



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 21 188 T3 2010.04.01**

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 194 575 B2**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/70 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 21 188.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR00/00733**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 942 494.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/004329**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.07.2005**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **26.08.2009**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.04.2010**

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

9927418 08.07.1999 KR

(73) Patentinhaber:

Hanmi Pharm. Co., Ltd., Kyungki, KR

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**KWON, Se Chang, Kumcheon-gu, Seoul 153-031,
KR; JUNG, Sung Youb, Songpa-gu, Seoul 138-112,
KR; BAE, Sung Min, Seoul 151-054, KR; LEE,
Gwan Sun, Songpa-gu, Seoul 138-160, KR**

(54) Bezeichnung: **MODIFIZIERTER HUMANER GRANULOZYTEN-KOLONIE STIMULIERENDERFAKTOR SOWIE
VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DESSELBEN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen modifizierten menschliche Granulozyten-Kolonien stimulierenden Faktor (hG-CSF), einen E.coli-Expressionsvektor, welcher eine DNA aufweist, die den modifizierten hG-CSF entschlüsselt, einen mit dem Vektor transformierten E. coli und ein Verfahren zur Herstellung des modifizierten hG-CSF unter Verwendung des E. coli.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Der Begriff Kolonien stimulierender Faktor (CSF) beinhaltet Granulozyten/Phagozyten-Kolonien stimulierende Faktoren (GM-CSF), Phagozyten-Kolonien stimulierende Faktoren (M-CSF) und Granulozyten-Kolonien stimulierende Faktoren (G-CSF), welche von T-Zellen, Phagozyten, Fibroblasten und endothelischen Zellen produziert werden. GM-CSF stimuliert Stammzellen von Granulozyten oder Phagozyten, um die Differenzierung derselben und die Wucherung von Granulozyt- oder Phagozyt-Kolonien hervorzurufen. M-CSF und G-CSF bewirken hauptsächlich die Bildung der Kolonien sowohl von Phagozyten als auch von Granulozyten. Am lebenden Objekt bewirkt G-CSF die Differenzierung von Knochenmarksleukozyten und verbessert die Funktion von reifen Granulozyten und dementsprechend ist seine klinische Wichtigkeit bei der Behandlung von Leukämie sehr anerkannt.

[0003] Humanes G-CSF (hG-CSF) ist ein Protein, welches aus 174 oder 177 Aminosäuren besteht, wobei die Variante mit 174 Aminosäuren eine höhere Aktivität bezüglich der Verbesserung von Neutrophilen aufweist (Morishita, K. et al., J. Biol. Chem., 262, 15208–15213 (1987)). Die Aminosäuresequenz von aus 174 Aminosäuren bestehendem hG-CSF ist in [Fig. 1](#) dargestellt und es gab viele Studien für die Serienproduktion von hG-CSF durch Manipulierung eines das hG-CSF verschlüsselnden Gens.

[0004] Zum Beispiel hat Chugai Pharmaceuticals Co., Ltd. (Japan) die Aminosäuresequenz von hG-CSF und ein dasselbe verschlüsselndes Gen beschrieben (Koreanische Patentveröffentlichungen Nr. 91-5624 und 92-2312) und von einem Verfahren zum Herstellen von Proteinen berichtet, welches eine hG-CSF-Aktivität mittels eines Gen-Rekombinat-Prozesses (Koreanische Patente Nr. 47178, 53723 und 57582) aufweist. Bei diesem Herstellungsverfahren wird glykosyliertes hG-CSF in einer Zelle eines Säugetiers durch Verwenden einer genomischen DNA oder cDNA hergestellt, welche ein hG-CSF verschlüsselndes Polynucleotid aufweist. Das glykosylierte hG-CSF weist eine O-glykosidische Zuckerkette auf, es ist jedoch bekannt, dass diese Zuckerkette für die Aktivität des hG-CSF nicht notwendig ist (Lawrence, M. et al., Science, 232, 61 (1986)). Des weiteren ist es auch gut bekannt, dass die Herstellung von glykosyliertem hG-CSF, welches Zellen eines Säugetiers verwendet, teure Materialien und Ausrüstung erfordert und aus diesem Grund ist ein solcher Prozess nicht ökonomisch machbar.

[0005] Mittlerweile gab es Versuche, nicht glykosyliertes hG-CSF durch Verwenden eines Mikroorganismus, z. B. E. coli, herzustellen. In diesen Studien werden hG-CSFs mit 175 oder 178 Aminosäuren, welche eine an dem N-Terminus derselben angebrachte Methioningruppe aufweisen, aufgrund des bei dem Mikroorganismus verwendeten ATG-Startkodons erhalten. Die zusätzliche Methioningruppe erzeugt jedoch unerwünschte Immunreaktionen im menschlichen Körper, wenn demselben das rekombinante hG-CSF verabreicht wird (Europäische Patentveröffentlichung Nr. 256,843). Des weiteren werden die meisten der Methionin enthaltenden hG-CSFs, welche in E. coli produziert werden, in den Zellen als nicht lösliche Einschlusskörper abgelagert und sie müssen durch einen Neufaltungsprozess mit einem erheblichen Ertragsverlust in eine aktive Form konvertiert werden. In diesem Zusammenhang nehmen vier der fünf Cys-Gruppen, welche im Wildtyp-hG-CSF vorhanden sind, an der Bildung von Disulfidverbindungen teil, während die verbleibende zu der Ansammlung des hG-CSF-Produkts während des Neufaltungsprozesses beiträgt, um den Ertrag zu verringern.

[0006] In jüngster Zeit wurden, um die mit der Herstellung eines Fremdproteins innerhalb einer Mikrobenzelle verbundenen Probleme zu lösen, verschiedene Anstrengungen unternommen, um ein Verfahren zu entwickeln, welches auf einer effizienten Ausscheidung eines Zielproteins über die Membran der Mikrobenzelle in die Domäne außerhalb der Zelle basiert.

[0007] Zum Beispiel wird bei einem Verfahren, welches ein Signalpeptid verwendet, ein gewünschtes Protein in der Form eines Fusionsproteins ausgedrückt, wobei ein Signalpeptid zu dem N-Terminus des Proteins hinzugefügt wird. Wenn das Fusionsprotein durch die Zellmembran gelangt, wird das Signalpeptid von einem Enzym entfernt und das gewünschte Protein wird in einer reifen Form ausgeschieden. Das Herstellungsverfahren

zur Ausscheidung ist darin vorteilhaft, dass die produzierte Aminosäuresequenz üblicherweise identisch zu dem Wildtyp ist. Der Ertrag eines Herstellungsverfahrens zur Ausscheidung ist aufgrund von unbefriedigenden Wirksamkeiten sowohl bezüglich des Membrantransports als auch des nachfolgenden Reinigungsprozesses jedoch häufig sehr gering. Dies steht in Übereinstimmung mit der gut bekannten Tatsache, dass der Ertrag eines in einem Ausscheidungsmodus in Prokaryoten hergestellten Säugetierproteins sehr gering ist: Bis jetzt wurde von keinem Mikrobenverfahren zur effizienten Expression und Ausscheidung von löslichem hG-CSF berichtet, welches keine zusätzlichen Methioningruppen an ihrem N-Terminus aufweisen.

[0008] Die gegenwärtigen Erfinder haben vor kurzem von der Verwendung eines neuen Ausscheidungssignal-Peptids berichtet, welches durch Modifizieren des Signalpeptids von E. coli wärmebeständigem Enterotoxin II (Koreanische Patentveröffentlichung Nr. 2000-19788) bei der Herstellung von hG-CSF hergestellt wird. Insbesondere wurde ein Expressionsvektor, welcher ein an dem 3'-Ende des modifizierten Signalpeptids von E. coli wärmebeständigem Enterotoxin II angebrachtes hG-CSF-Gen aufweist, berichtet, und biologisch aktives, reifes hG-CSF wurde durch Verwendung von mit dem Expressionsvektor umgewandeltem E. coli ausgedrückt. Jedoch sammelte sich das meiste des ausgedrückten hG-CSF in dem Zytoplasma und nicht in dem Periplasma an.

[0009] Die gegenwärtigen Erfinder haben danach gestrebt, ein effizientes Ausscheidungsverfahren für die Herstellung von hG-CSF in einem Mikroorganismus zu entwickeln und haben herausgefunden, dass ein modifiziertes hG-CSF, welches durch Ersetzen von wenigstens einer Aminosäuregruppe, insbesondere der 17. Zysteingruppe, von Wildtyp-hG-CSF mit einer andere Aminosäure hergestellt wird, die biologische Aktivität des Wildtyps bewahrt, und dass das modifizierte hG-CSF, welches an dem N-Terminus desselben keine Methioningruppe aufweist, mittels eines Organismus auf effiziente Weise ausgedrückt und ausgeschieden werden kann, wenn ein geeignetes Ausscheidungssignalpeptid verwendet wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Folglich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen modifizierten, menschliche Granulozyten stimulierenden Faktor (hG-CSF) zu schaffen, welcher unter Verwendung eines Mikroorganismus auf effiziente Weise hergestellt werden kann.

[0011] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen E. coli-Expressionsvektor zu schaffen.

[0012] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein mit diesem Vektor transformiertes E. coli zu schaffen.

[0013] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines hG-CSF zu schaffen, bei welchem unter Verwendung des E. coli an dem Amino-Terminus eine Methioningruppe nicht gebunden ist.

[0014] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein modifizierter hG-CSF gemäß Anspruch 1 verfügbar gemacht.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0015] Die oben genannten anderen Aufgaben und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden aus der nachfolgenden Beschreibung der Erfindung deutlich, welche in Verbindung mit den nachfolgenden, beigefügten Zeichnungen angegeben wird, welche jeweils zeigen:

[0016] [Fig. 1](#): die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von menschlichem Granulozyt stimulierenden Faktor des Wildtyps, der aus 174 Aminosäuregruppen zusammengesetzt ist (SEQ ID NR: 1 und 2);

[0017] [Fig. 2](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pT-CSF;

[0018] [Fig. 3](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pT14S1SG;

[0019] [Fig. 4](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pT14SS1SG;

[0020] [Fig. 5](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pT140SSG-4T22Q;

[0021] [Fig. 6](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pT14SS1S17SEG;

[0022] [Fig. 7](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pTO1SG;

[0023] [Fig. 8](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pBADG;

[0024] [Fig. 9](#): das Verfahren zur Konstruktion des Vektors pBAD2M3VG;

[0025] [Fig. 10a](#) und [Fig. 10b](#): die Ergebnisse von Western-Blot-Analysen, welche die Expression von hG-CSF und modifizierten hG-CSFs von rekombinierten Zelllinien und das Molekulargewicht der ausgedrückten Proteine verifizieren; und

[0026] [Fig. 11](#): die zellularen Aktivitäten von hG-CSF und modifiziertem hG-CSF hergestellt aus rekombinierten Zelllinien.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0027] Die modifizierten hG-CSFs der vorliegenden Erfindung werden in den Ansprüchen 1 bis 3 definiert.

[0028] Vier der fünf Cys-Gruppen von hG-CSF nehmen bei der Bildung von Disulfidbindungen teil, während die 17. Cys-Gruppe ungebunden in ihrem natürlichen Zustand verbleibt. Wenn jedoch eine große Menge an hG-CSF in Rekombinationszellen ausgedrückt wird, wird die 17. Cys-Gruppe in eine intermolekulare Disulfidbindungsbildung involviert, was zu der Ansammlung von agglomerierten hG-CSFs in dem Zytoplasma führt. Das erfindungsgemäße modifizierte hG-CSF, welches eine von Cys verschiedene Aminosäure an der 17. Position aufweist, ist jedoch frei von einem solchen Problem und kann in effektiver Weise mittels eines Ausscheidungsverfahrens unter Verwendung eines in geeigneter Weise umgewandelten Mikroorganismus hergestellt werden.

[0029] Das modifizierte hG-CSF der vorliegenden Erfindung kann mittels eines Gens verschlüsselt werden, welches eine Nukleotidsequenz aufweist, die von der modifizierten hG-CSF-Aminosäuresequenz gemäß dem genetischen Code abgeleitet wird. Es ist bekannt, dass einige unterschiedliche Kodons, welche eine spezielle Aminosäure verschlüsseln, aufgrund der Kodondegeneration existieren und aus diesem Grund schließt die vorliegende Erfindung in ihrem Schutzbereich alle Nukleotidsequenzen ein, welche von der modifizierten hG-CSF-Aminosäuresequenz abgeleitet sind. Vorzugsweise beinhaltet die modifizierte hG-CSF-Gensequenz einen oder mehrere bevorzugte Kodons von E. Coli.

[0030] Das auf diese Weise erzeugte Gen kann in einem konventionellen Vektor eingesetzt werden, um einen Expressionsvektor zu erlangen, welcher wiederum in einen geeigneten Wirt eingeführt werden kann, z. B. einen E. coli. Der Expressionsvektor kann des weiteren ein Signalpeptid beinhalten. Repräsentative Signalpeptide beinhalten ein wärmebeständiges E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptid (SEQ ID NR: 53), ein modifiziertes wärmebeständiges E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptid (SEQ ID NR: 54), ein Beta-Laktamase-Signalpeptid (SEQ ID NR: 24), ein Gen-III-Signalpeptid (SEQ ID NR: 42) oder ein modifiziertes Peptid davon, diese beschränken jedoch nicht die Signalpeptide, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Der bei der Erzeugung bzw. Herstellung des Expressionsvektors der vorliegenden Erfindung verwendete Aktivator kann jeder von denjenigen sein, welche ein heterologes Protein in einem Mikroorganismus als Wirt ausdrücken können. Insbesondere lac, Tac und Arabinose-Aktivator ist zu bevorzugen, wenn das heterologe Protein aus E. coli ausgedrückt wird.

[0031] Ein beispielhafter Expressionsvektor der vorliegenden Erfindung schließt pT14SS1S17SEG, pTO1S17SG, pTO17SG und pBAD2M3V17SG ein.

[0032] Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung können in den Mikroorganismus, z. B. E. coli BL21(DE3) (Novagen), E. coli XL-1 blue (Novagen), gemäß einer konventionellen Umwandlungsmethode (Sambrook et al., the supra) eingeführt werden, um Umwandlungsprodukte E. coli BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG (HM 10311), E. coli BL21(DE3)/pTO1S17SG (HM 10410), E. coli BL21(DE3)/pTO17SG (HM 10411), E. coli BL21(DE3)/pTO17TG (HM 10413), E. coli BL21(DE3)/pTO17AG (HM 10414), E. coli BL21(DE3)/pTO17GG (HM 10415), E. coli BL21(DE3)/pBAD17SG (HM 10511) und E. coli BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG (HM 10512) zu erhalten. Unter den umgewandelten Mikroorganismen sind die Umwandlungsprodukte E. coli BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG (HM 10311), E. coli BL21(DE3)/pTO1S17SG (HM 10410) und E. coli BL21(DE3)/pTO17SG (HM 10411) bevorzugt, welche an dem Korean Culture Center

of Microorganisms (KCCM) (Adresse: Department of Food Engineering, College of Eng., Yonsei University, Sodaemun-gu, Seoul 120-749, Republik Korea) am 24. März 1999 unter den jeweiligen Zugangsnummern KC-CM-10154, KCCM-10151 bzw. KCCM-10152 gemäß den Vorgaben des Budapester Vertrags über die Internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren hinterlegt wurden.

[0033] Das modifizierte hG-CSF-Protein der vorliegenden Erfindung kann durch Züchten der umgewandelten Mikroorganismen hergestellt werden, um das Gen auszudrücken, welches das modifizierte hG-CSF-Protein verschlüsselt bzw. codiert, und um das modifizierte hG-CSF-Protein zu Periplasma abzusondern; und durch Wiedergewinnen des modifizierten hG-CSF-Proteins aus dem Periplasma. Der umgewandelte Mikroorganismus kann gemäß einem konventionellen Verfahren (Sambrook et al., the supra) gezüchtet werden. Die Mikroorganismuskultur kann zentrifugiert oder gefiltert werden, um den das modifizierte hG-CSF-Protein absondernen Mikroorganismus zu sammeln. Der umgewandelte Mikroorganismus kann gemäß einem konventionellen Verfahren (Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, (1989)) gespalten werden, um eine periplasmische Lösung zu erhalten. Zum Beispiel kann der Mikroorganismus in einer hypotonischen Lösung, z. B. destilliertem Wasser, mittels eines osmotischen Schocks gespalten werden. Eine Wiedergewinnung des modifizierten hG-CSF in der periplasmischen Lösung kann mittels eines konventionellen Verfahrens (Sambrook et al., the supra) durchgeführt werden, z. B. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrations-Säulen-Chromatographie oder Immunsäulenchromatographie. Zum Beispiel kann hG-CSF mittels einer aufeinanderfolgenden Durchführung von CM-Sepharosesäulenchromatographie und Phenylsepharosesäulenchromatographie gereinigt werden.

[0034] Das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellte, modifizierte hG-CSF-Protein ist an dem N-Terminus nicht methioniert und weist eine biologische Eigenschaft auf, welche gleich oder höher als diejenige von Wildtyp-hG-CSF ist. Aus diesem Grund kann es so wie es ist in verschiedenen Anwendungen verwendet werden.

[0035] Die folgenden Beispiele dienen dazu, die vorliegende Erfindung weiter darzustellen, ohne ihren Schutzbereich einzuschränken.

Beispiel 1: Präparation bzw. Herstellung eines Gens, welches hG-CSF verschlüsselt

[0036] Ein cDNA-Gen, welches hG-CSF verschlüsselt, wurde mittels Durchführen von PCR hergestellt, wobei ein hG-CSF-Muster (R&D system, USA) verwendet wurde. Die verwendeten Primer sind diejenigen, die in dem US-Patent Nr. 4,810,643 beschrieben sind.

[0037] Um ein cDNA-Gen herzustellen, welches reifes hG-CSF verschlüsselt, wurde der Vektor pUC19-G-CSF (Biolabs, USA) PCR unter Verwendung der Primer der SEQ ID NR: 3 und 4 ausgesetzt. Der Primer der SEQ ID NR: 3 wurde dafür bestimmt, eine NdeI-Drosselstelle (5'-CATATG-3') vor dem ersten Aminosäure (Threonin)-Kodon des reifen hG-CSF zu schaffen, und der Primer der SEQ ID NR: 4, um eine BamHI-Drosselstelle (5'-GGATCC-3') nach dem Endkodon davon zu schaffen.

[0038] Das verstärkte hG-CSF-Gen wurde mit NdeI und BamHI aufgespalten, um ein Gen zu erhalten, welches reifes hG-CSF verschlüsselt. Das hG-CSF-Gen wurde an dem NdeI/BamHI-Abschnitt des Vektors pET14b (Novagen, USA) eingefügt, um den Vektor pT-CSF zu erhalten.

[0039] [Fig. 2](#) zeigt die oben genannte Vorgehensweise zum Konstruieren des Vektors pT-CSF.

Beispiel 2: Konstruktion eines Vektors, welcher das Gen beinhaltet, welches E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptid und ein modifiziertes hG-CSF verschlüsselt

(Schritt 1) Klonen des E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptidgens

[0040] Um das E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptidgen herzustellen, wurde das Paar komplementärer Oligonukleotide erzeugt, welches SEQ ID NR: 5 und 6 aufweist, und zwar basierend auf der Nukleotidsequenz des E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptids, und unter Verwendung von DNA-Synthesizer (Model 380B, Applied Biosystem, USA) synthetisiert.

[0041] Die oben genannten Oligonukleotide wurden erzeugt, um vor dem Anfangskodon des E. Coli Enterotoxin II eine BspHI-Drosselstelle (Komplementärstelle zu einer NcoI-Drosselstelle) und eine MluI-Drosselstelle

mittels eines langsamen Wechsels an dem anderen Ende zu schaffen.

[0042] Beide Oligonukleotide wurden bei 95°C temperiert, um stumpfendige DNA-Fragmente zu erhalten, welche eine Nukleotid-Sequenz aufweisen, welche E. coli-Enterotoxin II-Signalpeptid (STII-Gen) verschlüsselt.

[0043] Das STII-Gen wurde an der SmaI-Stelle des Vektors pUC19 (Biolabs, USA) eingefügt, um den Vektor pUC19ST zu erhalten.

(Schritt 2) Herstellung eines Gens, welches STII/hG-CSF verschlüsselt

[0044] Um ein Gen herzustellen, welches STII/hG-CSF verschlüsselt, wurde der in dem Herstellungsbeispiel 1 erlangte Vektor pT-CSF unter Verwendung der Primers der SEQ ID NR: 7 und 8 PCR ausgesetzt. Der Primer der SEQ ID NR: 7 wurde dafür bestimmt, das erste Kodon von hG-CSF durch das Ser-Kodon zu ersetzen, und der Primer der SEQ ID NR: 8 um eine BamHI-Drosselstelle (5'-GGATCC-3') nach dem Endkodon davon zu schaffen.

[0045] Die verstärkten DNA-Fragmente wurden mit MluI und BamHI aufgespalten und dann an dem MluI/BamHI-Abschnitt des in Schritt 1 erlangten pUC19ST eingesetzt, um den Vektor pUC19S1SG zu erhalten. Der auf diese Weise erhaltene Vektor pUC19S1SG enthielt ein Gen, welches ein STII/hG-CSF (gewünschtes STII-hG-CSF-Gen) verschlüsselt.

[0046] Der Vektor pUC19S1SG wurde mit BspHI und BamHI aufgespalten, um ein DNA-Fragment (522 bp) zu erhalten. Das DNA-Fragment wurde an dem NcoI/BamHI-Abschnitt des Vektors pET14b (Novagen, USA) eingefügt, um den Vektor pT14S1SG zu erhalten.

[0047] [Fig. 3](#) zeigt die oben genannte Vorgehensweise zum Herstellen des Vektors pT15S1SG.

(Schritt 3) Addition von E. coli-Enterotoxin II-Shine-Dalgarno-Sequenz zu STII-hG-CSF-Gen

[0048] Der in Schritt 2 erhaltene Vektor pT14S1SG wurde unter Verwendung der Primer der SEQ ID NR: 9 und 10 PCR ausgesetzt. Der Primer der SEQ ID NR: 9 wurde hergestellt, um eine E. coli-Enterotoxin II-Shine-Dalgarno-Sequenz (gewünschte STII-SD-Sequenz) und eine XbaI-Drosselstelle zu schaffen, und der Primer der SEQ ID NR: 10, um eine BamHI-Drosselstelle nach dem Endkodon des reifen hG-CSF zu schaffen, um ein DNA-Fragment (STII-SD-STII-hCSF) zu erhalten, welches ein STII-SD- und ein STII-hG-CSF-Gen enthält.

[0049] Das STII-SD-STII-hG-CSF-Fragment wurde mit XbaI und BamHI aufgespalten und dann an dem XbaI/BamHI-Abschnitt des Vektors pET14b (Novagen, USA) eingefügt, um den Vektor pT14SS1SG zu erhalten.

[0050] [Fig. 4](#) zeigt die oben genannte Vorgehensweise zum Erzeugen des Vektors pT14SS1SG.

[0051] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pT14SS1SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10310 bezeichnet wird.

(Schritt 4) Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen enthält, welches STII/hG-CSF-Fusionsprotein verschlüsselt

[0052] Das erste Kodon des modifizierten hG-CSF-Gens von Plasmid pT14SS1SSG, welches in Schritt 3 erhalten wurde, wurde gemäß einer gerichteten Mutagenese (Papworth, C. et al., Strategies, 9 (1996)) durch Thr ersetzt, was mittels PCR des Plasmids mit einem Sense-Primer (SEQ ID NR: 12) durchgeführt wurde, welcher eine modifizierte Nukleotidsequenz, einen entsprechenden Antisense-Primer (SEQ ID NR: 13) und Pfu (Stratagene, USA) aufwies.

[0053] Das verstärkte DNA-Fragment wurde wiedergewonnen und das Drosselenzym DpnI wurde hinzugegeben, um nicht umgesetzte Plasmide zu entfernen.

[0054] E. coli-XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Grundsequenz der DNA, welche von den umgewandelten Kolonien wiedergewonnen wurde, wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pT14SSG erhalten, welches ein Gen enthielt, welches Thr anstatt der ersten

Aminosäure von hG-CSF (SEQ ID NR: 11) enthielt.

-5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5

Thr Asn Ala Tyr Ala Thr Pro Leu Gly Pro (SEQ ID NR: 11)

-ACA-AAT-GCC-TAC-GCG-ACA-CCC-CTG-GGC-CCT (SEQ ID NR: 12)

-TGT-TTA-CGG-ATG-CGC-TGT-GGG-GAC-CCG-GGA (SEQ ID NR: 13)

[0055] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pT14SSG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10301 bezeichnet wird.

(Schritt 5) Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen enthält, das modifiziertes STII/hG-CSF verschlüsselt

[0056] Der in Schritt 4 erhaltene Vektor pT14SSG wurde unter Verwendung der Komplementär-Primer von SEQ ID NR: 15 und 16, welche gebildet wurden, um Thr-Kodon für das 4. Kodon von STII gemäß dem Verfahren von Schritt 4 einzusetzen, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten, PCR unterzogen.

[0057] E. coli XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Grundsequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde ein Plasmid erhalten, welches ein Gen enthielt, das Thr anstelle der 4. Aminosäure von STII (SEQ ID NR: 14) aufweist.

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu (SEQ ID NR: 14)

5'-GG-TGT-TTT-ATG-AAA-AAG-ACA-ATC-GCA-TTT-CTT-C-3' (SEQ ID NR: 15)

3'-CC-ACA-AAA-TAC-TTT-TTC-TGT-TAG-CGT-AAA-GAA-G-5' (SEQ ID NR: 16)

[0058] Das auf diese Weise erhaltene Plasmid wurde mit XbaI und MluI aufgespalten und dann an dem XbaI/MluI-Abschnitt des in Schritt 4 erhaltenen Vektors pT14SSG eingesetzt, um den Vektor pT14SSG-4T zu erhalten.

(Schritt 6) Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen aufweist, das modifiziertes STII/hG-CSF verschlüsselt

[0059] Der in Schritt 5 erhaltene Vektor pT14SSG-4T wurde unter Verwendung der Komplementär-Primer von SEQ ID NR: 18 und 19, welche gebildet wurden, um Gln-Kodon für das 22. Kodon von STII gemäß dem Verfahren von Schritt 4 einzusetzen, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten, PCR unterzogen.

[0060] E. coli XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Grundsequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde ein Plasmid pT14SSG-4T22Q erhalten, welches ein Gen enthielt, das Gln anstelle der 22. Aminosäure von STII (SEQ ID NR: 17) aufweist.

ASN Ala Gln Ala Thr Pro Leu Gly (SEQ ID NR: 17)

5'-CA-AAT-GCC-CAA-GCG-ACA-CCC-CTG-GGC-3' (SEQ ID NR: 18)

3'-GT-TTA-CGG-GTT-CGC-TGT-GGG-GAC-CCG-5' (SEQ ID NR: 19)

(Schritt 7) Erzeugung eines Vektors, welcher ein modifiziertes STII-SD und ein Gen beinhaltet, welches modifiziertes STII/hG-CSF verschlüsselt

[0061] Der in Schritt 6 erhaltene Vektor pT14SSG-4T22Q wurde unter Verwendung der Komplementär-Primer der SEQ ID NR: 20 und 21 gemäß dem Verfahren von Schritt 4 PCR unterzogen, um den Vektor pT14SSG-4T22Q zu erhalten, welcher die sechs Nukleotidsequenzen zwischen der STII-SD-Sequenz (GAGG) und dem Anfangskodon von STII (modifiziertes STII-SD von SEQ ID NR: 71) aufweist, PCR unterzogen.

[0062] [Fig. 5](#) repräsentiert die oben genannte Vorgehensweise zur Erzeugung des Vektors pT14SSG-4T22Q.

[0063] E. coli BL21(DE3) wurde mit dem Vektor pT14SSG-4T22Q umgewandelt, um ein Umwandlungspro-

dukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10302 bezeichnet wird.

Beispiel 3: Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen aufweist, das modifiziertes hG-CSF verschlüsselt

[0064] Um ein modifiziertes hG-CSF-Gen herzustellen, wurden S1-Oligomer (SEQ ID NR: 22), welches E. coli bevorzugte Kodone und Ser anstelle der 17. Aminosäure von hG-CSF aufweist, und AS1-Oligomer (SEQ ID NR: 23) unter Verwendung von DNA-Synthesizer (Model 380B, Applied Biosystem, USA) synthetisch hergestellt.

[0065] Eine 0,5 µl (50 pMol) Menge der Oligonukleotide wurde bei 95°C für 15 Min. zur Reaktion gebracht und für 3 Stunden bis 35°C gehalten. Die Mischung wurde in Ethanol abgeschieden und einer Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, um ein kohäsives Ende aufweisendes Doppelstrang(ds)-Oligomer zu erhalten.

[0066] Das in Schritt 3 von Beispiel 2 erhaltene Plasmid pT14SS1SG wurde mit Apal und BstXI aufgespalten und dann mit dem ein adhäsives Ende aufweisenden ds-Oligomer abgebunden, um den Vektor pT14SS1S17SEG zu erhalten. Der Vektor pT14SS1S17SEG enthielt ein Gen, welches hG-CSF verschlüsselt, das E. coli bevorzugte Kodone an dem Aminoterminal und Ser anstelle von jeweils der 1. und der 17. Aminosäure von hG-CSF aufwies.

[0067] [Fig. 6](#) zeigt die oben genannte Vorgehensweise zum Erzeugen des Vektors pT140SS1S17SEG.

[0068] E. coli BL21(DE3) wurde mit dem Vektor pT14SS1S17SEG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10311 bezeichnet wurde, welches bei dem Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) am 24. März 1999 unter der Zugangsnummer KCCM-10154 hinterlegt wurde.

Beispiel 4 (Vergleichsbeispiel): Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen beinhaltet, das E. coli-OmpA-Signalpeptid und modifiziertes hG-CSF verschlüsselt

[0069] Ein Vektor, welcher ein Gen beinhaltet, welches Tac-Aktivator und OmpA-Signalpeptid (SEQ ID NR: 24) verschlüsselt, sowie ein Gen, welches modifiziertes hG-CSF verschlüsselt, wurde wie folgt hergestellt:

Met-Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Ala-Ile-Ala, Val, Ala-Leu-Ala-Gly-Phe-

Ala-Thr-Val-Ala-Tln-Ala- (SEQ ID NR: 24)

--GTT-GCG-CAA-GCT-TCT-CGA-- (SEQ ID NR: 25)

--CAA-CGC-GTT-CGA-AGA-GCT-- (SEQ ID NR: 26)

HindIII-Drosselstelle

[0070] Der in Beispiel 1 erhaltene Vektor pT-CSF wurde unter Verwendung eines Primers (SEQ ID NR: 27) PCR unterzogen, welcher zum Ersetzen des Ser-Kodons für das erste Kodon von hG-CSF dafür bestimmt war, sowie einem weiteren Primer (SEQ ID NR: 28), um eine EcoRI-Drosselstelle (5'GAATTC-3') nach dem Endkodon davon zu schaffen, um ein DNA-Fragment zu erhalten, welches ein Gen beinhaltet, das modifiziertes hG-CSF verschlüsselt.

[0071] Das DNA-Fragment wurde mit HindIII und EcoRI aufgespalten und dann an dem HindIII/EcoRI-Abschnitt des Vektors pFlag-CTS (Eastman, USA) eingefügt, um den Vektor pTO1SG zu erhalten, welcher ein Gen beinhaltet, welches E. coli-OmpA-Signalpeptid und modifiziertes hG-CSF (SEQ ID NR: 29) verschlüsselt.

[0072] [Fig. 7](#) zeigt das oben beschriebene Verfahren zur Erzeugung des Vektors pTO1SG.

[0073] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO1SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10409 bezeichnet wurde.

Beispiel 5: Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen beinhaltet, das E. coli-OmpA-Signalpeptid und modifiziertes hG-CSF verschlüsselt

[0074] Das erste Kodon des modifizierten hG-CSF-Gens des in Beispiel 4 erhaltenen Plasmids pTO1SG wurde durch Thr ersetzt, und zwar in Übereinstimmung mit gerichteter Mutagenese (Papworth, C. et al., Strate-

gies, 9, 3 (1996)) mittels Durchführung von PCR des in Beispiel 4 erhaltenen Plasmids pTO1SG mit einem Sense-Primer (SEQ ID NR: 30), welcher dafür bestimmt war, das erste Kodon hG-CSF mit einem Thr-Kodon zu ersetzen, sowie einem Komplementär-Aantisense-Primer (SEQ ID NR: 31).

[0075] E. coli XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den transformierten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde ein Plasmid pTOG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Thr anstelle der 1. Aminosäure von hG-CSF aufwies.

[0076] E. coli BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTOG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches E. coli-HM 10401 bezeichnet wurde.

Beispiel 6: Produktion von modifizierten hG-CSFs

(a) Produktion von [Ser1, Ser17]hG-CSF

[0077] Der im Beispiel 4 erhaltene Vektor pTO1SG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 32), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Ser-Kodon zu ersetzen, und einem Komplementär-Antisense-Primer (SEQ ID NR: 33) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0078] E. coli-XL1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO1S17SG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Ser anstelle der 1. und 17. Aminosäuren von hG-CSF aufwies.

[0079] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO1S17SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10410 bezeichnet wurde, welches am 24. März 1999 unter der Zugangsnummer KCCM-10151 am Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) hinterlegt wurde.

(b) Produktion von [Ser17]hG-CSF

[0080] Der im Beispiel 5 erhaltene Vektor pTOG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 32), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Ser-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 33) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0081] E. coli-XL1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO17SG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Ser anstelle der 17. Aminosäure von hG-CSF aufwies.

[0082] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO17SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10411 bezeichnet wurde, welches am 24. März 1999 unter der Zugangsnummer KCCM-10152 am Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) hinterlegt wurde.

(c) Produktion von [Thr17]hG-CSF

[0083] Der im Beispiel 5 erhaltene Vektor pTOG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 34), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Komplementär-Antisense-Primer (SEQ ID NR: 35) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2 zu ersetzen, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0084] E. coli-XL1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO17TG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Thr anstelle der 17. Aminosäuren von hG-CSF aufwies.

[0085] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO17SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10413 bezeichnet wurde.

(d) Produktion von [Ala17]hG-CSF

[0086] Der im Beispiel 5 erhaltene Vektor pTOG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 36), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Ala-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 37) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0087] E. coli-XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO17AG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Thr anstelle der 17. Aminosäuren von hG-CSF aufwies.

[0088] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO17TG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10414 bezeichnet wurde.

(e) Produktion von [Gly17]hG-CSF

[0089] Der im Beispiel 5 erhaltene Vektor pTOG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 38), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Gly-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 39) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0090] E. coli-XL1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO17GG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Gly anstelle der 17. Aminosäure von hG-CSF aufwies.

[0091] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO17GG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10415 bezeichnet wurde.

(f) Produktion von [Asp17]hG-CSF (Vergleichsbeispiel)

[0092] Der im Beispiel 5 erhaltene Vektor pTOG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 40), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit einem Asp-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 41) gemäß dem Verfahren von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0093] E. coli-XL1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisssequenz der aus den umgewandelten Kolonien wiedergewonnenen DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pTO1S17APG erhalten, welches ein Gen beinhaltet, welches Asp anstelle der 17. Aminosäuren von hG-CSF aufwies.

[0094] E. coli-BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pTO1S17APG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10416 bezeichnet wurde.

Beispiel 7: Erzeugung eines Vektors, welcher ein Gen beinhaltet, das E. coli-Gen III-Signalpeptid und modifiziertes hG-CSF verschlüsselt

(a) Konstruktion eines Vektors, welcher ein Gen beinhaltet, das Arabinoseaktivator und E. coli-Gen II-Signalpeptid verschlüsselt

[0095] Ein Vektor, welcher ein Gen beinhaltet, das Arabinoseaktivator und E. coli-Gen III-Signalpeptid (SEQ ID NR: 42) verschlüsselt, sowie ein Gen, welches modifiziertes hG-CSF verschlüsselt, wurde wie folgt erzeugt:

Met-Lys-Lys-Leu-Leu-Phe-Ala-Ile-Pro-Leu-Val-Val-Pro-
 Phe-Tyr-Ser-His-Ser- (SEQ ID NR: 42)
 -TAT-AGC-CAT-AGC-ACC-ATG-GAG (SEQ ID NR: 43)
 -ATA-TCG-GTA-TCG-TGG-TAC-CTC (SEQ ID NR: 44)

NcoI-Drosselstelle

[0096] Plasmid pBAD-gIIIA (Invitrogen, USA), welches ein Gen beinhaltet, das Arabinoseaktivator und Gen III-Signalpeptid verschlüsselt, wurde mit NcoI aufgespalten und Einzelstrang-DNAs wurden mit Klenow DNA-Polymerase entfernt, um eine stumpfendige Doppelstrang-DNA zu erhalten, welche dann mit BglII aufgespalten wurde, um ein Vektorfragment zu erhalten, welches sowohl ein stumpfes Ende als auch ein kohäsives Ende aufwies.

[0097] Der in Beispiel 1 erhaltene Vektor pT-CSF wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 46), welcher eine Nukleotidsequenz aufwies, welche die 2. bis zu der 9. Aminosäure von hG-CSF (SEQ ID NR: 45) verschlüsselte, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 47) in Übereinstimmung mit der Vorgehensweise von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein stumpfendiges DNA-Fragment zu erhalten, welches hG-CSF-Gen und eine BamHI-Drosselstelle in dem Karboxyl-Terminus aufweist. Das Fragment wurde dann mit BamHI aufgespalten, um ein hG-CSF-Genfragment zu erhalten, welches sowohl ein stumpfes Ende als auch ein kohäsives Ende aufwies.

Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu (SEQ ID NR: 45)
 5'-C-CCC-CTG-GGC-CCT-GCC-AGC-TCC-CRG-3' (SEQ ID NR: 46)
 3'-G-GGG-GAC-CCG-GGA-CGG-TCG-AGG-GAC-5' (SEQ ID NR: 47)

[0098] Das hG-CSF-Genfragment wurde in den oben erhaltenen Vektor eingeführt, um den Vektor pBADG zu erhalten, welcher ein Gen enthielt, welches E. coli-Gen III-Signalpeptid und hG-CSF (SEQ ID NR: 48) verschlüsselte.

[0099] [Fig. 8](#) beschreibt die oben genannte Vorgehensweise zum Erzeugen des Vektors pBADG.

[0100] E. coli BI21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pBADG umgewandelt, um eine Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als E. coli-HM 10501 bezeichnet wurde.

(b) Produktion von [Met2, Val3]hG-CSF (Vergleichsbeispiel)

[0101] Plasmid pBAD-gIIIA (Invitrogen, USA) wurde mit NcoI und BglII aufgespalten, um ein Fragment zu erhalten, welches zwei kohäsive Enden aufwies.

[0102] Der in Beispiel 1 erhaltene Vektor pT-CSF wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 50), welcher eine Nukleotidsequenz aufwies, welche für die 2. bis zu der 9. Aminosäure von [Met2, Val3]hG-CSF (SEQ ID NR: 49) verschlüsselte, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 51) in Übereinstimmung mit der Vorgehensweise von Schritt 4 von Beispiel 2, um ein stumpfendiges DNA-Fragment zu erhalten, welches hG-CSF-Gen und eine BamHI-Drosselstelle in dem Karboxyl-Terminus aufweist, welches dann mit Neol und BamHI aufgespalten wurde, um ein hG-CSF-Genfragment zu erhalten, welches zwei kohäsive Enden aufwies.

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu (SEQ ID NR: 49)
 5'-TAC-GCG-TCC-ATG-GTG-GGC-CCT-GCC-AGC-TCC-CTG-3' (SEQ ID NR: 50)
 3'-ATG-CGC-AGG-TAC-CAC-CCG-GGA-CGG-TCG-AGG-GAC-5' (SEQ ID NR: 51)

NcoI-Drosselstelle

[0103] Das hG-CSF-Genfragment wurde in den oben erhaltenen Vektor eingeführt, um den Vektor pBAD2M2VG zu erhalten, welcher ein Gen enthielt, das E. coli-Gen II-Signalpeptid verschlüsselte, und Met und Val anstelle der 2. und 3. Aminosäuren von hG-CSF (SEQ ID NR: 52).

[0104] [Fig. 9](#) zeigt die oben genannte Vorgehensweise zum Konstruieren des Vektors pBAD2M3VG.

[0105] *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pGAD2M3VG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als *E. coli*-HM 10510 bezeichnet wurde, welches am Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) am 24. März 1999 unter der Zugangsnummer KCCM-10153 hinterlegt wurde.

(c) Produktion von [Ser 17]hG-CSF

[0106] Der in (a) erhaltene Vektor pBADG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 32), welcher dafür konstruiert war, das 17. Kodon von hG-CSF mit dem Ser-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 33) gemäß der Vorgehensweise von Schritt 4 aus Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0107] *E. coli* XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisequenz der von den umgewandelten Kolonien wiedererlangten DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pBAD17SG erhalten, welches ein Gen beinhaltete, welches anstelle der 17. Aminosäure von hG-CSF Ser hatte.

[0108] *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pBAD17SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als *E. coli*-HM 10511 bezeichnet wurde.

(d) Produktion von [Met2, Val3, Ser17]hG-CSF

[0109] Der in (b) erhaltene Vektor pBAD2M3VG wurde PCR unterzogen, und zwar unter Verwendung eines Sense-Primers (SEQ ID NR: 32), welcher dafür bestimmt war, das 17. Kodon von hG-CSF mit dem Ser-Kodon zu ersetzen, und eines Komplementär-Antisense-Primers (SEQ ID NR: 33) gemäß der Vorgehensweise von Schritt 4 aus Beispiel 2, um ein modifiziertes Plasmid zu erhalten.

[0110] *E. coli* XL-1 blue (Novagen, USA) wurde mit dem modifizierten Plasmid umgewandelt. Die Basisequenz der von den umgewandelten Kolonien wiedererlangten DNA wurde ermittelt und auf diese Weise wurde das Plasmid pBAD2M3V17SG erhalten, welches ein Gen beinhaltete, welches anstelle der 2. 3, und 17. Aminosäure von hG-CSF Met, Val und Ser hatte.

[0111] *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene, USA) wurde mit dem Vektor pBAD2M3V17SG umgewandelt, um ein Umwandlungsprodukt zu erhalten, welches als *E. coli*-HM 10512 bezeichnet wurde.

Beispiel 8: Produktion von hG-CSF

[0112] Die in den Beispielen 2 bis 7 hergestellten Umwandlungsprodukte wurden in LB-Medium (1% Baktrypton, 0,5% Bakto-Hefeextrakt und 1% NaCl) in einer Kultur angelegt bzw. gezüchtet und dann in der Brutkammer in der Gegenwart eines Expressionsinduktors (IPTG) für 3 Stunden aufbewahrt oder in der Abwesenheit von IPTG für mehr als 15 Stunden gezüchtet. Jede der Kulturen wurde bei 6.000 U/min für 20 min. zentrifugiert, um bakterielle Zellen abzuscheiden, und der Niederschlag wurde in einem 1/10-Volumen einer isotoni-schen Lösung (20% Sucrose, 10 mM Tris-Cl-Pufferlösung, welche 1 mM EDTA, pH 7,0 enthielt) suspendiert. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 30 min. stehengelassen und dann bei 7.000 U/min für 10 min. zentrifugiert, um bakterielle Zellen zu sammeln. Die Zellen wurden in D. W. bei 4°C resuspendiert und bei 7.000 U/min für 10 min. zentrifugiert, um eine überstehende Flüssigkeit als eine periplasmische Lösung zu erhalten. Das hG-CSF-Niveau in der periplasmischen Lösung wurde gemäß dem ELISA-Verfahren analysiert (Kato, K. et al., J. Immunol., 116, 1554 (1976)) unter Verwendung eines Antikörpers gegen hG-CSF (Aland, USA), welcher als die Menge von hG-CSF berechnet wurde, welche pro 1 l der Kultur erzeugt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Umwandlungsprodukt	Beispiel	Expressionsvektor	hG-CSF-Niveau im Periplasma (mg/l)
HM 10301	2 (Schritt 4)	pT14SSG	65
HM 10302	2 (Schritt 7)	pT140SSG-4T22Q	277
HM 10310	2 (Schritt 3)	pT14SS1SG	92
HM 10311	3	pT14SS1S17SEG	1.512
HM 10401	5	pTOG	85
HM 10409	4	pTO1SG	105
HM 10410	6(a)	pTO1S17SG	1.477
HM 10411	6(b)	pTO17SG	1.550
HM 10413	6(c)	pTO17TG	1.373
MM 10414	6(d)	pTO17AG	1.486
HM 10415	6(e)	pTO17GG	1.480
HM 10416	6(f)	pTO17APG	67
HM 10501	7(a)	pBADG	54
HM 10510	7(b)	pBAD2M3VG	69
HM 10511	7(c)	pBAD17SG	937
HM 10512	7(d)	pBAD2M3V17SG	983

Beispiel 9: Reinigung von hG-CSF

[0113] Das Umwandlungsprodukt E. coli-HM 10411, welches in Beispiel 6(b) hergestellt wurde, wurde in LB-Medium gezüchtet und die Kultur wurde bei 6.000 1/min für 20 Min. zu Erntezellen zentrifugiert. Die periplasmische Lösung wurde aus den Zellen durch das Wiederholen der Vorgehensweise von Beispiel 8 hergestellt.

[0114] Die periplasmische Lösung wurde auf einen pH-Wert von 5,0 bis 5,5 eingestellt, adsorbiert auf einer CM-Sepharose-Säule (Pharmacia Inc., Schweden) auf einen pH-Wert von 5,3 vorausgeglichen und dann wurde die Säule mit 25 mM NaCl gewaschen. hG-CSF wurde durch sequenzielles Hinzufügen von Pufferlösungen, welche 50 mM, 100 mM und 200 mM NaCl enthielten, zu der Säule eliminiert und Teile, welche hG-CSF enthielten, wurden gesammelt und kombiniert.

[0115] Die kombinierten Teile wurden einer Phenylsepharose (Pharmacia Inc., Schweden) Säulenchromatographie unterzogen, um [Ser17]hG-CSF zu erhalten, welches eine Reinheit von 99% aufwies.

[0116] Des weiteren wurde die oben genannte Vorgehensweise wiederholt, und zwar unter Verwendung von jedem der Umwandlungsprodukte E. coli HM 10311, HM 10409, HM 10411, HM 10413, HM 10414, HM 10415, HM 10510 und HM 10512, welche in den jeweiligen Beispielen 3, 4, 6(b), 6(c), 6(d), 6(e), 7(b) und 7(d) hergestellt wurden.

[0117] Jede der gereinigten hG-CSF-Teile wurde einer Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen, um die Reinheit und die ungefähre Konzentration des hG-CSF zu ermitteln, und dann ELISA ausgesetzt, um die exakte hG-CSF-Konzentration in der periplasmischen Lösung zu ermitteln. Met-hG-CSF (Kirin amgen) wurde als eine Kontrolle verwendet.

[0118] [Fig. 10a](#) reproduziert das SDS-PAGE-Ergebnis, wobei Spalte 1 Met-G-CSF, Spalte 2 die periplasmische Lösung des Umwandlungsprodukts E. coli-HM 10411 und Spalte 3 das gereinigte [Ser17]hG-CSF zeigt. Wie in [Fig. 10b](#) ersichtlich ist, ist das Molekulargewicht von [Ser17]hG-CSF dasselbe wie dasjenige des Wildtyp-hG-CSF und die periplasmische Lösung des Umwandlungsprodukts E. coli HM 10411 beinhaltet einen hohen Anteil von [Ser17]hG-CSF.

[0119] Des weiteren wurden die N-Terminal-Aminosäuresequenzen von hG-CSFs ermittelt und die Nukleo-

tidsequenzen, welche die 1. bis 32. Aminosäure verschlüsselten, wurden unter Verwendung der Umwandlungsprodukte HM 10311, HM 10409, HM 10411, HM 10413, HM 10414, HM 10415, HM 10510 und HM 10512, welche in den SEQ ID NR: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 und 70 dargestellt sind, hergestellt. Das Ergebnis zeigt, dass das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellte, modifizierte hG-CSF an dem N-Terminus nicht methionyliert ist.

[0120] Ein Nitrocellulosefilter (Bio-Rad Lab., USA) wurde mit einer Pufferlösung zum Aufsaugen befeuchtet (170 mM Glizin, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 20% Methanol) und die auf dem Gel separierten Proteine wurden auf einem Nitrocellulosefilter (Bio-Rad Lab., USA) für 3 Stunden einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Der Filter wurde in 1% Kasein für 1 Stunde gehalten und drei Mal mit PBS, welches 0,05% Tween 20 enthielt, gewaschen. Der Filter wurde in Ziegen-Anti-G-CSF-Antikörper(R&D System AB-214-NA, USA)-Lösung, welche mit PBS verdünnt war, getan und bei Zimmertemperatur für 2 Stunden zur Reaktion gebracht. Nach der Reaktion wurde der Filter 3 Mal mit einer PBST-Lösung gewaschen, um unreaktierte Antikörper zu entfernen. Meerrettich-Peroxydase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Ziegen-IgG (Bio-Rad Lab., USA), verdünnt mit PBS, wurde hinzugefügt und bei Zimmertemperatur für 2 Stunden zur Reaktion gebracht. Der Filter wurde mit PBST gewaschen und eine Peroxydase-Substanz-Kit(Bio-Rad Lab., USA)-Lösung wurde hinzugefügt, um eine Farbreaktion zu entwickeln. Die Ergebnisse von der oben angegebenen Western-Blot-Analyse sind in [Fig. 10b](#) dargestellt, wobei Spalte 1 eine positive Kontrolle, Met-G-CSF, repräsentiert und Spalte 2 gereinigtes [Ser17]hG-CSF. Wie in [Fig. 10b](#) zu erkennen ist, entspricht das Molekulargewicht von [Ser17]hG-CSF demjenigen von Wildtyp-hG-CSF.

Beispiel 10: Zelluläre Aktivität von hG-CSF und modifiziertem hG-CSF

[0121] Die Zelllinie HL-60 (ATCC CCL-240 stammend von dem Knochenmark eines promyelozytischen Leukämiepatienten/einer weißen, 36 Jahre alten Frau) wurde in RPMI 1640 Medium, welches 10% fötales Bovinserum enthielt und auf $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt war, wonach zu demselben DMSO (Dimethylsulfoxid, Kulturgard/SIGMA) auf eine Konzentration von 1,25% (v/v) hinzugegeben wurde. 90 µl der sich ergebenden Lösung wurde einer 96 Wellplatte (Corning/geringe Evaporation 96 Wellplatte) in einer Menge von 2×10^4 Zellen/Well und bei 37°C unter 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert.

[0122] Jede der modifizierten [Ala17]hG-CSF, [Gly17]hG-CSF, [Ser17]hG-CSF und [Thr17]hG-CSF wurde in RPMI 1640-Medium verdünnt auf eine Konzentration von 500 ng/ml und dann 10 Mal zweifach mit RPMI 1640-Medium verdünnt.

[0123] Die sich ergebende Lösung wurde zu den Wells bei 10 µl pro Well hinzugefügt und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Als eine positive Kontrolle wurde ein kommerziell erhältliches hG-CSF (Jeil Pharmaceutical.) eingesetzt.

[0124] Das Niveau der vergrößerten Zelllinie wurde festgestellt, indem ein kommerziell erhältlicher CellTiter96™ (Cat # G4100, Promega) basierend auf der gemessenen optischen Dichte bei 670 nm eingesetzt wurde.

[0125] Wie aus [Fig. 11](#) ersichtlich ist, sind die zellularen Aktivitäten der modifizierten hG-CSF dieselben oder höher als diejenigen der positiven Kontrolle Wildtyp-hG-CSF.


[0126] Während die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beschrieben und dargestellt wurden, ist es offensichtlich dass verschiedene Änderungen und Modifikationen daran vorgenommen werden können, ohne von dem Gedanken der vorliegenden Erfindung abzuweichen, welcher nur durch den Schutzbereich der beigefügten Ansprüche beschränkt werden sollte.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Hanmi Pharm. Co., Ltd
#893-5 Hajeo-ri Paltan-myun
Hwasung-Kun
Kyonggi-do.
KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>HM10311</i>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10154
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March 24, 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Department of Food Engineering College of Eng. Yonsei University Sodaemun-gu, Seoul 120-749 Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s) : Date: April 6, 1999 


¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired : where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: Hanmi Pharm. Co., Ltd
#893-5 Hajeo-ri Paltan-myun
Hwasung-Kun
Kyonggi-do:
KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : HM10410	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10151
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March 24, 1999 (date of the original deposit). ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Department of Food Engineering College of Eng. Yonsei University Sodaemun-gu, Seoul 120-749 Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s): Date: April 6, 1999 <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  </div>

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired : where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.


EP 1 194 575 B1

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Hanmi Pharm. Co., Ltd
#893-5 Hajeo-ri Paltan-myun
Hwasung-Kun
Kyonggi-do.
KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : HM10111	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10152
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March. 24. 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Department of Food Engineering College of Eng. Yonsei University Sodaemun-gu, Seoul 120-749 Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of of authouized official(s) : Date: April. 6. 1999 

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired : where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To: Hanmi Pharm. Co., Ltd
#893-5 Hajeo-ri Paltan-myun
Hwasung-Kun
Kyonggi-do,
KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>HM10510</i>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM-10153
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March 24, 1999 (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Department of Food Engineering College of Eng. Yonsei University Sodaemun-gu, Seoul 120-749 Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of of authorized official(s): Date: April. 6. 1999



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired : where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

<110> Pharm. Co., Ltd.

<120> Modifizierter menschlicher Granulozyten-Kolonien stimulierender
Faktor und Verfahren zur Herstellung desselben

<130> PCA00729/HMY

<140> US/10/031,123

<141> 2002-01-09

<160> 71

<170> KOPATIN 1.0

<210> 1

<211> 522

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

<400> 1

aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

gag aag ctg tgt gcc acc tac aag ctg tgc cac ccc gag gag ctg gtg 144
 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45

ctg ctc gga cac tct ctg ggc atc ccc tgg gct ccc ctg agc tcc tgc 192
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

ccc agc cag gcc ctg cag ctg gca ggc tgc ttg agc caa ctc cat agc 240
 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80

ggc ctt ttc ctc tac cag ggg ctc ctg cag gcc ctg gaa ggg ata tcc 288
 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95

ccc gag ttg ggt ccc acc ttg gac aca ctg cag ctg gac gtc gcc gac 336
 Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 100 105 110

ttt gcc acc acc atc tgg cag cag atg gaa gaa ctg gga atg gcc cct 384
 Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 115 120 125

gcc ctg cag ccc acc cag ggt gcc atg ccg gcc ttc gcc tct gct ttc 432

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe

130

135

140

cag cgc cgg gca gga ggg gtc ctg gtt gct agc cat ctg cag agc ttc 480

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe

145

150

155

160

ctg gag gtg tcg tac cgc gtt cta cgc cac ctt gcg cag ccc 522

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165

170

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val

35

40

45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys

50

55

60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser

65

70

75

80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser

85

90

95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp

100

105

110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro

115

120

125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe

130

135

140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe

145

150

155

160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165

170

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer für den N-Terminal von hG-CSF

<400> 3

cgccgccata tgacaccctt gggccctgcc ag

32

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer für den C-Terminal von hG-CSF

<400> 4

accgaattcg gatcctcagg gctgcgcaag gtggcg

36

<210> 5

<211> 72

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Herstellen von *E. coli* Enterotoxin II
Signalpeptid

<400> 5

tcatgaaaaa gaatatcgca ttcttcttg catctatgtt cgtttttct attgctacaa 60

atgcctacgc gt

72

<210> 6

<211> 72

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Herstellen von *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid

<400> 6

acgcgtaggc attgtagca atagaaaaaa cgaacataga tgcaagaaga aatgcgatat 60

tccttttcat ga

72

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer, welcher den N-Terminal von [Ser1]hG-CSF verschlüsselt

<400> 7

acaaatgcct acgcgtctcc cctgggccct gccagctcc

39

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer, welcher den C-Terminal von [Ser1]hG-CSF
verschlüsselt

<400> 8

accgaattcg gatcctcagg gctgcgcaag gtggcgtaga ac

42

<210> 9

<211> 65

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer, welcher die *E.coli* Enterotoxin II-Shine-
Dalgarno-Sequenz verschlüsselt

<400> 9

cggtttcct ctagaggttg aggtgttta tgaaaaagaa tatcgcatftt ctcttgcat 60

ctatg

65

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid, welches eine BamHI-Drosselstelle aufweist

<400> 10

accgaattcg gatcctcagg gctgcgcaag gtggcgtaga acgcg

45

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Letzte fünf Aminosäuren von *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid plus
die 1. bis 5. Aminosäuren von hG-CSF

<400> 11

Thr Asn Ala Tyr Ala Thr Pro Leu Gly Pro

1

5

10

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Herstellen von [Thr1]hG-CSF

<400> 12

acaaatgcct acgcgacacc cctgggccct

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense der SEQ ID NR: 12

<400> 13

agggccccagg ggtgtcgcgt aggcatttgt

30

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> N-Terminal-Sequenz von *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid, welches Threonin als die 4. Aminosäure aufweist

<400> 14

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu

1

5

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Ersetzen der 4. Aminosäure von *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid mit Threonin

<400> 15

gggtgttttat gaaaaagaca atcgcatttc ttc...

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 15

<400> 16

gaagaaatgc gattgtcttt ttcataaaac acc

33

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> C-Terminal-Sequenz von *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid, welches
Glutamin als die 22. Aminosäure aufweist

<400> 17

Asn Ala Gln Ala Thr Pro Leu Gly

1

5

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Ersetzen der 22. Aminosäure von *E. coli*
Enterotoxin II-Signalpeptid mit Glutamin

<400> 18

caaatgccca agcgacaccc ctgggc

26

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 18

<400> 19

gcccaggggt gtcgcttggg catttg

26

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zum Modifizieren von *E. coli* Enterotoxin II-Shine-Dalgarno-Sequenz

<400> 20

tctagagggt gaggtgttt atga

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 20

<400> 21

tcataaaaca cctcaacctc taga

24

<210> 22

<211> 66

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> S1 Oligomer, welches eine *E. coli*-bevorzugte Nucleotidsequenz aufweist, welche die 6. bis 26. Aminosäure von [Ser17]hG-CSF verschlüsselt

<400> 22

cagcctcttc tctccacaa tcttccttc ttaagtctct tgaacaagtt agaaagatcc 60

aaggcgcg

66

<210> 23

<211> 66
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 22 (AS1 Oligomer)

<400> 23

ccgggtcgga gaagagaagg tgtagaaaag gaagaattca gagaacttgt tcaatcttcc 60

taggtt

66

<210> 24
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<220>

<221> SIGNAL
 <222> (1).. (21)
 <223> *E. coli* OmpA Signalpeptid

<400> 24

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1

5

10

15

Thr Val Ala Gln Ala

20

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid, welches eine Hind III-Erkennungsstelle beinhaltet

<400> 25

gttgcgcaag cttctcga

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 25

<400> 26

tcgagaagct tgcgcaac

18

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid für den N-Terminal von [Ser1] hG-CSF

<400> 27

gttgcgcaag cttctcccct gggccctgcc agctccctg 39

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid, welches eine EcoRI-Drosselstelle aufweist

<400> 28

accgaattct cagggctgcg caaggtggcg tagaacgcg 39

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> *E. coli* OmpA-Signalpeptid plus die 1. bis 5. Aminosäure von [Ser1]hG-CSF

<400> 29

Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ser Pro Leu Gly Pro

1

5

10

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Thr1]hG-CSF

<400> 30

accgttgcg c aagctacacc cctgggccct

30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 30

<400> 31

agggccccagg ggtgtagctt gcgcaacggt

30

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Ser17]hG-CSF

<400> 32 —

agcttcctgc tcaagtcttt agagcaagtg agg

33

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 32

<400> 33

cctcacttgc tctaaagact tgagcaggaa gct

33

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Thr17]hG-CSF

<400> 34

agcttcctgc tcaagacctt agagcaagtg agg

33

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 34

<400> 35

cctcacttgc tctaaggtct tgagcaggaa gct

33

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Ala17]hG-CSF

<400> 36

agcttcctgc tcaaggcctt agagcaagtg agg

33

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 36

<400> 37

cctcacttgc tctaaggcct tgagcaggaa gct

33

<210> 38

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Gly17]hG-CSF

<400> 38

agcttcctgc tcaagggcct agagcaagtg agg

33

<210> 39

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 38

<400> 39

cctcacttgc tctaagccct tgagcaggaa gct

33

<210> 40

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Asp17]hG-CSF

<400> 40

agcttcctgc tcaaggactt agagcaagtg agg

33

<210> 41

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 40

<400> 41

cctcacttgc tctaagtcct tgagcaggaa gct

33

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(18)

<223> *E. coli* Gen III-Signalpeptid

<400> 42

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser

1

5

10

15

His Ser

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid, welches eine Nco I-Drosselstelle aufweist

<400> 43

tatagccata gcaccatgga g

21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 43

<400> 44

ctccatggig ctatggctat a

21

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 2. bis 10. Aminosäure von hG-CSF

<400> 45

Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu

1

5

<210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer, welcher die 2. bis 10. Aminosäure von hG-CSF plus ein zusätzliches Cytosin an seinem 5'-Ende verschlüsselt

<400> 46

ccccctgggc cctgccagct ccctg

25

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 46

<400> 47

cagggagctg

gcagggccca

ggggg

25

<210> 48
 <211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> *E. coli* Gen III-Signalpeptid plus die 1. bis 5. Aminosäure von hG-CSF

<400> 48

Phe Tyr Ser His Ser Thr Pro Leu Gly Pro

1

5

10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 9. Aminosäure von [Met²,Val³]hG-CSF

<400> 49

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu

1

5

<210> 50

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotid zur Herstellung von [Met2,Val3]hG-CSF

<400> 50

tacgcgtcca tggtagggccc tgccagctcc ctg

33

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense von SEQ ID NR: 50

<400> 51

cagggagctg gcagggccca ccatggacgc gta

33

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> *E. coli* Gen III-Signalpeptid plus die 1. bis 5. Aminosäure von [Met2,Val3]hG-CSF

<400> 52

Phe Tyr Ser His Ser Thr Met Val Gly Pro

1

5

10

<210> 53

<211> 23

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(23)

<223> Wärmebeständiges *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid

<400> 53

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1

5

10

15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Modifiziertes wärmebeständiges *E. coli* Enterotoxin II-Signalpeptid

<400> 54

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser

1

5

10

15

Ile Ala Thr Asn Ala Gln Ala

20

<210> 55

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser1, Ser17]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 55

tct ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

tct tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser1, Ser17]hG-CSF

<400> 56

Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 57

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser1]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 57

tct ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser1]hG-CSF

<400> 58

Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 59

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser17]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 59

aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

tct tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223>Die 1. bis 32. Aminosäure von [Ser17]hG-CSF

<400> 60

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 61

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von
[Thr17]hG—CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 61

aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

acc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Thr Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Thr17]hG--CSF

<400> 62

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Thr Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 63

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Ala17]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 63

aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

gcc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Ala Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Ala17]hG-CSF

<400> 64

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 65
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Gly17]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(96)

<400> 65

aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1 5 10 15

ggc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Gly Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20 25 30

<210> 66
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Gly17]hG-CSF

<400> 66

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Gly Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 67

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Met2, Val3]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 67

aca atg gtc ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

<210> 68

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Met2, Val3]hG-CSF

<400> 68

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

<210> 69

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Nucleotidsequenz, welche die 1. bis 32. Aminosäure von [Met2,

Val3, Ser17]hG-CSF verschlüsselt

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(96)

<400> 69

aca atg gtc ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag 48

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

tct tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag 96

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Die 1. bis 32. Aminosäure von [Met2, Val3, Ser17]hG-CSF

<400> 70

Thr Met Val Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys

1

5

10

15

Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln

20

25

30

<210> 71

<211> 10

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Modifizierte Shine-Dalgarno-Sequenz

<400> 71

gaggtgtttt

10

Patentansprüche

1. Modifizierter menschlicher Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (hG-CSF), welcher keine Zuckerkette und kein N-terminales Methionin aufweist, wobei die Aminosäuresequenz des modifizierten hG-CSF dieselbe ist wie diejenige des Wildtyp hG-CSF (SEQ ID NO: 2) mit der Ausnahme, dass

(a) die erste Aminosäure Ser ist und die siebzehnte Aminosäure X ist;

(b) die zweite Aminosäure Met ist, die dritte Aminosäure Val ist und die siebzehnte Aminosäure X ist; oder

(c) die siebzehnte Aminosäure X ist,

wobei X eine Aminosäure ist, welche bei einem neutralen pH-Wert nicht geladen ist.

2. Modifizierter hG-CSF nach Anspruch 1, wobei X Ser, Thr, Ala oder Gly ist.

3. Modifizierter hG-CSF nach Anspruch 2, wobei X Ser ist.

4. E. coli-Expressionsvektor, welcher die DNA, die den modifizierten hG-CSF nach Anspruch 1 kodiert, und ein Polynucleotid, welches ein Signalpeptid kodiert, welches an dem 5'-Ende der DNA angehängt ist, welche den modifizierten hG-CSF kodiert, aufweist.

5. Expressionsvektor nach Anspruch 4, wobei das Signalpeptid E. coli wärmebeständiges Enterotoxin II Signalpeptid oder modifiziertes E. coli wärmebeständiges Enterotoxin II Signalpeptid ist.

6. Expressionsvektor nach Anspruch 5, wobei das E. coli wärmebeständige Enterotoxin II Signalpeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 53 aufweist.

7. Expressionsvektor nach Anspruch 5, wobei das modifizierte E. coli wärmebeständige Enterotoxin II Signalpeptid die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 54 aufweist.

8. Expressionsvektor nach Anspruch 5, welcher des weiteren eine modifizierte E. coli Enterotoxin II Shine-Dalgarno-Sequenz aufweist, welche die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 71 aufweist.

9. Expressionsvektor nach Anspruch 4, wobei das Signalpeptid E. coli Betalaktamase Signalpeptid oder modifiziertes E. coli Betalaktamase Signalpeptid ist.

10. Expressionsvektor nach Anspruch 9, wobei das E. coli Betalaktamase Signalpeptid die Aminosäurese-

quenz von SEQ ID NO: 24 aufweist.

11. Expressionsvektor nach Anspruch 4, welcher pT14SS1S17SEG, pTO1S17SG, pTO17SG oder pBAD2M3V17SG ist.

12. E. coli transformiert mit dem E. coli Expressionsvektor nach Anspruch 4.

13. E. coli nach Anspruch 12, welches E. coli BL21(DE3)/pT14SS1S17SEG (HM 10311, KCCM-10154), E. coli BL21(DE3)/pTO1S17SG (HM 10410, KCCM-10151), E. coli BL21(DE3)/pTO17SG (HM 10411, KCCM-10152), E. coli BL21(DE3)/pTO17TG (HM 10413), E. coli BL21(DE3)/pTO17AG (HM 10414), E. coli BL21(DE3)/pTO17GG (HM 10415), E. coli BL21(DE3)/pBAD17SG (HM 10511) oder E. coli BL21(DE3)/pBAD2M3V17SG (HM 10512) ist.

14. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten hG-CSF in E. coli, welches ein Kultivieren des E. coli nach Anspruch 12 aufweist, um den modifizierten hG-CSF zu produzieren und in das Periplasma zu sezernieren.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

```

T  P  L  G  P  A  S  S  L  P  Q  S  F  L  L  K
aca ccc ctg ggc cct gcc agc tcc ctg ccc cag agc ttc ctg ctc aag

C  L  E  Q  V  R  K  I  Q  G  D  G  A  A  L  Q
tgc tta gag caa gtg agg aag atc cag ggc gat ggc gca gcg ctc cag

E  K  L  C  A  T  Y  K  L  C  H  P  E  E  L  V
gag aag ctg tgt gcc acc tac aag ctg tgc cac ccc gag gag ctg gtg

L  L  G  H  S  L  G  I  P  W  A  P  L  S  S  C
ctg ctc gga cac tct ctg ggc atc ccc tgg gct ccc ctg agc tcc tgc

P  S  Q  A  L  Q  L  A  G  C  L  S  Q  L  H  S
ccc agc cag gcc ctg cag ctg gca ggc tgc ttg agc caa ctc cat agc

G  L  F  L  Y  Q  G  L  L  Q  A  L  E  G  I  S
ggc ctt ttc ctc tac cag ggg ctc ctg cag gcc ctg gaa ggg ata tcc

P  E  L  G  P  T  L  D  T  L  Q  L  D  V  A  D
ccc gag ttg ggt ccc acc ttg gac aca ctg cag ctg gac gtc gcc gac

F  A  T  T  I  W  Q  Q  M  E  E  L  G  M  A  P
ttt gcc acc acc atc tgg cag cag atg gaa gaa ctg gga atg gcc cct

A  L  Q  P  T  Q  G  A  M  P  A  F  A  S  A  F
gcc ctg cag ccc acc cag ggt gcc atg ccg gcc ttc gcc tct gct ttc

Q  R  R  A  G  G  V  L  V  A  S  H  L  Q  S  F
cag cgc cgg gca gga ggg gtc ctg gtt gct agc cat ctg cag agc ttc

L  E  V  S  Y  R  V  L  R  H  L  A  Q  P
ctg gag gtg tct tac cgc gtt cta cgc cac ctt gcg cag ccc

```

Fig. 1

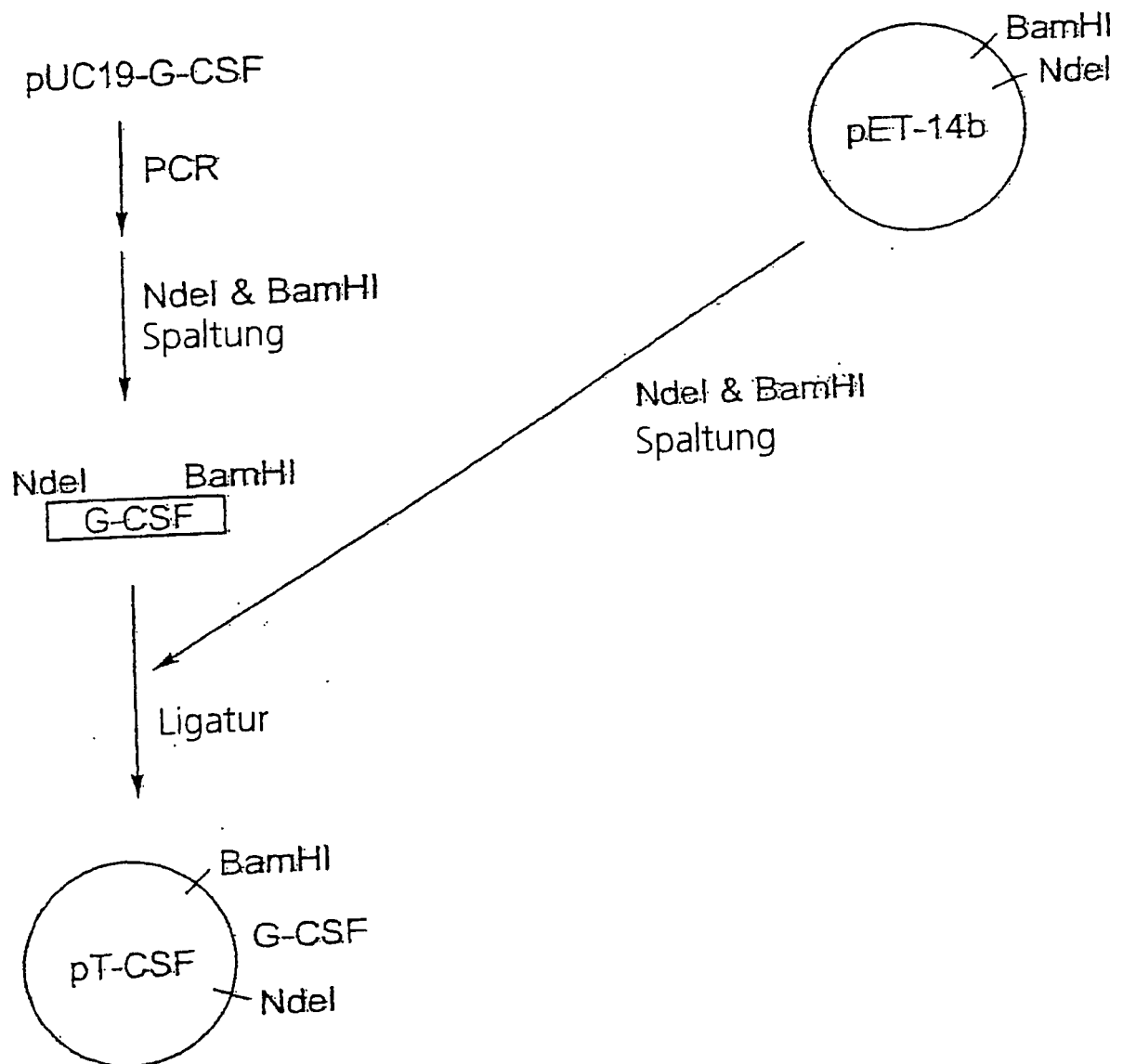


Fig. 2

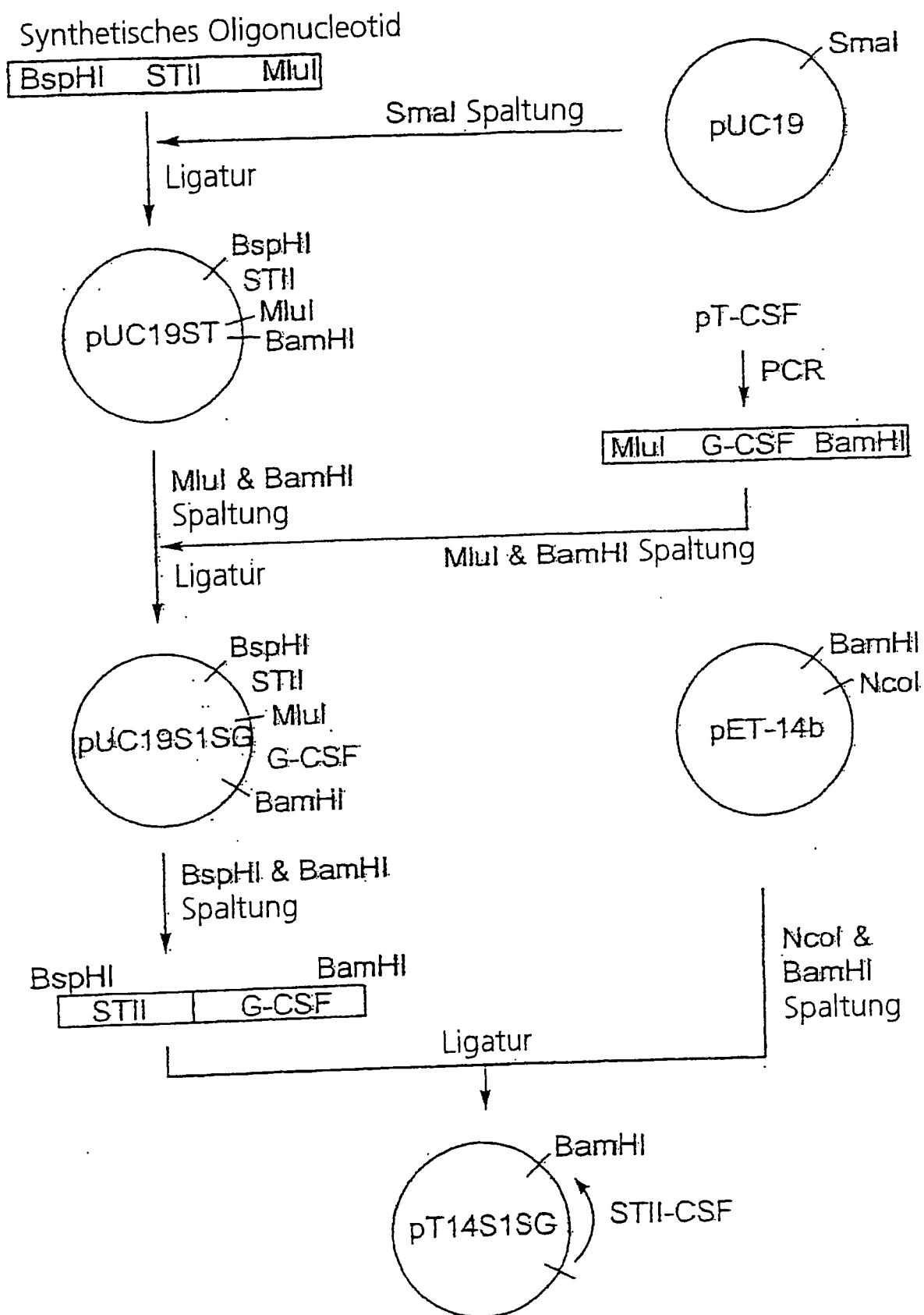


Fig. 3

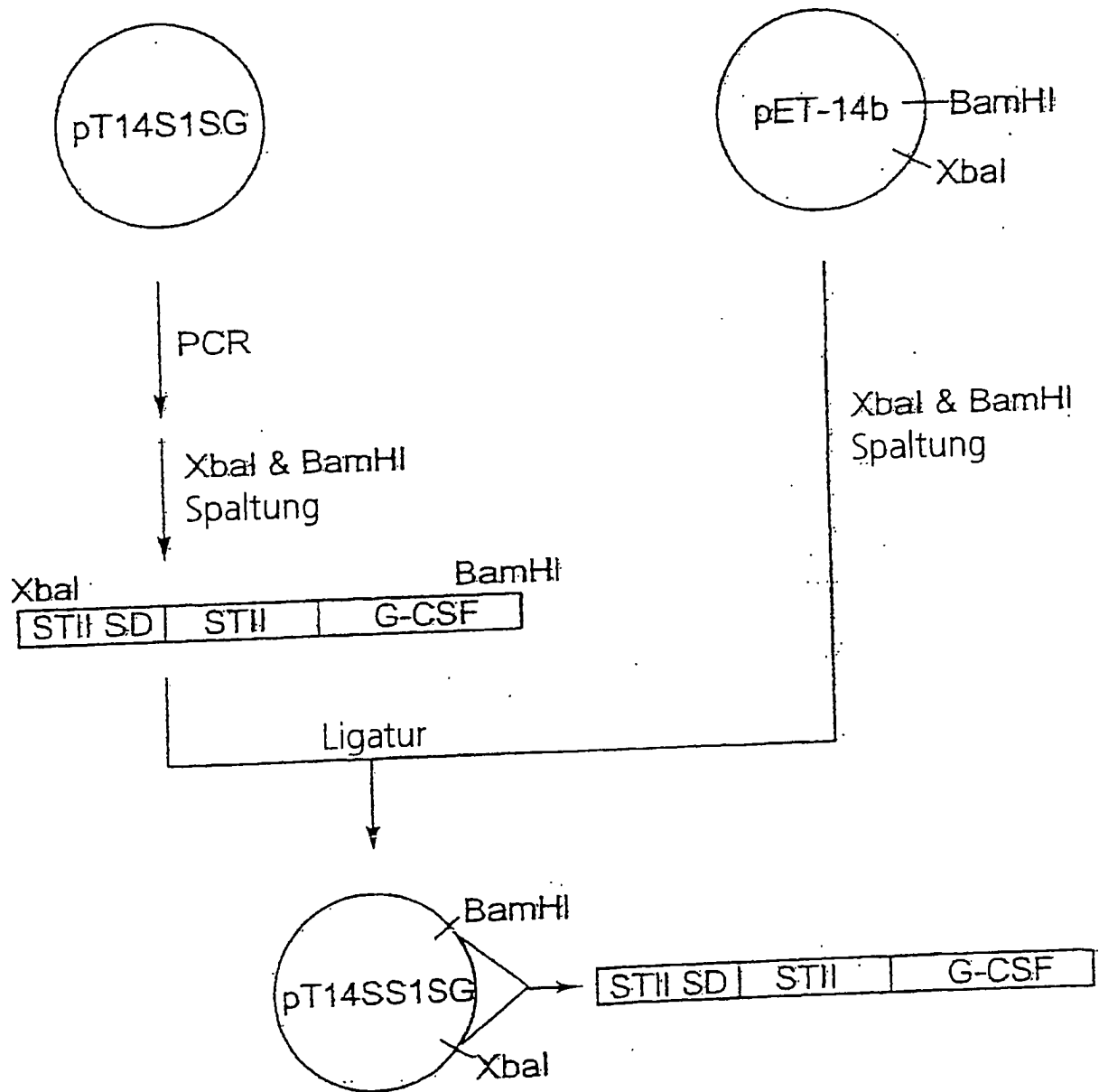


Fig. 4

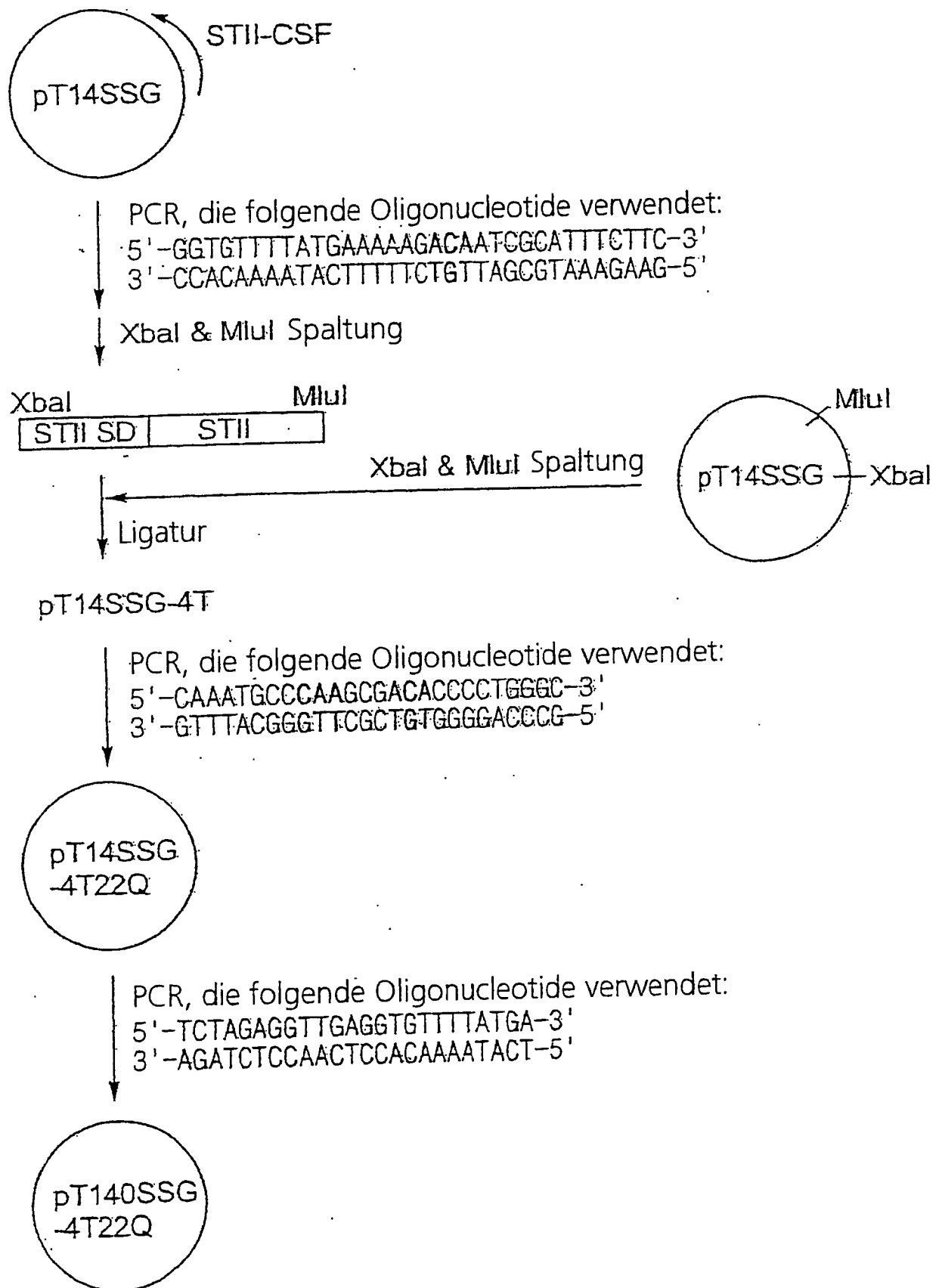
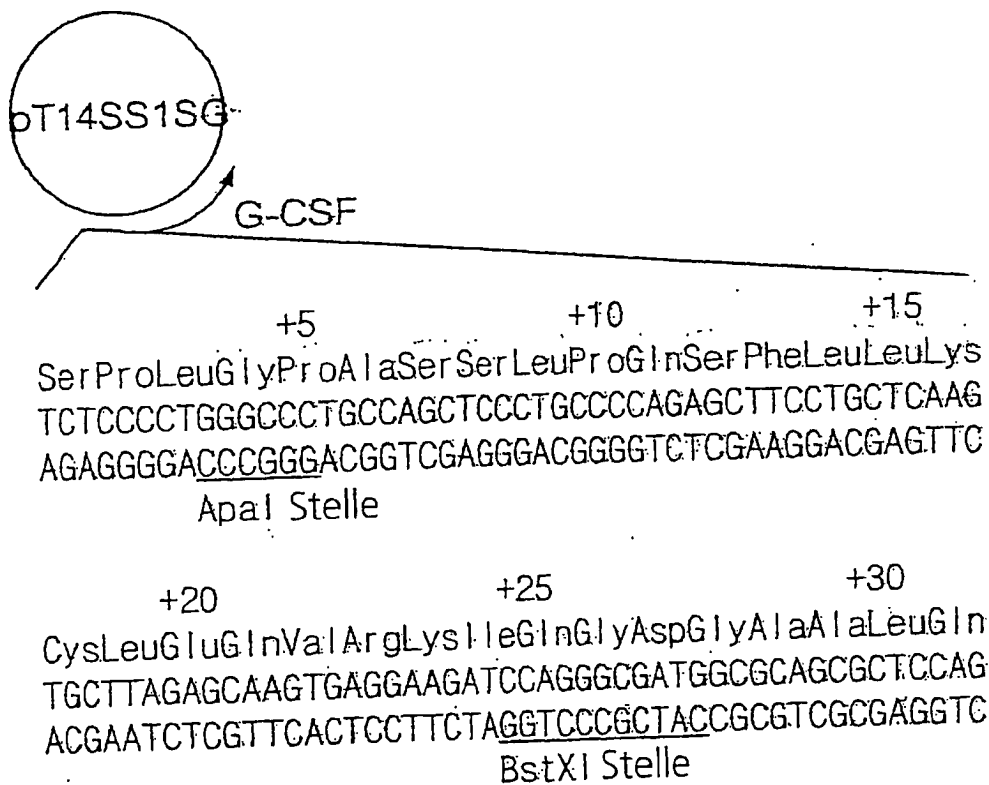


Fig. 5



Apal & BstXI Spaltung

Gefolgt von einer Wiedererlangung des Vektorfragments

Tempern der Oligonucleotide

5'-CAGCCTCTTCTCTTCCACAATCTTTCTTCTTAAGTCTCTTGAACAA
3'-CCGGGTCGGAGAAGAGAAGGTGTTAGAAAGGAAGAATTCAGAGAACTTGTT

GTTAGAAAGATCCAAGGCG-3'
CAATCTTTCTAGGTT-5'

Ligatur

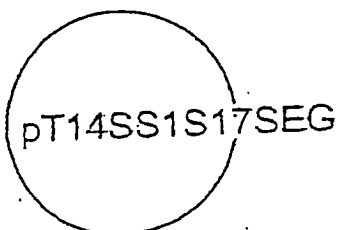


Fig. 6

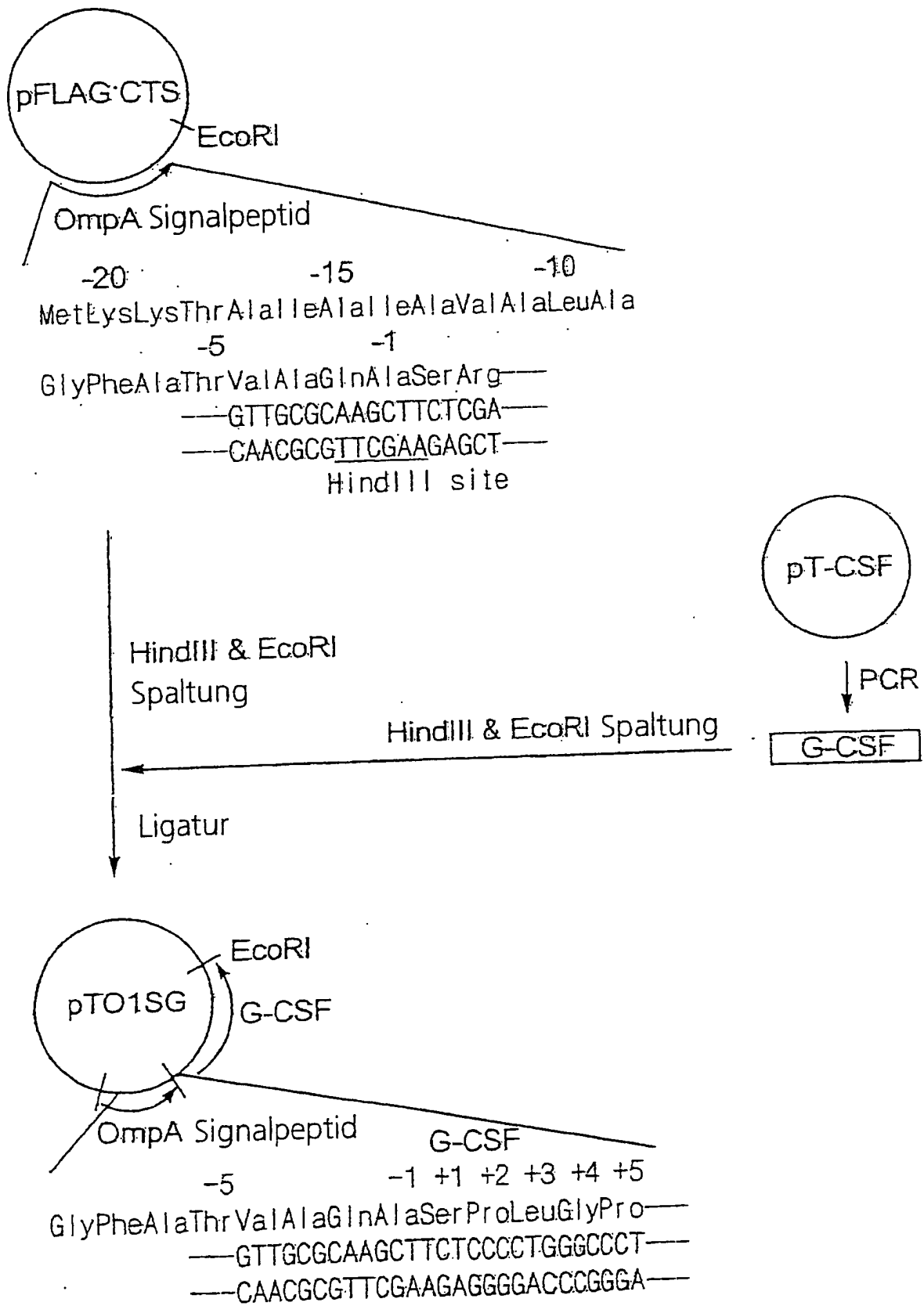


Fig. 7

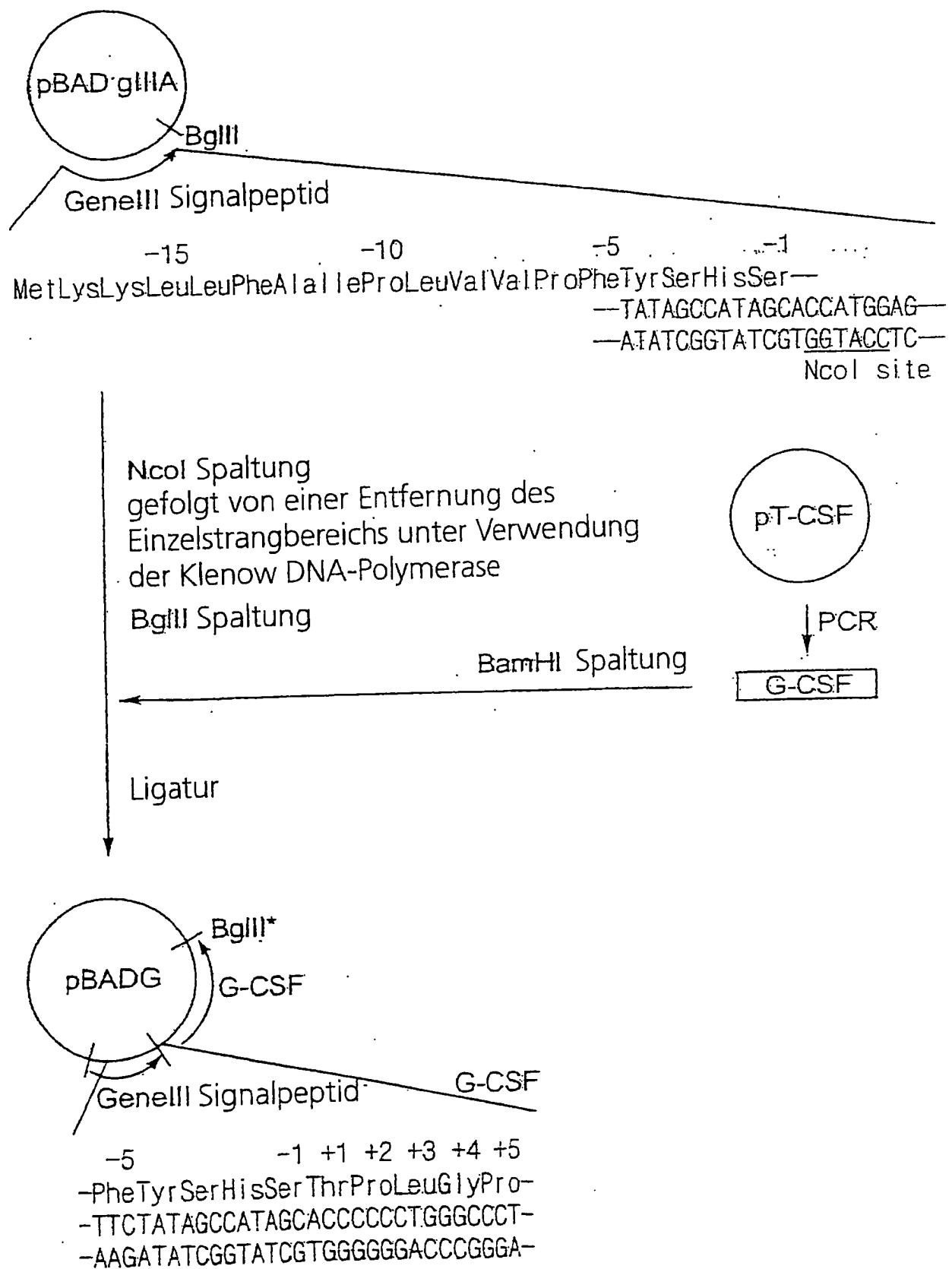


Fig. 8

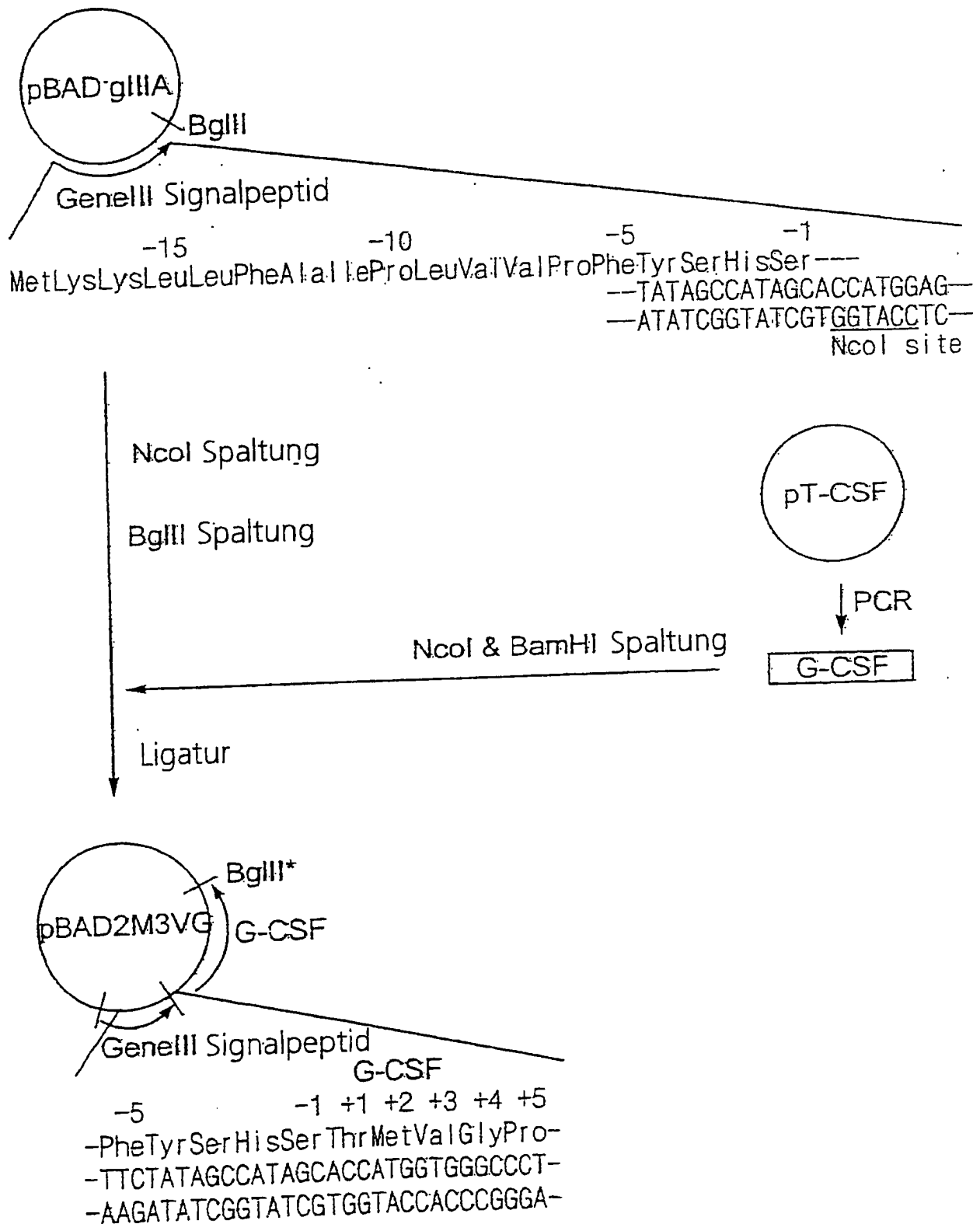


Fig. 9

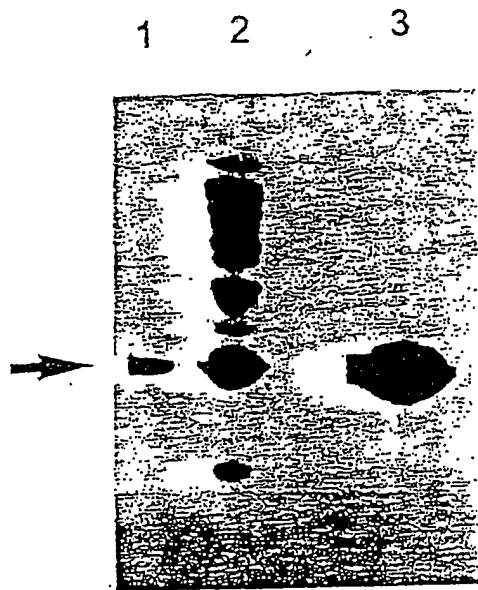


Fig. 10a



Fig. 10b

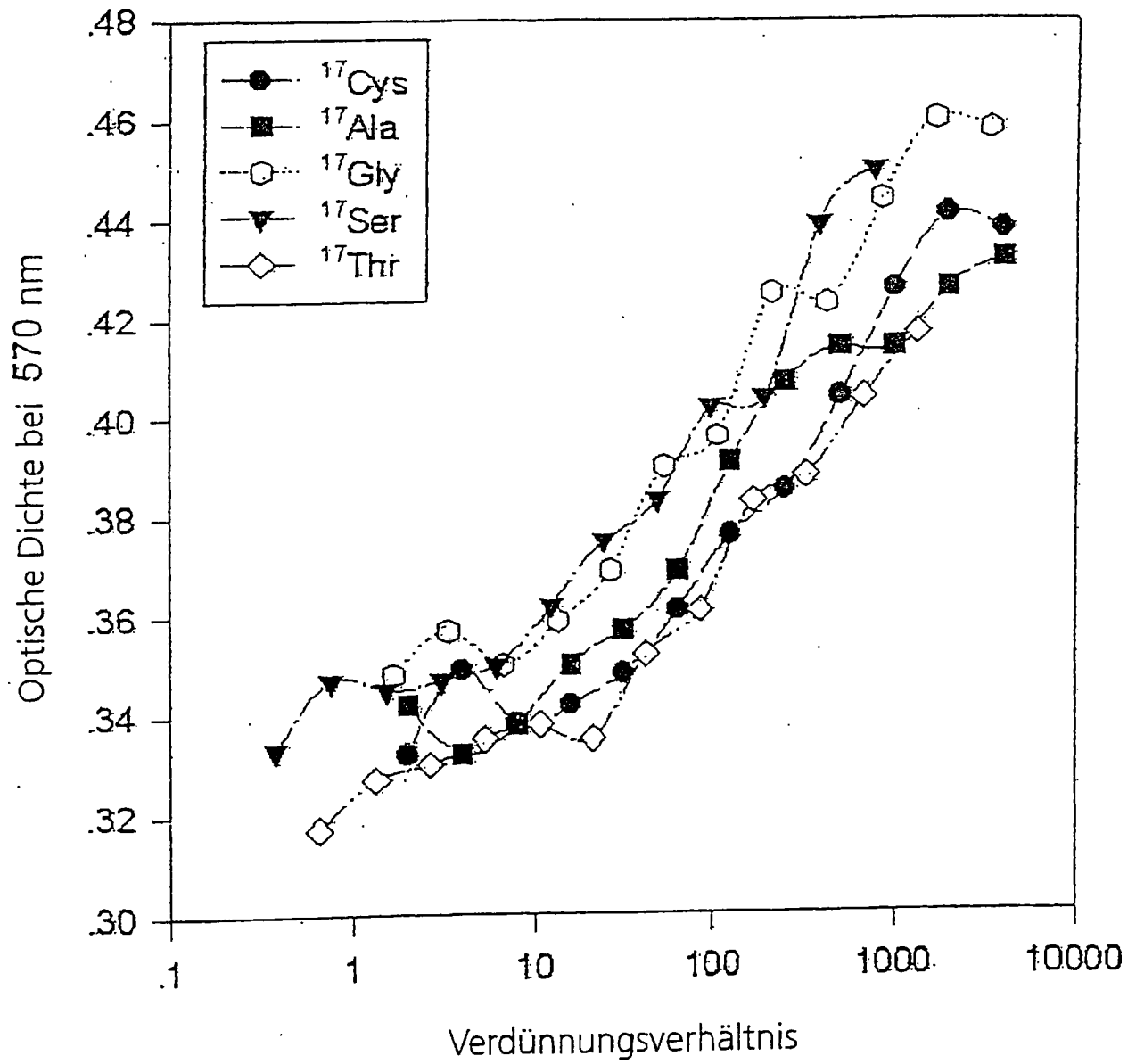


Fig. 11