



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 071

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2441 492
(31) 55126

(22) 04.07.80
(32) 05.07.79

(44) 30.05.84
(33) US

(71) siehe (73)
(72) GOEDDEL, DAVID V.;US;HEYNEKER, HERBERT L.;NL;
(73) GENENTECH INC.;SAN FRANCISCO, US

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER LEBENSFAEHIGEN KULTUR

(57) Die Erfindung betrifft die mikrobielle Expression von quasie-synthetischen Genen über die Herstellung eines sich replizierenden klonierenden Vektors. Die Erfindung stellt ein genetisches Verfahren zur Herstellung von medizinisch einsetzbarem, menschlichem Wachstumshormon dar. Erfindungsaufgabe ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines Polypeptids. Es werden Verfahren und Mittel für die Konstruktion und mikrobielle Expression quasi-synthetischer Gene beschrieben, die aus der Kombination von organischer Synthese und enzymatischer, reverser Transkription von Boten-RNA-Sequenzen hervorgehen, die vom Standpunkt des gewünschten Proteinprodukts unvollständig sind. Bevorzugten Produkten der Expression fehlen bioinaktivierende Führersequenzen, die in eukaryotischen Expressionsprodukten üblich sind, jedoch problematisch in bezug auf das mikrobielle Schneiden, das erst das bioaktive Material liefert. Eine bevorzugte Ausführungsform ist näher erläutert, bei der ein Gen, das für menschliches Wachstumshormon codiert (welches beispielsweise für die Behandlung von hypophysärem Zwergenwuchs benötigt wird), konstruiert und exprimiert wird.

244149 2

Berlin, den 11.4.1983
Ausscheidung I aus
AP C 12 N/222 413
(57 800/12)

Verfahren zur Herstellung einer lebensfähigen Kultur

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die mikrobielle Expression von quasi-synthetischen Genen über die Herstellung eines sich replizierenden klonierenden Vektors. Es gelingt dadurch die Bereitstellung eines menschlichen Wachstumshormons, das in der Medizin bei der Behandlung von hypophysärem Zwergenwuchs eingesetzt werden kann.

Bekannte technische Lösungen

Die DNA oder DNS (Desoxyribonucleinsäure) aus der Gene bestehen, enthält sowohl Protein codierende oder "Struktur"-Gene als auch Kontrollregionen, welche die Expression ihrer Information dadurch vermitteln, daß sie Bereiche (sites) für die RNS-Polymerase-Bindung, Information für ribosomale Bindestellen usw. bereitstellen. Codiertes Protein wird von der korrespondierenden DNS innerhalb eines Organismus durch einen vielstufigen Prozeß exprimiert, wobei:

1. das Enzym RNS-Polymerase in der Kontrollregion (im folgenden "Promotor" genannt) aktiviert wird und sich an den Struktur-Genen entlang arbeitet, wobei deren codierte Information in Boten-(Messenger)-Ribonucleinsäure (mRNS) transkribiert wird, bis die Transkription bei einem oder mehreren "Stop"-Codons beendet wird;

15 APR 1983*082998

244149 2 - 2 -

2. die mRNA-Botschaft an den Ribosomen in ein Protein translatiert wird, für dessen Aminosäuresequenz das Gen codiert, beginnend bei einem "Start"-Signal für die Translation, überwiegend einem ATG (das in "f-Methionin" translatiert wird).

In Übereinstimmung mit dem genetischen Code spezifiziert die DNA jede Aminosäure durch ein Triplet oder "Codon" von drei benachbarten Nucleotiden, die einzeln ausgewählt werden aus Adenosin, Thymidin, Cytidin und Guanin, die im folgenden A, T, C oder G genannt werden. Diese treten in dem codierenden Strang oder der codierenden Sequenz einer Doppelstrang-("Duplex")-DNA auf, dessen bleibender oder "komplementärer" Strang aus Nucleotiden ("Basen") gebildet wird, die mit den ihnen komplementären Basen im codierenden Strang Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. A ist komplementär zu T, und C ist komplementär zu G. Die bisher beschriebenen und weitere Erkenntnisse, die sich auf den Hintergrund der Erfindung beziehen, sind ausführlich diskutiert in Benjamin Lewin, Gene Expression, 1, 2 (1974) und 3 (1977) John Wiley und Sons, N. Y. Diese und andere Veröffentlichungen, die hier angesprochen sind, sind durch Verweis in die Offenbarung mit einbezogen.

Schneiden und Verbinden von DNA

Es steht eine Anzahl von Techniken für DNA-Rekombination zur Verfügung, nach denen aneinandergrenzende Enden separater DNA-Fragmente auf die eine oder andere Weise geschnitten werden, um das Verbinden zu erleichtern. Das Verbinden geschieht durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen

aneinandergrenzenden Nucleotiden, meistens durch die Wirkung eines Enzyms, einer T4-DNA-Ligase. Auf diese Weise können stumpfe Enden direkt miteinander verbunden werden. Alternativ dazu sind Fragmente mit komplementären Einzelsträngen an ihren aneinandergrenzenden Enden vorteilhaft, da durch die Wasserstoffbrückenbindungen die jeweiligen Enden in die Position für die anschließende Verbindung gebracht werden. Solche Einzelstränge, als kohäsive Enden bezeichnet, können dadurch gebildet werden, daß man an stumpfe Enden unter Verwendung einer terminalen Transferase Nucleotide anhängt, und manchmal einfach dadurch, daß ein Strang eines stumpfen Endes mit einem Enzym wie λ -Exonuclease abgeknabbert wird. Meistens jedoch verwendet man Restriktionsendonucleasen (im folgenden "Restriktionsenzyme"), die Phosphodiesterbindungen in und im Bereich von spezifischen Nucleotidsequenzen, die eine Länge von etwa 4 bis 6 Basenpaaren haben ("Restriktionserkennungsstelle"), schneiden. Es sind sehr viele Restriktionsenzyme und ihre Erkennungsstellen bekannt. Siehe z. B. R. J. Roberts, CRC Critical Reviews in Biochemistry, 123 (Nov. 1976). Viele davon machen versetzte Schnitte, wodurch kurze komplementäre Einzelstrangsequenzen an den Enden eines an sich doppelsträngigen Fragments entstehen. Als komplementäre Sequenzen können die überstehenden oder "kohäsiven" Enden durch Basenpaarung rekombinieren. Wenn zwei unterschiedliche Moleküle mit diesen Enzymen geschnitten werden, entsteht durch kreuzweise Paarung der komplementären Einzelstränge ein neues DNA-Molekül. Durch die Verwendung von Ligase, die die an den Verschmelzungspunkten bleibenden Einzelstrangbrüche heilt, erhalten die neuen DNA-Moleküle eine feste kovalente Bindung.

Restriktionsenzyme, die an geschnittener doppelsträngiger DNA "stumpfe" Enden hinterlassen, erlauben eine Rekombination mit anderen stumpfendigen Sequenzen durch beispielsweise T4-Ligase.

Klonierende Vektoren und rekombinante DNA

Für den vorliegenden Zweck wird folgendes "klonierender Vektor" genannt: ein nichtchromosomales Stück einer doppelsträngigen DNA, das ein intaktes Replikon enthält, so daß der Vektor repliziert werden kann, wenn er in einen einzelnen Organismus ("Mikrobe") durch Transformation gebracht wird. Ein auf diese Weise transformierter Organismus wird "Transformante" genannt. Derzeit sind die klonierenden Vektoren, die üblicherweise verwendet werden, von Viren und Bakterien abgeleitet und sind überwiegend Ringe von bakterieller DNA, genannt "Plasmide".

Die Fortschritte in der Biochemie haben in den letzten Jahren zur Konstruktion von "rekombinanten" klonierenden Vektoren geführt, die beispielsweise aus einem Plasmid, das exogene DNA enthält, bestehen. In besonderen Beispielen kann die Rekombinante "heterologe" DNA einschließen, wobei damit eine DNA gemeint ist, die für Polypeptide codiert, die normalerweise nicht durch den Organismus hergestellt werden, welcher empfindlich ist für die Transformation durch den rekombinanten Vektor. Es werden somit Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten, um lineare DNA, die verbindbare Enden hat, zur Verfügung zu stellen. Diese werden an ein exogenes Gen gebunden, das ebenfalls verbindbare Enden aufweist, um ein biologisch funktionierendes Teil zur Verfügung zu stellen, das ein intaktes Replikon und eine phänotypische Eigenschaft aufweist, die benutzt werden kann,

um Transformanten zu selektieren. Das rekombinante Teil wird durch Transformation in einem Mikroorganismus überführt, und die Transformante wird isoliert und geclont. Das Ziel ist, große Populationen zu erhalten, die Kopien des exogenen Gens enthalten, und in besonderen Fällen ist das Ziel die Expression des Proteins, für welches das Gen codiert. Über die hiermit verbundene Technologie und deren mögliche Anwendung ist in extenso berichtet in Miles International Symposium Series 10; Recombinant Molecules: Impact on Science and Society, Beers und Bosseff, eds., Raven Press, N. Y. (1977).

Expression von rekombinanter DNA

Neben der Verwendung von clonierenden Vektoren, um den Vorrat von Genen durch Replikation zu vergrößern, hat es Versuche gegeben, einige davon erfolgreich, tatsächlich eine Expression der Proteine zu erhalten, für die die Gene codieren. In einem ersten derartigen Versuch wurde ein Gen für das Hirnhormon Somatostatin unter dem Einfluß des lac-Promoters in einem E. coli Bakterium exprimiert (K. Itakura et al., Science, 198, 1056 (1977)). Kürzlich gelang auf diese gleiche Weise die Expression der A- und B-Kette des menschlichen Insulins, die zusammengefügt das Hormon bilden (D. V. Goeddel et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 76, 106 (1979)). In jedem Fall wurden die Gene vollständig durch Synthese konstruiert. In jedem Fall würden offensichtlich proteolytische Enzyme innerhalb der Zelle das gewünschte Produkt abbauen, wodurch dessen Herstellung in konjugierter Form nötig ist, d. h. als Tandem mit einem

anderen Protein, das das gewünschte Produkt durch Kompartimentierung schützt und das außerhalb der Zelle abgeschnitten werden kann, um das angestrebte Produkt zu erhalten. Diese Arbeit ist in den folgenden veröffentlichten englischen Patentschriften des Anmelders der vorliegenden Anmeldung beschrieben: GB-PS 2 007 675 A, 2 007 670 A, 2 007 676 A und 2 008 123 A.

Während sich der Weg über synthetische Gene in den bisher diskutierten, verschiedenen Fällen als zweckmäßig erwiesen hat, zeigten sich wirkliche Schwierigkeiten für den Fall von sehr viel größeren Proteinprodukten, z. B. Wachstums-hormonen, Interferon usw., deren Gene in korrespondierender Weise komplexer und weniger geeignet für eine leichte Synthese waren. Gleichzeitig wäre es wünschenswert, derartige Produkte ohne die Begleitung durch konjugierendes Protein zu exprimieren, da die Notwendigkeit von deren Expression die Verwertung von Material erfordert, das innerhalb des Organismus besser für die Konstruktion des angestrebten Produkts verwendet werden könnte.

In anderen Arbeiten ist die Expression von Genen versucht worden, die nicht durch organische Synthese erhalten wurden, sondern durch reverse Transkription von korrespondierender Messenger-RNA, die aus Gewebe gereinigt wurde. Dieser Versuch ist mit zwei Problemen behaftet. Erstens kann die reverse Transkriptase die Transkription von der mRNA kurz vor der Fertigstellung der cDNA für die komplette gewünschte Aminosäuresequenz beenden. So haben beispielsweise Villa-Komaroff et al. eine cDNA für Ratten-Proinsulin erhalten,

der die ersten drei Aminosäuren des Insulinvorläufers fehlten (Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 75, 3727 (1978)). Weiterhin hat die reverse Transkription von mRNA für Polypeptide, die in Vorläuferform exprimiert werden, eine cDNA für den Vorläufer ergeben, statt des bioaktiven Proteins, das man erhält, wenn in einer eukaryotischen Zelle Führersequenzen (im folgenden Leader-Sequenzen) enzymatisch abgetrennt werden. Bisher ist keine Bakterienzelle aufgezeigt worden, die diese Fähigkeit hätte, so daß das mRNA-Transkript eher die Expression von Produkten ergeben hat, die die Leader-Sequenz der Vorläuferform enthalten als das bioaktive Protein selbst (Villa-Komaroff, a. a. O. (Ratten-Proinsulin); P. H. Seeburg et. al., Nature, 276, 795 (1978) (Rattenwachstumshormon)).

Schließlich haben vergangene Versuche durch andere zur bakteriellen Expression menschlicher Hormone (oder deren Vorläufern) von mRNA-Transkripten gelegentlich nur zur Produktion des konjugierten Proteins geführt, das offensichtlich nicht dem extrazellulären Schneiden zugänglich ist, z. B. Villa-Komaroff, a. a. O. (Penicillinase-Proinsulin); Seeburg, a. a. O. (β-Lactamase-Wachstumshormon).

Menschliches Wachstumshormon

Menschliches Wachstumshormon ("HGH") wird abgesondert in der menschlichen Hypophyse. Es besteht aus 191 Aminosäuren und ist mit einem Molekulargewicht von etwa 21.500 mehr als dreimal so groß wie Insulin. Bis zur vorliegenden Erfindung konnte menschliches Wachstumshormon nur arbeitsaufwendig aus einem sehr limitierten Angebot gewonnen werden - der

Hypophyse aus menschlichen Leichen. Die daraus folgende Knappheit dieser Substanz hat ihre Anwendung bei der Behandlung von durch Funktionsstörung der Hypophyse verursachten hypophysärem Zwergenwuchs begrenzt, und sogar hier wird aufgrund zuverlässiger Schätzungen vermutet, daß vom Menschen abgeleitetes HGH nur in einer solchen Menge erhalten werden kann, daß nicht mehr als 50 % der Betroffenen damit behandelt werden können.

Ziel der Erfindung

Zusammengefaßt besteht daher eine Notwendigkeit für neue Methoden, um HGH und andere Polypeptidprodukte in großen Mengen herzustellen. Diese Notwendigkeit ist besonders akut in dem Fall, wenn Polypeptide zu groß sind, um organische Synthese zuzulassen oder, aus diesem Grund, mikrobiologische Expression von vollständigen synthetischen Genen. Die Expression von Säugetierhormonen von mRNA-Transkripten hat die Aussicht eröffnet, die Schwierigkeit, die dem synthetischen Versuch anhaften, zu umgehen, andererseits jedoch bis heute lediglich die mikrobielle Produktion von bioinaktiven Konjugaten erlaubt, von denen die gewünschten Hormone nicht brauchbar getrennt werden können.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung einer lebensfähigen Kultur zu entwickeln, die in einem mikrobiellen Organismus zur Expression eines speziellen Polypeptids mit bekannter Aminosäuresequenz fähig ist, bei dem ein für das Polypeptid codierendes Gen in einen klonierenden Vektor eingefügt und unter Kontrolle eines Expressionspromotors gebracht wird.

Erfindungsgemäß bereitgestellt wird somit ein Verfahren zum Herstellen einer lebensfähigen Kultur eines mikrobiellen Organismus, der einen sich replizierenden klonierenden Vektor trägt und der fähig ist, menschliches Wachstumshormon zu exprimieren, wobei ein für menschliches Wachstumshormon codierendes Gen in einen klonierenden Vektor inseriert und unter die Kontrolle eines Expressionspromotors gestellt ist. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß

- ein erstes Genfragment für ein Expressionsprodukt erhalten wird, wobei das besagte Fragment einen Teil der codierenden Sequenz für das genannte menschliche Wachstumshormon enthält und das genannte erste Fragment für weniger als alle Aminosäuren der Aminosäuresequenz des genannten Wachstumshormons codiert,
- ein zweites Genfragment zur Verfügung gestellt wird, das für den Rest der Aminosäuresequenz des menschlichen Wachstumshormons codiert, wobei das genannte zweite Genfragment für mindestens den Amino-Ende-Bestandteil des menschlichen Wachstumshormons codiert,
- die genannten Genfragmente in einem sich replizierenden klonierenden Vektor in richtiger Lesephase relativ zueinander und unter die Kontrolle eines Expressionspromotors angeordnet werden, wodurch ein sich replizierender klonierender Vektor gebildet wird, der zur Expression der Aminosäuresequenz des genannten menschlichen Wachstumshormons ohne anhängendes Fremdprotein fähig ist,

- der Mikroorganismus mit dem klonierenden Vektor transformiert wird, und
- der transformierte Mikroorganismus in einer Kultur mit Nährstoffen gezüchtet wird.

Die Fragmente werden so ausgewählt, daß sie als wesentlichen Bestandteil cDNA oder eine Replikation davon enthalten.

Als klonierenden Vektor wird ein Plasmid selektiert, und das Plasmid wird gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent gemacht.

Es wird ein solches Plasmid gebildet, dem der tet-Promotor fehlt und das dennoch gegenüber Tetracyclin resistent ist.

Das Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß das für das menschliche Wachstumshormon codierende Gen unter die Kontrolle eines lac-Promotors in Tandem-Struktur gestellt wird, wobei erfindungsgemäß der sich replizierende klonierende Vektor das Plasmid pHGH 107 ist.

Der sich replizierende klonierende Vektor kann auch das Plasmid pHGH 107-1 sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer lebensfähigen Kultur eines mikrobiellen Organismus, der einen sich replizierenden klonierenden Vektor trägt, ist ferner dadurch gekennzeichnet, daß dieser Funktionsgene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält, sowie einen lac-Promotor in Tandem-Struktur, der zwischen den genannten Genen liegt, und so orientiert ist, daß er die Expression in Richtung des Gens für Tetracyclinresistenz in Gang setzt, und daß ferner eine Mehrzahl von Restriktionserkennungsstellen enthalten sind, die stromabwärts vom genannten Protorsystem liegen, wobei die genannten Restriktionserkennungsstellen jeweils cohäsive und stumpfe Enden nach dem Schneiden liefern, wodurch richtiges Einfügen von heterologer DNA zwischen den genannten Erkennungsstellen ermöglicht wird, so daß diese unter die Kontrolle des genannten Promotor-Systems gelangen, und daß der klonierende Vektor transformiert wird, um einen Mikroorganismus mit dem klonierenden Vektor zu erhalten, und daß der transformierte Mikroorganismus in einer Nährmedium enthaltenden Kultur gezüchtet wird.

244149 2

-12-

11.4.1983

61 113/12

Der oben genannte, sich replizierende klonierende Vektor ist das Plasmid pGH 6.

Die vorliegende Erfindung stellt Methoden und Mittel zur Expression quasi-synthetischer Gene zur Verfügung, wobei durch reverse Transkription ein wesentlicher Bestandteil, vorzugsweise die Mehrheit der codierenden Sequenz, zur Verfügung gestellt wird, ohne den arbeitsaufwendigen Umweg der

vollständigen synthetischen Konstruktion, während die Synthese des Restes der codierenden Sequenz ein komplettes Gen liefert, das fähig ist zur Expression des gewünschten Polypeptids, ohne die Begleitung von bioinaktivierenden Leader-Sequenzen oder anderem Fremdprotein. Alternativ dazu kann der synthetische Rest ein gegen Proteolyse resistentes Konjugat ergeben, so gebaut, daß das Schneiden des Fremdproteins außerhalb der Zelle ermöglicht ist, wodurch die bioaktive Form erhalten wird. Die Erfindung stellt folglich Methoden und Mittel für die mikrobielle Produktion von zahlreichen Materialien zur Verfügung, die bisher lediglich in sehr begrenzter Menge durch kosten-aufwendige Extraktion aus Gewebe hergestellt werden konnten, und weitere, die früher zur industriellen Herstellung ungeeignet waren. In ihrer am meisten bevorzugten Form stellt die Erfindung die erste Möglichkeit dar, mit der ein medizinisch signifikantes Polypeptidhormon (menschliches Wachstumshormon) bakteriell experimentiert wird, wobei sowohl die intrazelluläre Proteolyse als auch die Notwendigkeit der Kompartimentierung der bioaktiven Form mit Fremdprotein bis zum extrazellulären Schneiden vermieden werden. Der mikrobielle Ursprung für menschliches Wachstumshormon, ermöglicht durch die Erfindung, bietet vorerst einen reichen Vorrat des Hormons für die Behandlung von Zwergengewuchs, zusammen mit anderen Anwendungsmöglichkeiten, die bisher jenseits der Kapazität des Hormons lagen, die aus Geweben zu erhalten waren, einschließlich diffusen Magenbluten, Pseudoarthrose, der Therapie von Brandwunden, Wundheilung Dystrophie und der Heilung von Knochenbrüchen.

Der generelle Weg der Erfindung ist die Kombination mehrerer Genfragmente in einem einzigen clonierenden Vektor, wobei

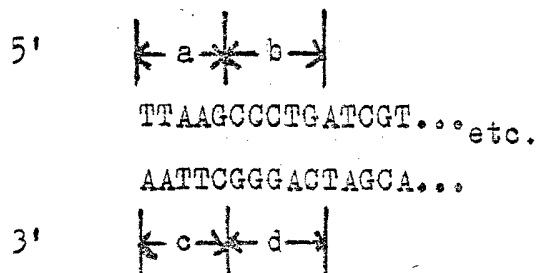
diese Genfragmente in Kombination für die Expression des gewünschten Produkts codieren. Von den Genfragmenten ist mindestens eines ein cDNA-Fragment, das durch reverse Transkription von mRNA abgeleitet ist, welches aus Gewebe isoliert wurde, wie durch die Methode nach A. Ullrich et al., Science, 196, 1313 (1977). Die cDNA stellt einen wesentlichen Bestandteil, vorzugsweise mindestens eine Mehrheit der Codons, für das gewünschte Produkt zur Verfügung, während restliche Teile des Gens synthetisch erhalten werden. Die synthetischen und die mRNA-Transkriptfragmente werden getrennt gecclont, um ausreichende Mengen für den Einsatz in dem späteren Kombinationsschritt zur Verfügung zu stellen.

Eine Vielzahl von Überlegungen beeinflusst die Verteilung der Codons für das Endprodukt, z. B. zwischen synthetischer und cDNA, ganz besonders die DNA-Sequenz der komplementären DNA, wie es beschrieben ist in dem Verfahren nach Maxam und Gilbert, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977). Komplementäre DNA, die durch reverse Transkription erhalten wird, wird auf unveränderliche Weise Codons für mindestens eine Carboxylendgruppe des gewünschten Produkts enthalten, ebenso wie andere, stromabwärts von einem oder mehreren Translations-Stopsignalen, benachbart zum Carboxylende liegende Codons für nichttranslatierte mRNA. Die Anwesenheit von DNA für nichttranslatierte RNA ist weitgehend unerheblich, obwohl übermäßig verlängerte Sequenzen dieser Art z. B. durch Schneiden mit Restriktionsenzymen entfernt werden können, um zelluläres Material zu erhalten, das für die Replikation und Expression der DNA für das angestrebte Produkt benötigt wird. In besonderen Fällen werden die cDNA-Codons für die vollständige gewünschte Aminosäuresequenz enthalten, ebenso wie fremde Codons stromaufwärts

vom Aminoende des angestrebten Produkts. Zum Beispiel werden viele, wenn nicht alle, Polypeptidhormone in einer Vorläuferform exprimiert mit Leader- oder Signalsequenzen für ein Protein, das beispielsweise beim Transport zur Zellwand beteiligt ist. Während der Expression von eukaryotischen Zellen werden diese Sequenzen enzymatisch beseitigt, so daß das Hormon in seiner freien bioaktiven Form in den periplasmatischen Raum eindringt. Man kann sich jedoch nicht darauf verlassen, daß mikrobielle Zellen diese Funktion ausführen, und es ist folglich wünschenswert, Sequenzen, die für solche Signale oder Leader-Sequenzen codieren, vom mRNA-Transkript zu entfernen. Im Verlauf dieses Entfernungsvorgangs geht auch das Translations-Startsignal verloren, und nahezu immer werden ebenso einige Codons für das angestrebte Produkt entfernt. Die synthetische Komponente des quasi-synthetischen Genprodukts der Erfindung ersetzt diese letztgenannten Codons, ebenso stellt sie ein neues Translations-Startsignal zur Verfügung, wobei der Vektor, in dem sich das Hybridgen letztlich entwickeln wird, selbst keinen günstig gelegenen Start aufweist.

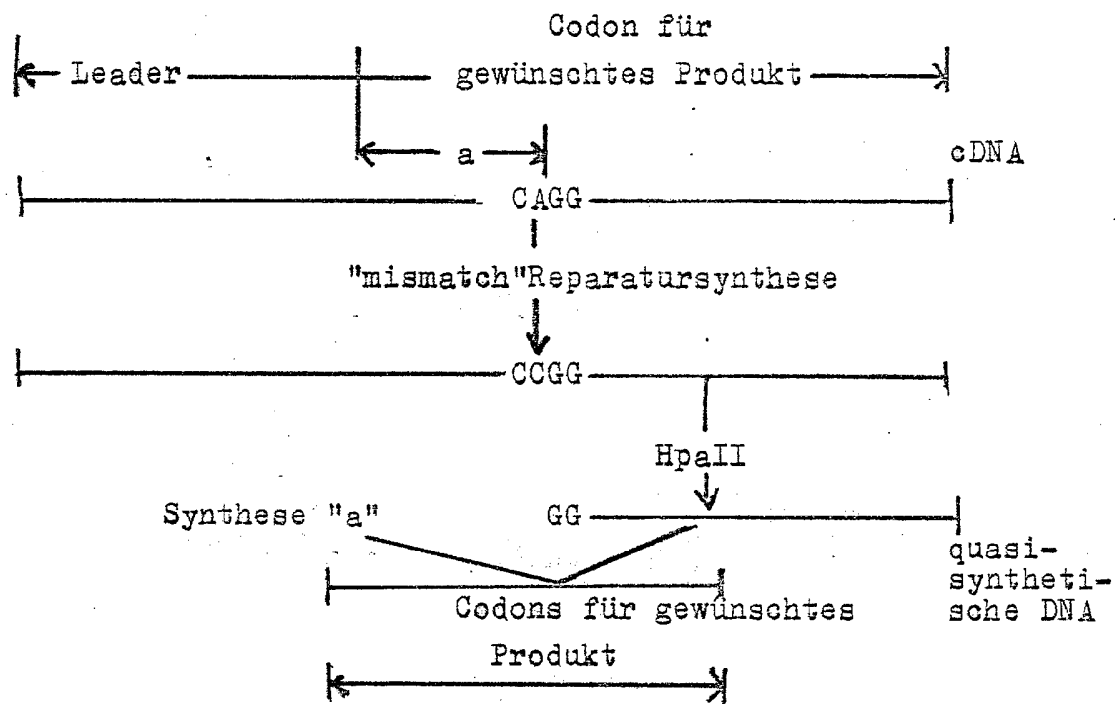
Das Eliminieren der Leader-Sequenz aus Wachstumshormon-cDNA wird begünstigt durch das Zurverfügungstellen einer Restriktionserkennungsstelle innerhalb des das Wachstumshormon codierenden Teils des Gens. Die Erfindung kann nichtsdestotrotz auch ohne das Zurverfügungstellen einer solchen Erkennungsstelle durchgeführt werden, oder in jedem Fall ohne Rücksicht auf die Erhältlichkeit einer Restriktionserkennungsstelle, die ausreichend nahe am Aminoende des gewünschten Polypeptids liegt, um die Notwendigkeit für eine umfangreiche Synthese der Genkomponente zu vermeiden, die nicht von mRNA abgeleitet ist. In jeder cDNA, die

für das gewünschte Polypeptid und eine Leader- oder andere bioinaktivierende Sequenz codiert, wird sich daher die Grenze zwischen den Codons der letzteren und denen des reifen Polypeptids an der Aminosäuresequenz des reifen Polypeptids zeigen. Man kann einfach in die Gene verdauen, die für das Peptid der Wahl codieren, und so die ungewünschten Leader- oder andere Sequenzen entfernen. Wenn daher beispielsweise eine cDNA folgender Struktur gegeben ist:



wobei der Endpunkt der Verdauung durch einen Pfeil bezeichnet ist, kann eine Reaktionsbedingung für eine Exonuclease-Verdauung gewählt werden, um die oberen Sequenzen "a" und "b" zu entfernen, wonach eine S1-Nuclease-Verdauung automatisch die unteren Sequenzen "c" und "d" eliminiert. Alternativ dazu und präziser kann man DNA-Polymerase-Verdauung in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten ("d(A,T,C,G)TP") einsetzen. Im oben genannten Beispiel wird daher DNA-Polymerase in Gegenwart von dGTP die Sequenz "c" entfernen (und bei "G" anhalten), daraufhin wird S1-Nuclease "a" verdauen; DNA-Polymerase in Gegenwart von dTTP wird "d" entfernen (und bei "T" anhalten), und S1-Nuclease wird dann "d" heraus schneiden usw. Siehe allgemein A. Kornberg, DNA-Synthesis, S. 87 bis 88, W. H. Freeman und Co., San Francisco (1974).

Vorzugsweise kann man ganz einfach eine Restriktionserkennungsstelle an einem passenden Punkt innerhalb des Bereichs der cDNA, die für das gewünschte Produkt codiert, konstruieren, durch Anwendung der "unpassenden" (mismatch) Reparatursynthesetechnik von A. Razin et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 75, 4268 (1978). Bei dieser Technik können eine oder mehrere Basen in eine bestehende DNA-Sequenz substituiert werden, wobei Primer verwendet werden, die den unpassenden Substituenten enthalten. Mindestens sieben palindromartige 4-Basenpaarsequenzen werden selektiv durch bekannte Restriktionsenzyme erkannt, das sind AGCT (AluI), CCGG (HpaII), CCGG (ThaI), GATC (Sau3A), GCGC (Hha), GGCC (HaeIII) und TCGA (TaqI). Wenn die cDNA-Sequenz eine Sequenz enthält, die sich von einer derartigen Erkennungsstelle in nur einer einzigen Base unterscheidet, was statistisch sehr wahrscheinlich ist, ist mit der Reparatursynthese eine replizierte cDNA zu erhalten, die die geeignete substituierte Base enthält und damit die gewünschte Restriktionserkennungsstelle. Durch einen Schnitt wird die DNA vom unerwünschten Leader entfernt, wonach durch Synthese die Codons wieder angefügt werden, die für die Expression des kompletten Polypeptids benötigt werden.

Zum Beispiel

Es ist natürlich offensichtlich, daß längere Restriktions-
 erkenntungsstellen auf ähnliche Weise eingesetzt werden können,
 wo das erwünscht ist, oder daß durch sukzessive Reparatur
 4-Basenpaare-Restriktionserkennungsstellen gebildet werden
 können, wo lediglich zwei Basen gemeinsam mit der Erkennungs-
 stelle am gewünschten Punkt erscheinen usw.

Es werden sich Anwendungsmöglichkeiten zeigen, bei denen
 es wünschenswert ist, nicht nur die Aminosäuresequenz des
 angestrebten Produkts, sondern auch eine bestimmte Menge
 fremdes, aber speziell hergestelltes Protein zu exprimieren.

Vier derartige Anwendungen werden durch Beispiele erwähnt werden. Erstens kann das quasi-synthetische Gen ein Hapten oder eine andere immunologische Determinante repräsentieren, auf welche Immunogenität durch Konjugation zu einem zusätzlichen Protein übertragen wird, so daß eine Vaccine produziert wird (siehe allgemein GB-PS 2 008 123 A). Es kann jedoch wieder aus Sicherheitsgründen wünschenswert sein, das angestrebte Produkt als eine Konjugate eines anderen bioinaktiven Proteins zu exprimieren, die so gebaut ist, daß extrazelluläres Schneiden ermöglicht ist, um die aktive Form zu erhalten. Drittens werden Anwendungen vorgestellt, bei denen Polypeptide mit Transportsignalen dem gewünschten Produkt vorausgehen, um die Herstellung des Produkts durch Ausschleusen durch die Zellmembran zu ermöglichen, solange das Signal-Peptid danach geschnitten werden kann. Schließlich kann eine Fremdverbindung verwendet werden, die so gebaut ist, daß ein spezifischer extrazellulärer Schnitt möglich ist, um das angestrebte Produkt abzuschirmen, das sonst empfindlich wäre für den Abbau durch endogene Proteasen des mikrobiellen Wirts. Zumindest in den letzten drei Anwendungsbereichen kann der synthetische molekulare Adapter, der verwendet wird, um die codierende Sequenz des mRNA-Transkripts zu vervollständigen, zusätzlich Codons eingebaut haben für Aminosäuresequenzen, die spezifisch geschnitten werden, beispielsweise durch enzymatische Wirkung. Beispielsweise schneidet Trypsin oder Chymotrysin bei Arg-Arg oder Lys-Lys usw. (siehe GB-PS 2 008 123 A).

Aus dem bisher Geschilderten ist ersichtlich, daß die Erfindung in ihrem breitesten Bereich die mannigfaltigsten Anwendungen erlaubt, von denen alle die folgenden Eigenschaften gemeinsam aufweisen:

- Es wird ein mRNA-Transkript verwendet, das für einen wesentlichen Bestandteil der angestrebten Aminosäuresequenz des Polypeptids codiert, das jedoch, falls es allein exprimiert wird, ein vom angestrebten Produkt verschiedenes Polypeptid produzieren würde, entweder kleiner oder größer als das angestrebte Produkt;
- Protein codierende Codons für andere als solche Aminosäuren, die im angestrebten Produkt enthalten sind, werden, falls vorhanden, entfernt;
- organische Synthese liefert ein Fragment oder Fragmente, die für den Rest der gewünschten Sequenz codieren; und
- das mRNA-Transkript und das (die) synthetische(n) Fragment(e) werden zusammengefügt und in einen einen Promoter enthaltenden clonierenden Vektor eingefügt, damit entweder das angestrebte Produkt ohne fremdes konjugiertes Protein, oder das angestrebte Produkt konjugiert mit, aber spezifisch abtrennbar von Fremdprotein repliziert und exprimiert wird.

Das Produkt der Expression wird natürlich in jedem Fall mit der Aminosäure beginnen, für die das Translations-Startsignal codiert (für den Fall von ATG, f-Methionin). Man kann erwarten, daß diese Aminosäure intrazellulär entfernt wird oder jedenfalls die Bioaktivität des resultierenden Produkts im wesentlichen unbeeinflusst läßt.

Obwohl die Erfindung ein Verfahren allgemeiner Anwendbarkeit bei der Produktion von nützlichen Proteinen, einschließlich Antikörpern, Enzymen und ähnlichem zur Verfügung

stellt, ist die Erfindung im besonderen auf die Expression von Polypeptidhormonen von Säugetieren und anderen Substanzen mit medizinischer Anwendung gerichtet, z. B. Glucagon, gastrointestinale Inhibitorpolypeptide, Polypeptide der Bauchspeicheldrüse, Adrenokortikotropin, β -Endorphine, Interferon, Urokinase, Blutgerinnungsfaktoren, menschliches Albumin usw.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend durch Beispiele näher erläutert. In der dazugehörigen Zeichnung, die sich auf bevorzugte Beispiele bezieht, zeigen:

Fig. 1: das Syntheschema für die Konstruktion eines Genfragments, das für die ersten 24 Aminosäuren des menschlichen Wachstumshormons codiert, zusammen mit dem Startsignal ATG und Bindegliedern, die beim Clonen verwendet werden. Die Pfeile im codierenden oder oberen Strang ("U") und in dem komplementären oder unteren Strang ("L") bezeichnen die Oligonucleotide, die miteinander verbunden wurden, um das gezeigte Fragment zu bilden;

Fig. 2: die Verbindungen der "U"- und "L"-Oligonucleotide für die Bildung des Genfragments aus Fig. 1 und dessen Insertion in ein Plasmid als clonierendem Vektor;

Fig. 3: die DNA-Sequenz (nur der codierende Strang) eines HaeIII-Restriktionsenzymfragments eines Hypophysen-mRNA-Transkripts mit den nummerierten Aminosäuren

des menschlichen Wachstumshormons, für das sie codieren; Schlüsselrestriktionserkennungsstellen sind bezeichnet, ebenso DNA (auf "Stop" folgende) für nichttranslatierte mRNA;

Fig. 4: die Konstruktion eines clonierenden Vektors für ein Genfragment, das für die Aminosäuren des menschlichen Wachstumshormons codiert, welches nicht synthetisch erhalten wurde, und die Konstruktion dieses Genfragments als komplementäre DNA durch reverse Transkription von mRNA, die aus der Hypophyse menschlichen Ursprungs isoliert wurde;

Fig. 5: die Konstruktion eines Plasmids, das in Bakterien zur Expression des menschlichen Wachstumshormons fähig ist, beginnend mit den Plasmiden der Fig. 2 und 3.

Im folgenden wird eine bevorzugte Ausführungsform, die die Erfindung erläutert, beschrieben, bei der ein quasi-synthetisches Gen, das für menschliches Wachstumshormon codiert, konstruiert, geclont und mikrobiell exprimiert wird.

Konstruktion und Expression eines clonierenden Vektors für menschliches Wachstumshormon

1. Clonieren des HaeIII-Fragments des mRNA-Transkripts (Fig. 3 und 4)

Polyadenylierte mRNA für menschliches Wachstumshormon (HGH) wurde aus hypophysäres Wachstumshormon produzierenden

den Tumoren gewonnen nach dem Verfahren von A. Ullrich et al., Science, 196, 1313 (1977). 1,5 µg von Doppelstrang-("ds")-cDNA werden präpariert aus 5 µg dieser RNA, im wesentlichen wie beschrieben bei Wickens et al., J. Biol. Chem., 253, 2483 (1978), mit der Ausnahme, daß die RNA-Polymerase "Klenow-Fragment", (H. Klenow, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 65, 168 (1970)) für die DNA-Polymerase I in der Zweit-Strangsynthese eingesetzt wurde. Das Restriktionsmuster von HGH ist derartig, daß HaeIII-Restriktionserkennungsstellen in der 3' nichtcodierenden Region und in der Sequenz, die für die Aminosäuren 23 und 24 des HGH codieren, vorhanden sind, wie gezeigt in Fig. 3. Eine Behandlung der ds-HGH-cDNA mit HaeIII gibt ein DNA-Fragment von 551 Basenpaaren ("bp"), die für die Aminosäuren 24 bis 91 des HGH codieren. 90 ng der cDNA werden mit HaeIII behandelt, in einem 8%igen Polyacrylamid-Gel einer Elektrophorese unterworfen und die Region bei 550 bp eluiert. Man erhält annähernd 1 ng cDNA.

pBR322, hergestellt nach F. Bolivar et al., Gene 2 (1977) 95 bis 113, wird als klonierender Vektor für die cDNA ausgewählt. pBR322 ist vollständig charakterisiert (J. G. Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium, 43, 70, 1978)), und ist ein mit zahlreichen Kopien (multicopy) replizierendes Plasmid, das sowohl Ampicillin- als auch Tetracyclin-Resistenz aufweist, die auf den Einschluß der korrespondierenden Gene ("Ap^R" bzw. "Tc^R" in Fig. 4) zurückzuführen sind, wobei das Plasmid Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme PstI, EcoRI und HindIII enthält, wie in der Figur gezeigt.

Die Schneideprodukte von HaeIII und PstI haben stumpfe Enden. Es kann folglich das GC-Anhängeverfahren nach Chang A. C. Y. et al., Nature, 275, 617 (1978) angewendet werden, um die stumpfendigen Produkte der PstI-Schnitte von pBR322 mit der HaeIII-Verdauung des mRNA-Transkripts zu verbinden, so daß das cDNA-Fragment in die PstI-Erkennungsstelle von pBR322 eingefügt wird, und zwar in der Weise, daß die HaeIII-Restriktionserkennungsstellen (GG↓CC) auf der cDNA und die PstI-Restriktionserkennungsstellen (CTGCA↓G) an jedem Ende des eingeschobenen Teils wieder hergestellt werden.

Es wird also terminale Desoxynucleotid-Transferase (TdT) verwendet, um annähernd 20 dC-Reste an das 3'-Ende anzufügen, wie bereits früher beschrieben, Chang A. C. Y., a. a. O. Auf ähnliche Weise werden an das 3'-Ende von 60 ng PstI-behandeltem pBR322 etwa 10 dG-Reste angehängt. Das Verschmelzen der dC-ergänzten ds-cDNA mit der dG-ergänzten Vektor-DNA wird in 130 µl von 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 100 mM NaCl und 0,25 mM EDTA durchgeführt. Die Mischung wird auf 70 °C erhitzt, langsam (12 Stunden) auf 37 °C abgekühlt und schließlich auf 20 °C (6 Stunden) abgekühlt, ehe sie zum Transformieren von E. coli x 1776 verwendet wird. Eine DNA-Sequenzanalyse des Plasmids pHGH31 nach der Methode von Maxam und Gilbert, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977), nach dem Clonen des Plasmids in x 1776, stimmte in den Codons für die Aminosäuren 24 bis 191 des HGH überein, wie in Fig. 3 gezeigt.

Der Stamm E. coli K-12 x 1776 hat den Genotyp F⁻tonA53, dapD8, minA1, supE42, Δ40(gal-uvrB), λ⁻, minB2, rfb-2,

nalA25, oms-2, thyA57^x, metC65, oms-1, Δ 29(bioH-asd), cycB2, cycA1, hedR2, x1776 wurde vom National Institutes of Health als ein EK2-Wirts-Vektor-System bescheinigt.

x1776 hat ein obligates Bedürfnis für Diaminopimelinsäure (DAP) und kann nicht die Mukopolysaccharidcolan-(colanic)-säure synthetisieren. Die Zelle unterliegt daher dem DAP-Mangeltod in all den Kulturmedien, in denen DAP begrenzt ist, jedoch genügend Nährsubstrat vorhanden ist, um den zellulären Stoffwechsel und das zelluläre Wachstum aufrechtzuerhalten. Der Stamm ist Thymin- oder Thymidin-bedürftig und unterliegt dem Thymin-Mangeltod mit Abbau der DNA, wenn Thymin und Thymidin in der Umgebung fehlen, jedoch genügend Nährsubstrate vorhanden sind, um die Stoffwechselaktivität aufrechtzuerhalten. x1776 ist hochgradig empfindlich gegen Galle und ist daher unfähig zu überleben, d. h. unfähig, eine Passage durch den Intestinaltrakt von Ratten zu überleben. x1776 ist hochgradig empfindlich gegen Detergenzien, Antibiotika, Arzneimittel und Chemikalien. x1776 kann weder die Dunkelreparatur noch die Photo-Reaktivierung von UV-induzierten Schäden durchführen und ist daher um mehrere Größenordnungen empfindlicher gegen Sonnenlicht als der Wildtypstamm von E. coli. x1776 ist resistent gegen viele transduzierende Phagen und läßt bei der Konjugation nur mangelhaft die genetische Übertragung von vielen verschiedenen Typen von bei der Konjugation beteiligten Plasmiden zu, was auf die Anwesenheit von verschiedenen Mutationen zurückzuführen ist. x1776 ist resistent gegen Nalidixinsäure, Cycloserin und Trimethoprim. Diese Substanzen können daher dem Medium zugegeben werden, um das Überprüfen des Stamms zu ermög-

lichen und eine Transformation von Kontaminanten während der Transformation auszuschließen.

x1776 wächst mit einer Generationszeit von etwa 50 Min. sowohl in L-Nährmedium (l-broth) als auch Penassay-Medium (Penassay broth), wenn diese mit 100 µg DAP/ml und 4 µg Thymidin/ml supplementiert werden, und erreicht eine Enddichte von 8 bis 10×10^8 Zellen/ml in der stationären Phase. Vorsichtiges kreisförmiges Hin- und Herschütteln für eine Zeitspanne von 1 bis 2 Minuten suspendiert die Zellen vollständig bei Erhalt der Lebensfähigkeit von 100 %. Zusätzliche Details bezüglich x1776 sind zu finden bei R. Curtis et al., Molecular Cloning of Recombinant DNA, 99 bis 177, Scott und Werner, eds., Academic Press (N. Y. 1977). x1776 wurde ohne Einschränkungen bei der Hinterlegungsstelle American Type Culture Collection am 3. Juli 1979 unter der Nummer ATCC 31537 hinterlegt.

2. Konstruktion und Clonieren des synthetischen Genfragments (Eq. 1 und 2)

Es ist Teil der Strategie für die Konstruktion des HGH-quasi-synthetischen Gens, daß ein synthetisches Fragment konstruiert wird, das stumpfendige Restriktionsschnittstellen aufweist, die an den Punkten sitzen, an denen an das Fragment das mRNA-Transkript angeknüpft werden soll. Das synthetische Gen für die ersten 24 Aminosäuren des HGH erhält daher, wie in Fig. 1 gezeigt, eine auf die Aminosäure 23 folgende HaeIII-Schneideerkennungsstelle. Das distale Ende des synthetischen Fragments wird mit einem Verbindungselement (im folgenden "Linker") ver-

sehen, das die Verschmelzung mit einem Einzelstrangende erlaubt, das durch Restriktionsschnitte in dem Plasmid erhalten wird, in das das mRNA-Transkript und das synthetische Fragment letztlich eingebaut werden sollen.

Wie in Fig. 1 gezeigt, haben die 5'-Enden des doppelsträngigen Fragments einzelsträngige kohäsive Enden für die EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonucleasen, um die Plasmid-Konstruktion zu erleichtern. Das Codon für Methionin am linken Ende stellt eine Erkennungsstelle für die Initiation der Translation zur Verfügung. Es werden zwölf verschiedene Oligonucleotide, die in ihrer Größe von undekamer bis hexadekamer variieren, synthetisiert, und zwar nach dem bewährten Phosphotriester-Verfahren nach Cres, R. Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978). Diese Oligonucleotide, U_1 bis U_6 und L_1 bis L_6 , sind durch Pfeile bezeichnet.

10 μ g Substanz von U_2 einschließlich U_6 und L_2 einschließlich L_6 werden unter Verwendung der T_4 -Polynucleotidkinase und (γ - 32 P)ATP phosphoryliert, und zwar nach dem veröffentlichten Verfahren von Goeddel, D. V. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 76, 106 (1979).

Es werden drei getrennte T4-Ligase-katalysierte Reaktionen durchgeführt: 10 μ g des 5'-OH-Fragments U_1 werden mit phosphoryliertem U_2 , L_5 und L_6 vereint; phosphoryliertes U_3 , U_4 , L_3 und L_4 werden vereint; weiterhin werden 10 μ g des 5'-OH-Fragments L_1 mit phosphoryliertem L_2 , U_5 und U_6 vereint. Diese Verknüpfungen werden bei 4 °C für sechs Stunden durchgeführt in einem Medium, das 300 μ l von 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 10 mM $MgCl_2$,

10 mM Dithiothreitol und 0,5 mM ATP enthält, wobei 100 Einheiten T4-Ligase verwendet werden. Die drei Verknüpfungsmischungen werden dann vereint, 100 Einheiten T4-Ligase zugegeben, worauf man die Reaktion 12 Stunden lang bei 20 °C ablaufen läßt. Die Mischung wird dann mit Äthanol ausgefällt und auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel einer Elektrophorese unterworfen. Die Bande, die bis zur 84-Basenpaar-Stelle gewandert ist, wird aus dem Gel herausgeschnitten und eluiert. pBR322 (1 µg) wird mit EcoRI und HindIII behandelt, das große Fragment wird durch Gel-Elektrophorese isoliert und mit der synthetischen DNA verknüpft. Diese Mischung wird verwendet, um den Stamm E. coli K-12-294 (end A, thi⁻, hsr⁻, hsm_k⁺) zu transformieren. Der Stamm 294 wurde am 30. Oktober 1978 bei der Hinterlegungsstelle American Type Culture Collection unter der Nummer ATCC 31446 ohne Einschränkungen hinterlegt. Eine Sequenzanalyse nach der Maxam- und Gilbert-Technik, a. a. O., bei der EcoRI - HindIII-Insertion von einem Plasmid pHGH3 einer Transformante bestätigte das in Fig. 1 Dargestellte.

3. Konstruktion eines Plasmids für die bakterielle Expression von HGH (Fig. 5)

Mit dem synthetischen Fragment in pHGH3 und dem mRNA-Transkript in pHGH31 wird ein zur Replikation fähiges Plasmid konstruiert, das beide Fragmente enthält, wobei das Expressionsplasmid pGH6 verwendet wird, wie in Fig. 5 gezeigt. Das Expressionsplasmid, das einen lac-Promotor als Tandem enthält, wurde zuerst folgendermaßen konstruiert. Ein 285-Basenpaare-langes EcoRI-Fragment,

das zwei 95-Basenpaare-lange UV5-lac-Promoter-Fragmente enthält, welche durch ein 95-Basenpaare-langes, heterologes DNA-Fragment abgetrennt wurden, wird aus dem Plasmid pKB268 isoliert, siehe K. Backman et al., Cell. Vol. 13, 65 bis 71 (1978). Das 285-bp-Fragment wird in die EcoRI-Erkennungsstelle von pBR322 eingesetzt und ein Clon pGH1 isoliert, in dem die Promoter auf das Gen für Tetracyclin-Resistenz hin und in richtiger Lese-phase mit diesem orientiert sind. Die distal zu dem letztgenannten Gen gelegene EcoRI-Erkennungsstelle wird durch teilweise EcoRI-Verdauung zerstört, die resultierenden einzelsträngigen EcoRI-Enden werden mit DNA-Polymerase I repariert, und das Plasmid wird durch stumpf-endige Verbindung wieder in Ringform gebracht. Das resultierende Plasmid (pGH6) enthält eine einzige EcoRI-Erkennungsstelle, die passend liegt im Hinblick auf das Promoter-System, in das das komplette Gen für HGH eingebaut werden kann.

Um das synthetische Fragment für die Vereinigung mit dem RNA-Transkript fertigzustellen, werden 10 µg von pGH3 mit EcoRI- und HaeIII-Restriktionsendonucleasen geschnitten, und das 77-Basenpaare-Fragment, das die codierenden Sequenzen für die HGH-Aminosäuren 1 bis 23 enthält, wird aus einem 8%igen Polyacrylamid-Gel isoliert.

Als nächstes wird das Plasmid pGH31 (5 µg) mit HaeIII geschnitten. Die 551-bp-HGH-Sequenz und ein mitgewandertes 540-bp-HaeIII-Fragment von pBR322 werden durch Gel-Elektrophorese gereinigt. Eine anschließende Behandlung mit XmaI schneidet nur die HGH-Sequenz, wobei 39 Basenpaare von der 3'-nichtcodierenden Region entfernt

244149 2 -30-

11.4.1983

61 113/12

werden. Das resultierende 512-bp-Fragment wird von dem 540-bp-pBR322-HaeIII-Stück durch Elektrophorese in einem 6%igen Polyacrylamid-Gel getrennt. 0,3 µg des 77-bp-EcoRI-HaeIII-Fragments werden mit T4-Ligase in einer 16 µl-Reaktion 14 Stunden lang bei 4 °C polymerisiert. Die Mischung wird dann für 5 Minuten auf 70 °C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren, anschließend mit EcoRI behandelt (um Fragmente zu schneiden, die aufgrund ihrer EcoRI-Erkennungsstellen dimerisiert haben), weiterhin mit SmaI behandelt (um XmaI-Dimere zu schneiden), wodurch ein 591-bp-Fragment mit einem EcoRI-Ende, das kohäsiv ist, und einem SmaI-Ende, das stumpf ist, erhalten wird. Nach der Reinigung auf einem 6%igen Polyacrylamid-Gel erhält man annähernd 30 ng dieses Fragments. Es sollte bemerkt werden, daß das Expressionsplasmid pGH6 keine XmaI-Erkennungsstelle enthält. SmaI erkennt jedoch die gleiche Erkennungsstelle wie XmaI, aber schneidet genau durch die Mitte, so daß stumpfe Enden erhalten werden. Das SmaI-geschnittene Ende des Fragments, das von pHGH31 abgeleitet ist, kann folglich stumpfendig an pGH6 gebunden werden.

Das Expressionsplasmid pGH6, das den lac-UV5-Promotor in Tandemform enthält, wird sukzessive mit HindIII, Nuclease S1 und EcoRI behandelt und durch Gel-Elektrophorese gereinigt. 50 ng des resultierenden Vektors, der ein kohäsives EcoRI-Ende und ein stumpfes Ende aufweist, wird mit 10 ng der 591-bp-HGH-DNA verbunden. Diese Verbindungsmischung wird verwendet, um E. coli x1776 zu transformieren. Die Kolonien werden durch Wachstum auf Tetracyclin (12,5 µg/ml) selektiert. Es ist bemerkenswert, daß die Insertion des hybriden HGH-Gens in

pGH6 den Promoter für die Tetracyclin-Resistenz zerstört, daß jedoch der Tandem-lac-Promoter das Durchlesen der Strukturgene für Tetracyclin-Resistenz erlaubt und auf diese Weise die Selektionscharakteristik erhalten bleibt. Es wurden annähernd 400 Transformanten erhalten. Mit der Grunstein-Hogness-Methode, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 72, 3961 (1975), wurden durch Filterhybridisierung 12 Kolonien identifiziert, die die HGH-Sequenz enthalten. Die aus drei dieser Kolonien isolierten Plasmide ergaben das erwartete Restriktionsmuster, wenn sie mit HaeIII, PvuII und PstI geschnitten wurden. Von einem Clon (pHGH107) wurde die DNA-Sequenz bestimmt.

Menschliches Wachstumshormon, das von Transformanten produziert wird, kann ohne weiteres durch direkten Radioimmunoassay nachgewiesen werden, welcher aus Verdünnungsreihen des Überstands lysierter Zellen durchgeführt wird, unter Verwendung von Phadebas HGH PRIST kit (Farmacia).

Um aufzuzeigen, daß die HGH-Expression unter der Kontrolle des lac-Promoters steht, wird pHGH107 in einen E. coli-Stamm D1210 ($lac+(i^0O+z^+y^+)$), einem Stamm, der den lac-Expressor überproduziert, transformiert. Bis zur Zugabe des Induktors IPTG (Isopropylthiogalactosidolipoid) kann keine nennenswerte Menge von HGH-Expression nachgewiesen werden.

Ein Entfernen der EcoRI-Erkennungsstelle in pHGH107 hätte zur Folge, daß das ATG-Startsignal von den Codons der Ansatzstelle für die Ribosomen des lac-Promoters den gleichen Abstand hätte, den diese Codons natürlicherweise vom Startsignal für β -Galactosidase haben. Um festzustellen, ob die Expression durch Nachahmung dieses natürlichen Abstands

3 zu steigern ist, wurde pHG107 in pHG107-1 überführt, indem das erstere Plasmid mit EcoRI geöffnet wurde, die entstehenden Einzelstrangenden mit S1-Endonuclease verdaut wurden und das Plasmid durch Verbinden der stumpfen Enden mit T4-Ligase wieder in Ringform überführt wurde. Obwohl sich zeigte, daß das erhaltene Plasmid in ähnlicher Weise zur Expression von HGH fähig war, produzierte es jedoch HGH überraschenderweise in geringerem Umfang als pHG107, wie durch direkten Radioimmunoassay gezeigt werden konnte.

3 Für den Fachmann ist offensichtlich, daß die vorliegende Erfindung nicht auf die bisher geschilderte, bevorzugte Ausführungsform beschränkt ist, sondern ausschließlich auf den Schutzbereich der Patentansprüche. Andere Abänderungen als die hier beschriebenen sind möglich, sei es die Wahl des Promoter-Systems, des Elternplasmids, des angestrebten Polypeptidprodukts oder sonstigem. Andere, für die vorliegende Erfindung anwendbare Promoter-Systeme bestehen beispielsweise aus dem Lambda-Promoter, dem Arabinose-Operon (phi80 dara) oder dem Colicin-E1-, Galactose-, alkalische Phosphatase- oder Tryptophan-Promoter. Wirtsorganismen für die bakterielle Expression können ausgewählt werden beispielsweise aus der Familie der Enterobacteriaceae, z. B. die Stämme Escherichia coli und Salmonella; aus der Familie der Bacillaceae, z. B. Bacillus subtilis; weiterhin Pneumococcus; Streptococcus und Haemophilus Influenzae. Natürlich wird die Wahl des Organismus das Niveau der physikalischen Beherrschung des Clonens und der Expression beeinflussen, welche nur unter Einhaltung der Richtlinien für rekombinante DNA des National Institutes of Health, 43 Fed. Reg. 60 080 (1978) durchgeführt werden sollen.

Für die Arbeit der vorliegenden Erfindung im Labormaßstab eignet sich der Stamm E. coli x1776 besonders gut, es könnte sich jedoch zeigen, daß für die industrielle Herstellung im großen Maßstab der Stamm weniger geeignet ist, und zwar aufgrund der ihm eigenen Schwächen, die absichtlich aus biologischen Sicherheitsgründen eingebracht wurden. Mit einer angemessenen Höhe an physikalischer Beherrschung, eher als biologischer, können für die Arbeit im großen Maßstab auch solche Organismen wie E. coli K-12 Stamm 294, a. a. O., und E. coli Stamm RR1, Genotyp: $\text{Pro}^- \text{Leu}^- \text{Thi}^- \text{R}_B^- \text{recA}^+ \text{Str}^r \text{Lac } y^-$ verwendet werden. E. coli RR1 wurde durch Paarung aus dem Stamm E. coli HB101 (H. W. Boyer et al. J. Mol. Bio. 41, 459 bis 472 (1969)) mit dem Stamm E. coli K-12, Stamm KL16 als Hfr-Donor erhalten. Siehe auch J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor, New York, 1972). Eine Kultur von E. coli RR1 wurde am 30. Oktober 1978 bei der American Type Culture Collection ohne Einschränkung bezüglich der Zugänglichkeit unter der Nummer ATCC 31343 hinterlegt. Auf ähnliche Weise wurde eine Kultur von x1776 am 3. Juli 1979 bei der American Type Culture Collection unter der Nummer ATCC 31537 hinterlegt. Am 3. Juli 1979 wurden bei der American Type Culture Collection weiterhin hinterlegt: Plasmid pGH107 (ATCC 40011); Plasmid pGH6 (ATCC 40012); der Stamm x1776, der mit pGH107 transformiert wurde (ATCC 31538); und E. coli K-12 Stamm 294, transformiert mit pGH6 (ATCC 31539).

Nach der Erfindung hergestellte Organismen können für die in industriellem Maßstab durchgeführte fermentative Produktion von menschlichem Wachstumshormon eingesetzt werden, wodurch ein Produkt in solchen Mengen und für Anwendungs-

gebiete erhalten wird, wie es bisher unerreichbar war. Beispielsweise können transformierte *E. coli*-Kulturen gezüchtet werden in wässrigem Medium in einem Stahl- oder einem anderen Fermentationsgefäß, auf übliche Weise belüftet und geschüttelt, in wässrigem Medium bei beispielsweise 37 °C und nahezu neutralem pH (beispielsweise $\text{pH} = 7 + 0,3$), ergänzt mit geeigneten Nährsubstraten (beispielsweise Kohlenhydrat oder Glycerin), Stickstoffquellen (z. B. Ammoniumsulfat), Kaliumquellen (z. B. Kaliumphosphat), Spurenelementen, Magnesiumsulfat und ähnlichem. Transformante Organismen weisen vorzugsweise eine oder mehrere Selektionscharakteristika auf, beispielsweise Antibiotika-Resistenzen, so daß ein Selektionsdruck ausgeübt werden kann, um konkurrierendes Wachstum von Wildtyp *E. coli* zu behindern. Für den Fall eines gegen Ampicillin oder Tetracyclin resistenten Organismus kann beispielsweise das Antibiotikum zum Fermentationsmedium gegeben werden, so daß Wildtyp-Organismen ausgesiebt werden, die nicht gegen diese Antibiotika resistent sind. Nachdem vollständig fermentiert wurde, wird die bakterielle Suspension zentrifugiert oder die Zellmasse auf andere Weise aus der Kulturbrühe gesammelt, daraufhin wird mit physikalischen oder chemischen Mitteln lysiert. Die Zelltrümmer werden vom Überstand getrennt, und das lösliche Wachstumshormon wird isoliert und gereinigt.

Menschliches Wachstumshormon kann aus Bakterienextrakt gereinigt werden, indem man eine der folgenden Methoden oder eine Kombination dieser anwendet:

- 1) Polyethylimin-Fraktionierung;
- 2) Gel-Filtrierungs-Chromatographie auf Sephadex S-200;
- 3) Ionenaustausch-Chromatographie auf Biorex-70 Harz oder CM Sephadex;

- 4) Ammoniumsulfat und/oder ph-Fraktionierung; und
- 5) Affinitäts-Chromatographie, wobei Antikörper-Harze verwendet werden, die aus anti-HGH IgG hergestellt werden, welches aus immunsensitivierten Tieren oder Hybridgeweben (hybridomas) isoliert wurde;
das Hormon wird unter sauren oder mild denaturierenden Bedingungen herausgelöst.

244149 2

11.4.1983

61 113/12

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung einer lebensfähigen Kultur eines mikrobiellen Organismus, der einen sich replizierenden klonierenden Vektor trägt und der fähig ist, menschliches Wachstumshormon zu exprimieren, wobei ein für menschliches Wachstumshormon codierendes Gen in einen klonierenden Vektor inseriert und unter die Kontrolle eines Expressionspromotors gestellt ist, gekennzeichnet dadurch, daß
 - ein erstes Genfragment für ein Expressionsprodukt erhalten wird, wobei das besagte Fragment einen Teil der codierten Sequenz für das genannte menschliche Wachstumshormon enthält und das genannte erste Fragment für weniger als alle Aminosäuren der Aminosäuresequenz des genannten Wachstumshormons codiert,
 - ein zweites Genfragment zur Verfügung gestellt wird, das für den Rest der Aminosäuresequenz des menschlichen Wachstumshormons codiert, wobei das genannte zweite Genfragment für mindestens den Amino-Ende-Bestandteil des menschlichen Wachstumshormons codiert,
 - die genannten Genfragmente in einem sich replizierenden klonierenden Vektor in richtiger Lesephase relativ zueinander und unter die Kontrolle eines Expressionspromotors angeordnet werden, wodurch ein sich replizierender klonierender Vektor gebildet wird, der zur Expression der Aminosäuresequenz des genannten menschlichen Wachstumshormons ohne anhängendes Fremdprotein fähig ist,

244 149 2

37
~~2~~

11.4.1983

61 113/12

- der Mikroorganismus mit dem klonierenden Vektor transformiert wird, und
 - der transformierte Mikroorganismus in einer Kultur mit Nährstoffen gezüchtet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Fragmente so ausgewählt werden, daß sie als wesentlichen Bestandteil cDNA oder eine Replikation davon enthalten.
 3. Verfahren nach mindestens einem der Punkte 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß als klonierender Vektor ein Plasmid selektiert wird und das Plasmid gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent gemacht wird.
 4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß ein Plasmid gebildet wird, dem der tet-Promotor fehlt und das dennoch gegenüber Tetracyclin resistent ist.
 5. Verfahren nach mindestens einem der Punkte 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß das für das menschliche Wachstumshormon codierende Gen unter die Kontrolle eines lac-Promotors in Tandem-Struktur gestellt wird.
 6. Verfahren nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß der sich replizierende klonierende Vektor das Plasmid pHGH 107 ist.
 7. Verfahren nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß der sich replizierende klonierende Vektor das Plasmid pHGH 107-1 ist.

244149 2 38
-2-

11.4.1983

61 113/12

8. Verfahren nach Punkt 1 zur Herstellung einer lebensfähigen Kultur eines mikrobiellen Organismus, der einen sich replizierenden klonierenden Vektor trägt, gekennzeichnet dadurch, daß dieser Funktionsgene für Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält, sowie einen lac-Promotor in Tandem-Struktur, der zwischen den genannten Genen liegt, und so orientiert ist, daß er die Expression in Richtung des Gens für Tetracyclinresistenz in Gang setzt, und daß ferner eine Mehrzahl von Restriktions-erkennungsstellen enthalten sind, die stromabwärts vom genannten Promotorsystem liegen, wobei die genannten Restriktionserkennungsstellen jeweils kohäsive und stumpfe Enden nach dem Schneiden liefern, wodurch richtiges Einfügen von heterologer DNA zwischen den genannten Erkennungsstellen ermöglicht wird, so daß diese unter die Kontrolle des genannten Promotor-Systems gelangen und daß der klonierende Vektor transformiert wird, um einen Mikroorganismus mit dem klonierenden Vektor zu erhalten, und daß der transformierte Mikroorganismus in einer Nährmedium enthaltenden Kultur gezüchtet wird.
9. Verfahren nach Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß der sich replizierende klonierende Vektor das Plasmid pGH 6 ist.