylformamid, Methanol, Dichlormethan und Methanol ausgewaschen. Nach dem Trocknen werden die nicht umgesetzten Aminogruppen acetyliert, indem das Harz in 6 ml Pyridin mit 1 ml Essigsäureanhydrid und 100 mg 4-Dimethylaminopyridin 30 min. gerührt wird. Das Polymer-Harz wird mit Dichlormethan, Dimethylformamid, Methanol und Dichlormethan ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die spektroskopische Methoxytrityl (MMT)-Bestimmung ergibt eine Beladung von 85 µMol/g.

Beispiel 2: Analog Beispiel 1 werden folgende geschützte Nucleosid-Polystyrol-Harze hergestellt:



Beispiel 3: Synthese des Trinukleotids



a) Synthese des Dinukleotids:

7,73 g (15 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-thymidin (MMT-O-T-OH) werden zweimal mit abs. Pyridin eingedampft. Der Rückstand wird in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zu 80 ml einer 0,2 M Lösung von 2-Chlorphenyl-di-(1-benzotriazolyl)-phosphat in Tetrahydrofuran unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß getropft und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung des 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphats wird in drei Teile geteilt.

α) Hydrolyse zu Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat:

Zu einem Drittel der obigen Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat werden unter Kühlung 100 ml 0,5 M Triethylammoniumbicarbonat gegeben. Nach 15 min. wird mit Dichlormethan-Lösung extrahiert. Die Dichlormethan-Lösung wird mit Wasser gewaschen, eingengt und tropfenweise mit Petrolether versetzt. Die erhaltene Fällung wird abgutscht, mit Ether-Petrolether 1:1 ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. DC: R_f 0,35 in Dichlormethan-Methanol-Wasser (75:22:3).

β) Veresterung zu 2-Cyanoethyl-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat und Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe:

Zu einem Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-phosphat werden 1,3 ml 2-Cyanoethanol und 2 ml Pyridin gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Essigsäureethylester gelöst und mehrmals mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet, eingengt und in Hexan eingetropft. Der Niederschlag wird abfiltriert, in 50 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und bei 0°C mit einer Lösung von 3,8 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 75 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und mit einer kalten Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird eingengt und mit Hexan versetzt. Das ausgefallene 2-Cyanoethyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat wird an Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol 96:4 chromatographiert. DC: R_f von 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

γ) Kondensation zum 5'-(4-Methoxytrityl)-3'-cyanoethyl-bis-thymidin-dinukleotid:

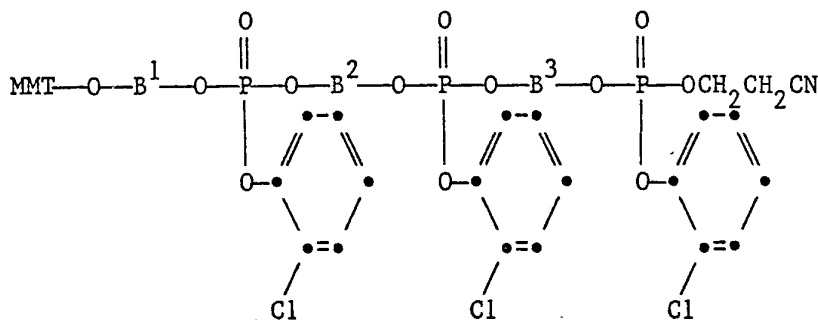
2,2 g 2-Cyanoethyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat werden zweimal durch Eindampfen mit abs. Pyridin entwässert, in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zum restlichen Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat gegeben. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur werden zur Reaktionslösung unter Eiskühlung 10 ml Wasser und 200 ml Essigsäureethylester zugegeben. Die organische Phase wird mehrmals mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und auf ein kleines Volumen eingengt. Das im Phosphat-Teil und am 5'- bzw. 3'-Ende geschützte Dinukleotid wird durch Eintropfen in Ether-Hexan 1:1 gefällt. DC: R_f 0,48 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

b) Synthese des Trinukleotids:

1,17 g (1 mMol) des oben beschriebenen vollgeschützten Dinukleotids werden in 30 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,9 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 20 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird eiskalte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, eingengt und in Hexan eingetropft. Das ausgefallene rohe Dinukleotid mit freier 5'-Hydroxygruppe wird an Kieselgel mit einem Gradienten von 2-8% Methanol in Dichlormethan chromatographiert. DC: R_f 0,33 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

850 mg dieses 5'-Hydroxy-dinukleotids und 1,06 g Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat [vgl. Abschnitt a) α)] werden zweimal mit Pyridin eingedampft, dann in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 560 mg Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid (MSNT) versetzt. Nach 2 Stunden werden 2 ml eiskaltes Wasser zugegeben und nach einer weiteren Stunde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet, eingengt und mit Ether versetzt. Das ausgefallene Trinukleotid wird durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. R_f 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

Beispiel 4: Analog Beispiel 3 werden folgende geschützte Trinukleotide der allgemeinen Formel



abgekürzt $B^1B^2B^3$, hergestellt. Für die Nukleoside B^1 , B^2 , B^3 werden folgende Abkürzungen verwendet:

A = N-Benzoyl-deoxyadenosin

C = N-Benzoyl-deoxycytidin

G = N-Isobutyl-deoxyguanosin

T = Thymidin

Verbindung	$R_f^{a)}$	Verbindung	$R_f^{a)}$
TTT	0,45	ATG	0,48
TTC	0,55	ACT	0,53
TCT	0,46	ACC	0,48
TAC	0,56	AAT	0,49
TAA	0,53	AAC	0,46
TAG	0,60	AAA	0,51
TGT	0,42	AGT	0,45
TGG	0,43	AGA	0,49
CTG	0,46	GTT	0,45
CCT	0,45	GCT	0,55
CCG	0,47	GCA	0,49
CAT	0,55	GCG	0,48
CAA	0,52	GAT	0,44
CAG	0,44	GAC	0,48
CGT	0,49	GAA	0,50
GGA	0,44	GGT	0,46

a) Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel in Dichlormethan–Methanol 9:1.

Beispiel 5: Synthese des DNA-Fragments einer Länge von 61 Basen von Base Nr. 172 bis Base Nr. 232 des komplementären DNA-Stranges (172/61 Komplementär)

a) **Abspaltung der 2-Cyanethylschutzgruppe der Trinukleotide:**

15 μ Mol der Trinukleotide aus Beispiel 3 und 4 werden unter Feuchtigkeitsausschluß in 60 μ l Pyridin–Acetonitril–Triethylamin 1:1:1 gelöst. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur werden 0,7 ml peroxidfreier Ether zugetropft und der Niederschlag abzentrifugiert. Das rohe Triethylammoniumsalz wird in 50 μ l Pyridin gelöst und nochmals mit 0,5 ml Ether ausgefällt, abzentrifugiert und 15 Stunden am Hochvakuum getrocknet.

b) **Kupplung der teilgeschützten Trinukleotide mit der an Polystyrol-Harz gebundenen Oligonukleotidkette:**

Alle Operationen werden unter Feuchtigkeitsausschluß in einem Reaktionsgefäß mit 280 μ l Inhalt und mikroprozessorgesteuerter Lösungsmittel- und Reagens-Zugabe durchgeführt. 17,6 mg (1,5 μ Mol) des Cytidin–Polystyrol-Harzes (Beispiel 1) werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und folgenden Operationen unterworfen:

1. Methylchlorid, 2 ml/min., 5 min.
2. Methylchlorid–Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2 min.
3. Zinkbromid 1 M und 1,2,4-Triazol 0,02 M in Methylchlorid–Isopropanol (7:3), 1 ml/min., 2–3,5 min.
4. Methylchlorid–Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 3 min.
5. Triethylammoniumacetat 0,5 M in DMF, 2 ml/min., 10 min.
6. Molekularsieb-getrocknetes Pyridin, 2 ml/min., 5 min.
7. Tetrahydrofuran (Peroxid-frei, Molekularsieb-getrocknet), 2 ml/min., 5 min.
8. Stickstoffstrom, 10 min.
9. Injektion 15 μ Mol Trinukleotid AAA (Trimethylammoniumsalz aus Abschnitt a)) und 13,3 mg (45 μ Mol) Mesitylsulfonyl–3-nitro–1,2,4-triazolid (MSNT) gelöst in 160 μ l Pyridin
10. 40°C, 30 min.
11. Pyridin, 2 ml/min., 5 min.
12. Acetanhydrid 5% und 4-Dimethylaminopyridin 2,5% in Pyridin, 2 ml/min., 5 min.
13. Pyridin, 2 ml/min., 5 min.
14. Pyridin–Isopropanol (1:1), 2 ml/min., 3 min.

Alle 14 Operationen werden 19mal wiederholt, wobei bei der 9. Operation, anstelle von AAA jeweils folgende Trinukleotide in Form ihrer Triethylammoniumsalze (Abschnitt a)) eingesetzt werden: AGA, TGT, GGT, CTG, TAC, TAG, CGT, CAA, TAA, GGT, CAT, GAA, GCG, CAT, CAA, AAC, CCT, GAT, CAG. Die mittlere Kupplungsausbeute beträgt 96%. Das Endprodukt hat folgende Struktur:

MMT–CAGGATCCTAACCAACCATGCGGAACATGGTTAACAACGTTAGTACCTGGGTTGTAGAAAAC–Polystyrol

c) Abspaltung des DNA-Fragments vom Träger und Abspaltung der Schutzgruppen:

40,2 mg (ca. 0,66 μ Mol) DNA-Syntheseharz/172/61 komplementär werden mit 66 mg (0,40 mMol) o-Nitrobenzaldoxim und 50 μ l (0,40 mMol) 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in 400 μ l 95%igem Pyridin während 3 Stunden bei 50°C und während 12 Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Nach dem Abblasen des Pyridins mit Stickstoff wird der Rückstand mit 1,6 ml wäßrigem Ammoniak (33%) versetzt und im geschlossenen Gefäß während 24 Stunden bei 50°C gehalten.

Die abgetrennte flüssige Phase wird im Vakuum vom Ammoniak befreit und 3mal mit je 3 ml peroxidfreiem Diethylether gewaschen. Nach dem Abtrennen der niedermolekularen Bestandteile an einer Biogel P6 Säule (100–200 mesh, 3 $\times$ 66 cm, 0,01 Molar Thrimethylammoniumhydrogencarbonat pH 7,5, 1,5 ml/min.) werden 285 ODs (260 nm) DNA isoliert.

Insgesamt 60 ODs werden an einer HPLC-Säule aufgetrennt (PRP-1/Hamilton, 250 $\times$ 4,6 mm). Gradient (Lösung A: 0,05 M Triethylammoniumacetat pH 7,0; Lösung B: Lösung A: Acetonitril 1:1): 30% B in A $\rightarrow$ 60% B in A in 20 min. bei 50°C in 2 ml/min.

Der lipophile Hauptpeak C Retentionszeit ca. 14 min.) wird gesammelt, an einer DE52-Cellulose (Whatman) Säule aufkonzentriert, eluiert und mit Ethanol gefällt. Zur Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe wird der Niederschlag in 50 μ l Essigsäure/H₂O (4:1) gelöst und 45 min. bei Raumtemperatur gehalten. Das Reaktionsprodukt wird lyophilisiert, mit Ethanol gefällt und zur Reinigung auf einem 8% Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt. Die der erwarteten DNA-Größe entsprechende Bande wird ausgeschnitten und das Produkt elektroeluiert, an DE52-Cellulose aufkonzentriert und die DNA der Struktur

5'-CAGGATCCTAACCAACATGCGGAACATGGTTAAACAACGTTAGTACCTGGGTTGTAGAAAAC-3' mit Ethanol gefällt.

Beispiel 6: Analog Beispiel 5 werden folgende DNA-Fragmente (5'-3') hergestellt:

1/40

CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTT

30/37 komplementär

AACAGTTTTACCAACAACCTTCTGGGAAAGATTTTCAGT

67/34

GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACC

91/37 komplementär (C)

CCGGCAGGAAGTAAACGTCGTACTGCGGGTAATGCAG

91/37 komplementär (B)

CCGGCAGGAAATGAACGTCGTACTGCGGGTAATGCAG

124/61

CCGGAAGGTTCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCGTGTTTTCTACAACC

Ferner werden die folgenden verkürzten Fragmente hergestellt:

1/40 (Δ 12) (C')

CTGGAATTCATGTCTGAACTGAAATCTT

und 1/40 (Δ 18) (C'')

CTGGAATTCATGCTGAAATCTT

Beispiel 7: Phosphorylierung der Fragmente 30/37, 67/34, 124/61 und 172/61

Die Phosphorylierung und die radioaktive Markierung an den 5'-Enden erfolgt mit [γ -³²P]ATP und T₄ Polynukleotid-Kinase (Boehringer) wie beschrieben (19).

Beispiel 8: Polymerisation zu Duplex III (Teilstück F₂ des Eglin C und Eglin B-Gens)

Je 50 pMol Fragment 124/61/kinasiert und Fragment 172/61/kinasiert werden in 24 μ l Wasser gelöst, die Lösung während 3 min. auf 90°C erwärmt und innerhalb von 5 min. auf 12°C abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l Endo-R Puffer (0,1 Molar Tris-HCl pH 7,5, 66 mM MgCl₂, 66 mM β -Mercaptoethanol, 0,6 M NaCl), 10 μ l Deoxynucleosidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, TTP, je 2 $\cdot$ 10⁻³ Molar, mit NH₃ auf pH 7,0 eingestellt) und 2 μ l (10 Einheiten) DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer) wird während 30 min. bei 12°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 3minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt und das Gemisch bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

In analoger Weise werden die Fragmente 1/40 und 30/37, 67/34 und 91/37 (C) bzw. 67/34 und 91/37 (B) zu den Duplexen I, II (C) bzw. II (B) polymerisiert.

Die Duplexe I-III haben die folgenden Strukturen:

Duplex I

CTGGAATTCATGACTGAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAAGTTGTTGGTAAACTGTT
GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

Duplex II (C)

GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCTGCGCG
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAGTAAAGGACGGCC

Duplex II (B)

GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCTGCGCG
CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAGTAAAGGACGGCC

Duplex III (Teilstück F₂ des Eglin C- und Eglin B-Gens)

CCGGAAGGTTCTCCTGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCGTGTTTTCTACAACCCAGGTAC
GGCCTTCCAAGAGGACAATGAGACCTGGACGCAATGTTGGCACAAGCACAAAAGATGTTGGGTCCATG
TAACGTTGTTAACCATGTTCCGCATGTTGGTTAGGATCCTG
ATTGCAACAATTGGTACAAGGCGTACAACCAATCCTAGGAC

In gleicher Weise werden die Fragmente 1/40 (Δ 12) (C') und 30/37 sowie die Fragmente 1/40 (Δ 18) (C'') und 30/37 zu den Duplexen I (C') und I (C'') polymerisiert.

Die Duplexe I (C') und I (C'') haben die folgenden Strukturen:

Duplex I (C')
 CTGGAATTCATGCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 Duplex I (C'')
 CTGGAATTCATGCTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA

Beispiel 9: Ligation von Duplex I mit Duplex II (C), Herstellung des Teilstücks F₁ (C) des Eglin C-Gens

Je 60 pMol Duplex I und Duplex II (vgl. Beispiel 8; nur an den A und G 5'-Enden kinasiert) werden in 54 µl Ligase-Puffer (66 mM Tris-HCl pH 7,5, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 5 mM ATP) gelöst, mit 6 µl (= 6 Einheiten) T₄-DNA-Ligase (Boehringer) versetzt und während 21 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 5minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Ethanolfällung isoliert.

Nach Auftrennung des Gemisches aus einem 8% Polyacrylamidgel (nativ) durch Elektrophorese werden die Ligationsprodukte mit 122–132 Basenpaaren elektroeluiert, an einer DE52–Cellulose-Säule aufkonzentriert und nach Elution durch Ethanolfällung isoliert.

Das Teilstück F₁ (C) des Eglin C-Gens hat die folgende Struktur:

CTGGAATTCATGACTGAAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAATGAAGGACGGCC

In analoger Weise werden je 60 pMol Duplex I (C') bzw. I (C'') und Duplex II zu den Teilstücken F₁ (C') bzw. F₁ (C'') des verkürzten Eglin C-Gens verknüpft.

Die Teilstücke F₁ (C') und F₁ (C'') haben die folgenden Strukturen:

CTGGAATTCATGCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACAGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAATGAAGGACGGCC
 F₁ (C')

CTGGAATTCATGCTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAATGAAGGACGGCC
 F₁ (C'')

Beispiel 10/ Ligation von Duplex I mit Duplex II (B), Herstellung des Teilstücks F₁ (B) des Eglin B-Gens

In analoger Weise, wie in Beispiel 9 beschrieben, werden je 60 pMol Duplex I und Duplex II (B) miteinander ligiert.

Das Teilstück F₁ (B) des Eglin (B)-Gens hat die folgende Struktur:

CTGGAATTCATGACTGAAATTTGGTTCTGAACTGAAATCTTTCCAGAAGTTGTTGGTAAAACTGTT
 GACCTTAAGTACTGACTTAAACCAAGACTTGACTTTAGAAAGGGTCTTCAACAACCATTTTGACAA
 GACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCATTACCCGCAGTACGACGTTTACTTCCTGCCGG
 CTGGTCCGAGCACTTATGAAGTGAGACGTAATGGGCGTCATGCTGCAAGTAAAGGACGGCC

Beispiel 11: Herstellung des Plasmids pML 87, enthaltend die F₁ (C)–DNA des Eglin C-Gens (Fig. 2)

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/Ball.

30 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit 5 Einheiten Ball Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 200 ml einer Lösung aus 100 µg/ml Gelatine für 5 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend wird diese Lösung auf 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl eingestellt und die DNA mit 30 Einheiten EcoRI–Restriktionsendonuclease (Biolabs) für 2 Stunden bei 37°C verdaut. Dann wird die Lösung auf TNE eingestellt, mit 1 Volumen Phenol und Chloroform extrahiert und die verdaute DNA mit 2 Volumen Alkohol bei –20°C über Nacht ausgefällt.

Der aus der pBR322 DNA herausgeschnittene Vektor (pBR322/EcoRI/Ball, 2916 Basenpaare) wird durch Dichtegradientenzentrifugation in Sucrose (5–23%) in 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 1 mM EDTA vom kleinen DNA-Fragment (1445 Basenpaare) abgetrennt. Die Zentrifugation wird bei 36000 upm in einem TST 41 Rotor (Kontron AG) für 16 Stunden bei 15°C durchgeführt. Anschließend werden von der zentrifugierten Lösung Fraktionen à 0,2 ml mit einem ISCO Gradienten-Sammler gewonnen. Diejenigen Fraktionen, welche das große DNA-Fragment (2916 Basenpaare) enthalten, werden vereinigt und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wird in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA gelöst und bis zu seiner Verwendung als Klonier-Vektor bei –20°C aufgehoben. 5,1 µg (= 10,5 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F₁ (C)–DNA/EcoR:

16 ng (= 0,84 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F₁ (C)–DNA (siehe Beispiel 9) werden mit 5 Einheiten EcoRI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 50 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Danach werden der Lösung 0,5 µg (= 1 pMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/Ball (Beispiel 11 a) zugesetzt. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C nach 10 min inaktiviert, die Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit Alkohol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wird unter Alkohol bei –20°C zur Weiterverarbeitung gelagert.

c) Ligierung der pBR322/EcoRI/Ball Vektor-DNA mit der F₁ (C)–DNA/EcoRI und Konstruktion des Plasmids pML 87.

Der in Beispiel 11 b) erhaltene DNA-Niederschlag, welcher die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 30 µl einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 25 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15°C für 16 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML 87, welches die F₁ (C)–DNA enthält.

d) Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Plasmid pML87

Die für die Transformation notwendigen mit Calcium vorbehandelten *E. coli* HB101 Zellen werden, wie von Mandel et. al. (6) beschrieben, hergestellt.

Die unter c) erhaltene Lösung, welche das rekombinierte Plasmid pML 87 enthält, wird für 10 min auf 65°C erhitzt, um die T₄-DNA Ligase zu inaktivieren und anschließend auf 37°C abgekühlt. 10 µl dieses Reaktionsgemisches werden zu 150 µl Calcium-behandelten *E. coli* HB101-Zellen in 10 mM MgCl₂ und 10 mM Tris · HCl (pH 7.5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl gegeben. Danach wird diese Mischung für 30 min in Eis gekühlt, 2 min auf 42°C erwärmt und dann 50 min in 1 ml L-Medium (vgl. Beispiel 21) bei 37°C stehen lassen. Darauf wird die Mischung in Aliquoten à 0,2 ml auf 5 Agarplatten (McConkey-Agar, Difco), welche 60 µg/ml Ampicillin (Serva) enthalten, ausgestrichen. Die Agarplatten werden hernach bei 37°C 16–18 Stunden gehalten. 470 Ampicillin-resistente Kolonien des transformierten *E. coli* HB 101 werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₁ (C)-DNA enthalten

470 transformierte Kolonien (Beispiel 11 d) werden auf Nitrozellulosefilter B85 (Schleicher und Schüll) abgedrückt. Nach Grunstein und Hogness (24) werden die Kolonien lysiert und ihre denaturierte DNA auf dem Filter fixiert. Anschließend erfolgt eine Vorhybridisierung der Filter in 20 ml (pro Filter) 4 × SET [= Lösung von 30 mM Tris · HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA], 0,1 % (g/v) Ficoll 400 (Pharmacia), 0,5 % SDS, 50 µg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA für 4 Stunden bei 64°C. Danach werden die Nitrozellulosefilter in 20 ml (pro Filter) 5 × SET (g/v) Ficoll 400, 0,2 % SDS und 50 µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA für 16 Stunden bei 64°C mit der ³²P-radioaktiv markierten Probe (ca. 10³–10⁴ Cerenkov cpm pro Filter) behandelt. Als Probe wird das Oligonucleotid 91/37 komplementär (C) (vgl. Beispiel 6) verwendet.

Anschließend werden die Filter in 2 × SET, 0,2 % SDS bei Raumtemperatur zweimal gewaschen, danach zweimal in 2 × Set, 0,5 % SDS bei 60°C (zuerst 30 min, dann 60 min lang). Dann werden die Filter zwischen 3 MM Papier (Whatman) getrocknet und bei –80°C auf ein Röntgen-Film (Fuji) mit einer Verstärkerfolie (Intensifying screen, Ilford) für 1–2 Tage gelegt.

Das erhaltene Autoradiogramm zeigt 71 positive Kolonien (Klone), die zur Weiterarbeit verwendet werden können, eine davon erhält die Bezeichnung pML87.

In analoger Weise wird die chemisch synthetisierte F₁ (C')-DNA bzw. F₁(C'')-DNA (vgl. Beispiel 9) mit EcoRI verdaut und mit dem linearisierten Vektor pBR322/EcoRI/BamHI ligiert, wobei das Plasmid pML87 (C'), enthaltend die F₁ (C)-DNA, bzw. das Plasmid pML87 (C''), enthaltend die F₁ (C'')-DNA, entsteht. *E. coli* HB101-Zellen werden mit dem Plasmid pML87 (C') bzw. pML87 (C'') transformiert und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten kultiviert. 95 bzw. 120 Ampicillinresistente Kolonien werden erhalten. Das Screening der transformierten Kolonien mit dem Oligonucleotid 91/37 komplementär (C) führt zur Identifizierung von 37 Kolonien, die F₁ (C')-DNA enthalten, bzw. von 58 Kolonien, die F₁ (C'')-DNA enthalten.

Beispiel 12: Herstellung des Plasmids pML90, enthaltend die F₁(B)-DNA des Eglin B-Gens

In analoger Weise, wie in Beispiel 11 b) beschrieben, werden 16 µg der chemisch synthetisierten F₁ (B)-DNA mit 5 Einheiten EcoRI-Restriktionsendonuclease verdaut und mit dem linearisierten Vektor pBR322/EcoRI/BamHI gemischt. Das Enzym wird inaktiviert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird gemäß Beispiel 11 c) mit T₄ DNA-Ligase behandelt, wobei ein Plasmid entsteht, welches die F₁(B)-DNA enthält.

Die rekombinierte Plasmide enthaltende Lösung wird entsprechend Beispiel 11 d) zur Transformation von Calcium-behandelten *E. coli* HB101-Zellen verwendet. 310 Ampicillin-resistente Kolonien des transformierten *E. coli* HB101 werden erhalten.

Die 310 Kolonien werden, in Analogie zu Beispiel 11 e), auf das Vorhandensein von F₁ (B)-DNA geprüft, wobei als Probe das Oligonucleotid 91/37 komplementär (B) verwendet wird. Im erhaltenen Autoradiogramm sind 55 positive, zur Weiterarbeit verwendbare Klone erkennbar. Einer davon erhielt die Bezeichnung pML90.

Beispiel 13: Herstellung des Plasmids pML136, welches die F₂-DNA enthält (Fig. 3)

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/NruI

15 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit 30 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease 30 min bei 37°C in einer Lösung von 100 mM NaCl, 6 mM Tris · HCl (pH 7,9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine verdaut.

Anschließend werden der Lösung 15 Einheiten NruI Restriktionsendonuclease zugefügt und 2 Stunden bei 37°C verdaut. Das Reaktionsgemisch wird für 10 min auf 70°C erwärmt, um die Enzyme zu inaktivieren. Danach werden die beiden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrigschmelzender Agarose in Tris-Acetat EDTA Puffer pH 8 voneinander getrennt. Nach Anfärben der DNA im Agarosegel mit EtBr wird die Stelle des Gels, welche die DNA-Bande des pBR322/BamHI/NruI Vektors (= 3766 Basenpaare) enthält, aus dem Gel ausgeschnitten und bei 65°C 10 min verflüssigt. Anschließend werden zu dem verflüssigten Agarosegelstück 2 Volumen 100 mM Tris · HCl (pH 8,7) gegeben und die Mischung auf 37°C abgekühlt. Diese DNA-Mischung wird mit 0,5 Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer) für 30 min bei 37°C verdaut. Durch Erhitzen der Lösung auf 65°C für 60 min wird das Enzym inaktiviert.

Zu dieser phosphatasebehandelten DNA-Lösung werden 20 Volumina TNE hinzugefügt und die DNA nach Mueller et al. (23) durch DE-52 Chromatographie gereinigt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA bei –20°C über Nacht mit Alkohol ausgefällt. Der DNA-Niederschlag wird in 50 µl 0,01 M Tris · HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA gelöst und bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt. 1,5 µg (= 2,4 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F₂-DNA/BamHI

1,6 µg (= 90 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F₂-DNA (Beispiel 8) werden mit 16 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 20 µl 150 mM NaCl, 6 mM Tris · HCl (pH 7,9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend werden der Lösung 60 ng (= 96 nMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/NruI (Beispiel 13a) zugesetzt, die ganze Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wird bis zur Weiterverarbeitung unter Alkohol bei –20°C gelagert.

c) Ligierung der pBR322/BamHI/NruI Vektor-DNA mit der F₂-DNA/BamHI und Konstruktion des Plasmids pML136

Der unter Beispiel 13b) erhaltene DNA-Niederschlag, der die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris · HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 15 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML136, welches die F₂-DNA enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML136

Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 11 d) beschrieben. Es werden 10 µl des in Beispiel 13 c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 65 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₂-DNA enthalten

65 transformierte Kolonien (Beispiel 13 d) werden auf F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 11 e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird das Oligonucleotid 172/61 komplementär (vgl. Beispiel 5) verwendet. Im Autoradiogramm werden 2 positive Kolonien erhalten, eine davon erhält die Bezeichnung pML136.

Beispiel 14: Charakterisierung der Klone pML87, pML90 und pML136

Die DNAs der rekombinierten Plasmide pML87, pML90 und pML136 werden nach Ish-Horowitz isoliert (25). Die Nucleotidsequenzen des F₁(C)-DNA-, F₁(B)-DNA- und F₂-DNA-Inserts werden nach Maxam und Gilbert bestimmt (3). Zu diesem Zweck werden je 10 µg Plasmid-DNA von pML87 und pML90 mit EcoRI-Restriktionsendonuclease und 10 µg Plasmid-DNA von pML136 mit BamHI-Restriktionsendonuclease gespalten und die linearisierten DNAs durch Gelelektion aus Agarosegel isoliert [vgl. Beispiele 11 a) bzw. 13 a)]. Anschließend werden die isolierten DNAs mit alkalischer Phosphatase verdaut und über DE-52 chromatographiert (vgl. Beispiel 13 a). Danach werden die DNAs am 5'-Ende mit [γ -³²P]ATP (spezifische Aktivität > 5000 Ci/mmol, Amersham) und T₄-Polynucleotid-Kinase (P-L-Biochemicals) radioaktiv markiert.

Die radioaktiv markierten DNAs werden dann mit einer zweiten Restriktionsendonuclease (PvuII) gespalten. Die entstandenen DNA-Fragmente werden durch Gelelektion aus Agarose isoliert. Im Falle von pML87 und pML90 wird dann vom PvuII-EcoRI* Fragment (ca. 2190 Basenpaare) die Nucleotidsequenz der F₁ (C)- bzw. F₁ (B)-DNA, im Fall vom pML136 die der F₂-DNA im PvuII-BamHI*-Fragment (ca. 1815 Basenpaare) bestimmt. (* gibt das DNA-Ende an, das radioaktiv markiert ist).

Die Nucleotidsequenzen, welche für die F₁ (C)-DNA, F₁ (B)-DNA und F₂-DNA bestimmt werden, sind identisch mit den in den Beispielen 8–10 dargestellten.

Beispiel 15: Herstellung des Plasmids pML141, enthaltend die F₁ (C)-F₂-DNA (Fig. 4)

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/BamHI

10 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit je 10 Einheiten EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 100 µl einer Lösung von 50 mM Tris · HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37°C verdaut.

Anschließend wird diese Lösung auf TNE eingestellt, mit 1 Volumen Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol bei –20°C über Nacht ausgefällt.

Der aus der pBR322-DNA herausgeschnittene Vektor (pBR322/EcoRI/BamHI, 3986 Basenpaare) wird durch Dichtegradientenzentrifugation in Sucrose (5–23%) in 50 mM Tris · HCl (pH 8) und 1 mM EDTA vom kleineren DNA-Fragment (376 Basenpaare) abgetrennt. Die Zentrifugation wird bei 30000 upm in einem TST 41 Rotor (Kontron AG) für 15 Stunden bei 15°C durchgeführt. Anschließend werden von der zentrifugierten Lösung Fraktionen à 0,2 ml mit einem ISCO Gradientensammler gewonnen. Diejenigen Fraktionen, die das große DNA-Bruchstück (3986 Basenpaare) enthalten werden vereinigt und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wird in 100 µl 50 mM Tris · HCl (pH 8) mit 0,3 Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer) für 30 min bei 37°C verdaut. Durch Erhitzen der Lösung auf 65°C für 1 Stunde wird das Enzym inaktiviert. Anschließend wird die Lösung mit Phenol/CHCl₃ extrahiert und die DNA über Nacht bei –20°C mit Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wird in 50 µl 10 mM Tris · HCl (pH 8—, 0,1 mM EDTA gelöst und bis zu seiner Verwendung als Klonier-Vektor bei –20°C aufbewahrt. 3,75 µg DNA (= 5,7 pMol Enden) wurden erhalten.

b) Herstellung der F₁ (C)-DNA/EcoRI/HpaII und der F₂-DNA/BamHI/HpaII

I. Herstellung der F₁ (C)-DNA/EcoRI/HpaII

10 µg Plasmid DNA vom pML87 werden zuerst mit 20 Einheiten HpaII Restriktionsendonuclease in 100 µl einer Lösung von 10 mM Tris · HCl (pH 7,4), 6 mM KCl, 10 mM MgCl₂, mM DTT und 100 µg/ml Gelatine verdaut. Es folgt eine Phenol/Chloroform Extraktion der Lösung und Ausfällung der entstandenen DNA-Fragmente mit Alkohol bei –20°C.

Das DNA-Fragmentgemisch wird anschließend durch Elektrophorese an einem 6% Polyacrylamidgel in Tris-acetat-EDTA Puffer pH 8 aufgetrennt. Das größte DNA-Fragment (= 586 Basenpaare) wird durch Gelelektion isoliert und anschließend mit EcoRI-Restriktionsendonuclease gespalten (vgl. Beispiel 11 a). Das entstandene DNA-Fragmentgemisch wird abermals einer Elektrophorese an 8% Polyacrylamid unterworfen. Daraus werden 40 ng von F₁(C)-DNA/EcoRI/HpaII (127 Basenpaare) isoliert.

II) Herstellung der F₂-DNA/BamHI/HpaII

20 µg Plasmid DNA vom pML136 werden mit 20 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease gespalten. Ein Aliquot (1 µg) dieser linearisierte Plasmid DNA/BamHI wird durch Gelelektion aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Beispiel 13 a) und mit [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert (vgl. Beispiel 14). Die Hauptmenge der Plasmid DNA/BamHI wird dann mit dieser radioaktiv markierten DNA vermischt, mit PvuII Restriktionsendonuclease verdaut und das PvuII-BamHI* DNA Fragment (1203 Basenpaare) nach Gelelektrophorese an 1% Agarose isoliert. 14 µg des PvuII-BamHI* Fragments werden mit HpaII Restriktionsendonuclease verdaut (siehe oben), anschließend das DNA-Gemisch durch 8% Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und 150 ng der F₂-DNA/BamHI*/HpaII (109 Basenpaare) durch Gelelektion isoliert.

c) Ligation der F₁ (C)-DNA mit der F₂-DNA und Konstruktion des Plasmids pML141

10 ng (= 473 nMol Enden) F₁(C)-DNA/EcoRI/HpaII und 9 ng (= 495 nMol Enden) F₂-DNA/BamHI/HpaII werden in einem Volumen von 20 µl mit T₄-DNA Ligase, wie bereits unter Beispiel 13 c) beschrieben, behandelt. Anschließend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird dann wie in Beispiel 13 a) beschrieben gelöst und mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease verdaut. Die Lösung wird dann auf TNE eingestellt und 30 ng (= 50 nMol Enden) der Vektor-DNA pBR322/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 15 a) zugegeben. Anschließend wird die Lösung abermals mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Die präzipitierte DNA-Mischung wird wie in Beispiel 13 c) angegeben mit T₄-DNA Ligase (Biolabs) behandelt. Auf diese Weise entstehen in der Lösung rekombinierte Plasmide, welche die F₁ (C)-F₂-DNA (Eglin C-Gen) als Insert enthalten.

d) Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Plasmid pML141

Die Transformation der mit Calcium behandelten *E. coli* HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 11 d) beschrieben. Es werden 10 µl des in Beispiel 15 c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 2586 Ampicillinresistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₁ (C)-F₂-DNA enthalten

18 transformierte Kolonien (Beispiel 15 d) werden auf ihren F₁ (C)-F₂-DNA-Gehalt geprüft, wie in Beispiel 11 e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligonucleotide verwendet. Im Autoradiogramm werden 13 positive Kolonien erhalten, vier davon erhalten die Bezeichnung pML141, pML143, pML144, pML145.

In analoger Weise wird das Plasmid pML87 (C') bzw. pML87 (C'') mit den Restriktionsendonucleasen HpaII und EcoRI gespalten, die entstandene F₁ (C')-DNA/EcoRI/HpaII bzw. F₁ (C'')-DNA/EcoRI/HpaII mit der F₂-DNA/BamHI/HpaII ligiert und die entstandene F₁ (C')-F₂-DNA/EcoRI/BamHI bzw. F₁ (C'')-F₂-DNA/EcoRI/BamHI mit dem linearisierten Vektor pBR322/EcoRI/BamHI ligiert. Die erhaltenen Plasmide, welche die F₁ (C')-F₂-DNA bzw. die F₁ (C'')-F₂-DNA enthalten, werden zur Transformation von Calcium-behandelten *E. coli* HB101-Zellen verwendet. Die Kultivierung der transformierten Zellen ergibt 850 bzw. 585 Ampicillin-resistente Kolonien. Die transformierten Kolonien werden mit dem Oligonucleotid 91/37 komplementär (C) auf das Vorhandensein von F₁ (C')-F₂-DNA bzw. F₁ (C'')-F₂-DNA geprüft. Es werden 18 Kolonien, die F₁ (C')-F₂-DNA enthalten, und 31 Kolonien, die F₁ (C'')-F₂-DNA enthalten, identifiziert. Jeweils eine Kolonie wird ausgewählt und erhält die Bezeichnung pML141 (C') bzw. pML141 (C'').

Beispiel 16: Herstellung des Plasmids pML 160, enthaltend die F₁ (B)-F₂-DNA

a. Herstellung der F₁ (B)-DNA/EcoRI/HpaII

In analoger Weise, wie für die F₁ (C)-DNA/EcoRI/HpaII beschrieben (Beispiel 15 bI), werden 10 µg Plasmid-DNA von pML90 zuerst mit HpaII und danach mit EcoRI gespalten. Das Fragmentgemisch wird, wie beschrieben, durch PAGE gereinigt.

b. Ligation der F₁ (B)-DNA mit der F₂-DNA und Konstruktion eines rekombinierten Plasmids

Die Ligation erfolgt, wie in Beispiel 15 c) beschrieben, ausgehend von 10 µg F₁ (B)-DNA/EcoRI/HpaII (s. o.) und 9 µg F₂-DNA/BamHI/HpaII (Beispiel 15 bII). Die gebildete F₁ (B)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI wird, wie beschrieben, mit 30 µg der Vektor-DNA pBR322/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 15 a) ligiert.

Die entstandene, rekombinierte Plasmide enthaltende Lösung wird zur Transformation von mit Calcium-behandelten *E. coli* HB101-Zellen verwendet. 15 transformierte Klone werden auf ihren F₁ (B)-F₂-DNA-Gehalt geprüft, wie in Beispiel 11 e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird wieder eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligonucleotide benutzt. In Autoradiogramm werden 6 positive Kolonien erhalten, eine davon erhält die Bezeichnung pML160.

Beispiel 17: Charakterisierung der Klone pML141 und pML160

Je 10 µg der Plasmid-DNAs von pML141 und pML160 werden jeweils mit EcoRI- bzw. BamHI-Restriktionsendonuclease verdaut (vgl. Beispiel 11 a bzw. 13 a). Die Charakterisierung von pML141 und pML160 erfolgt wie bereits in Beispiel 14 beschrieben. Die für die F₁ (C)-F₂-DNA und F₁ (B)-F₂-DNA ermittelten Nucleotid-Sequenzen sind mit denjenigen der oben dargestellten synthetischen Eglin C- und Eglin B-Gene identisch.

Beispiel 18: Herstellung des Expressionsplasmids pML147

a) Konstruktion des linearisierten Vektors pHRi148/EcoRI/BamHI, welcher den trp-Promotor-Operator enthält (Fig. 5 und Fig. 6)

A. Konstruktion des Plasmids p159

10 µg Plasmid pBRH_{trp} (21) werden mit 50 Einheiten EcoRI (Biolabs) gespalten während 60 min bei 37°C, und das Verdauungsgemisch wird nach Phenolextraktion durch einen Saccharose-Dichtegradienten (5–23%) in 50 mM Tris · HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST41 (Kontron AG) Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation dauert 14 Stunden bei 40000 upm und 15°C. 0,3 ml Fraktionen werden mit einem ISCO-Gradientenkollektor bei 1 ml/min gesammelt. Die Fraktionen, welche das kleinere Fragment enthalten, werden vereinigt, die Lösung wird auf TNE eingestellt und mit 2 Volumina Ethanol bei –20°C gefällt. Die DNA wird nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge in 100 µl 10 mM Tris · HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst. 5 µg dieses DNA-Fragmentes werden mit 5 Einheiten BglII (Biolabs) 60 min bei 37°C gespalten. Das Reaktionsgemisch wird mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA wird mit 2 Volumina Ethanol bei –80°C während 10 min inkubiert und die DNA durch Zentrifugation gesammelt und erneut in 50 µl 50 mM Tris · HCl (pH 8,0) gelöst. 2 µl von dieser Lösung werden entnommen (0,2 µg DNA) und bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl in 50 mM Tris · HCl (pH 8,0) mit 1 Einheit intestinaler alkalischer Kälber-Phosphate (Boehringer) während 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen der Lösung während 60 min bei 65°C inaktiviert. 0,04 µg DNA wird entnommen und 5'-terminal mit 10 µCi [γ -³²P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham) und 5 Einheiten (T₄ Polynucleotid-Kinase (P-L Biochemicals) in 20 µl Reaktionsvolumen in 50 mM Tris · HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂, und 5 mM DTT, während 30 min bei 37°C inkubiert. Die radioaktive Probe wird mit der nichtmarkierten Probe (s. oben) gemischt und die DNA-Fragmente werden durch einen 5–23% Saccharose-Dichtegradienten in 50 mM Tris · HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST60 Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation erfolgt während 5 Stunden bei 60000 upm und 15°C. Es werden 0,2 ml Fraktionen gesammelt. Die Radioaktivität jeder Fraktion wird durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt und die Fragmente damit identifiziert. Die gewünschten Fraktionen, welche das kleine DNA-Fragment enthalten, werden vereinigt, die DNA mit 2 Volumina Ethanol gefällt und nach Zentrifugation wieder in 20 µl 10 mM Tris · HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst.

Das ³²P-markierte EcoRI-BglII DNA-Fragment wird mit 0,2 Einheiten TaqI (Biolabs) in 50 µl Volumen während 10 min bei 37°C partiell gespalten. Das Reaktionsgemisch wird auf 0,2% SDS, 10% Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05% Bromphenol-Blau eingestellt und die DNA-Fragmente auf einem 6% Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (22) aufgetrennt. Auf dem Autoradiogramm wird die das gewünschte EcoRI-TaqI enthaltende Bande (das größte Teilfragment) identifiziert. Dieses Fragment (L, siehe Fig. 5) wird aus dem Gel extrahiert und gereinigt (23) und in 10 µl 10 mM Tris · HCl pH 7,5, 1 mM EDTA gelöst.

Als Akzeptor-Plasmid wird pBR322, welches ClaI und EcoRI gespalten ist, verwendet: 2 µg pBR322 werden mit 4 Einheiten ClaI (Biolabs) in 20 µl Reaktionsvolumen während 60 min bei 37°C verdaut. Das Protein wird mit Phenol extrahiert und die DNA anschließend mit 2 Volumina Ethanol bei –80°C während 10 min gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation gesammelt und dann mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min bei 37°C in 20 µl Reaktionsvolumen verdaut. Anschließend wird die

Lösung mit 2 Volumina 0,1 M Tris · HCl (pH 8,7) versetzt und mit 1 Einheit alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wird anschließend durch Inkubation bei 65°C während 60 min inaktiviert. 100 ng des Akzeptor-Plasmids werden mit 5 µl Fragment L-DNA in 15 µl Reaktionsvolumen in 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris · HCl (pH 7,8), 10 mM DTT, 0,5 mM ATP mit 30 Einheiten pro µl Reaktionsvolumen T₄ DNA-Ligase (Biolabs) während 2 Stunden inkubiert.

5 µl dieser Lösung werden zu einem Gemisch gegeben, das 150 ml mit Calciumchlorid behandelte *E. coli* HB101-Zellen (6) in 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 10 mM Tris · HCl (pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl enthält. Das Gemisch wird 20 min in Eis gekühlt, 1 min auf 42°C erhitzt und 10 min bei 20°C inkubiert. 1 ml Trypton-Medium [Trypton-Medium enthält 10 g Bacto-Trypton (Difco); 1 g Hefeextrakt (Difco); 1 g Glucose; 8 g NaCl und 294 mg CaCl₂ · 2 H₂O in 1 l destilliertem Wasser] wird zugesetzt und das Gemisch 30 min bei 37°C unter Schütteln bei 300 U/min inkubiert. Die Mischung wird auf zwei Agarplatten (McConkey Agar, Difco; 0,6 ml/Platte), supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin (Sigma), plattiert. Die Platten werden 12 bis 17 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Plasmid-DNA von 10 verschiedenen Kolonien wird wie folgt isoliert:

Die Kolonien werden zur Inokulierung von 10 ml Trypton-Medium, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, wie oben, in einem 25 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kulturen werden 15 bis 18 Stunden bei 37°C und 300 U/min geschüttelt. Die Zellen werden durch Zentrifugieren (Sorval, HS-4 Rotor, 10 min bei 4000 U/min, 4°C) geerntet. Man erhält etwa 0,1 g Zellen, und diese werden in 1 ml 50 mM Tris · HCl (pH 8,0) resuspendiert. 0,25 ml Lysozymlösung [10 mg/ml in 50 mM Tris · HCl (pH 8,0); Lysozym wird von Sigma vertrieben] werden zugesetzt und nach 10minütiger Inkubation bei 0°C werden 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) zugegeben. Nach weiteren 10 min bei 0°C werden in 60 µl 2%iges Triton X-100 (Merck) zugegeben. Nach 30 min bei 0°C wird die Probe 30 min bei 15000 U/min und 4°C in einem Sorval SA-600 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1 Vol. Phenol (gesättigt in TNE) deproteinisiert. Die Phasen werden durch Zentrifugieren (Sorval HB-4 Rotor) während 10 min bei 5000 U/min. und 4°C getrennt. Die obere Phase wird zweimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Pankreatische RNase A (Sigma; 10 mg/ml in TNE 10 min bei 85°C vorerhitzt) wird bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben und das Gemisch 40 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird dann auf 1 M NaCl und 10% Polyethylenglykol 6000 (Fluka, 20 min bei 120°C im Autoklaven behandelt) eingestellt und 2 Stunden bei -10°C inkubiert. Das Präzipitat wird in einem Sorval HB-4 Rotor (20 min bei 10000 U/min, 0°C) gesammelt und erneut in 100 µl TNE gelöst. Die DNA-Lösung wird mit 1 Vol. Phenol extrahiert und die DNA wird mit 2 Vol. Ethanol 10 min bei -80°C präzipitiert. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge gesammelt und die DNA erneut in 20 µl 10 mM Tris · HCl (pH 7,5) und 0,5 mM EDTA gelöst. Aus einer 10 ml Kultur gewinnt man 8 bis 10 µg Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNAs werden nach Verdauung mit den folgenden Restriktionsenzymen analysiert:

Je 0,5 µg Plasmid-DNA wird mit HpaI (Biolabs) sowie mit HpaI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) mit ClaI (Biolabs) nach Standard-Vorschriften, gemäß Angaben des Enzym-Herstellers, gespalten. Die DNAs werden auf einem 1% Agarose-Gel in 40 mM Tris · Acetat (pH 7,8) 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die gewünschten Plasmide enthalten eine HpaI-Stelle und ergeben nach der 3fachen Verdauung neben dem großen DNA-Fragment 2 kleinere Fragmente, welche größer sind als das kleine EcoRI-ClaI-Fragment von pBR322. Eines dieser Plasmide wird mit p159 bezeichnet (siehe Fig. 5).

B. Konstruktion des Plasmids pHri145

2 µg p159-DNA werden mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min bei 37°C verdaut. Die DNA wird mit Phenol extrahiert, mit Ethanol gefällt und nach Zentrifugation in 10 µl 10 mM Tris · HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst. Die mit EcoRI verdaute DNA wird weiterhin mit 5 Einheiten DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) (Boehringer) in 10 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0,1 mM dATP (P&L Biochemicals), 0,1 mM dTTP (P&L Biochemicals) während 15 min bei 12°C behandelt. Die Polymerase wird anschließend durch Inkubation bei 85°C während 5 min inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wird in 20 mM Tris · HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP (Sigma) auf das 10fache verdünnt und mit 30 Einheiten T₄ DNA-Ligase pro µl Reaktionsgemisch während 1 Stunde bei 15°C inkubiert.

50 ng der DNA werden in *E. coli* transformiert (wie oben beschrieben) und auf McConkey-Agarplatten supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert.

Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien wird, wie oben beschrieben, isoliert. Die Plasmid-DNAs werden analysiert durch Verdauung mit EcoRI. Die gewünschten Plasmide sind EcoRI-resistent. Die Analyse erfolgt wie oben beschrieben. Eines der gewünschten Plasmide wird als Hri145 bezeichnet (Fig. 5).

C. Konstruktion des Plasmids pHri148

2 µg pHri145-DNA werden mit 5 Einheiten ClaI (Boehringer) während 60 min bei 37°C behandelt, dann mittels Phenol-Extraktion deproteinisiert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und dann in 20 µl 10 mM Tris · HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst. Die überhängenden Enden werden, wie oben beschrieben, mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt, mit der Änderung, daß dATP und dTTP ersetzt werden durch dCTP (P&L Biochemicals) und dGTP (P&L Biochemicals). Die Polymerase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85°C während 5 min. Das Reaktionsgemisch wird mit 2 Volumina 0,1 M Tris · HCl (pH 8,7) versetzt und mit 0,5 Einheiten Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird deproteinisiert durch Phenol-Extraktion. Die DNA wird mit Ethanol gefällt und in 8 µl 10 mM Tris · HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst.

Ein chemisch synthetisierter DNA-Linker der Formel

5'-GAATTCATGGTACCATGGAATTC-3'

wird am 5'-Ende phosphoryliert, indem 8 pMol des Linkers mit 5 µCi [γ -³²P]-ATP (5500 Ci · mmol⁻¹ Amersham) in 8 µl Reaktionsvolumen, welches 0,1 mM rATP (Sigma), 50 mM Tris · HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 2 Einheiten T₄ Polynucleotid-Kinase (P&L Biochemicals) enthält, während 30 min bei 37°C inkubiert werden. Die Reaktion wird gestoppt durch Einfrieren bei -80°C.

Der radioaktiv markierte Linker wird anschließend mit 1 µg ClaI und Phosphatase behandelt und mit pHri145-DNA (siehe oben) in einem 20 µl Reaktionsvolumen ligiert, welches 0,5 mM rATP (Sigma), 10 mM DTT (Calbiochem), 20 mM Tris · HCl (pH 7,8), 1 mM MgCl₂ und 800 Einheiten T₄ DNA-Ligase (Biolabs) enthält. Die Inkubation erfolgt bei 15°C während 2 Stunden. Die Ligase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85°C während 10 min. Anschließend werden 2 Volumina Wasser hinzugegeben, die Kochsalz-Konzentration auf 10 mM eingestellt und 20 Einheiten KpnI (Biolabs) hinzugegeben während 30 min bei 37°C. Nach der Extraktion mit Phenol und Chloroform wird die Mischung durch ein 0,9% niedrigschmelzendes Agarose-Gel (Biorad) in 40 mM

Tris · Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die durch UV-Bestrahlung sichtbare Bande, welche die gleiche Mobilität wie eine Marker-DNA gleicher Größe aufzeigt, wird mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wird 5 min bei 65°C geschmolzen und dann auf 37°C abgekühlt. Man erhält ein Volumen von ca. 20 µl. 5 µl dieser Lösung werden entnommen und mit 400 Einheiten T₄-Ligase (Biolabs) in 10 µl Reaktionsvolumen, welches auf 0,5 mM ATP, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris · HCl (pH 7,8) eingestellt wird, während 12 Stunden bei 15°C inkubiert. 1/10 Volumen einer Lösung mit 100 mM Tris · HCl (pH 7,5), 100 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂ werden zum Ligase-Gemisch (solifidiert bei 15°C) hinzugegeben und bei 65°C während 5 min inkubiert. Die Lösung wird dann verwendet, um mit Calcium behandelte *E. coli* HB101-Zellen, wie oben beschrieben, zu transformieren. Es wird auf McConkey-Agarplatten, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert. Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien werden isoliert, wie oben beschrieben, und die DNA wird der folgenden Restriktionsenzymanalyse unterworfen: Je 0,5 µg Plasmid DNA wird nacheinander mit KpnI (Biolabs), NcoI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) nach den Vorschriften des Enzym-Herstellers gespalten. Die Spaltprodukte werden auf 1% Agarose-Gelen in 40 mM Tris · Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Alle Plasmide zeigen je eine dieser Enzymspaltstellen, wie gewünscht. Eines wird als HRI148 bezeichnet.

Das Plasmid HRI148 enthält einen Tryptophan-Promoter-Operator und eine ribosomale Bindungsstelle bis und mit ATG. Eglin C als auch andere heterologe Gene können direkt über die einmalig im Plasmid vorhandenen EcoRI, NcoI, KpnI-Stellen angekoppelt werden. Des weiteren ermöglicht diese Konstruktion das direkte Koppeln und Expressieren von heterologen Genen, ohne daß das für die Initiation der Translation notwendige ATG auf dem entsprechenden Gen vorhanden sein muß. Dies kann leicht erreicht werden durch Spaltung mit NcoI und Auffüllen der überhängenden Enden mit DNA-Polymerase I, wie beschrieben, oder durch Spalten mit KpnI und Entfernen der überhängenden Enden durch Nuklease S₁. Das Plasmid HRI148 ist somit ein breit anwendbares Expressionsplasmid.

D. Herstellung des linearisierten Vektors pHRI148/EcoRI/BamHI

5 µg Plasmid-DNA von pHRI148 werden mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI, wie in Beispiel 15a beschrieben, verdaut. Der herausgeschnittene Vektor pHRI148/EcoRI/BamHI wird mittels Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Beispiel 15a) isoliert.

b) Herstellung der F₁ (C)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI (Fig. 6)

5 µg Plasmid-DNA von pML141 werden mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease wie in den Beispielen 11a) und 13a) beschrieben verdaut. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung wird die F₁ (C)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI vom Plasmid (pBR322/EcoRI/BamHI) durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrigschmelzender Agarose (Biorad) (Beispiel 13a) abgetrennt und mit EtBr sichtbar gemacht. Anschließend wird die Stelle des Gels, welche die DNA Bande der F₁ (C)-F₂-DNA (= 236 Basenpaare) enthält, aus dem Gel geschnitten und bei 65°C 10 min. verflüssigt.

c) Ligierung der pHRI148/EcoRI/BamHI Vektor-DNA mit der F₁ (C)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI und Konstruktion des Plasmids pML147 (Fig. 6)

100 ng (ca. 100 nMol Enden) Plasmid DNA pHRI148/EcoRI/BamHI und 28 ng (713 nMol Enden) der F₁ (C)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI (gelöst in 10 µl des in Beispiel 18b) erhaltenen flüssigen Gels) werden bei 37°C in einem Volumen von 20 µl miteinander gemischt und wie in Beispiel 13c) beschrieben, mit T₄-DNA Ligase bei 15°C für 16 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in dieser Mischung das Expressionsplasmid pML147, welches das Eglin C-Gen (F₁ (C)-F₂-DNA) enthält.

d) Transformation von *E. coli* HB101 mit dem Plasmid pML147

10 µl des das Plasmid pML147 enthaltenden Gemisches (Beispiel 18c) werden für 10 min. bei 65°C verflüssigt und für die Transformation der Calcium-behandelten *E. coli* HB101 Zellen verwendet. Ca. 6000 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₁ (C)-F₂-DNA enthalten

Transformierte Kolonien (Beispiel 18d) werden auf das Vorhandensein von F₁ (C)-F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 15e) angegeben.

Es werden sieben positive Kolonien erhalten, welche die Bezeichnung pML147-pML153 erhalten.

In analoger Weise wird die F₁ (C')-F₂-DNA/EcoRI/BamHI bzw. F₁ (C'')-F₂-DNA/EcoRI/BamHI, hergestellt aus den Plasmiden pML147 (C') bzw. pML147 (C''), mit der pHRI148/EcoRI/BamHI ligiert. Auf diese Weise entstehen Plasmide, die das Eglin C'-Gen [F₁ (C')-F₂-DNA] bzw. das Eglin C''-Gen [F₁ (C'')-F₂-DNA] enthalten. Die Plasmide werden zur Transformation von Calcium-behandelten *E. coli* HB101-Zellen verwendet. Die Kultivierung der transformierten Zellen ergibt 940 bzw. 1080 Ampicillin-resistente Kolonien. Die Kolonien werden mit dem Oligonucleotid 91/37 komplementär (C) auf das Vorhandensein von F₁ (C')-F₂-DNA bzw. F₁ (C'')-F₂-DNA geprüft. 9 Kolonien, enthaltend die F₁ (C')-F₂-DNA (Eglin C'-Gen), und 17 Kolonien, enthaltend die F₁ (C'')-F₂-DNA (Eglin C''-Gen), werden identifiziert. Jeweils eine Kolonie wird ausgewählt und erhält die Bezeichnung pML147 (C') bzw. pML147 (C'').

Beispiel 19: Herstellung des Expressionsplasmids pML 199

a. Herstellung der F₁ (B)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI

Analog Beispiel 18b) werden 5 µg Plasmid-DNA von pML 160 mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI verdaut. Die F₁ (B)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI wird, wie beschrieben, mittels Gelelektrophorese abgetrennt.

b. Ligation der pHRI148/EcoRI/BamHI-Vektor-DNA mit der F₁ (B)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI und Konstruktion von rekombinierten Plasmiden

100 µg Plasmid-DNA pHRI148/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 18aD) wird mit 28 µg F₁ (B)-F₂-DNA/EcoRI/BamHI gemäß Beispiel 18c) ligiert. Die entstandene Lösung, welche rekombinierte Plasmide enthält, wird benutzt, um Calcium-behandelte *E. coli* HB101-Zellen zu transformieren. Transformierte Kolonien werden auf das Vorhandensein von F₁ (B)-F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 15e) beschrieben.

Es werden sechs positive Kolonien erhalten, welche die Bezeichnung pML199-204 erhalten.

Beispiel 20: Charakterisierung der Klone pML147 und pML199

Die Charakterisierung der F_1 (C)- F_2 - bzw. F_1 (B)- F_2 -DNA-Sequenzen in den rekombinierten Plasmiden pML147 und pML199 erfolgt durch Sequenzierung der F_1 (C)- F_2 - bzw. F_1 (B)- F_2 -DNA nach Maxam und Gilbert (3), wie in Beispiel 17 beschrieben. 10 μ g Plasmid-DNA werden geprüft. Die Nucleotidsequenz der F_1 (C)- F_2 -DNA ist mit der für das synthetische Eglin C-Gen beschriebenen, diejenige der F_1 (B)- F_2 -DNA mit der für das synthetische Eglin B-Gen beschriebenen identisch.

Beispiel 21: Synthese von Polypeptiden mit Eglin-Aktivität durch E. coli-Zellen, die Plasmide mit rekombinierten Eglin-Genen enthalten

a. Synthese von Polypeptiden mit Eglin C-Aktivität

Jeder der 7 Klone, die das rekombinierte Eglin C-Gen enthalten, nämlich

E. coli HB101 pML 147
E. coli HB101 pML 148
E. coli HB101 pML 149
E. coli HB101 pML 150
E. coli HB101 pML 151
E. coli HB101 pML 152
E. coli HB101 pML 153
E. coli HB101 pML 147 (C')
E. coli HB101 pML 147 (C'')

wird auf die Bildung von Eglin C-Aktivität getestet.

Zu diesem Zweck werden die oben genannten Klone in 5 ml L-Medium über Nacht (16 Stunden) bei 37°C und 250 upm kultiviert. L-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	5 g
Ampicillin	0,1 g

1 ml dieser Übernachtskultur wird am nächsten Tag in 25 ml M9-Medium übertragen. M9-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	13,25 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Casaminsäuren	2,5 g
Vitamin B ₁	0,0099 g
Glucose	5,0 g
Ampicillin	0,1 g

Es wird bei 37°C und 250 upm solange kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD_{623}) von ca. 0,9–1,0 erreicht hat. Anschließend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris · HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C werden die Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5mal wiederholt, anschließend wird die Mischung 30 min bei 16000 upm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden auf Eglin C-Aktivität untersucht, indem die Hemmung der Humanleukocyten-Elastase (1) gemessen wird.

Folgende Aktivitäten werden erhalten:

Bakterienextrakt	Eglin C-Aktivität $\mu\text{g/ml}$ Kultur
E. coli HB101 pML 147	3,3
E. coli HB101 pML 148	3,3
E. coli HB101 pML 149	3,4
E. coli HB101 pML 150	3,3
E. coli HB101 pML 151	3,3
E. coli HB101 pML 152	3,5
E. coli HB101 pML 153	3,3
E. coli HB101 pML 147 (C')	3,0
E. coli HB101 pML 147 (C'')	3,1

b. Synthese von Polypeptiden mit Eglin B-Aktivität

In analoger Weise, wie in Beispiel 21 a) beschrieben, werden jeder der 6 Klone, die das rekombinierte Eglin B-Gen enthalten, nämlich

E. coli HB101 pML 199
E. coli HB101 pML 200
E. coli HB101 pML 201
E. coli HB101 pML 202
E. coli HB101 pML 203
E. coli HB101 pML 204

auf die Bildung von Eglin B-Aktivität getestet.

Die genannten Klone werden, wie beschrieben, in L-Medium kultiviert und dann auf M9-Medium übertragen. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{623}) von ca. 0,9–1,0 werden die Zellen geerntet, lysiert und durch abwechselndes Einfrieren und Auftauen zerstört. Die Mischungen werden zentrifugiert, und die Überstände durch Messung der Hemmung der Humanleukocyten-Elastase (1) auf Eglin B-Aktivität geprüft.

Folgende Aktivitäten werden erhalten:

Bakterienextrakt	Eglin B-Aktivität $\mu\text{g/ml Kultur}$
<i>E. coli</i> HB101 pML 199	3,2
<i>E. coli</i> HB101 pML 200	3,1
<i>E. coli</i> HB101 pML 201	3,8
<i>E. coli</i> HB101 pML 202	3,5
<i>E. coli</i> HB101 pML 203	3,3
<i>E. coli</i> HB101 pML 204	3,3

Beispiel 22: Kultivierung des Stammes *E. coli* HB101 pML 147

20 ml L-Medium (siehe Beispiel 21) werden mit den *E. coli* HB101 pML 147-Zellen von einer gut gewachsenen Agarplatte beimpft und im Schüttelkolben auf einem Rundschüttler bei 150 upm bei 37°C für 12 Stunden geschüttelt. 5 ml dieser Vorkultur werden in 120 ml M9 Nährmedium übertragen. Diese Kultur wird bei 250 upm und 37°C geschüttelt. Nach ca. 8–10 Stunden hat die Kultur den höchsten Titer an Polypeptiden mit Eglin C-Aktivität erreicht und wird geerntet.

Beispiel 23: Nachweis der Eglin C-Aktivität

Ca. 5–10 μl einer Probe, welche Polypeptide mit Eglin C-Aktivität enthält (vgl. Beispiele 21 und 22), werden auf 1 cm^2 Nitrocellulosepapier (NZ) (BIORAD) aufgetropft und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird das NZ für 1 Stunde bei 37°C in einer Lösung von 3% Serumalbumin in 0,01 M Tris · HCl (pH 8) und 0,9% NaCl inkubiert.

Anschließend wird das NZ in einer Lösung von 0,01 M Tris · HCl (pH 8) und 0,9% NaCl für 30 min gewaschen. Dabei wird die Lösung 5 mal gewechselt. Danach wird das gewaschene NZ für 2 Stunden bei 25°C in einer Lösung von 3% Serumalbumin in 0,01 M Tris · HCl (pH 8) und 0,9% NaCl, die 2 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper (aus Kaninchen hergestellte, oder monoclonale Antikörper) gegen Eglin C enthält, behandelt. Danach wird das NZ, wie oben beschrieben gewaschen.

Anschließend wird das NZ für 2–3 Stunden bei 25°C mit einer Lösung von 3% Serumalbumin in 0,01 M Tris · HCl (pH 8) und 0,9% NaCl, die 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{125}I -Protein A (sp. Aktivität 89,8 $\mu\text{Ci/mg}$) (NEN) enthält, behandelt. Danach wird abermals das NZ, wie oben beschrieben, gewaschen, getrocknet und in einem γ -Zähler (Multi-Gamma, 1260 gamma counter, LKB, Wallace) die gebundene Radioaktivität bestimmt, welche ein Maß für das auf dem NZ vorhandene Polypeptid mit Eglin C-Aktivität ist.

In einem alternativen Verfahren wird obige Probe einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) unterworfen [vgl. (7)]. Das PAGE Elektropherogramm wird durch Elektro-Blotting auf NZ übertragen. Danach wird die NZ wie oben beschrieben behandelt und/oder über Nacht zusammen mit einem Röntgenfilm (Fuji) autoradiographiert. Stellen auf dem NZ, welche Polypeptide mit Eglin C-Aktivität enthalten, erscheinen auf dem Film als schwarze Flecken.

Beispiel 24: Isolierung und Reinigung von N^α-Acetyl-eglin C mit Hilfe einer monoklonalen Antikörper-Säule

a. Herstellung der Polypeptidlösung für die monoklonale Antikörpersäule

150 ml Kulturbrühe (erhalten gemäß Beispiel 22) werden auf 4°C abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (5000 upm, 15 min, Sorvall RC 3B) abgetrennt. Der klare Überstand enthält keine Eglin C-Aktivität.

Anschließend werden die Zellen in 12 ml Lyse Puffer (50 mM Tris · HCl pH 8, 30 mM NaCl) suspendiert. Dieser Mischung werden 15 mg Lysozym (Boehringer) zugesetzt und diese dann 30 min bei 4°C aufbewahrt. Anschließend werden die Zellen durch 4maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C zerstört. Danach wird 30 min bei 16000 upm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität. In dem Überstand (15 ml) werden dann 7,7 g festes Ammoniumsulfat aufgelöst. Die trübe Mischung wird bei 4°C für 30 min stengelassen und dann zentrifugiert (s. oben). Das nasse Sediment wird in 1 ml 0,05 mM Tris · HCl pH 8 Puffer gelöst und man erhält die gewünschte Polypeptidlösung.

b. Reinigung von N^α-Acetyl-eglin C auf einer monoklonalen Antikörper-Säule

Die monoklonale Antikörper-Säule 1K-F299-22-10 (Bettvolumen 0,8 ml, siehe unten) ist mit 0,05 M Tris · HCl (pH 8) äquilibriert. 0,5 ml-Portionen der oben erhaltenen Polypeptid-Lösung werden bei 4°C auf die Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 7 ml/Stunde aufgetragen. Gewaschen wird dann mit 10 ml 0,05 M Tris · HCl pH 8. Die ersten Fraktionen erhalten die nicht adsorbierten Polypeptide, welche verworfen werden. Anschließend wird die Säule mit 5 ml 5 M Natriumthiocyanat (Merck) in 0,05 M Tris · HCl (pH 8) gewaschen und die erhaltenen Fraktionen auf N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität mit dem HLE Test (1) geprüft. Die Fraktionen, welche die Polypeptide enthalten, werden durch Messung der $OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt. Fraktionen 19 und 20 enthalten die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität; sie werden bei –20°C aufbewahrt oder bis zur Weiterverarbeitung im Eisbad. Die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität beträgt in Fraktion 19 61 $\mu\text{g/ml}$ und in Fraktion 20 49 $\mu\text{g/ml}$. Danach werden die Fraktionen dialysiert oder über Sephadex-G25 (Pharmacia) entsalzt. Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (7) ergibt ein Molekulargewicht für N^α-Acetyl-eglin C von ca. 8100 Dalton.

In analoger Weise können N^α-Acetyl-eglin B, Eglin C und Eglin B mittels der monoklonalen Antikörper-Säule 1K-F299-22-10 gereinigt werden.

c. Herstellung der monoklonalen Antikörper-Säule 1K-F299-22-10

A) Immunisierung von Mäusen

Reines natürliches Eglin C (6 mg) in lyophilisierter Form wird in wenig 0,1% Essigsäure gelöst und dann mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung ergänzt und der pH wird auf 7,2 eingestellt, so daß die Endkonzentration 2 mg/ml beträgt. Portionen dieser Antigen-Lösung werden mit gleichen Mengen komplettem Freund's Adjuvans, inkomplettem Freund's Adjuvans oder phosphatgepufferter Salzlösung gemischt und emulgiert.

Weibliche Balb/c Mäuse (8–14 Wochen alt, erhalten von der Tierfarm Sisseln, Schweiz) werden durch Injektion einer solchen Emulsion, enthaltend 100 μg Eglin, in die Fußpfoten immunisiert. Während den folgenden sechs Wochen werden jede Woche weitere 100 μg Eglin emulgiert wie zuvor, aber in inkomplettem Freund's Adjuvans subcutan und schließlich 200 μg Eglin in

B) Herstellung der Hybridoma und Antikörper-Test

Die Herstellung der Hybridomazellen erfolgt durch Verschmelzung der erhaltenen Milzzellen mit der Myeloma-Zelllinie SP 2/0. Dabei werden 10^8 Milzzellen und 10^7 Myelomazellen eingesetzt. Die Fusion wird wie beschrieben (9, 26) durchgeführt. Die Bestimmung der anti-Eglin C-Aktivität in den Hybridoma-Überständen erfolgt mit Hilfe eines kompetitiven Radioimmunoassays [RIA, (10)].

Zu diesem Zwecke wird Eglin C mit radioaktivem ^{125}Jod nach der üblichen Chloramin T-Methode markiert (30 000 cpm). Durch Inkubieren über Nacht wird ein polyklonaler Kaninchen anti-Eglin C-Antikörper in den Vertiefungen einer Polystyrol-Mikrotiterplatte fixiert. Etwa 50–70% des radioaktiven Eglins C werden an diesen Festphasen-Antikörper gebunden. Von 45 erhaltenen Hybridoma-Kulturen inhibierten 32 Überstände diese Bindung zu mehr als 50% signifikant. Zwei der stark inhibierenden Überstände, bzw. ihre Hybridoma-Zellen, werden als 299S18 und 299S22 bezeichnet und zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Sie werden zunächst durch die begrenzende Verdünnungsmethode kloniert, wobei 299S18 vier und 299S22 neun positive Klone ergibt, von denen die Klone 299S18-20, 299S22-1 und 299S22-10 ausgewählt und näher charakterisiert werden. Die genannten Hybridoma-Zelllinien produzieren monoklonale Antikörper (mit der gleichen Bezeichnung) vom Subtyp Ig_κ.

C) Isolierung und Reinigung der Anti-Eglin C-Antikörper aus Aszites

Balb/c Mäuse werden intraperitoneal mit 0,4 ml Pristan (Carl Roth) vorbehandelt. Nach einer Woche werden 2 bis 5×10^6 klonierte Hybridoma-Zellen intraperitoneal injiziert. Aszitische Flüssigkeit wird von jeder Maus wiederholt genommen und bei -80°C gefroren. Die gesammelte Flüssigkeit wird aufgetaut und 30 min bei 4°C mit 16 000 upm zentrifugiert. Das Fett wird abgesaugt und zum verbleibenden Debris-freien Überstand langsam unter Rühren bei 0°C 0,9 Volumenäquivalente einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugetropft. Die erhaltene rohe Immunoglobulin-Fraktion wird unter Verwendung von 0,1 M Tris · HCl (pH 8,2) durch Sephacryl G 200 (Pharmacia), gemäß den Angaben des Herstellers, gegeben. Aktive Fraktionen werden vereinigt und mit Amicon XM50-Filter (Amicon) konzentriert. Man erhält auf diese Weise die monoklonalen anti-Eglin C-Antikörper 299S18-20, 299S22-1 und 299S22-10.

D) Herstellung der Antikörper-Säule 1K-F299-22-10

Affi-Gel 10 (Bio-Rad) wird nach den Angaben des Herstellers mit kaltem destilliertem Wasser und Kupplungspuffer pH 8,0 (0,1 M NaHCO_3 -Lösung) gewaschen. Eine 50%ige Suspension des Gels in Kupplungspuffer (1 ml) wird in ein Plastikrohr übertragen, mit der gleichen Menge gereinigter Antikörperlösung (19 mg monoklonale anti-Eglin C-Antikörper 299S22-10) vermischt und 4 Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Danach wird das Gel mit Kupplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung der noch freien aktiven Stellen wird das Gel mit 0,1 ml 1 M Ethanolamin-HCl (pH 8,0) pro ml Gel während 2 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, dann mit phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 10 mM Natriumazid pro ml Gel gewaschen und darin bei 4°C gehalten. Der Kupplungsgrad wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt und beträgt 15 bis 30 mg Antikörper pro ml Gel. 0,8 ml des entstandenen Immunogels werden verwendet, um die monoklonale Antikörpersäule 1K-F299-22-10 herzustellen.

Beispiel 25: Isolierung und Reinigung von N^α-Acetyl-eglin C mit Hilfe einer Anhydrochymotrypsin-Säule

a. Herstellung der Polypeptidlösung für die Anhydrochymotrypsin-Säule.

150 ml Kulturbrühe (erhalten gemäß Beispiel 22) werden auf 4°C abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (5000 upm, 15 min, Sorvall RC 3B) abgetrennt. Der klare Überstand enthält keine Eglin C-Aktivität. Anschließend werden die Zellen in 12 ml Lyse Puffer (50 mM Tris · HCl pH 8, 30 mM NaCl) suspendiert. Dieser Mischung werden 15 mg Lysozym (Boehringer) zugesetzt und diese dann 30 min bei 4°C aufbewahrt. Anschließend werden die Zellen durch 4maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C zerstört. Danach wird 30 min bei 16 000 upm 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität. In dem Überstand (15 ml) werden dann 7,7 g festes Ammoniumsulfat aufgelöst. Die trübe Mischung wird bei 4°C für 30 min stengelassen und dann zentrifugiert (s. oben). Das nasse Sediment wird in 1 ml 0,05 mM Tris · HCl pH 8 Puffer gelöst und man erhält die gewünschte Polypeptidlösung.

b. Reinigung von N^α-Acetyl-eglin C auf einer Anhydrochymotrypsin (AnCht)-Säule.

Die AnCht-Säule (Bettvolumen 4 ml) ist mit 0,05 M Tris-HCl pH 8 äquilibriert. 2,5 ml-Portionen der oben erhaltenen Polypeptid-Lösung werden bei 4°C auf die Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 7 ml/Stunde aufgetragen. Gewaschen wird dann mit 25 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 8). Die ersten Fraktionen enthalten die nicht adsorbierten Polypeptide, welche verworfen werden. Anschließend wird die Säule mit 10 ml 5 M Natriumthiocyanat (Merck) in 0,05 M Tris-HCl (pH 8) gewaschen und die erhaltenen Fraktionen auf N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität mit dem HLE Test (1) geprüft. Die Fraktionen, welche die Polypeptide enthalten, werden durch Messung der $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ bestimmt. Fraktionen 30 und 31 enthalten die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität; sie werden bei -20°C aufbewahrt oder bis zur Weiterverarbeitung im Eisbad. Die N^α-Acetyl-eglin C-Aktivität beträgt in Fraktion 30 30 $\mu\text{g/ml}$ und in Fraktion 31 64 $\mu\text{g/ml}$. Danach werden die Fraktionen dialysiert oder über Sephadex-G25 (Pharmacia) entsalzt. Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (7) ergibt ein Molekulargewicht für N^α-Acetyl-eglin C von ca. 8 100 Dalton.

c. Herstellung der Anhydrochymotrypsin-Säule

A. Herstellung von Anhydrochymotrypsin (AnCht)

Die Herstellung von AnCht erfolgt wie in Ako et al. (27) beschrieben:

500 mg Chymotrypsin (Merck) werden in 50 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8)-Puffer, der 0,1 M NaCl, 0,12 M CaCl_2 und 13% (v/v) Methanol enthält, gelöst. Zu dieser Lösung werden siebenmal 0,1 ml Aliquote von Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Fluka, Lösung von 7 mg/ml in Aceton) unter Rühren zugegeben und jeweils die Abnahme der Chymotrypsinaktivität bestimmt (28). Nachdem die Chymotrypsinaktivität unter 1% gesunken ist, wird die Lösung gegen 1 mM HCl über Nacht bei 4°C dialysiert (3×10 Liter) und anschließend lyophilisiert. Das entstandene Phenylmethylsulfonyl-Chymotrypsin (PMS-Cht) wird in 100 ml eiskalter 0,1 M KOH gelöst, 1 Stunde in Eis stehen lassen und anschließend mit 6 N HCl auf pH 3 eingestellt. Die erhaltene Lösung wird über Nacht bei 4°C gegen 1 mM HCl dialysiert (3×10 Liter) und anschließend lyophilisiert. AnCht fällt als weißes Pulver an (120 mg).

B. Herstellung der AnCht-Säule

Affi-Gel 10 (Bio Rad) wird nach Angaben des Herstellers mit kaltem destilliertem Wasser und Kupplungspuffer pH8,5 (0.1 M NaHCO₃/Na₂CO₃-Lösung) gewaschen. Eine 50%ige Suspension der Gels in Kupplungspuffer (4 ml) wird in ein Plastikrohr übertragen, mit der gleichen Menge Anhydrochymotrypsinlösung (120 mg in 4 ml Kupplungspuffer) vermischt und über Nacht bei 4°C rotiert. Danach wird das Gel mit Kupplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung der noch freien aktiven Stellen wird das Gel mit 0.1 ml 1 M Äthanolamin-HCl (pH8.0) pro Gel während 3 Stunden bei 4°C behandelt dann mit phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 10 mM Natriumazid pro ml Gel gewaschen und darin bei 4°C gehalten. Der Kupplungsgrad wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt und beträgt 15 bis 30 mg AnCht pro ml Gel. 4 ml des entstandenen AnCht-Gels werden verwendet, um die Affinitätssäule herzustellen. In gleicher Weise können auch N^α-Acetyl-eglin B, Eglin C und Eglin B gereinigt werden.

Beispiel 26: Alternative Reinigungsverfahren für N^α-Acetyl-eglin C

Alternativ oder zusätzlich zu den vorstehenden Reinigungsverfahren (vgl. Beispiele 24 und 25) können folgende Reinigungsschritte verwendet werden:

a. Butanol-Extraktion des Lysats

Die nach der Lyse durch viermaliges Einfrieren und Auftauen zerstörten Zellen (vgl. Beispiel 24 a) werden mit Essigsäure (Endkonzentration 0.1%; pH4.5) versetzt. Die ausfallenden bakteriellen Proteine werden mittels Zentrifugation abgetrennt. N^α-Acetyl-eglin C verbleibt im Überstand.

Das Zweiphasengemisch n-Butanol-Eisessig-Wasser 5:1:4 (25 ml) wird kräftig vorgemischt. Man läßt es dann 2 Stunden bei Zimmertemperatur äquilibrieren, wobei sich das Gemisch in zwei Phasen trennt. 0.5 ml der 0.1 % Essigsäure-Lysat-Probe (s. o.) werden mit 250 µl Unterphase verdünnt und N^α-Acetyl-eglin C mit 750 µl Oberphase extrahiert (5 min Vortex, Fa. Bender Hobein). Anschließend trennt man die Phasen durch 60 min Zentrifugation (5400 upm) bei Raumtemperatur. (Hettich Tischzentrifuge EBA 3S). Die Probe wird mit einem Gerät der Fa. Savant (Speed Vac Concentrator) am Hochvakuum zur Trockene eingedampft. Der Nachweis von N^α-Acetyl-eglin C gelingt mittels HLE-Test, RP-HPLC und SDS-Gelelektrophorese.

b. Gelfiltration an Sephadex G50

31 mg des so erhaltenen Materials werden in 600 µl 30 % Essigsäure suspendiert, 5 min bei Raumtemperatur bei 5000 upm zentrifugiert und der klare Überstand wird auf die Sephadex-Säule G50 fine (Pharmacia) aufgetragen (Säulendimension: 1.5 cm × 30 cm; Detektion: LKB8300 Uvicord II; 254 nm, Transmission 500 mV; Fluß: 0,4 ml/min). Eluiert wird mit 50 ml 2 % Essigsäure. N^α-Acetyl-eglin C ist in den Fraktionen 6–8 (2.5 ml) enthalten. Ausbeute: 3 mg reines Lyophilisat, Reinheit ca. 95 %.

c. Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose zur Gewinnung von N^α-Acetyl-eglin C und Eglin C.

100 ml eines Überstands nach der Proteinfällung mittels Essigsäure (vgl. Beispiel 26 a) wird konzentriert und einer Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-53 (Fa. Whatman) bei pH 6.6 unterworfen (Chromatographiebedingungen: Säule: 1,5 × 80 cm, Elutionspuffer: 30 mM Ammoniumacetat, pH 6,6, Fluß 15 ml/h. Fraktionsvolumen 3,5 ml). Die Säule wird mit dem Elutionspuffer äquilibriert und entwickelt, bis der erste Peak (Eglin C) zwischen Fraktionen 18–25 eluiert ist. Ab Fraktion 50 wird ein linearer Salzgradient aus je 300 ml Elutionspuffer und 0,06 M Ammoniumacetat/0,4 M NaCl pH 4,5 ausgeschlossen. N^α-Acetyl-eglin C eluiert zwischen Fraktionen 70–85. Der Nachweis gelingt mittels RP-HPLC, PAGE und HLE-Test. Die Reinheit der Produkte beträgt ca. 90 % bezüglich Proteingehalt.

IP (pool Frakt. 18–25): 6.5

IP (pool Frakt. 70–85): 5.4.

Auf diese beschriebene Weise können auch N^α-Acetyl-eglin B, Eglin B und andere Eglin-Verbindungen (Methionin-eglin C u. a. aus der Biosynthese) abgetrennt und gereinigt werden.

Beispiel 27: Strukturbeweis und physikalisch-chemische Charakterisierung von N^α-Acetyl-eglin C

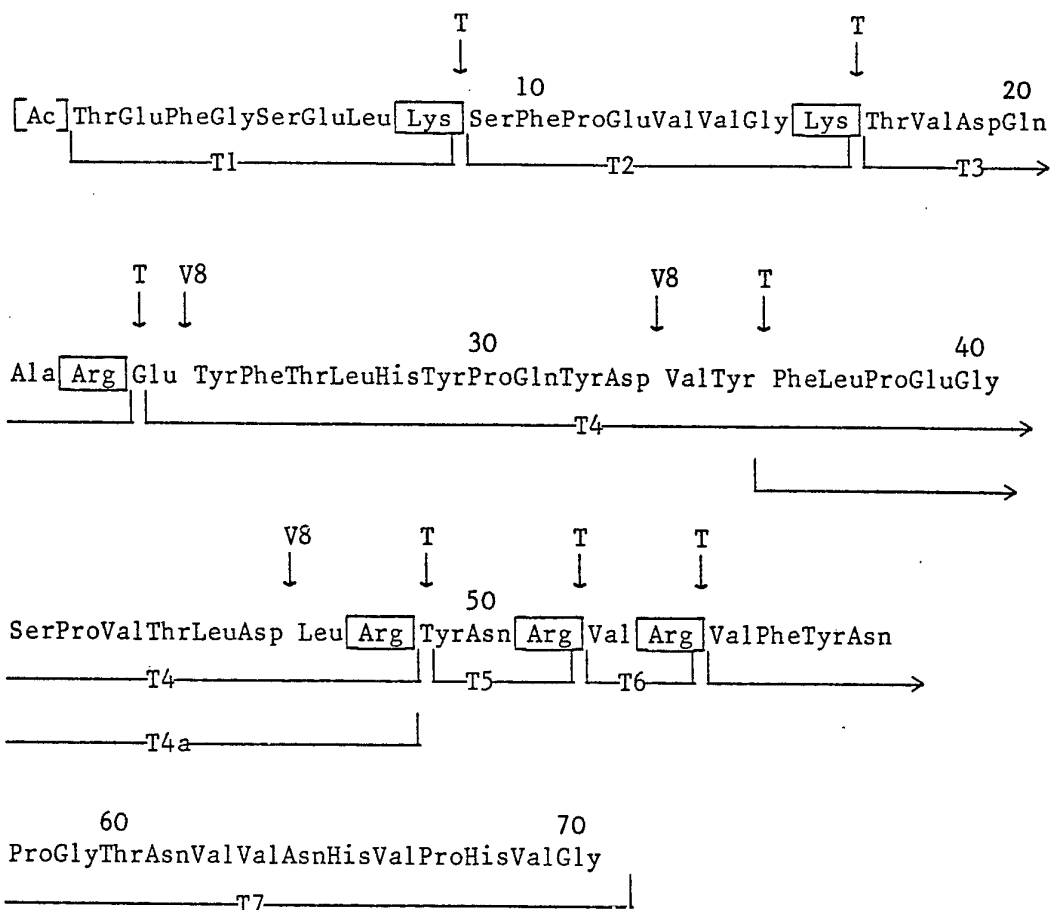
a. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

200 µg N^α-Acetyl-eglin C werden mit 6N HCl bei 110°C während 24 h hydrolysiert und dann nach S. Moore et al. (29) analysiert. Das Hydrolysat weist die folgende Zusammensetzung auf:

Aminosäure	Hydrolysat	Aminosäure	Hydrolysat
Asn	7.2 (7)	Met	0 (0)
Thr	4.6 (5)	Leu	5.3 (5)
Ser	3.5 (3)	Tyr	4.9 (6)
Gln	7.8 (7)	Phe	4.9 (5)
Pro	5.4 (6)	Lys	2.3 (2)
Gly	5.7 (5)	His	2.5 (3)
Ala	1.6 (1)	Trp	0 (0)
Val	10.1 (11)	Arg	4.5 (4)
		Total:	(70)

b. Peptid-Mapping von N^α-Acetyl-eglin C

Im folgenden Schema sind die Aminosäuresequenz von N^α-Acetyl-eglin C und die Spaltstellen für Trypsin und *Staphylococcus aureus*-Protease (V8) markiert (vgl. Zitat 31):



T: Spaltstellen für Trypsin; V8: Spaltstellen für *Staphylococcus aureus*-Protease (V8)

I) Tryptischer Abbau von N^α-Acetyl-eglin C

N^α-Acetyl-eglin C (9,6 mg, 1,18 μmol) werden in 2 ml 0,1 N Ammoniumacetat-Puffer; 10⁻³ M CaCl₂ suspendiert, der pH mit verdünntem Ammoniak wird auf 7,5 eingestellt und mit TPCK-Trypsin (Worthington, 500 μg) während 90 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 50 μl Eisessig gestoppt. Durch Zentrifugation entfernt man ein tryptisches Fragment (T₄) und trennt anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC den klaren Überstand in die übrigen tryptischen Fragmente (T₁-T₇) auf (vgl. obiges Schema). Die Analyse erfolgt mittels FAB-Mapping (30).

Der tryptische Abbau von N^α-Acetyl-eglin C (200 pmol) und die mikropräparative RP-HPLC-Isolierung von DABTC-Peptiden nach der Methode von R. Knecht et al. (32), sowie der Vergleich mit natürlichem Eglin C bestätigt die Identität der tryptischen Peptide T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ und T₇ (vgl. obiges Schema).

Das Peptid T₁ (Threonin am N-Terminus) weist in beiden Experimenten eine im Vergleich zum natürlichen Eglin C verschiedene Retentionszeit in einer HPLC-Analyse auf (Nucleosil 5/C18, 4,6 × 120 mm; 1,2 ml/min.; Elutionsmittel: 0,1 % Trifluoressigsäure; Acetonitril-Wasser 8:2 mit 0,07 % Trifluoressigsäure):

R_t 9,44 min. (zum Vergleich Peptid T₁ bei natürlichem Eglin C: R_t 7,34 min).

II. *Staphylococcus aureus*-Protease V8-Abbau des tryptischen Fragments T₄ von N^α-Acetyl-eglin C

Der Abbau von ca. 100 μg des tryptischen Fragments T₄ von N^α-Acetyl-eglin C (siehe oben) durch *Staphylococcus aureus*-Protease V8 wird in 100 μl 0,1 M Ammoniumacetat pH 8,0 bei 37°C während 4 h durchgeführt. Der Abbau ergibt die erwarteten Fragmente (vgl. obiges Schema; Gemischanalyse mittels FAB-MS).

c. Partielle Sequenzanalyse

I) Edman-Abbau

Das Misslingen der klassischen Sequenzanalyse nach Edman unter Standardbedingungen (33) (keine N-terminalen Aminosäurereste werden identifiziert) weist auf einen modifizierten (blockierten) N-Terminus beim N^α-Acetyl-eglin C hin.

II) Sequenzierung mittels FAB-MS

Das N-terminale tryptische Fragment „T₁“ hat laut FAB („fast atom bombardment“)-MS ein nominales Molekulargewicht von 951. Dieses liegt damit um 42 höher als im korrespondierenden T₁-Fragment aus natürlichem Eglin C (909). Auf Grund der Massendifferenzen muß die Modifikation an der N-terminalen Aminosäure Threonin vorliegen.

Die Molekulargewichte der übrigen tryptischen Fragmente aus obigem Experiment (Beispiel 27 bl) entsprechen den Erwartungen.

d) Molekulargewichtsbestimmung von N^α-Acetyl-eglin C

(Vergleich mit natürlichem Eglin C)

Probe 1 (N^α-Acetyl-eglin C) **Probe 2** (natürliches Eglin C aus Blutegelein)

Summenformel:	Summenformel:
C ₃₇₅ H ₅₂₂ N ₉₆ O ₁₀₈	C ₃₇₃ H ₅₅₀ N ₉₆ O ₁₀₇
chemisches Molekulargewicht	chemisches Molekulargewicht
gefunden: 8133,1	gefunden: 8091,4
berechnet: 8133,06	berechnet: 8091,03

Die chemischen Molekulargewichte sind gemittelt aus 3 verschiedenen Messungen (C12,011; H1,0079; N14,0067; O15,9994).

Experimentelle Bedingungen: ca. 30 µg Probe wird direkt in Thioglycerin als Matrix auf dem Probengeber gelöst, und mit einem ZAB-HF (Auflösung 1000)-Massenspektrometer der Fa. VG-Analytical Ltd. Manchester gemessen: Xenon bombardment; Ion energy 3 keV; scanning linear mode; Eichung: Csl/Rbl-Referenz Mischung

e. Isoelektrische Fokussierung:

Isoelektrischer Punkt IP	N ^α -Acetyl-eglin C 5,4
IP	natürliches Eglin C 6,5

Bedingungen: Je 20 µg Probe in 20 µl H₂O aufgetragen. PAGplate LKB-Ampholine pH3,5–9,5; 5% PAG 1 mm. Elektrolyt: Anode(+) 1M H₃PO₄, Kathode(–) 1N NaOH, 20 mA, 700 V, 2,5 Std. Färbung mittels 10% (wt/vol.) Trichloressigsäure-Lösung oder Coomassie Brilliant Blue R-250 in üblicher Weise.

f. Celluloseacetat-Elektrophorese (steigend)

N^α-Acetyl-eglin C: 4,7 cm vom Start Richtung Kathode

Eglin C: 5,8 cm vom Start Richtung Kathode

Bedingungen: Je 2 µg Probe in 2 µl H₂O aufgetragen auf Cellogel 8 × 17 cm Folie (Chemetron, Milano): Horiphor Flachbettelektrophoresekammer (Innovativ Labor), Elektrolyt pH 1,9, 250 Volt 1 Stunde; Nachweis mit den üblichen Färbereagentien, wie TDM, Ninhydrin, Ponceau S-Lösung (Biotec-Fischer).

g. Nachweis der N-Acetyl-Gruppe in N^α-Acetyl-eglin C

I) 100 µg N^α-Acetyl-eglin C werden in 100 µl 0,03 N Salzsäure für 16 Stunden bei 110°C partiell hydrolysiert und am Hochvakuum getrocknet. Mittels Gaschromatographie werden mehr als 0,5 Äquivalente Essigsäure identifiziert (34).

II) Die Acetylgruppe wird eindeutig mittels 360 MHz-Protonenresonanzspektroskopie im tryptischen Fragment „T₁“ (vgl. Beispiel 27B) identifiziert: 400 µg Fragment „T₁“ aus N^α-Acetyl-eglin C werden am Hochvakuum während 2 h getrocknet und in 1 ml D₂O gelöst. Das 360 MHz ¹H-NMR-Spektrum wird bei 297°K mit 4000 SW über Nacht gemessen. Referenz H₂O (δ 4,95 ppm).

δ 2,15 ppm Singulett (3H) CH₃ aus N-Acetyl-Gruppe

δ 1,2 ppm Dublett (3H, J = 7 Hz) γ-CH₃ aus Threonin.

Beispiel 28: Transformation verschiedener *E. coli*-Stämme mit dem Plasmid pML147 und Kultivierung der transformierten Wirtszellen.

In analoger Weise, wie in Beispiel 18d beschrieben, werden die Stämme *E. coli* LM1035, *E. coli* JA221 und *E. coli* W3110 trpR, trp Δ ED24 (vgl. Referenz 38) mit dem Plasmid pML147 transformiert. Transformierte Kolonien werden auf das Vorhandensein von F₁(C)–F₂–DNA geprüft, wie in Beispiel 15e beschrieben. Es werden 3, 5 bzw. 3 positive Kolonien erhalten, die die folgenden Bezeichnungen erhalten:

E. coli LM1035/pML147/1
E. coli LM1035/pML147/2
E. coli LM1035/pML147/3
E. coli JA221/pML147/1
E. coli JA221/pML147/2
E. coli JA221/pML147/3
E. coli JA221/pML147/4
E. coli JA221/pML147/5
E. coli W3110trpR, Δ trpED24/pML147/1
E. coli W3110trpR, Δ trpED24/pML147/2
E. coli W3110trpR, Δ trpED24/pML147/3

Die genannten Klone werden in einem modifizierten M9-Medium kultiviert, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	9,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	3,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,015 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
Casaminoacids	7,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Vitamin B ₁	0,0099 g
Eisen-II-citrat	0,006 g
MOPS (3–Morpholinopropan–1–sulfonsäure)	34,0 g
Glucose	20,0 g
Ampicillin	0,1 g

Es wird bei 37°C und 180 upm solange kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 13,0 erreicht hat. Anschließend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris · HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min. in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C werden die

Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5mal wiederholt. Anschließend wird die Mischung 30 min. bei 16000upm bei 4°C zentrifugiert.

Jeder der Klone wird auf die Bildung von Eglin C-Aktivität getestet, wie in Beispiel 21 beschrieben. In den Bakterienextrakten werden Eglin C-Aktivitäten von 3,0–13 µg/ml Kultur erhalten. Beispielsweise werden die folgenden Aktivitäten erhalten:

Stamm	Eglin C-Aktivität (µg/ml Kulturlösung)
E. coli LM1035/pML147/1	3,0
E. coli JA 221/pML147/1	6,0
E. coli W3110trpR, trpΔED24/pML147/1	11,0

Beispiel 29: Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110trpR, trpΔED24/pML147/1 und Aufarbeitung der Kulturbühe

In analoger Weise, wie in Beispiel 28 beschrieben, werden in einem 5000l Fermenter **E. coli** W3110trpR, trpΔED24/pML147/1-Zellen in 3000l modifiziertem M9-Medium kultiviert, bis die Suspension eine optische Dichte (OD_{623}) von ca. 10–13 erreicht hat. Die Kulturbühe (pH 7,4) wird auf 10°C abgekühlt, und die Zellen werden mit einer Alfa-Laval BRPX-207 Entschlammvorrichtung behandelt. Der klare Überstand enthält keine Eglin-Aktivität und wird verworfen. Während der Entschlammung wird der Schlammraum fortwährend mit Lysepuffer A (50 mM Tris · HCl, 30 mM NaCl, eingestellt mit HCl auf pH 8,0) teilentschlamm und am Schluß der Inhalt der Zentrifugenschale (7 l) unter voller Entschlammung mit Lysepuffer A ausgestoßen. Die erhaltene Zellmasse wird mit Puffer A auf 375l eingestellt und besitzt einen pH-Wert von 7,6. Nach dem Kühlen auf 5–10°C wird die Suspension durch eine Dyno-Mühle (Typ KD5) geleitet, welche mit 4,2l Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5–0,75 mm ausgerüstet ist. Dabei werden die Zellen zerstört. Die so erhaltene Suspension wird mit Essigsäure auf einen Essigsäuregehalt um 2% (v/v) eingestellt und über Nacht bei 10°C gerührt. Die Suspension mit einem pH von 3,9 wird mit der oben beschriebenen Technik entschlammt. Der klare Überstand von 300l wird in einem Fallfilmverdampfer (Stundenleistung 60l Wasser) auf 35l aufkonzentriert. Das leicht trübe Konzentrat wird zentrifugiert und der so erhaltene klare Überstand auf einer Ultrafiltrationsanlage DDS = Lab 35, welche mit GR81 PP Membrane bestückt ist (Fläche 2,5 m²), gegen 2% Essigsäure diafiltriert. Das Endvolumen beträgt 31l.

Ein aliquoter Test von 2l dieser klaren Proteinlösung wird auf eine Sephadex G-50 F-Säule (KS370 Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 96l aufgetragen, wobei die Säule mit 2% Essigsäure äquilibriert ist. Die in 15l Eluat enthaltene Hauptfraktion wird mittels Ultrafiltration eingengt und anschließend gegen Wasser diafiltriert. Die so erhaltene klare wäßrige Lösung wird lyophilisiert. Der Rückstand besteht aus reinen Eglin C-Verbindungen.

Beispiel 30: Analyse des Produktgemisches aus der Fermentation von E. coli W3110trpR, trpΔED24/pML147/1

Der in Beispiel 29 erhaltene, aus Eglin C-Verbindungen bestehende Rückstand wird einer HPLC-Analyse unterworfen.

Experimentelle Bedingungen: Vydac 218 TP510-RP-HPLC-Säule, 10 × 250 mm; 1 mg Eglin-Verbindungen pro Trennung; AUFC: 2,0 bei 220 nm; Durchflußgeschwindigkeit: 2 ml/min; Eluent: A: 0,1% Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07% Trifluoressigsäure, 1 min. 40% B, dann während 30 min. auf 60% B steigern.

Ergebnis: Es werden sieben Produkte identifiziert, die fraktioniert und einzeln dem HLE-Test unterworfen werden. Außerdem werden die isoelektrischen Punkte (IP; isoelektrische Fokussierung wie in Beispiel 27e beschrieben, LKB-Ampholine pH 4,0–6,5) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Fraktion	Retentionszeit (min)	IP	HLE
FO	28,2	6,5	+
F1	29,1	6,4 6,3	+
F1A	30,0	5,3	
F2	31,2	5,4	+
F3	33,8	4,8	+
F4 F4A	34,6 35,4	4,8	+

Beim Hauptprodukt (Fraktion F2) handelt es sich auf Grund des gemessenen isoelektrischen Punktes, des HPLC-Wertes und der zur Kontrolle durchgeführten Molekulargewichtsbestimmung (gefundenes Molekulargewicht: 8133,2) um N^α-Acetyl-eglin C. Die Substanz in Fraktion 0 (FO) ist natürliches Eglin C, wie der isoelektrische Punkt, der HPLC-Wert und die zur Kontrolle durchgeführten Molekulargewichtsbestimmung (gefundenes Molekulargewicht: 8091,2) beweisen.

Beispiel 31: Synthese von modifizierten Eglin C-Verbindungen durch E. coli HB101-Zellen, die mit dem Plasmid pML147 (C') bzw. pML147 (C'') transformiert wurden

Die Stämme *E. coli* HB101 pML147 (C') und *E. coli* HB 101 pML147 (C'') werden, wie in Beispiel 22 beschrieben, kultiviert, und nach dem Zellaufschluß wird die Kulturbrühe durch Chromatographie an einer Anhydrochymotrypsin-Säule (vgl. Beispiel 25) gereinigt.

Durch HPLC-Trennung (Bedingungen: siehe Beispiel 30) werden aus der Kulturbrühe von *E. coli* HB 101 pML147 (C') zwei Produkte (A und B) isoliert. Produkt A bei der Disk-Elektrophorese (pH 8,9, 15%iges Gel; entsprechend einem Maurer-System Nr. 2) einen R_F-Wert von 0,42 auf. Der Abbau mit Trypsin ergibt 7 Fragmente, von denen 6 mit den durch Abbau von N^α-Acetyl-eglin C gewonnenen Fragmenten (vgl. Beispiel 27b) identisch sind. Das 7. Fragment, entsprechend den N-Terminus des Peptids, besteht laut Aminosäure-Sequenzanalyse nach Edman (33) aus der Sequenz Ser-Clu-Leu-Lys. Produkt A hat damit die für Eglin C' erwartete Struktur:

SerCluLeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuPro
GluGlySerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGly
ThrAsnValValAsnHisValProHisValGly.

Produkt B ergibt beim tryptischen Abbau ebenfalls 7 Fragmente. Ein Unterschied zu Produkt A besteht nur im N-terminalen Fragment, welches eine zusätzliche N-Acetylgruppe am Serin-Rest trägt und somit die Sequenz N-Acetyl-Ser-Clu-Leu-Lys aufweist. Produkt B ist damit als N^α-Acetyl-eglin C' zu bezeichnen.

Aus dem Aufschluß der kultivierten *E. coli* HB101 pML147 (C'')-Zellen läßt sich nach Chromatographie an einer Anhydrochymotrypsin-Säule und Feinreinigung mit HPLC nur ein Produkt identifizieren (Produkt C). Produkt C weist bei der Disk-Elektrophorese (Bedingungen wie oben) einen R_F-Wert von 0,30 auf. Der tryptische Abbau ergibt als N-terminales Fragment das Dipeptid Leu-Lys; die übrigen Fragmente sind mit den entsprechenden, beim tryptischen Abbau von N^α-Acetyl-eglin C isolierten Fragmenten identisch. Produkt C hat damit die für Eglin C'' erwartete Struktur:

LeuLysSerPheProGluValValGlyLysThrVal
AspGlnAlaArgGluTyrPheThrLeuHisTyrProGlnTyrAspValTyrPheLeuPro
GluGlySerProValThrLeuAspLeuArgTyrAsnArgValArgValPheTyrAsnProGly
ThrAsnValValAsnHisValProHisValGly.

Beispiel 32: Enzymatische Synthese von N^α-Acetyl-eglin C

8 mg (1 μMol) Eglin C (gewonnen gemäß Beispiel 26c mit anschließender Feinreinigung durch HPLC) werden in einem 0,06 M Phosphatpuffer pH 7,5 mit 0,5 μMol Acetyl-Coenzym A und ca. 200 μg eines N^α-Acetyltransferase enthaltenden *E. coli* HB101-Extraktes versetzt. Die Inkubation wird bei 37°C durchgeführt. Nach 3 Stunden wird das Enzym durch Erhitzen auf 60°C inaktiviert und die Mischung der HPLC-Reinigung unterworfen. Das abgetrennte N^α-Acetyl-eglin C ist mit dem biosynthetischen Produkt (vgl. Beispiel 26c) identisch.

Beispiel 33: Test-Kit mit monoklonalen anti-Eglin C-Antikörpern zur Bestimmung von Eglin C, kompetitiver Radio-Immunoassay

Eine nach Beispiel 24c C) hergestellte Lösung von anti-Eglin C-Antikörpern wird mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung) auf eine Konzentration von 1 μg pro 100 μl verdünnt. 100 μl dieser Lösung werden 2 Stunden bei 37°C in Plastik-Röhrchen oder auf Plastik-Mikrotiterplatten inkubiert, wobei Antikörper unspezifisch auf die Plastikoberfläche adsorbiert werden. Zur Absättigung der noch freien aktiven Stellen auf der Plastikoberfläche wird mit einer Bovinserum-Albumin-Lösung (BSA-Lösung) nachbehandelt.

Verdünnungsreihen einer Probelösung oder der Standardlösung in BSA-Lösung werden mit je 50 μl einer Lösung von nach bekannter Weise (20) mit radioaktivem ¹²⁵Jod markiertem Eglin C der Aktivität 10 000 cpm pro 50 μl versetzt und dann auf der Plastikoberfläche 2 Stunden bei 37°C und anschließend 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Röhrchen oder Mikrotiterplatten werden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Die Konzentration von Eglin C in der Probelösung wird durch eine mit Standardlösung gemessene Eichkurve bestimmt.

Ein Test-Kit für den beschriebenen Radio-Immunoassay enthält:

- 2 ml Lösung von anti-Eglin-Antikörpern aus Beispiel 24c C) mit einer Konzentration von 1 bis 10 mg pro ml,
- 100 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung)
- 100 ml 0,3 % Bovinserum-Albumin und 0,1 % Natriumazid in PBS-Lösung (BSA-Lösung),
- 2 ml Lösung von radioaktivem Eglin C der Aktivität 200 000 cpm/ml,
- 2 ml Standardlösung enthaltend 100 ng/ml Eglin C,
- 1 ml-Röhrchen oder Mikrotiterplatten aus Plastik.

Beispiel 34: Test-Kit für Tandem ELISA mit monoklonalen anti-Eglin C Antikörpern

Auf Mikrotiterplatten werden 300 ng/Vertiefung monoklonale Antikörper 299S18-20, gelöst in Natriumkarbonat-Fixierungspuffer (pH 9,6), durch Inkubation über Nacht bei 4°C fixiert. Die Platten werden dreimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, enthaltend 0,005 % Tween 20 (H7,2) gewaschen und die Vertiefungen anschließend über Nacht bei 4°C mit 200 μl/Vertiefung phosphatgepufferter Kochsalzlösung enthaltend 0,2 % Gelatine und 0,02 % Natriumazid (PBS + Gelatine + A) behandelt. Wie zuvor wird dreimal gewaschen. Verschiedene Konzentrationen von Eglin C verdünnt in PBS + Gelatine + A werden zugefügt und 4 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wie zuvor wird mit 100 μl/Vertiefung einer Mischung vom zweiten monoklonalen Antikörper (299S22-1) gekuppelt an alkalische Phosphatase bei optimalem Titer (0,5 mg/ml Konjugat, für den Test 1:200 verdünnt mit PBS + Gelatine + A) versetzt und 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, worauf nach Zugabe von 150 μl p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer (pH 9,8) die Farbe entwickelt wird. Die Farbintensität (OD₄₀₅) wird während einer Stunde alle 15 Minuten mit einem Multiscan ELISA Ablesegerät festgestellt.

Anhand einer Eichkurve mit bekannten Mengen natürlichem Eglin C, z. B. von 10^1 bis 10^3 ng/ml, wird durch Vergleich der gemessenen OD_{405} der Gehalt an Eglin C in der zu untersuchenden Probe festgestellt.

Die Methode ist auch anwendbar zur Bestimmung von Eglin B oder einem anderen Eglin, z. B. N^α-Acetyl-eglin C, und ist auch anwendbar, wenn die zu bestimmenden Egline sich im Plasma, z. B. in Ratten-, Katzen- oder Kaninchen-Plasma, befinden. Ein Test-Kit für diesen Tandem ELISA umfaßt die dafür notwendigen Reagentien, insbesondere monoklonale anti-Eglin Antikörper, z. B. 299S18-20 und 299S22-1, gegebenenfalls als Lösung in dem zu benutzenden Puffer, die zu benutzenden Puffer, inklusive den Substratpuffer, Waschlösungen, p-Nitrophenylphosphat als Substrat, eine Standardlösung enthaltend das zu bestimmende Eglin, z. B. Eglin C, eine Plastikmikrotiterplatte, und/oder gegebenenfalls eine Tabelle oder Eichkurve, z. B. die folgende; erhalten gemäß vorstehend beschriebenem Tandem ELISA:

Natürliches Eglin C (ng/ml)	OD_{405}
10^0	0.09
10^1	0.18
10^2	0.73
10^3	1.23
N ^α -Acetyleglin C (ng/ml)	OD_{405}
10^0	0.08
10^1	0.32
10^2	1.00
10^3	1.26

Beispiel 35: Pharmazeutisches Präparat enthaltend N^α-Acetyl-eglin C für parenterale Applikation

Eine gemäß Beispiel 24 oder 25 hergestellte, N^α-Acetyl-eglin C enthaltende Lösung wird gegen eine 0,9%ige NaCl-Lösung dialysiert. Die Konzentration der Lösung wird danach durch Verdünnen mit der gleichen NaCl-Lösung auf 1 mg/ml oder 10 mg/ml eingestellt. Diese Lösungen werden durch Ultrafiltration (Membranen mit 0,22 μ m Poren) sterilisiert.

Die sterilisierten Lösungen sind direkt verwendbar für die intravenöse Verabreichung, für die Dauertropfinfusion, sowie zur Vernebelung in einem Inhalationsgerät (z. B. Bird).

Die erfindungsgemäß erhaltenen monoklonale anti-Eglin Antikörper produzierenden Hybridomzellen wurden am Oktober 1984 in der „Collection Nationale de Cultures de Microorganismes“ des Institut Pasteur, Paris, Frankreich unter den folgenden Nummern hinterlegt:

Hinterlegung am 06. November 1984, hinterlegte Hybridomzellen und Hinterlegungs-Nummern: 299s18-20 nr. i-361, 299s22-1 nr. i-362, 299s22-10 nr. i-363.

Beispiel 36: Expression von Eglin in Hefe

Ein für die Expression von fremden Genen in Hefe geeignetes System erfordert einen starken Hefepromoter, vorzugsweise einen induzierbaren Promoter, und ein Hefe-Transkriptions-Stopsignal, welche hintereinander geschaltet sind und durch für die Einfügung von fremden Genen geeigneten, einmalig vorkommenden Restriktionsstellen getrennt sind. Ein Expressionsvektor enthält außerdem DNA Sequenzen aus Hefe, welche die autonome Replikation in Hefe erlauben und zu einer hohen Kopienzahl des Plasmids führen. Bei diesen Sequenzen handelt es sich vorzugsweise um Hefe-2 μ -Sequenzen. Der Vektor enthält weiterhin ein Hefe-Selektionsgen, vorzugsweise des LEU2-Gen der Hefe, sowie pBR322-DNA Sequenzen mit dem Replikationsursprung und dem Ampicillin-Resistenzgen für eine Vermehrung in E. coli.

Ein geeignetes Expressionssystem, das die beschriebenen Anforderungen erfüllt, ist der Europäischen Patentanmeldung Nr. 100,561 beschrieben worden und hat sich als sehr leistungsfähig in Hefe herausgestellt. Fremde Gene werden unter der Kontrolle des induzierbaren PHO5 Promoters der sauren Phosphatase der Hefe exprimiert. PHO5 Promoter, fremdes Gen und PHO5 Transkriptions-Stopsignale sind nacheinander im Plasmid pJDB207 angeordnet. Das Plasmid enthält Hefe-2 μ -Sequenzen, das LEU2-Gen der Hefe, und den Replikationsursprung und das Ampicillin-Resistenzgen von E. coli.

Das Expressionsplasmid pJDB207R/PHO5-EGL wird wie folgt hergestellt:

a) Isolierung des pJDB207 Vektorfragmentes:

6 μ g des Plasmids pJDB207R/IF (α -3) (EP 100,561) werden vollständig mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut. Die resultierenden DNA-Fragmente einer Größe von 6,85 kb und 1,15 kb werden mit Ethanol gefällt und in 400 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. 4,5 Einheiten Kälberdarm-alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim) werden hinzugefügt. Die Mischung wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Phosphatase durch 1,5stündige Inkubierung bei 65°C inaktiviert. Die Lösung wird auf 150 mM NaCl eingestellt. Die DNA-Lösung wird auf einen DE 52 (Whatman) Anionenaustauscher (100 μ l-Bett), welcher mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 enthaltend 150 mM NaCl und 1 mM EDTA äquilibriert worden ist, aufgetragen. Nach dem Waschen mit dem gleichen Puffer wird die DNA mit 400 μ l 1,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA eluiert und mit Ethanol gefällt. Das große 6,85 kb BamHI-Fragment wird auf einem 0,6%igen niedrigschmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 von dem kleinen Fragment abgetrennt.

b) Isolierung des 534 bp PHO5 Promoterfragmentes

10 μ g des Plasmids p31/R (EP 100,561) werden mit den Restriktionsendonuklearen EcoRI und BamHI verdaut. Die 3 resultierenden Fragmente werden auf einem 0,6%igen niedrigschmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 getrennt. Das 534 bp BamHI-EcoRI-Fragment, welches den PHO5-Promoter anschließend des mRNA-Starts enthält, wird isoliert.

c) Isolierung eines 221 bp DNA-Fragmentes, welches die Eglin-Kodiersequenz enthält

8 μ g des Plasmids pML 147 werden mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI verdaut. Die 2 resultierenden DNA-Fragmente werden auf einem 0,6%igen niedrigschmelzenden Agarosegel in Tris-Borat-EDTA-Puffer pH 8,3 getrennt. Das 221 bp

d) Ligierung der DNA-Fragmente

Die drei oben beschriebenen und passende kohäsive Enden aufweisenden DNA-Fragmente werden in einer Reaktion ligiert. 0,1 pmol (0,45 µg) des 6,85 kb BamHI-Vektorfragmentes, 0,1 pmol (70 ng) des 534 bp BamHI-EcoRI-PHO5-Promoterfragmentes und 0,2 pmol (29 ng) des 221 bp EcoRI-BamHI-Fragments von pML 147 werden ligiert. Die 3 DNA-Fragmente sind in kleinen Gelblöcken von niedrigschmelzender Agarose enthalten. Die drei Agarosegelblöcke werden vereinigt, bei 65°C verflüssigt und 2fach verdünnt. Die Ligierung wird in einem Volumen von 270 µl von 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP mit 16 Einheiten T4 DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) bei 15°C während 16 Stunden durchgeführt. Ein Aliquot der Ligiermischung (10 µl) wird zu 100 µl Kalzium-behandelten, Transformationskompetenten *E. coli* HB101-Zellen hinzugefügt. 24 transformierte, amp^R Kolonien werden separat in LB Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthält, kultiviert. Das Plasmid DNA wird nach der Methode von Holmes et al. (Anal. Biochem. **114**, 193 [1981]) gewonnen und wird durch einen HindIII/EcoRI-Doppelverdau analysiert. Das Auffinden eines 600 bp-EcoRI-HindIII-Fragments beweist, daß der Einbau des PHO5-Promoter-Eglin C-DNA-Fragments in den Expressionsvektor in der richtigen Orientierung erfolgt ist. Wie erwartet besitzen ungefähr 50% der Klone den Einschub in der richtigen Orientierung. Einer dieser Klone wird isoliert und als pJDB207/PHO5-EGL bezeichnet.

e) Transformierung von *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18

Das Plasmid pJDB207R/PHO5-EGL wird in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm GRF 18 (α , his 3–11, his 3–15, leu 2–3, leu 2–112, can^R) gemäß der Transformationsvorschrift von Hinnen et al. (4) eingebracht. Transformierte Hefezellen werden auf Hefe-Minimalmediumplatten (ohne Leucin) selektiert. Einzelne transformierte Hefekolonien werden isoliert und als *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18/pJDB207R/PHO5-EGL bezeichnet.

f) Fermentierung von *S. cerevisiae* GRF18/pJDB20 R/PHO5-EGL

Zellen von *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/PHO5-EGL werden in 300 ml Hefe Minimalmedium (Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, dem 2% Glukose und 20 mg/l L-Histidin zugegeben wurde) unter Schütteln bei 30°C während 24 Stunden in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben bis zu einer Dichte von 3×10^7 Zellen/ml kultiviert. Die Zellen werden mit 0,9% NaCl gewaschen und dazu verwendet, 3 l eines niedrig P_i-Minimalmediums, welches nach der Vorschrift des Difco Yeast Nitrogen Base-Mediums (ohne Aminosäuren) — mit 0,03 g/l KH₂PO₄, 1 g/l KCl, 10 g/l L-Asparagin an Stelle von (NH₄)₂SO₄, 2% Glukose und 1 g/l L-Histidin hergestellt wurde. Das Medium wird auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,25 eingestellt. Die Zellen werden in einem MBR Mini-Bioreaktor während 24 Stunden unter Rühren (500 rpm) bei 30°C kultiviert und bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 1,9 geerntet.

Beispiel 37: Gewinnung von Eglin C und N^α-Acetyl-Eglin C aus transformiertem *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18/pJDB 207R/PHO5 EGL

Eglin C und N^α-Acetyl-Eglin C werden aus einem *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm, der mit einem Plasmid, welches das Eglin C Strukturen enthält, isoliert. Die Produkte werden in einem Verhältnis von 2:1 (w/w) und gemäß reversed phase HPLC in einer Ausbeute von 15–20 mg Kulturbrühe exprimiert. Die *S. cerevisiae*-Zellen werden bis zu einer Zelldichte (O. D. bei 600 nm) von 1,9 kultiviert, wie in Beispiel 36f beschrieben.

Die Kulturbrühe (3 l) der transformierten Hefezellen wird auf 4°C abgekühlt und zentrifugiert. Die Zellen im Zentrifugationsniederschlag werden in 150 ml Puffer (50 mM Phosphat pH 7,4, 4 mM Zwittergent [Calbiochem.]) resuspendiert und mit Glaskugeln zerschlagen. Die homogenisierte Lösung wird zentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen 2%iger Essigsäure verdünnt. Die Suspension wird 15 Min. bei 4000 upm zentrifugiert, der Niederschlag abgetrennt und der trübe Überstand erneut 60 Min. bei 1200 upm zentrifugiert. Der klare Überstand wird durch eine kationische Austauschersäule (Carboxymethylcellulose, Bettvolumen 32 ml) bei pH 4 gegeben (1 Bettvolumen als Startpuffer). Die Elution wird mit einem linearen Salzgradienten von 5 Bettvolumen Puffer A und 5 Bettvolumen Puffer B durchgeführt (Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat, pH 4,0; Puffer B: 200 mM Ammoniumacetat, pH 6,5; 43 ml Durchfluß pro Stunde; Fraktionsgröße 14 ml). N^α-Acetyl-Eglin C wird in den Fraktionen 29–31 (15 mg) gewonnen und, wie beschrieben, weiter durch semipräparative reversed phase HPLC gereinigt (Ausbeute: 8 mg).

Eglin C wird in den Fraktionen 32–33 (24 mg) gewonnen, lyophilisiert und weiter durch Chromatographie an einer Diethylaminoethylcellulose-Kolonne (DE 53, Whatman, 32 ml Bettvolumen) gereinigt. Das Produkt wird in 15 ml Startpuffer (pH 7,6) gelöst, auf die Säule gebracht und mit einem Bettvolumen Puffer A gewaschen. Mehr als 90% (bezogen auf den Gesamtproteingehalt) reines Eglin C eluiert mit den Fraktionen 48–54, wobei man einen linearen Salzgradienten benutzt (Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat pH 7,6, 5 Bettvolumen;

Puffer B: 200 mM Ammoniumacetat pH 5,0, 5 Bettvolumen; Durchfluß 42 ml/Stunde, Fraktionsgröße 3,8 ml [5 Min.]). Reine Fraktionen (gemäß isoelektrischer Focussierung) werden vereinigt und dreimal lyophilisiert (Ausbeute 18 mg).

Die beiden gewonnenen Egline werden untersucht und chemisch charakterisiert, wie in den Beispielen 27–30 beschrieben.

Ergebnisse:

Eglin C	isoelektrischer Punkt	6,5
	Molekulargewicht (FAB-MS)	8091
	N-terminal Aminosäure	Thr
	HLE Inhibierung	+
N ^α -Acetyl-Eglin C	isoelektrischer Punkt	5,4
	Molekulargewicht (FAB-MS)	8133
	N-terminale Aminosäure	N ^α -Acetyl-Thr
	HLE-Inhibierung	+

Das aus transformierten Hefezellen gewonnene Eglin C hat die gleichen Retentionszeiten im HPLC wie das natürliche Eglin C aus 3lutegein. N^α-Acetyl-Eglin C aus transformierten Hefezellen hat die gleichen Retentionszeiten wie sein Gegenstück aus *E. coli*. Die Aminosäure-Zusammensetzungen und die übrigen Daten entsprechen den Erwartungen.

Beispiel 38: Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18/pJDB 207/PHO5-EGL in einem 30 l Fermenter

Der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18/pJDB 207 R/PHO5-EGL wird im folgenden Nährmedium (niedrig P_i) bis zu einer Zelldichte (O. D. bei 600 nm) von 1,87 kultiviert (Konzentrationen in g oder mg pro 1 l Lösung):

L-Asparagin · H ₂ O	10 g
L-Histidin	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,03 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
KCl	1,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
Cerelose (separat sterilisiert)	20 g
Borsäure	50 mg
CuSO ₄	5 mg
Kaliumjodid	10 mg
FeCl ₃	20 mg
MnSO ₄	40 mg
Natriummolybdat	20 mg
ZnSO ₄	40 mg
Kalziumpantothenat	40 mg
Folsäure	5 mg
Inositol	200 mg
Nikotinsäure	40 mg
Paraaminobenzoesäure	20 mg
Pyridoxalphosphat	40 mg
Riboflavin	20 mg
Thiamin	40 mg
Biotin-Lösung	(10 mg/100 ml 50 % Ethanol)

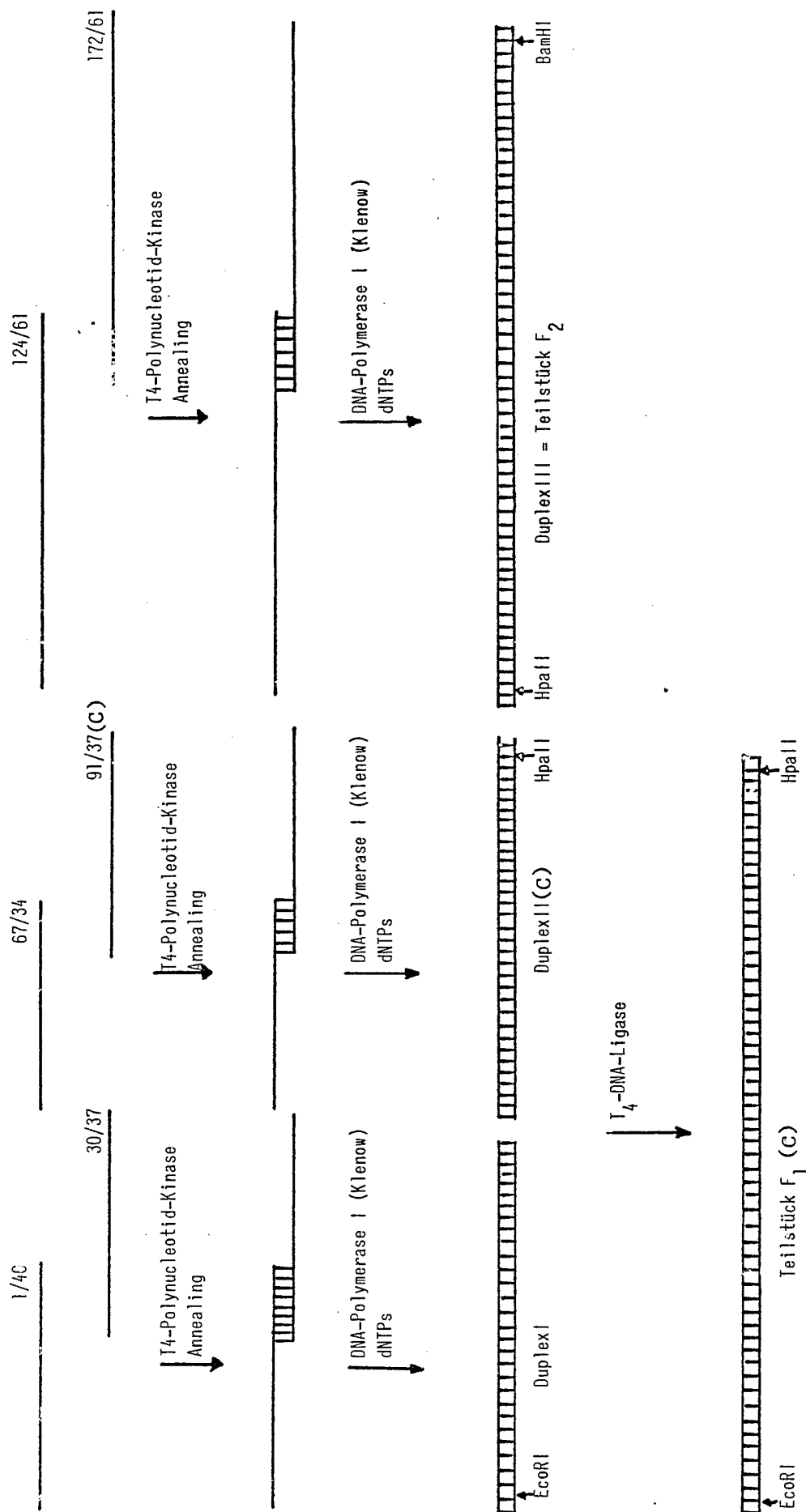
Bedingungen: pH-Kontrolle mit NaOH; niedere Grenze pH 4,6; Temperatur 30 °C. Testproben (insgesamt 8, jeweils 100 ml Kulturbrühe) werden alle 6 Stunden genommen. Die Zellen werden mechanisch zerschlagen und die klaren Überstände werden nach der Behandlung mit Essigsäure mittels RP-HPLC, PAGE und HLE-Inhibierung untersucht. Nach einer Fermentationszeit von 36 Stunden werden optimale Ausbeuten erhalten (4,4 mg N^α-Acetyl-Eglin C und 13,6 mg Eglin C pro 1 l Kulturbrühe). Die scheinbaren Molekulargewichte auf PAGE entsprechen den Erwartungen. Durch pH-Kontrolle mit einem niederen Limit von pH 5 und eine Fermentationsdauer von 30 Stunden unter den gleichen Bedingungen wird das Verhältnis zwischen den beiden Produkten zugunsten von Eglin C verschoben (Ausbeute: 6,4 mg/l; Ausbeute an N^α-Acetyl-Eglin C: 0,1 mg/l). Hefe-Eglin C und Hefe-N^α-Acetyl-Eglin C werden gewonnen und bis zur Homogenität gereinigt, wie in Beispiel 29 beschrieben.

Referenzen

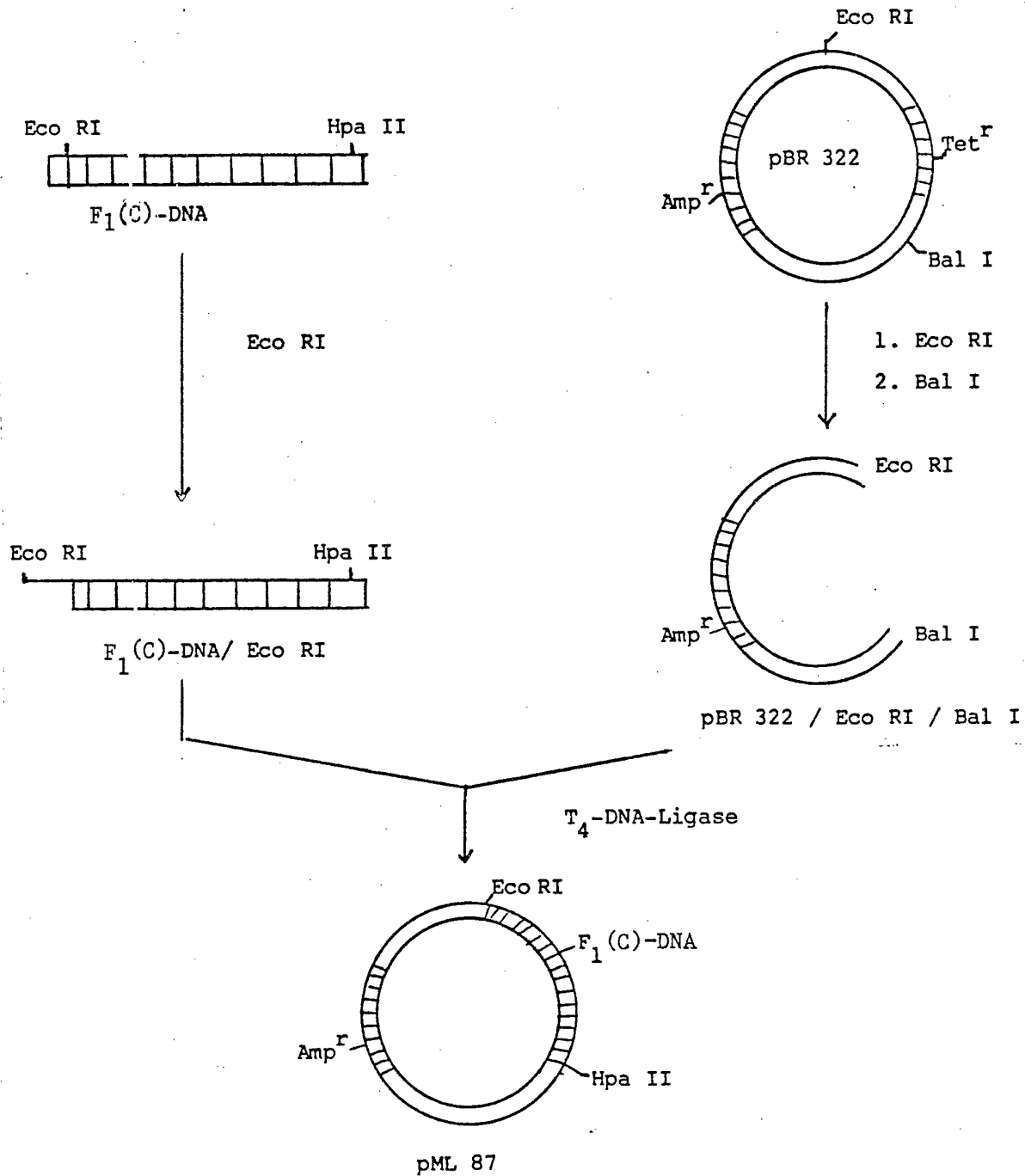
1. U. Seemüller et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 1105 (1977)
2. R. Knecht et al., Anal. Biochem. **130**, 65 (1983)
3. A. M. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 560 (1977); siehe auch Meth. Enzym. **65**, 499 (1980)
4. A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 1929 (1978)
5. Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. **81** 741 (1961)
6. M. Mandel et al., J. Mol. Biol. **53**, 159 (1970)
7. U. K. Laemmli, Nature **227**, 680 (1970)
8. S. Tsunasawa und F. Sakiyama, in Methods Enzymol. **106**, 165 (1984)
9. S. Alkan et al., Immunol. **20**, 203 (1983)
10. T. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1978
11. S. A. Narang, Tetrahedron **39**, 3 (1983)
12. K. L. Agarwal et al., Angew. Chem. **84**, 489 (1972)
13. C. B. Reese, Tetrahedron **34**, 3143 (1972)
14. R. L. Letsinger und W. B. Lunsford, J. Am. Chem. Soc. **98**, 3655 (1976)
15. K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. **103**, 706 (1981)
16. H. G. Khorana et al., J. Biol. Chem. **251**, 565 (1976)
17. S. A. Narang et al., Anal. Biochem. **121**, 356 (1982)
18. K. Itakura et al., J. Biol. Chem. **257**, 9226 (1982)
19. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (ed. T. Maniatis et al.), Cold Spring Harbor Lab., 1982, S. 125
20. A. E. Bolton und W. M. Hunter, Biochem. J. **133**, 529 (1973)
21. DE-OS 3 111 405 (Genentech)
22. A. C. Peacock et al., Biochemistry **6**, 1818 (1967)
23. W. Müller et al., J. Mol. Biol. **124**, 343 (1978)
24. M. Grunstein und D. S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3961 (1979)
25. Ish-Horowitz, in loc. cit. 19), S. 368
26. Köhler und Milstein, Nature **256**, 495 (1975)
27. H. Ako et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., **46**, 1639 (1972)
28. H. Fritz et al., in: „Methoden der enzymatischen Analyse“ (Hrsg. H. U. Bergmeyer), 3. Auflage, Weinheim 1974, S. 1105
29. S. Moore et al., J. Biol. Chem. **192**, 663 (1951), D. H. Spadman et al., Anal. Chem. **30**, 1190 (1958)
30. H. Morris et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. **117**, 299 (1983)
31. U. Seemüller et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **361**, 1841 (1980)
32. R. Knecht et al., Analyt. Biochem. **130**, 65 (1983)
33. W. F. Brandt et al., Z. Physiol. Chem. **357**, 1505 (1976)
34. A. Goldstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 725 (1977)

35. R. Wetzel und D. V. Goeddel, in „The Peptides“ (Hrsgb. E. Gross und J. Meienhofer), Academic Press, New York 1983, S. 1–64
36. J. G. Bieth, Bull. europ. physiopath. respirat. **16** (suppl.), 183 (1980)
37. L. Clarke und J. Carbon, J. Mol. Biol. **120**, 517 (1978)
38. D. S. Oppenheim und C. Yanofsky, J. Mol. Biol. **144**, 143 (1980)

Fig. 1: Syntheschema für die Teilstücke $F_1(C)$ und F_2 des Eglin C-Gens

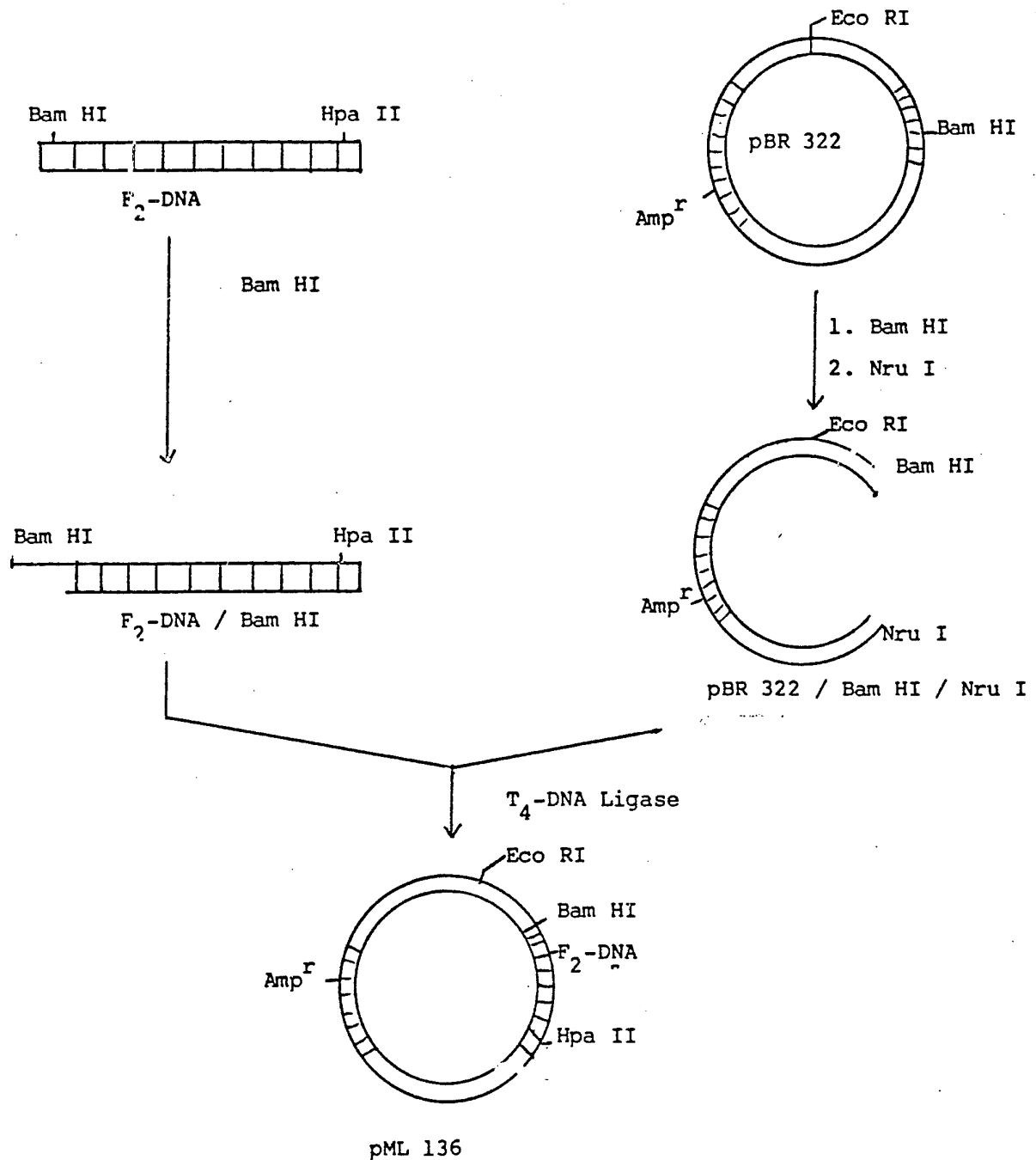


Figur 2: Konstruktion des Plasmids pML87

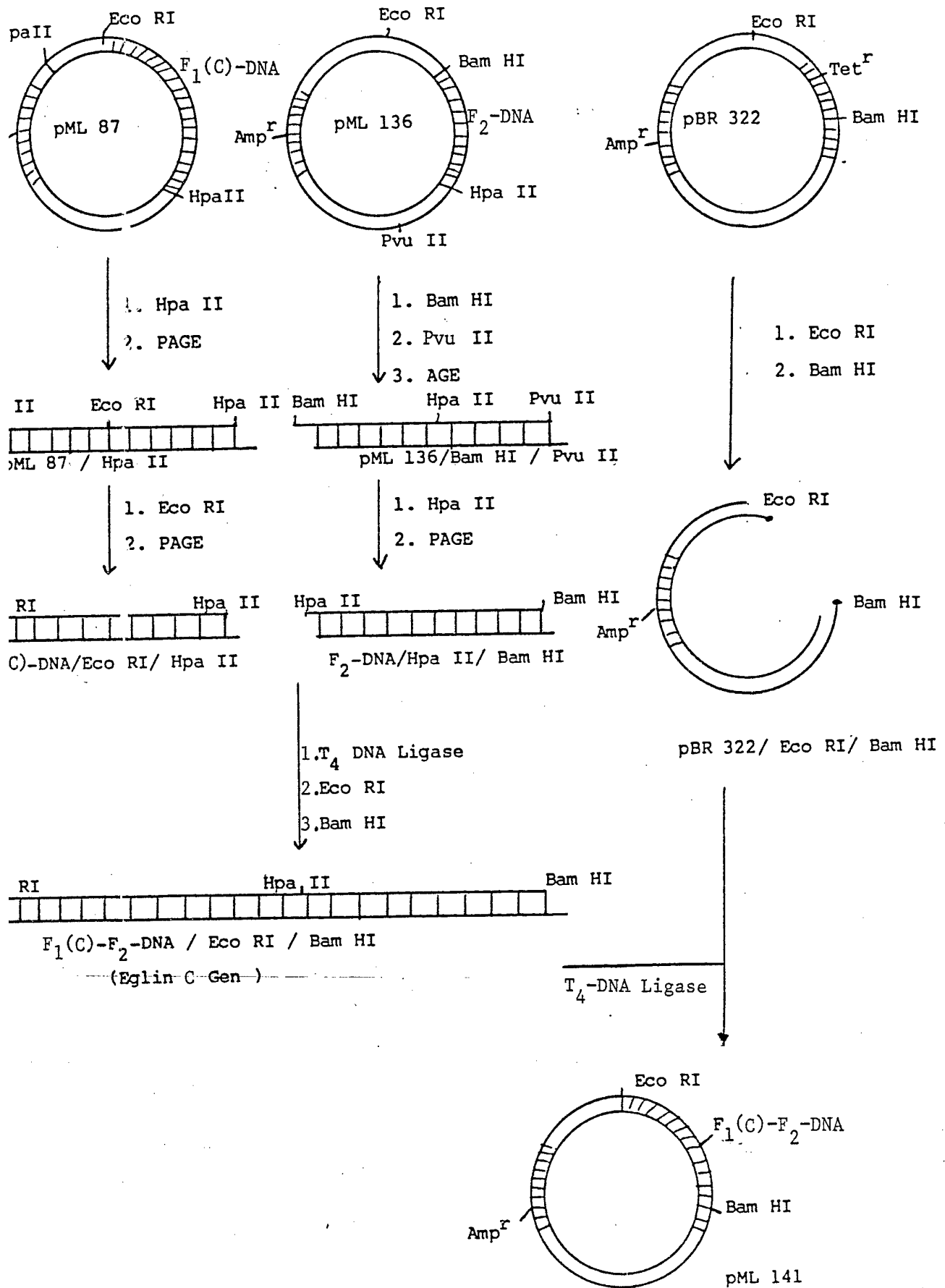


Figur 3: Konstruktion des Plasmids pML136

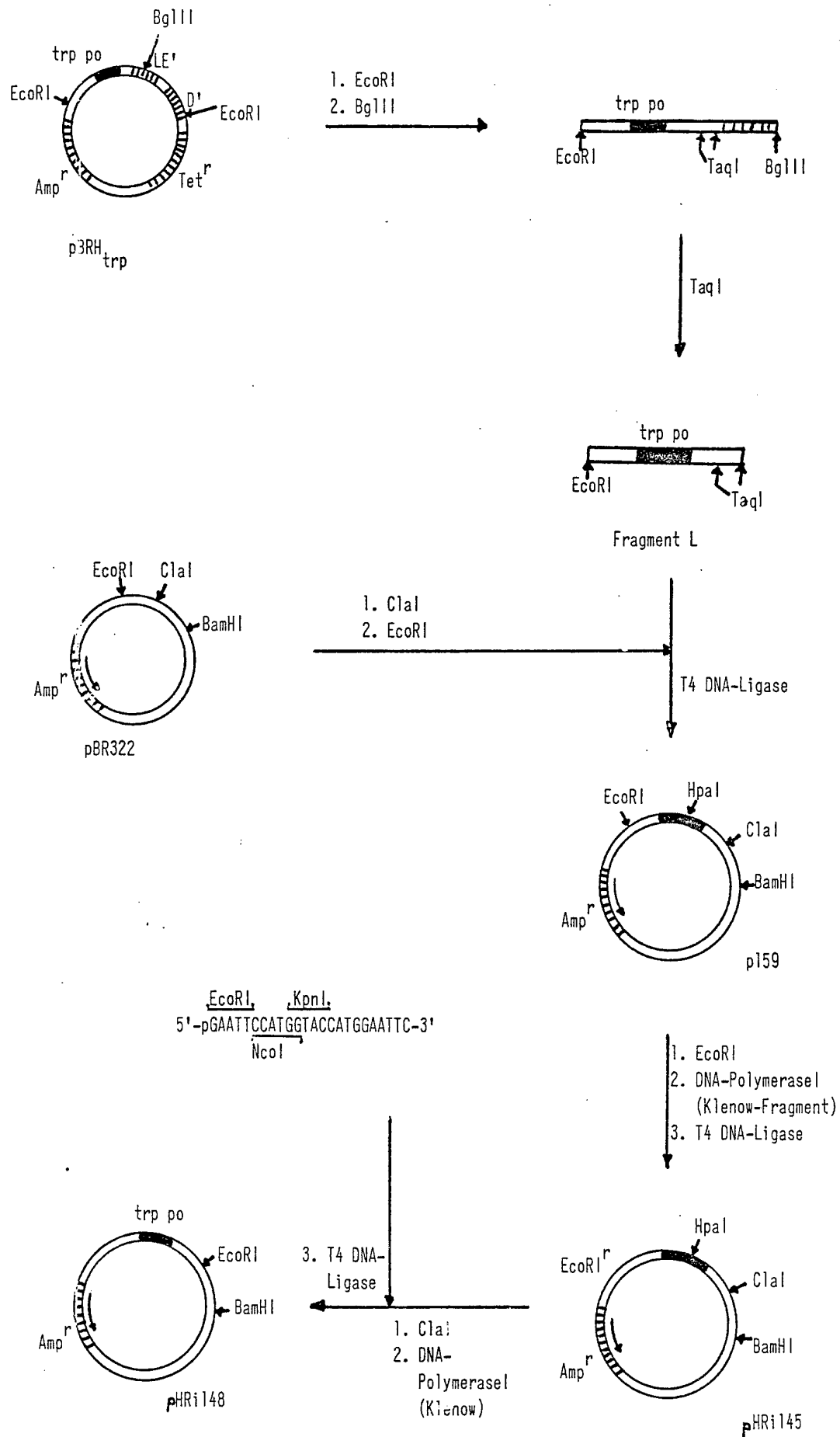
34



Figur 4: Konstruktion des Plasmids pML141



Figur 5: Konstruktion des Plasmids pHRi148



Figur 6: Konstruktion des Expressionsplasmids pML147

