(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 283 T2** 2004.09.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 770 139 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 283.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK95/00254**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 922 443.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/035385**
(86) PCT-Anmeldetag: **19.06.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **28.12.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **10.12.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/80**
C12N 1/15, C07K 14/38, C07H 21/04

(30) Unionspriorität:
71794 17.06.1994 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, 81679 München

(72) Erfinder:
CHRISTENSEN, Tove, 2880 Bagsvaerd, DK;
HYNES, Michael J., Parkville, AU

(54) Bezeichnung: **EIN PILZ, IN DEM DAS areA-GEN VERÄNDERT IST, UND EIN areA-GEN AUS ASPERGILLUS ORYZAE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Pilze, welche keine Proteasen herstellen. Die Pilze der Erfindung sind zur Herstellung von Proteinen, die für proteolytische Degradierung durch die üblicherweise hergestellten Proteasen anfällig sind, als Wirte verwendbar, und folglich umfasst die Erfindung Verfahren zur Herstellung von interessierenden Proteinen in großen Mengen unter Verwendung der Pilze der Erfindung. Die Erfindung umfasst auch Verfahren zur Herstellung solcher Pilze und DNA-Konstrukte, die in diesen Verfahren verwendet werden sollen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Pilze, und besonders filamentöse Pilze, werden weithin wegen ihrer Fähigkeit, bemerkenswert hohe Proteinlevel abzusondern, kommerziell verwendet.
[0003] Unter den filamentösen Pilzen haben Arten, die zu dem Stamm Aspergillus gehören, eine lange Geschichte kommerzieller Verwendung zur Herstellung von endogenen und kürzlich auch heterologen Proteinen.
[0004] Ein Nachteil bei den meisten zur Herstellung von Proteinen verwendeten Mikroorganismen ist die inherente Herstellung von Proteasen, welche ein Proteinprodukt von Interesse der Degradierung aufgrund von Proteolyse unterziehen können.
[0005] Verschiedene Wege, um dies zu vermeiden, wurden ins Auge gefasst. Unter anderen Lösungen wurde es vorgeschlagen, die Gene, die die verschiedenen Proteasen kodieren, zu deletieren oder zu unterbrechen. Unglücklicherweise stellen die Pilze eine hohe Anzahl an Proteasen her, was solch eine Lösung mehr oder weniger unrealistisch macht.
[0006] Folglich besteht Bedarf an filmentösen Pilzen, die keine oder sehr niedrige Level an Proteasen herstellen. Seit einigen Jahren ist es bekannt, dass das regulatorische Gen areA, welches die Hemmung von Stickstoff-Stoffwechselprodukten in A. nidulans vermittelt, die Herstellung von extrazellulären Proteasen beeinflusst (Arst & Cove, molec. gen. Genet. 126, (1973) 111–141).
[0007] Das areA-Gen aus A. nidulans wurde kloniert (Caddick et. al, EMBO Journal 5, (1986) 1087–1090), und verschiedene Modifikationen wurden daran durchgeführt, um Funktionen von verschiedenen Regionen in dem von diesem Gen kodierten Aktivator-Protein zu beurteilen (Stankovitch et. al Mol. Microbiol. 7, (1993) 81–87). Darüber hinaus ist das Gen, das die entsprechende Funktion in A. fumigatus kodiert, offenbar kürzlich kloniert worden (Hensel et. al. 2nd European Conference on Fungal Genetics, April 28 to May 1, 1994, Book of Abstracts, E11).
[0008] Aus der Literatur ist auch eine einzelne Verwendung eines Stammes von A. nidulans des Genotyps argB areA1 als ein Wirt zur Herstellung von t-PA (Upshall et. al. Biotechnology 5, (1987) 1301–1304) bekannt. In diesem Beispiel wird nur der argB-Genotyp als ein Selektionsmarker durch seine Arginin-Prototrophie verwendet, während der areA-Genotyp nur ein Zufall ist.
[0009] Die vorliegende Erfindung hat die Verminderung des Bedarfs an Protease-freien filamentösen Pilzen als Gegenstand.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Proteins oder Genprodukts, besonders abgesonderter Proteine, wobei ein Pilzwirt, in dem das areA-Gen durch rekombinante DNA-Technologie derart modifiziert worden ist, dass es nicht derart exprimiert werden kann, dass es einen funktionalen AreA-Aktivator bereitstellt, und optional mit einem DNA-Konstrukt, umfassend mindestens eine DNA-Sequenz, die das Protein oder Genprodukt von Interesse kodiert, transformiert worden ist, in einem geeigneten Wachstumsmedium bei geeigneten Bedingungen gezüchtet wird und das gewünschte Genprodukt gewonnen und aufgereinigt wird.
[0011] Während dem Arbeiten mit der Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, dass die Pilze der Erfindung derartige abgesonderte Proteine mit einem viel besseren Ertrag herstellen. Es wurde auch überraschenderweise gefunden, dass die einzige Stickstoffquelle, die fähig war, für gutes Wachstum der A. oryzae areA-Stämme zu sorgen, Glutamin war.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0012] Die Erfindung wird in weiterem Detail in den folgenden Teilen der Beschreibung in Bezug auf die Beispiele und die Zeichnungen beschrieben, worin
[0013] **Fig.** 1 die Schritte, die an der Konstruktion von HowB101 beteiligt sind, zeigt,

[0014] **Fig.** 2 die Schritte, die an der Konstruktion von pSK5 und pSK9 beteiligt sind, zeigt,
[0015] **Fig.** 3a und 3b die Schritte, die an der Konstruktion von pToC266 beteiligt sind, zeigen,
[0016] **Fig.** 4 die Schritte, die an der Konstruktion von pMT1606 beteiligt sind, zeigt, und
[0017] **Fig.** 5 die Schritte, die an der Konstruktion von pToC56 beteiligt sind, zeigt.

DEFINITIONEN

[0018] In der vorliegenden Beschreibung der folgenden Definitionen werden verwendet: Der Ausdruck areAΔ bezeichnet einen Stamm, in welchem das areA-Gen deletiert ist.
[0019] Der Ausdruck areA bezeichnet einen Stamm, welcher keinen funktionalen AreA-Aktivator herstellt. Der Ausdruck "Verlust von Funktion" wird dafür auch oft verwendet.
[0020] Der Ausdruck "Anti-Sense Technologie" beschreibt derartige Verfahren wie im US Patent Nr. 5,190,931 offenbart.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] Wie angegeben, bezieht sich die vorliegende Erfindung in ihrem ersten Aspekt auf Pilze, worin das areA-Gen durch rekombinante DNA-Technologie derart modifiziert worden ist, dass es nicht derart exprimiert werden kann, dass es einen funktionalen AreA-Aktivator bereitstellt.
[0022] Dieser Gegenstand kann besonders durch Deletion oder Unterbrechung des areA-Gens erhalten werden.
[0023] Das Klonieren des areA Gens wird in den Beispielen beschrieben.
[0024] AreA-Homologe aus anderen Pilzen konnten entweder durch Kreuz-Hybridisierung mit einem der schon bekannten Gene oder durch Komplementierung von areA-Mutanten kloniert werden; z. B. A. nidulans areA-18 oder der in dieser Anmeldung beschriebene A. oryzae areA deletierte Stamm.
[0025] Verfahren zum Deletieren oder Unterbrechen eines Gens sind besonders in WO 90/00192 (Genencor) beschrieben.
[0026] Verfahren zum Substituieren von DNA in einem Gen sind auch allgemein bekannt und kann durch Ersetzen von einem oder mehreren fortlaufenden Teilen des Gens durchgeführt werden, aber es kann auch durch ortsgerichtete Mutagenese, die eine DNA-Sequenz generiert, die eine AreA-Aktivator-Variante kodiert, die nicht funktional ist, erhalten werden.
[0027] Ein anderes Verfahren, durch welches solch ein Ziel erhalten werden kann, ist die Verwendung der Anti-Sense Technologie.
[0028] Die Anti-Sense Technologie und wie sie angewendet wird, ist im Detail in dem oben erwähnten US Patent Nr. 5,190,931 (University of New York) beschrieben.
[0029] Ein weiteres Verfahren zum Erhalten der Inaktivierung ist das interne Inserieren von zusätzlicher DNA in das areA-Gen, wodurch die Expression eines gestörten Aktivator-Proteins passieren kann.
[0030] Im Zusammenhang mit diesem Verfahren kann durch das Klonieren zur Verfügung gestellte Information verwendet werden, um DNA-Konstrukte herzustellen, die in das areA-Gen integriert werden können, und es sogar mit einem anderen Gen, wie zum Beispiel dem pyrG-Gen, zu ersetzen.
[0031] Ein weiteres Verfahren zur Vermeidung der Anwesenheit des areA-Aktivators ist, die Regulation des Expressions-Signals, das die Expression des areA-Gens selbst reguliert, zu stören.
[0032] Nach der Erfindung gehört der Pilz vorzugsweise zu einem Stamm ausgewählt aus der Gruppe umfassend Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Candida, Acremonium, Fusarium und Penicilium.
[0033] Unter diesen Gattungen sind Arten, ausgewählt aus der Gruppe umfassend A. oryzae, A. niger, A. awamori, A. phoenicis, A. japonicus, A. foetidus, A. nidulans, T. reesei, T. harzianum, H. insulens, H. lanuginosa, F. graminearum, F. solani, P. chrysogenum und andere bevorzugt.
[0034] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Genprodukts, vorzugsweise eines sekretierten Genprodukts, wobei ein Pilz nach der Erfindung in einem geeigneten Wachstumsmedium bei geeigneten Bedingungen gezüchtet wird und das gewünschte Genprodukt gewonnen und aufgereinigt wird.
[0035] Im Falle eines durch ein heterologes Gen exprimiertes Genprodukt kann die DNA-Sequenz, die das gewünschte Genprodukt kodiert, Teil des für die Herstellung des Pilzes verwendeten DNA-Konstrukts sein.
[0036] Dennoch wird normalerweise eine getrennte Transformation des Pilzes der Erfindung durchgeführt, um den Pilz zur Herstellung des gewünschten Produkts zu befähigen.
[0037] Verfahren zum Transformieren von Pilzen sind in der Technik gut bekannt, vgl. z. B. EP 0 184 438 A2 (Gist-Brocades N.V.) und EP Anmeldung Nr. 87103806 (Novo Nordisk A/S).
[0038] Für von Haus aus hergestellte Produkte ist das natürlich nicht notwendig, aber um die Produktion zu erhöhen, kann es von Vorteil sein, dafür zu sorgen, dass vielfache Kopien des Gens, das das Protein von Interesse kodiert, in den Wirt eingegliedert werden.

[0039] Das gewünschte Genprodukt ist im allgemeinen ein Peptid oder Protein, vorzugsweise ein Enzym.
[0040] Unter den Enzymen ist es vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Proteasen, zum Beispiel Trypsin und Chymosin, Lipasen, Cutinasen, Cellulasen, Xylanasen, Laccasen, Pectinasen, etc.
[0041] Eine andere An von gewünschten Genprodukt ist im allgemeinen ein therapeutisch-aktives Peptid oder Protein.
[0042] Unter den therapeutischen-aktiven Peptiden oder Proteinen wird das Protein vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe umfassend Insulin, Wachstumshormone, Glukagon, Somatostatin, Interferone, PDGF, Faktor VII, Faktor VIII, Urokinase, t-PA, CSF; Lactoferrin, TPO, etc.
[0043] Die Erfindung wird in weiteren Einzelheiten in den unten gegebenen Beispielen erklärt. Diese sollen wie auch immer nicht in irgendeiner Weise als den Bereich der Erfindung wie in den angefügten Ansprüchen definiert, einschränkend ausgelegt werden.

BEISPIELE

Material und Methoden

Stämme

A. oryzae, IFO4177:	Erhältlich vom Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Hammachi 2-Chome Yodogawa-Ku, Osaka, Japan.
ToC913:	Die Konstruktion dieses Stammes wird in den Beispielen beschrieben.

Gene

areA:	Dieses Gen kodiert ein regulatorisches Protein, das den Stickstoff-Katabolismus kontrolliert.
pyrG:	Dieses Gen kodiert Orotidin-S'-Phosphat Decarboxylase, ein Enzym, das an der Biosynthese von Uridin beteiligt ist.
bar:	Dieses Gen wurde ursprünglich aus Streptomyces hygroscopicus isoliert und kodiert für Phosphinothricin Acetyltransferase. Dieses Enzym modifiziert Phosphinothricin (=Glufosinat) und inaktiviert dadurch diese Verbindung, welche für Bakterien, Pilze und Pflanzen toxisch ist.

Plasmide

pUC118:	Viera and Mesing J. Meth. Enzymol. 1987 153 3–11
pSO2:	Die Konstruktion dieses Plasmids wird in den Beispielen beschrieben.
pJers4:	Ein 2,0 kb Subklon von pSO2 in pUC118. pJers4 enthält ein funktionales A. oryzae pyrG-Gen.
pSO5:	Die Konstruktion dieses Plasmids von pSO2 wird in den Beispielen beschrieben.
pToC56:	Die Konstruktion dieses Plasmids wird in der EP Anmeldung Nr. 87103806 beschrieben.
pToC266:	Die Konstruktion dieses Plasmids wird in den Beispielen beschrieben.
pMT1606:	Die Konstruktion dieses Plasmids von pBP1T (B. Straubinger et. al Fungal Genetics Newsletter 39 (1992): 82–83) und p775 (EP Anmeldung Nr. 87103806) wird in den Beispielen beschrieben.
p777:	Die Konstruktion dieses Plasmids wird im EP Anmeldung Nr. 87103806 beschrieben.
pHW470:	Die Konstruktion dieses Plasmids wird in den Beispielen beschrieben.

BEISPIEL 1

Konstruktion eines Aspergillus oryzae areAΔ Stammes.

[0044] Der areAΔ Stamm wurde durch die folgenden Schritte konstruiert. Das A. oryzae pyrG-Gen wurde kloniert und ein A. oryzae pyrG mutanter Stamm wurde isoliert. Das areA-Gen aus A. oryzae wurde kloniert. Die pyrG-Mutante wurde mit einem Plasmid, dass das pyrG-Gen zwischen den DNA-Fragmenten stromaufwärts und stromabwärts des areA-Gens inseriert trägt, transformiert. Die für areA kodierende Region war auf dem Plasmid nicht vorhanden. Transformanten wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, in der Abwesenheit von Uridin und in der Anwesenheit von Chlorat zu wachsen, selektioniert. Diese Doppelselektion selektioniert sowohl für ein funktionales pyrG-Gen als auch für areA minus. Stämme, die durch dieses Selektionsverfahren erhalten wurden, wurden schließlich durch Southern-Analyse überprüft, um solche zu identifizieren, in denen das chromosomale areA-Gen durch das pyrG-Gen ersetzt worden war.

Klonierung des A. oryzae pyrG-Gens

[0045] Das A. oryzae pyrG-Gen wurde durch Kreuzhybridisierung mit dem A. niger pyrG-Gen (W. van Hartingsveldt et. al, Mol. Gen. Genet 206: 71–75 (1987)) kloniert. Eine lambda Bibliothek von teilweise SauIIIA verdauter A. oryzae IFO4177 DNA wurde bei niedriger Stringenz mit einem 1 kb DNA-Fragment aus dem A. niger pyrG-Gen hybridisiert. Ein 3,8 kb HindIII-Fragment eines positiven Klons wurde in einen pUC118 Vektor subkloniert. Von dem resultierenden Plasmid, pSO2, wurde gezeigt, dass es das pyrG-Gen durch Komplementation einer A. niger pyrG-Mutante enthält.

Konstruktion eines A. oryzae pyrG minus Stammes.

[0046] Ein pyrG Deletionsplasmid, pSO5, das ungefähr 1 kb der pyrG flankierenden Sequenz an beiden Enden enthält, wurde aus dem Plasmid pSO2 konstruiert. A. oryzae IFO4177 wurde mit diesem Konstrukt transformiert und Transformanten wurden durch Resistenz gegen 5-Fluor-Orotsäure, eine phenotypische Eigenschaft von pyrG-Mutanten, selektioniert. Von einer Transformante, HowB101, wurde durch Southern Analyse gezeigt, dass sie die erwartete Deletion an dem pyrG Locus hat. Eine pyrG-Mutante HowB101-Mutante benötigt Uridin zum wachsen. HowB101 kann mit dem wt pyrG-Gen transformiert werden durch Selektion der Fähigkeit, ohne Uridin zu wachsen.

[0047] Die Schritte, die in der Konstruktion von HowB101 eingeschlossen sind, sind in **Fig.** 1 dargestellt.

Klonierung des areA-Gens

[0048] Das A. oryzae areA-Gen wurde durch Kreuzhybridisierung mit dem A. nidulans areA-Gen (B. Kudla et. a1, EMBO J., 9: 1355–1364 (1990)) kloniert. Eine genomische Bibliothek von A. oryzae IFO4177 wurde durch teilweisen Verdau von chromosomaler DNA mit SauIIIA und Klonierung der erhaltenen DNA-Fragmente in den Vektor λGEM-II (erhalten von Promega) hergestellt. Kreuzhybridisierung der Bibliothek mit. dem A. nidulans are A-Gen wurde in 40%igen Formamid bei 37°C durchgeführt. Hybridisierende λ Klone wurden isoliert und von diesen Fragmenten wurden sie in den Vektor pBluescript SK+ (erhalten von Stratagene) subkloniert, die Plasmide pSK5 und pSK9, dargestellt in **Fig.** 2, zur Folge haben. Das klonierte Gen war in der Lage, eine A. nidulans areA-Mutante zu komplementieren, dadurch beweisend, dass es in der Tat das A. oryzae areA Homolog ist. 5643bp des Klons wurden sequenziert, und der Vergleich der Sequenz von den A. oryzae und den A. nidulans areA-Genen zeigt, dass sie hochgradig homolog sind. Die Sequenz des A. oryzae areA-Gens ist in SEQ ID Nr. 1 gezeigt.

Konstruktion des areA Deletions-Plasmids.

[0049] Das Plasmid pToC266 wurde konstruiert, um das areA-Gen aus dem A. oryzae Chromosom zu deletieren. pToC266 enthält ein 2,1 kb DNA-Fragment, das stromaufwärts des areA-Gens (isoliert aus pSK5) entsteht, und ein 1,4 kb DNA-Fragment, das stromabwärts des areA-Gens (isoliert aus pSK9) entsteht. Die beiden Fragmente sind durch ca. 3,2 kb in dem Genom getrennt, die kodierende Region liegt in diesem Teil des Gens. Das A. oryzae pyrG-Gen aus pJers4 wurde zwischen die stromaufwärts gelegenen areA und die stromabwärts gelegenen DNA-Fragmente inseriert. Die Konstruktion von pToC266 ist in den **Fig.** 3a und 3b dargestellt. pToC266 hat eine einzelne EcoRI-Stelle und wurde vor der Verwendung für Transformationen durch Schneiden mit diesen Restriktionsenzym linearisiert.

Selektion von A. oryzae areAΔ-Stämmen

[0050] A. oryzae HowB101 wurde mit linearisiertem pToC266 transformiert. Transformanten wurden auf Minimal-Platten (Cove Biochem. biophy. Acta (1966) 113 51– 56), die 5% Natriumchlorat und 0,5 mM Ammoniumsulfat und 1% Glukose enthalten, selektioniert. Die Transformanten wurden so einer Doppelselektion unterworfen, beide Male, ob sie das pyrG-Gen erhalten haben, durch ihre Fähigkeit, ohne Zugabe von Uridin zu wachsen, und ihre Chlorat-Resistenz. Chlorat-Resistenz ist eine der Phänotypen von A. nidulans areA-Mutanten (H. N. Arst und D. J: Cove, MGG 126: 111–141 (1973)). Wöchentlich wachsende Transformanten wurden zweimal auf der selben Plattenart reisoliert. Drei unabhängige Transformanten namens ToC913, ToC919 und ToC920 wurden einem Wachstumstest auf verschiedenen Stickstoffquellen unterzogen. Sie wuchsen gut auf Glutamin, aber schwach auf anderen getesteten Stickstoffquellen, eingeschlossen Ammoniak. Southern Analyse zeigte, dass die drei Stämme das strukturelle areA-Gen, welches durch das pyrG-Gen ersetzt worden war, verloren hatten.
[0051] areAΔ-Stämme können auch durch Selektion von Transformanten von linearisiertem pToC266 auf Minimal-Platten, die Glutamin als Stickstoffquelle enthalten, erhalten werden. In einem solchen Experiment war einer von 25 Transformanten ein areAΔ-Stamm.

BEISPIEL 2

Konstruktion von pMT1606

[0052] Ein Plasmid, das das bar-Gen aus Streptomyces hygroscopius (C. J. Thompson et. al, EMBO J. 6: 2519–2523 (1987)), inseriert nach dem A. oryzae TAKA-Amylase Promotor und gefolgt durch ein Fragment, welches den transkriptionalen Terminator und das Polyadenylierungssignal aus dem A. niger gla-Gen enthält, wurde konstruiert.
[0053] Das Plasmid pMT1606 kann zur Selektion von Glufosinat-resistenten Transformanten von A. oryzae verwendet werden. pMT1606 wurde durch Isolierung des bar-Gens aus dem Plasmid pBP1T (B. Straubinger et. al, Fungal Genetics Newsletter 39: 82–83 (1992)) und durch Klonieren in einem Pilz-Expressions-Plasmid p775, das in der EP Anmeldung Nr. 87103806 beschrieben ist, konstruiert. **Fig.** 4 stellt die Konstruktion von pMT1606 dar.

BEISPIEL 3

Herstellung von Chymosin in ToC913 (A. oryzae IFO4177 areAΔ)

[0054] Der A. oryzae areAΔ-Stamm ToC913 wurde mit dem Plasmid pToC56 (**Fig.** 5), welches ein Pilz-Expressions-Plasmid für das Säugetier-Enzym Chymosin ist, durch Co-Transformation mit pMT1606 transformiert. Die Konstruktion des Plasmids pToC56 ist in der EP Anmeldung Nr. 87103806 beschrieben.
[0055] Transformanten wurden auf Wachstum auf Minimal-Medium, das 10 mM Ammonium und ein 1 mg/ml Glufosinat enthält, selektioniert, und auf die Anwesenheit von pToC56 durch die Fähigkeit, Chymosin herzustellen, überprüft. Drei Transformanten wurden in Schüttelflaschen in Minimal-Medium, das Maltodextrin und Glutamin enthält, für 4 Tage bei 30°C gezüchtet. Zwei Transformanten von pToC56 in IFO4177 (erhalten wie in EP 87103806 beschrieben) als auch untransformierte IFO4177 und ToC913 wurden zusammen mit den ToC913 Transformanten gezüchtet.
[0056] Jeden Tag wurden Proben der Fermentationsbrühe entnommen und für SDS-Page und Western blotting angewendet. Die Blotting-Membran wurde mit Chymosin-spezifischem Hasen-Antikörper inkubiert, gefolgt von Ziege-Hase-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase. Färben der Membran zeigte, dass die Überstände der Transformanten von IFO4177 kleine Mengen an Chymosin oder Abbauprodukte davon an dem ersten und zweiten Tag der Fermentation enthielten und nichts später in der Fermentation.
[0057] Transformanten von ToC913 enthielten mindestens zehnmal mehr volle-Größe-Chymosin. Die Menge an Chymosin in den Überständen stieg in den ersten zwei– drei Tagen an und blieb dann konstant.
[0058] Überstände vom 3. und 4. Tag der Fermentation von IFO4177, ToC913, einem Transformanten von pToC56 in ToC913, und ein Transformant in IFO4177 wurden in einem isoelektrischen Fokusierungsgel angewendet und Elektrophorese wurde durchgeführt. Der pH Gradient war von 3,5 bis 9,5. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel mit einem Puffer von pH = 7,0, enthaltend 2 mM Zn^{2+} und überschichtet mit einem Agar, enthaltend 0,5% Casein, gespült. Das Gel wurde bei 45°C inkubiert, bis Protease-Aktivität sichtbar war.
[0059] In Proben von IFO4177 konnten drei Banden mit Protease-Aktivität gesehen werden; eine mit einem alkalischen pI und zwei mit sauren pI's.
[0060] In Proben von den pToC56 Transformanten von IFO4177 konnte eine schwache Reaktion von Chymosin gesehen werden, welche teilweise überlappte mit einer der sauren Banden, die in untransformierten

IFO4177 gefunden wurde, die Protease mit dem am meisten sauren pI war kaum sichtbar, wohingegen die Protease mit dem alkalischen pI klar sichtbar war, zusammen mit einer oder mehreren Banden mit einem fast neutralem pI. In den Proben von ToC913 wurde keine Protease-Aktivität festgestellt, wohingegen die Probe aus dem pToC56 Transformanten von ToC913 ein starkes Chymosin-Signal zeigte. Keine anderen Proteasen wurden in den Proben von diesen Transformanten festgestellt.

BEISPIEL 4

Herstellung von humanem Trypsin I in ToC913 (A. oryzae IF04177 areAΔ)

[0061] cDNA, die das humane pankreatische Trypsinogen I (TRYI) kodiert, wurde unter Verwendung von Standardverfahren und der von M. Emi et al, Gene (1986) 41: 305–310 (vgl. dänische Patent Anmeldung Nr. 693/95) publizierten Sequenz isoliert. Eine BamHI-Stelle (GGATCC) wurde sofort stromaufwärts des Start-Codons (ATG (Met)) mit der kurzen Sequenz ACC dazwischen eingeführt.

[0062] Diese BamH1-Stelle wurde dazu verwendet, um die cDNA mit dem BamH1-Verbindungsstück in den Taka-Amylase-Promotor in dem Pilz-Expressions-Plasmid p777, beschrieben in der EP Anmeldung Nr. 87103806, zu fusionieren. Das 3'-Ende der cDNA wurde 41 bp stromabwärts des Stop-Codons mit einer NruI-Stelle in p777 fusioniert. Das inseriert die TRYI cDNA zwischen dem A. oryzae Taka-Amylase-Promotor und dem A. niger Glukoamylase-Transkriptionsterminator. Das resultierende Plasmid wurde pHW470 (vgl. dänische Patentanmeldung Nr. 693/95) genannt.

[0063] pHW470 wurde in ToC913 durch Co-Transformation mit dem Plasmid pMT1606 transformiert. BASTA-resistente Transformanten wurden zweimal durch Conidiosporen reisoliert. 8 Transformanten wurden für 4 Tage bei 30°C in YPM (YPD (Sherman, F. et al (1981) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor-Laboratory. Cold Spring Harbor, NY)), in welchem die Glukose durch 2% Maltose ersetzt war, gezüchtet. Überstände wurden durch SDS-PAGE, gefolgt von Western Blotting und Inkubation mit einem Hasen-Antikörper, hergestellt gegen Schweine-Trypsin, auf den Gehalt von humanem Trypsin hin analysiert. Die Blotting-Membran wurde dann mit Ziege-gegen-Hase-Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, inkubiert, und dann mit 3-Amino-9-Ethyl Carbazol in Reaktion gebracht. Überstände von drei der Transformanten enthielten eine gefärbte Bande von der erwarteten Größe. Die Konzentration von Trypsin in den drei positiven Überständen betrug 2–5 mg/l.

[0064] Die Anwesenheit von Trypsin wurde ferner verifiziert durch Inkubation von Proben der Überstände mit L-Benzoyl-Arginoyl-Paranitroanilid (L-BAPNA). Proben der drei immuno-positiven Stämme spalteten das Substrat, was in der Entwicklung einer gelben Farbe resultierte. Proben von ToC913 und IFO4177 zeigten keine Aktivität gegen dieses Substrat. Die spezifische Aktivität von humanem Trypsin in dieser Untersuchung ist nicht bekannt, so ist es nicht möglich, die Konzentration von Trypsin in den Überständen aus diesen Daten zu berechnen.

[0065] Auch wurden Transformanten von pHW470 in dem Wild-Typ-Stamm IFO4177 gemacht. Mehr als 20 L-BAPNA positive Transformanten wurden angeschaut, aber es war nicht möglich, irgendwelche immonoreaktiven Banden in den Überständen von diesen Transformanten festzustellen. Das Detektionslimit in dieser Untersuchung betrug ungefähr 0,5 mg/l.

AUFLISTUNG DER SEQUENZEN

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Novo Nordisk A/S

(B) STRASSE: Novo Alle

(C) STADT: Bagsvaerd

(E) LAND: Dänemark

(F) POSTLEITZAHL (PLZ): DK-2880

(G) TELEFON: +45 4442 2668

(H) TELEFAX: +45 4449 3256

(ii) NAME DER ERFINDUNG: Neuer Mikroorganismus

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTERLESBARES FORMAT
- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(EPO)

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 5643 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzel
- (D) STRUKTUR: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
- (A) ORGANISMUS: Aspergillus oryzae
- (B) STAMM: IFO4177

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Intron
- (B) EINBAUORT: 2701..2769

(ix) EIGENSCHAFT:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) EINBAUORT: VERBINDUNG

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

```
AAGCTTCGTC CTCGCATCTC GGCCGGGTGA GTAAGGTATG GTATTATTCA TGAAGGGATC      60
TCGTTGGTTA CCGTTGTCTA TCCCTAAACA AAGGATTCAA GAGAACAACT CGGAATGCTC     120
CCTCCGCTTA AACCCCTTGA CTCACTGATG GTGTATGTAC TATGGGTACG ACGTTCGGGA     180
TGTGGACTAC CAACCAGAGA GTGATTAGAG AGTCCGGGTT CTCAGTCCAT GATTTTTGCA     240
TCTTTGAAAC AGACGATGCG GAGCGGTCAT TGGCGGAGTT TACTCCCAAA TACGGCCGAA     300
CGGGGTACTT TAAGTGGAAT CTCCGATTTT GGATCTAAGC TCATGAAGGA AAAGTACTAC     360
TAATGCGTAC CTGTGCCTAA TGTTAGTGCT AGTTCGTCTG TTGCATTTTA CCCGTCGGTT     420
AAGACGAATG GATCCGTTCA GGTTTTAAAA TAACTATCTA TGAAATATTT TAGATTTCCC     480
GACATAGTGG TTGGGATGTC TCGATTAACA CTAGGTACAT CAGGCTCAAT TGATTTTGGT     540
TTTAACGAAA CATGATATAG GTCAGGGTCG TGGACCACCC TCCGCCAGGG ATCAGGGGAC     600
GGTTACATGC GAAGGATTCT GATTATATTC ATGATTATGT CAAGCCTTTT CTCTCGTGTG     660
AAGAGGAGCA GAGAATCCGT ACGGGTTTAA TTTAATTTAG CGCCCTGCAG CTTCGAGAAC     720
ATCCCCAGCA ACGTTAAAAA CCACGAGCTA AAATGGGTCG CCACCGGAAG CACTCGAGTC     780
GAGAGATCGG TCGGCTCAGT ATTCGTAATA CCTGCGTTCC AGACGGTTTT GGTCGTTGGT     840
TTCACTCAGG GAACTTAATT CCAGCGGGAC CCAATATAAT TTGAATGATT CATGATACAT     900
CCATTCGTTT GAACCGATCC TGCAAGAGTT CTGTCTGATT TGGTCAACAT AGTTTTCCTC     960
TGGGGGAGAC TGGGGAAGAG TCAACACAAT GGTCAGGGAG AGAAGAATGA AAGCTCTCGC    1020
AAGTGGATGA TCATGCTACG TACTGTAGGA ATAAAATTAA TTAATGCGAG GCTGCAAGTA    1080
TCCCTGCGCC GATTTTCTCT TCTTACGGCG GGAACCAAAA AATGTGACGC TGTGATTTTC    1140
TGGAAAAGGT AAGGATGTTT AGTTTCCCAG GATTATTACT GGTTCCGTAT GTGTATGTGT    1200
ATGGATATCA TTCCGTATGG ATACGCCCGT TTCCTCCGCC CAGAACCAGT CCGTCATCCA    1260
TCCTCCACTC TTTCTTCTCT TAGAGCCTTT CCACCTCTCT TCACTTTCTT TTTCTTTCCC    1320
CCCTCCCTCT TTGCTTTCCC TCTCCCAGTA TTATTCTTAT ATTATCGGTT TGACCGTCGC    1380
CTCAGTATCG GCCCCCCGTG AATCACTTTT CGTTTCTCTT GTATTTTACT TTCCTATCTG    1440
GGATTGCTCC TCGATTAGCA GCTCTACTTC ATTCGGCCAT GTGCGTCTAG AGGGTCTAGC    1500
CCCTCTCTCT CTTTGCACTG ACTGTCAGCC ATACCATAGT ATCATCCCGG AATTAAGAAA    1560
AAAAAAGAAA TTATTCTACC TCCGATCTGG ACAAATTATA ACCAGGAGAA AATCAAGCGA    1620
AAGAGGGGCA AAGGAGGAGA CACCATTAAA ACTGGGTCTG GTTTGATTCA TGACATACAT    1680
TCGTCGTCTT GAATTTCAAT AGGTACGGAC TGATGCATTC CACTCGAGCC TTTTTAGCTG    1740
CGTGTCCGTC TCCAATCGCA CTTCTTTTCT TATTTCCTTG TGGGATAAAT TGATTATTTA    1800
CCGTTTCGTT TTCTCTATAT TGCGGTGGTG GTGCGACCCA TCCAACTATT ATTATTATAA    1860
TTGGAATTTG ATTTGGATTT TGATTCCTGT GACGGATCTC AGACCAAGTG CCTAAACTAT    1920
AACTGACTTG GACCCCCTTC AGATCCTAGC TTCCCGATTC TTTTCCACCA CTGCTGCATC    1980
```

```
CTCTTCCTGC ACGCAGCGTT CGTTTAGGGC GGGTAGACTG GAATTTATTC CTTGCGCCAC    2040

GGACCAATCG CTCCCTCGAC GCTCTCATTC CTGCGTCGAG CTCTTTTTCC CTCGACTCTC    2100

ATTGCTTGCT GGGCTGGTTC TTGAACCTCT TCAATCGTCC TTATCTCTTT CCCCCCATCC    2160

GGCCTGTGAT TCCTATCTTT CCTTTTTTTC TTCCCTTTCT TGTTTGATCC CCCCTCCTCC    2220

CCGTCTTATC GCCTACTATC GTGATCCCCG CCCTTCCCAA TAAAGAGTAG GGCGTGTGAA    2280

C ATG TCC GGG TTA ACC CTC GGG CGA GGC CCT GGG GGC GTG CGA CCG          2326
  Met Ser Gly Leu Thr Leu Gly Arg Gly Pro Gly Gly Val Arg Pro
    1               5                  10                  15

ACT CAA ACC GCA ACT TTT ACC ACC CAC CAC CCG TCC GCC GAT GCT GAC      2374
Thr Gln Thr Ala Thr Phe Thr Thr His His Pro Ser Ala Asp Ala Asp
                20                  25                  30

CGC TCC TCC AAC AAC CTC CCC CCT ACC TCC TCG CAG CTG TCC GAT GAC      2422
Arg Ser Ser Asn Asn Leu Pro Pro Thr Ser Ser Gln Leu Ser Asp Asp
            35                  40                  45

TTT TCT TTC GGT TCC CCT CTG AGC CCC GCC GAC TCA CAG GCC CAT GAC      2470
Phe Ser Phe Gly Ser Pro Leu Ser Pro Ala Asp Ser Gln Ala His Asp
        50                  55                  60

GGC CTA CTT CAG GAC TCC CTC TTC CCT GAA TGG GGG TCT GGT GCG CCT      2518
Gly Leu Leu Gln Asp Ser Leu Phe Pro Glu Trp Gly Ser Gly Ala Pro
    65                  70                  75

CGA CCC GGC ATT GAC AGT CCG GAT GAG ATG CAG AGG CAA GAT CCG CTA      2566
Arg Pro Gly Ile Asp Ser Pro Asp Glu Met Gln Arg Gln Asp Pro Leu
80                  85                  90                  95

GCG ACT CAA ATA TGG AAG CTC TAT TCT AGG ACC AAG GCC CAG TTG CCC      2614
Ala Thr Gln Ile Trp Lys Leu Tyr Ser Arg Thr Lys Ala Gln Leu Pro
                100                 105                 110

AAC CAG GAG CGT ATG GAA AAC CTG ACC TGG CGG ATG ATG GCG ATG AGT      2662
Asn Gln Glu Arg Met Glu Asn Leu Thr Trp Arg Met Met Ala Met Ser
            115                 120                 125

TTG AAA CGT AAG GAG CGG GAA CGT GCT CAA CAG TCC  AT  GTAGGTGTTC      2710
Leu Lys Arg Lys Glu Arg Glu Arg Ala Gln Gln Ser  Met
        130                 135                 140

TCCCTCTGTA GAGGAACGGC TGGACCCGCT CATCATTAAT TTTTTTTTTG TCTGTGAAG G  2770

TTT CCT GCG AGA CGC GGT AGC GCT GGC CCC AGT GGT ATC GCT CAA CTG      2818
Phe Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Gly Pro Ser Gly Ile Ala Gln Leu
                145                 150                 155

CGC ATT TCC GAC CCG CCC GTT GCC ACC GGT AAC CCT CAG TCA ACC GAC      2866
Arg Ile Ser Asp Pro Pro Val Ala Thr Gly Asn Pro Gln Ser Thr Asp
            160                 165                 170

CTG ACC GCC GAC CCT ATG AAC CTC GAC GAT TTC ATC GTG CCC TTC GAA      2914
Leu Thr Ala Asp Pro Met Asn Leu Asp Asp Phe Ile Val Pro Phe Glu
        175                 180                 185

TCT CCT TCG GAC CAC CCC TCG CCC AGT GCC GTC AAG ATT TCC GAC TCC      2962
Ser Pro Ser Asp His Pro Ser Pro Ser Ala Val Lys Ile Ser Asp Ser
    190                 195                 200
```

```
ACG GCG TCC GCG GCC ATT CCC ATC AAG TCC CGG AAA GAC CAG CTG AGA      3010
Thr Ala Ser Ala Ala Ile Pro Ile Lys Ser Arg Lys Asp Gln Leu Arg
205                 210                 215                 220

GAT TCT ACC CCG GTG CCG GCC TCG TTC CAC CAT CCG GCT CAG GAT CAA      3058
Asp Ser Thr Pro Val Pro Ala Ser Phe His His Pro Ala Gln Asp Gln
                225                 230                 235

CGG AAG AAC AGT GAA TTT GGC TAC GTC CCC CGT CGC GTG CGC AAG ACG      3106
Arg Lys Asn Ser Glu Phe Gly Tyr Val Pro Arg Arg Val Arg Lys Thr
            240                 245                 250

AGT ATC GAC GAG CGT CAA TTT TTC TCA CTG CAG GTG CCG ACC CGA AAG      3154
Ser Ile Asp Glu Arg Gln Phe Phe Ser Leu Gln Val Pro Thr Arg Lys
        255                 260                 265

CGA CCG GCC GAA TCC TCG CCC CAG GTA CCC CCC GTT TCC AAC TCG ATG      3202
Arg Pro Ala Glu Ser Ser Pro Gln Val Pro Pro Val Ser Asn Ser Met
    270                 275                 280

TTG GCC CAC GAT CCG GAC CTC GCT TCC GGC GTG CCC GAT TAT GCC TTG      3250
Leu Ala His Asp Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Tyr Ala Leu
285                 290                 295                 300

GAC GCC CCG TCC TCG GCC TTT GGC TTC CAT CAG GGT AAC CAC CAT CCG      3298
Asp Ala Pro Ser Ser Ala Phe Gly Phe His Gln Gly Asn His His Pro
                305                 310                 315

GTC AAT CAT CAC AAC CAC ACC TCC CCC GGG GCA CCG TTT GGC TTG GAT      3346
Val Asn His His Asn His Thr Ser Pro Gly Ala Pro Phe Gly Leu Asp
            320                 325                 330

ACG TTC GGC CTG GGA GAT GAT CCA ATC TTG CCC TCC GCG GGC CCC TAC      3394
Thr Phe Gly Leu Gly Asp Asp Pro Ile Leu Pro Ser Ala Gly Pro Tyr
        335                 340                 345

CAG TCG CAA TTC ACC TTC TCA CCC AGC GAG TCT CCG ATG GCC TCC GGT      3442
Gln Ser Gln Phe Thr Phe Ser Pro Ser Glu Ser Pro Met Ala Ser Gly
    350                 355                 360

CAT CCG TTT GCG AAC CTC TAT TCG CAT ACC CCG GTG GCT TCG TCC CTC      3490
His Pro Phe Ala Asn Leu Tyr Ser His Thr Pro Val Ala Ser Ser Leu
365                 370                 375                 380

AAC TCG ACG GAT TTC TTC TCT CCA CCG CCA TCA GGC TAC CAG TCC ACG      3538
Asn Ser Thr Asp Phe Phe Ser Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gln Ser Thr
                385                 390                 395

GCA TCC ACG CCG CAG CCC ACC TAC GAC GGG GAC CAT TCC GTT TAT TTC      3586
Ala Ser Thr Pro Gln Pro Thr Tyr Asp Gly Asp His Ser Val Tyr Phe
            400                 405                 410

GAT ATG CCG TCG GGC GAC GCG CGC ACC CAG CGC CGC ATT CCG AAC TAT      3634
Asp Met Pro Ser Gly Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Ile Pro Asn Tyr
        415                 420                 425

ATT TCG CAT CGG TCC AAC TTG TCT GCT TCG CTG CAG CCT CGG TAT ATG      3682
Ile Ser His Arg Ser Asn Leu Ser Ala Ser Leu Gln Pro Arg Tyr Met
    430                 435                 440

TTC AAC CAG AAC AAC CAT GAA CAG GCC AGT TCG TCG ACG GTG CAT TCG      3730
Phe Asn Gln Asn Asn His Glu Gln Ala Ser Ser Ser Thr Val His Ser
445                 450                 455                 460

CCG AGC TAC CCC ATT CCC CAG CCG CAA CAT GTG GAC CCC ACT CAG GTG      3778
Pro Ser Tyr Pro Ile Pro Gln Pro Gln His Val Asp Pro Thr Gln Val
                465                 470                 475
```

```
TTG AAC GCC ACC AAT TAC TCG ACC GGC AAC TCC CAC CAT ACC GGC GCC      3826
Leu Asn Ala Thr Asn Tyr Ser Thr Gly Asn Ser His His Thr Gly Ala
            480                 485                 490

ATG TTT TCA TTT GGA GCC GAT TCA GAT AAC GAG GAT GAC GAT GGT CAT      3874
Met Phe Ser Phe Gly Ala Asp Ser Asp Asn Glu Asp Asp Asp Gly His
        495                 500                 505

CAG CTG TCC GAG CGG GCT GGT CTG GCG ATG CCG ACT GAA TAT GGG GAC      3922
Gln Leu Ser Glu Arg Ala Gly Leu Ala Met Pro Thr Glu Tyr Gly Asp
    510                 515                 520

GAG GAC GGG TTC TCG TCG GGC ATG CAG TGG GAT GGG CAG TTC CCG GGC      3970
Glu Asp Gly Phe Ser Ser Gly Met Gln Trp Asp Gly Gln Phe Pro Gly
525                 530                 535                 540

TCC TTC CAT TCG CTG CCG GGC TTT GGC CCT CAA CAT CGC AAG CAT GTT      4018
Ser Phe His Ser Leu Pro Gly Phe Gly Pro Gln His Arg Lys His Val
                545                 550                 555

ACC ATC GGG TCC ACG GAC ATG ATG GAC ACC CCC GAG GAG TGG AAT CAC      4066
Thr Ile Gly Ser Thr Asp Met Met Asp Thr Pro Glu Glu Trp Asn His
            560                 565                 570

GGT GGC AGT TTG GGT CGG ACT CAT GGG TCG GTG GCT TCG GTC AGT GAG      4114
Gly Gly Ser Leu Gly Arg Thr His Gly Ser Val Ala Ser Val Ser Glu
        575                 580                 585

GTG CGC AAC CGA GAG CAG GAC CCT CGC CGG CAG AAG ATT GCC CGC ACC      4162
Val Arg Asn Arg Glu Gln Asp Pro Arg Arg Gln Lys Ile Ala Arg Thr
    590                 595                 600

ACG TCC ACC CCC AAT ACG GCC CAG CTG TTG CGC CAA AGC ATG CAC TCT      4210
Thr Ser Thr Pro Asn Thr Ala Gln Leu Leu Arg Gln Ser Met His Ser
605                 610                 615                 620

AAT AAC AAT ACG TCT CAT ACC TCC CCT AAT ACG CCG CCC GAG TCC GCC      4258
Asn Asn Asn Thr Ser His Thr Ser Pro Asn Thr Pro Pro Glu Ser Ala
                625                 630                 635

CTG AGC AGC GCA GTT CCG TCC CGC CCG GCC AGT CCC GGG GGC AGC AAG      4306
Leu Ser Ser Ala Val Pro Ser Arg Pro Ala Ser Pro Gly Gly Ser Lys
            640                 645                 650

AAC GGC GAC CAA GGC AGC AAC GGA CCG ACC ACC TGC ACG AAC TGC TTC      4354
Asn Gly Asp Gln Gly Ser Asn Gly Pro Thr Thr Cys Thr Asn Cys Phe
        655                 660                 665

ACT CAA ACC ACT CCG CTG TGG CGT CGG AAC CCA GAG GGC CAG CCA CTG      4402
Thr Gln Thr Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asn Pro Glu Gly Gln Pro Leu
    670                 675                 680

TGC AAT GCC TGC GGG TTG TTT TTG AAA TTG CAC GGT GTC GTG CGC CCT      4450
Cys Asn Ala Cys Gly Leu Phe Leu Lys Leu His Gly Val Val Arg Pro
685                 690                 695                 700

CTG TCC CTG AAA ACG GAC GTT ATC AAA AAG CGC AAC CGT AGC AGT GCC      4498
Leu Ser Leu Lys Thr Asp Val Ile Lys Lys Arg Asn Arg Ser Ser Ala
                705                 710                 715

AAC AGC TTG GCG GTT GGG ACC TCC CGT GCG TCG AAG AAG ACA GCC CGC      4546
Asn Ser Leu Ala Val Gly Thr Ser Arg Ala Ser Lys Lys Thr Ala Arg
            720                 725                 730

AAG AAC TCG GTG CAG CAA GCA TCC GTC ACG ACT CCG ACA TCA AGC CGC      4594
Lys Asn Ser Val Gln Gln Ala Ser Val Thr Thr Pro Thr Ser Ser Arg
        735                 740                 745
```

```
GCT CAG AAT GGG ACT TCC TTC GAA TCC CCG CCC GCC GGC TTT AGT GCT      4642
Ala Gln Asn Gly Thr Ser Phe Glu Ser Pro Pro Ala Gly Phe Ser Ala
    750                 755                 760

GCC GCG GGA CGG TCG AAT GGG GTG GTA CCC ATT GCC GCC GCT CCT CCG      4690
Ala Ala Gly Arg Ser Asn Gly Val Val Pro Ile Ala Ala Ala Pro Pro
765                 770                 775                 780

AAG GCA GCT CCC TCC GCA GCC GCC TCC CCT AGC ACG GGC CAG ACC CGC      4738
Lys Ala Ala Pro Ser Ala Ala Ala Ser Pro Ser Thr Gly Gln Thr Arg
                785                 790                 795

AAC CCG ATC CAG GCT GCC CCG AAA CGT CAA CGA CGG CTG GAA AAG GCC      4786
Asn Pro Ile Gln Ala Ala Pro Lys Arg Gln Arg Arg Leu Glu Lys Ala
            800                 805                 810

ACG GAG ATG GAA ACG GAC GAG GCT AAC AAG TCC GCG GGA GGC CGA TCC      4834
Thr Glu Met Glu Thr Asp Glu Ala Asn Lys Ser Ala Gly Gly Arg Ser
        815                 820                 825

AAG GTG GTG CCT CTG GCA CCC GCC ATG CCA CCG GCA GCA GCC AAT CCG      4882
Lys Val Val Pro Leu Ala Pro Ala Met Pro Pro Ala Ala Ala Asn Pro
    830                 835                 840

GCG AAC CAT AGT ATT GCC GGA GGC CAA GGG GCT AGT CAG GAA TGG GAG      4930
Ala Asn His Ser Ile Ala Gly Gly Gln Gly Ala Ser Gln Glu Trp Glu
845                 850                 855                 860

TGG TTG ACG ATG AGT CTGTAATGGC CGCGCTTACC TCTCTACTTC TCTACACTCG      4985
Trp Leu Thr Met Ser Leu
                865

TTTCTTAATA TCTTTCTTGA ACCCCCCCTT ATATTTTCCC ACCGTTGATG CTACGCCATG    5045

ACCGATAGAG ATGATGAATA CTGCAACCAA TGGAATCTCG CTAGACGAGA GGTGTTAGAT    5105

GACGTGGCCC GCGATGCACT TAATGAGATA CGAGGAGGTG CAATGCGTTG GTTACGCTAG    5165

TTTAATGGTA ACATGACGAG GGATATTCGC TCTGTTATTT CGGGCTTTGA TCTGTTTCAG    5225

TCTGCGATTT AACAGCGACT GATCCTCTGC TGTGACAATA CACAGCTTGT CTTGTGGTTC    5285

TGTTGTGGCT TTCTGTTTGT TTGGCTGATT TGATTTATGC TTGATACAAT CGCGTCTGTC    5345

CGGACCCCGG CCTTTGTTTT GTTTTCAGTT CTGATTCTTC ACTGTTTCTG ATTCTCTTGT    5405

TCATGTTTTT GATTTGTTCA AGGCTTGGGG CCGGGCAGAA GTGCGCATCT CTGCTTTGTG    5465

TTTTCCGTCA CCGTGCATAG ACGCTGTATG TATATGCTAC AGCAAGATTC TACTTATCCA    5525

GTCTGAGCCT GTATTCATTG AAGTGTAGCC AGCTGTCGAA TGAGCTTTTT AACGATATTG    5585

TTTTGTTGAG TAGTCAACAA GTAGTATCTG TATATTCCGG AGTCTAAGTA AGACACTT      5643
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 866 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) STRUKTUR: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr: 2:

```
Met Ser Gly Leu Thr Leu Gly Arg Gly Pro Gly Gly Val Arg Pro Thr
 1               5                  10                  15

Gln Thr Ala Thr Phe Thr Thr His His Pro Ser Ala Asp Ala Asp Arg
            20                  25                  30

Ser Ser Asn Asn Leu Pro Pro Thr Ser Ser Gln Leu Ser Asp Asp Phe
        35                  40                  45

Ser Phe Gly Ser Pro Leu Ser Pro Ala Asp Ser Gln Ala His Asp Gly
    50                  55                  60

Leu Leu Gln Asp Ser Leu Phe Pro Glu Trp Gly Ser Gly Ala Pro Arg
65                  70                  75                  80

Pro Gly Ile Asp Ser Pro Asp Glu Met Gln Arg Gln Asp Pro Leu Ala
                85                  90                  95

Thr Gln Ile Trp Lys Leu Tyr Ser Arg Thr Lys Ala Gln Leu Pro Asn
            100                 105                 110

Gln Glu Arg Met Glu Asn Leu Thr Trp Arg Met Met Ala Met Ser Leu
        115                 120                 125

Lys Arg Lys Glu Arg Glu Arg Ala Gln Gln Ser Met Phe Pro Ala Arg
    130                 135                 140

Arg Gly Ser Ala Gly Pro Ser Gly Ile Ala Gln Leu Arg Ile Ser Asp
145                 150                 155                 160

Pro Pro Val Ala Thr Gly Asn Pro Gln Ser Thr Asp Leu Thr Ala Asp
                165                 170                 175

Pro Met Asn Leu Asp Asp Phe Ile Val Pro Phe Glu Ser Pro Ser Asp
            180                 185                 190

His Pro Ser Pro Ser Ala Val Lys Ile Ser Asp Ser Thr Ala Ser Ala
        195                 200                 205

Ala Ile Pro Ile Lys Ser Arg Lys Asp Gln Leu Arg Asp Ser Thr Pro
    210                 215                 220

Val Pro Ala Ser Phe His His Pro Ala Gln Asp Gln Arg Lys Asn Ser
225                 230                 235                 240

Glu Phe Gly Tyr Val Pro Arg Arg Val Arg Lys Thr Ser Ile Asp Glu
                245                 250                 255

Arg Gln Phe Phe Ser Leu Gln Val Pro Thr Arg Lys Arg Pro Ala Glu
            260                 265                 270
```

```
Ser Ser Pro Gln Val Pro Pro Val Ser Asn Ser Met Leu Ala His Asp
        275                 280                 285

Pro Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Ala Pro Ser
    290                 295                 300

Ser Ala Phe Gly Phe His Gln Gly Asn His His Pro Val Asn His His
305                 310                 315                 320

Asn His Thr Ser Pro Gly Ala Pro Phe Gly Leu Asp Thr Phe Gly Leu
                325                 330                 335

Gly Asp Asp Pro Ile Leu Pro Ser Ala Gly Pro Tyr Gln Ser Gln Phe
            340                 345                 350

Thr Phe Ser Pro Ser Glu Ser Pro Met Ala Ser Gly His Pro Phe Ala
        355                 360                 365

Asn Leu Tyr Ser His Thr Pro Val Ala Ser Ser Leu Asn Ser Thr Asp
    370                 375                 380

Phe Phe Ser Pro Pro Pro Ser Gly Tyr Gln Ser Thr Ala Ser Thr Pro
385                 390                 395                 400

Gln Pro Thr Tyr Asp Gly Asp His Ser Val Tyr Phe Asp Met Pro Ser
                405                 410                 415

Gly Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Ile Pro Asn Tyr Ile Ser His Arg
            420                 425                 430

Ser Asn Leu Ser Ala Ser Leu Gln Pro Arg Tyr Met Phe Asn Gln Asn
        435                 440                 445

Asn His Glu Gln Ala Ser Ser Ser Thr Val His Ser Pro Ser Tyr Pro
    450                 455                 460

Ile Pro Gln Pro Gln His Val Asp Pro Thr Gln Val Leu Asn Ala Thr
465                 470                 475                 480

Asn Tyr Ser Thr Gly Asn Ser His His Thr Gly Ala Met Phe Ser Phe
                485                 490                 495

Gly Ala Asp Ser Asp Asn Glu Asp Asp Asp Gly His Gln Leu Ser Glu
            500                 505                 510

Arg Ala Gly Leu Ala Met Pro Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Asp Gly Phe
        515                 520                 525

Ser Ser Gly Met Gln Trp Asp Gly Gln Phe Pro Gly Ser Phe His Ser
    530                 535                 540

Leu Pro Gly Phe Gly Pro Gln His Arg Lys His Val Thr Ile Gly Ser
545                 550                 555                 560

Thr Asp Met Met Asp Thr Pro Glu Glu Trp Asn His Gly Gly Ser Leu
                565                 570                 575
```

```
Gly Arg Thr His Gly Ser Val Ala Ser Val Ser Glu Val Arg Asn Arg
            580                 585                 590

Glu Gln Asp Pro Arg Arg Gln Lys Ile Ala Arg Thr Thr Ser Thr Pro
        595                 600                 605

Asn Thr Ala Gln Leu Leu Arg Gln Ser Met His Ser Asn Asn Asn Thr
    610                 615                 620

Ser His Thr Ser Pro Asn Thr Pro Pro Glu Ser Ala Leu Ser Ser Ala
625                 630                 635                 640

Val Pro Ser Arg Pro Ala Ser Pro Gly Gly Ser Lys Asn Gly Asp Gln
                645                 650                 655

Gly Ser Asn Gly Pro Thr Thr Cys Thr Asn Cys Phe Thr Gln Thr Thr
            660                 665                 670

Pro Leu Trp Arg Arg Asn Pro Glu Gly Gln Pro Leu Cys Asn Ala Cys
        675                 680                 685

Gly Leu Phe Leu Lys Leu His Gly Val Val Arg Pro Leu Ser Leu Lys
    690                 695                 700

Thr Asp Val Ile Lys Lys Arg Asn Arg Ser Ser Ala Asn Ser Leu Ala
705                 710                 715                 720

Val Gly Thr Ser Arg Ala Ser Lys Lys Thr Ala Arg Lys Asn Ser Val
                725                 730                 735

Gln Gln Ala Ser Val Thr Thr Pro Thr Ser Ser Arg Ala Gln Asn Gly
            740                 745                 750

Thr Ser Phe Glu Ser Pro Pro Ala Gly Phe Ser Ala Ala Ala Gly Arg
        755                 760                 765

Ser Asn Gly Val Val Pro Ile Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Ala Pro
    770                 775                 780

Ser Ala Ala Ala Ser Pro Ser Thr Gly Gln Thr Arg Asn Pro Ile Gln
785                 790                 795                 800

Ala Ala Pro Lys Arg Gln Arg Arg Leu Glu Lys Ala Thr Glu Met Glu
                805                 810                 815

Thr Asp Glu Ala Asn Lys Ser Ala Gly Gly Arg Ser Lys Val Val Pro
            820                 825                 830

Leu Ala Pro Ala Met Pro Pro Ala Ala Ala Asn Pro Ala Asn His Ser
        835                 840                 845

Ile Ala Gly Gly Gln Gly Ala Ser Gln Glu Trp Glu Trp Leu Thr Met
    850                 855                 860

Ser Leu
865
```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines gewünschten Genprodukts, in dem ein Pilz, gewählt aus der Gruppe bestehend aus A. oryzae, A. niger, A. awamori, A. phoenicis, A. japonicus, A. foetidus, T. reesei, T. harzianum, H. insulens, H. lanuginosa, F. graminearum, F. solani, P. chrysogenum, wobei in dem Pilz das areA-Gen durch rekombinante DNA-Technologie derart modifiziert worden ist, dass es nicht derart exprimiert werden kann, dass es einen funktionalen AreA-Aktivator bereitstellt, und wobei der Pilz transformiert worden ist, um eine DNA-Sequenz, die das gewünschte Genprodukt kodiert, in das Genom eines Pilzes in funktionaler Art und Weise zu integrieren, in einem geeigneten Wachstumsmedium bei geeigneten Bedingungen gezüchtet wird

und das gewünschte Genprodukt gewonnen und aufgereinigt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Genprodukt ein abgesondertes Protein ist.

3. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 oder 2, worin gewünschtes Genprodukt ein industrielles Peptid oder Protein ist, vorzugsweise ein Enzym.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das Enzym aus der Gruppe, umfassend eine Protease, Lipase, Cutinase, Cellulase, Xylanase, Laccase und Pectinase, gewählt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin gewünschtes Genprodukt ein therapeutisch aktives Peptid oder Protein ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin das therapeutisch aktive Peptid oder Protein aus der Gruppe, umfassend Insulin, Wachstumshormon, Glucagon, Somatostatin, Interferon, PDGF, Faktor VII, Faktor VIII, Urokinase, tPA, EPO oder TPO, gewählt wird.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

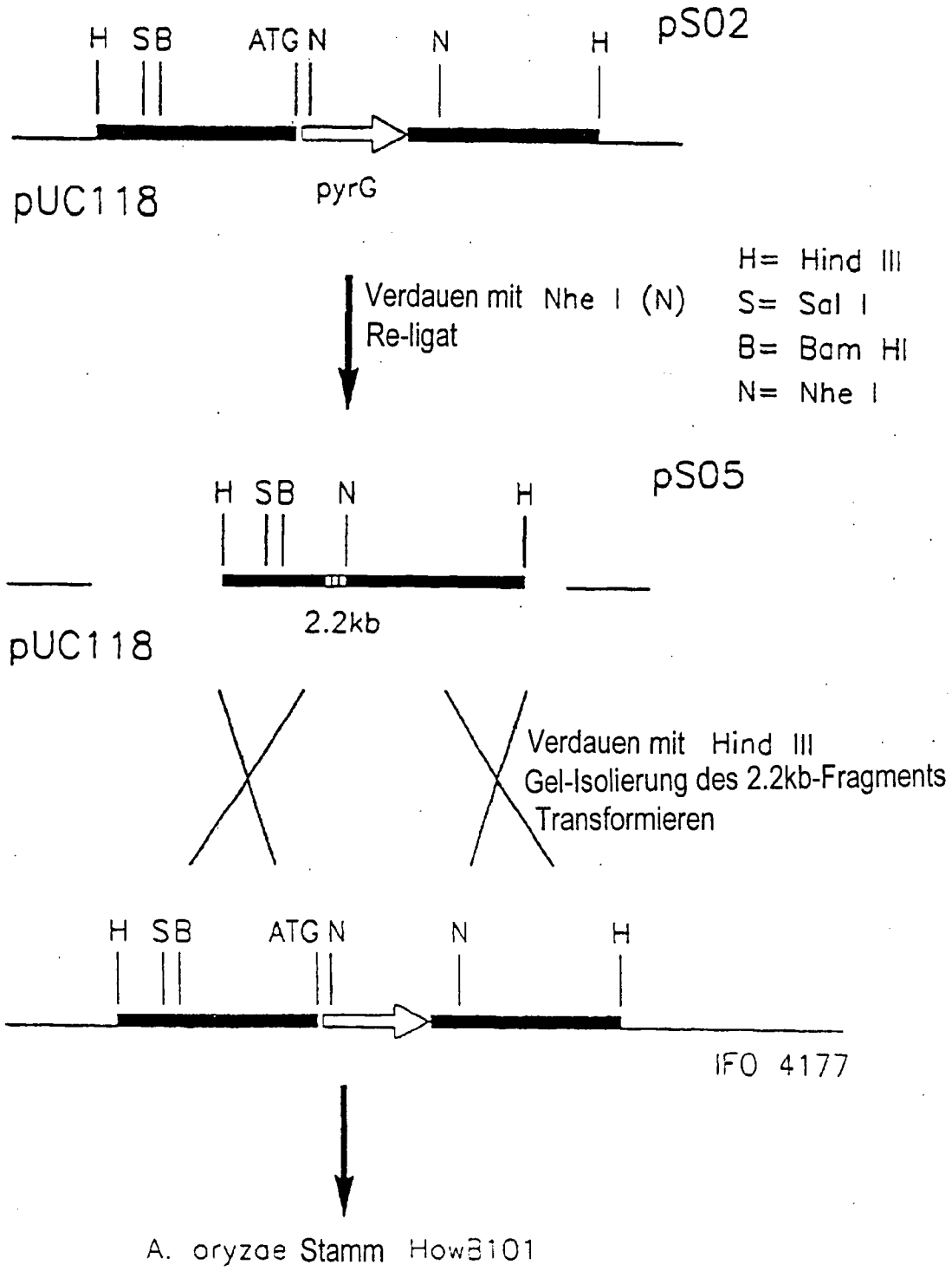

Fig. 1

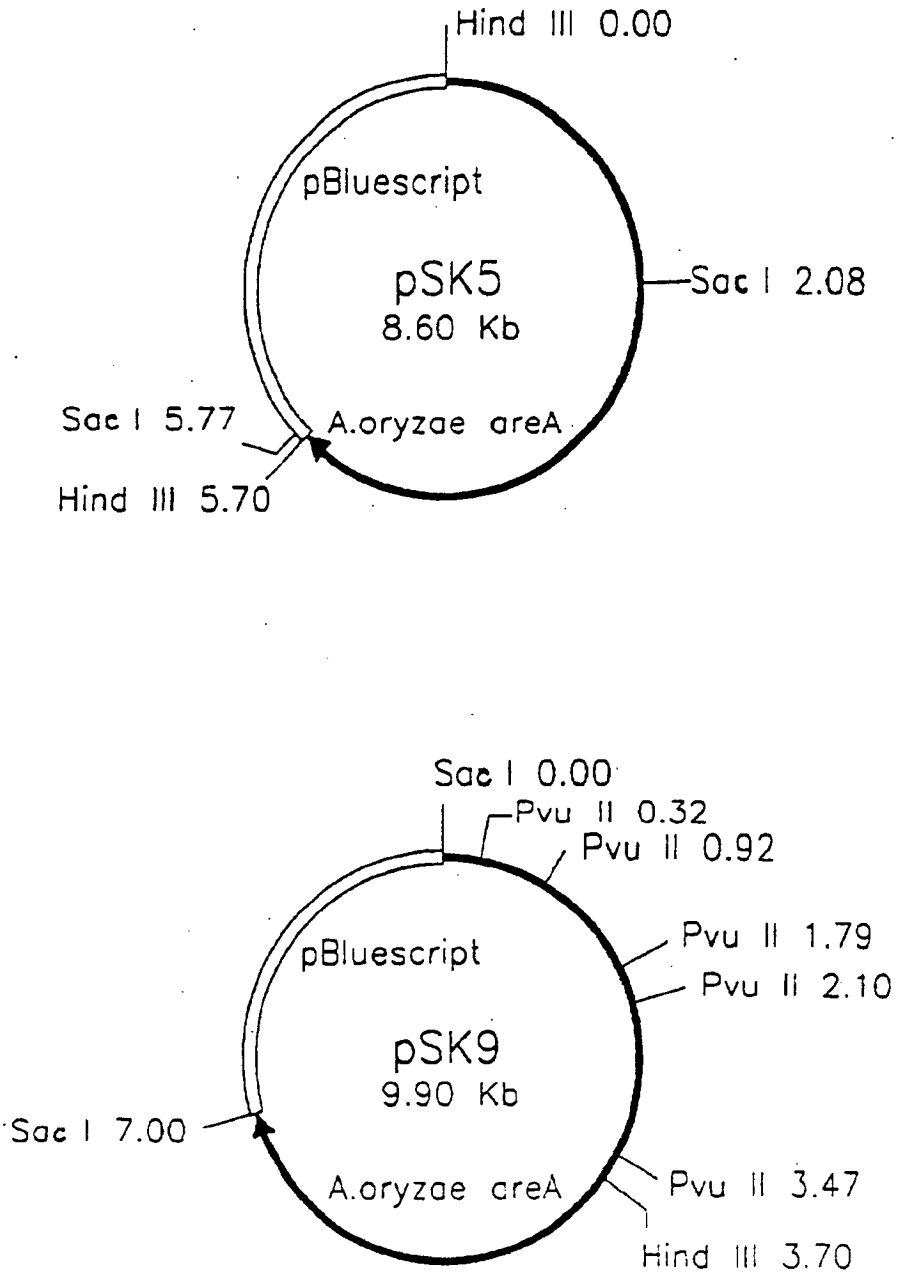
Hind III 0.00
pBluescript
pSK5
8.60 Kb
Sac I 2.08
Sac I 5.77
A.oryzae areA
Hind III 5.70
Sac I 0.00
Pvu II 0.32
Pvu II 0.92
Pvu II 1.79
pBluescript
Pvu II 2.10
pSK9
9.90 Kb
Sac I 7.00
A.oryzae creA
Pvu II 3.47
Hind III 3.70

Fig. 2

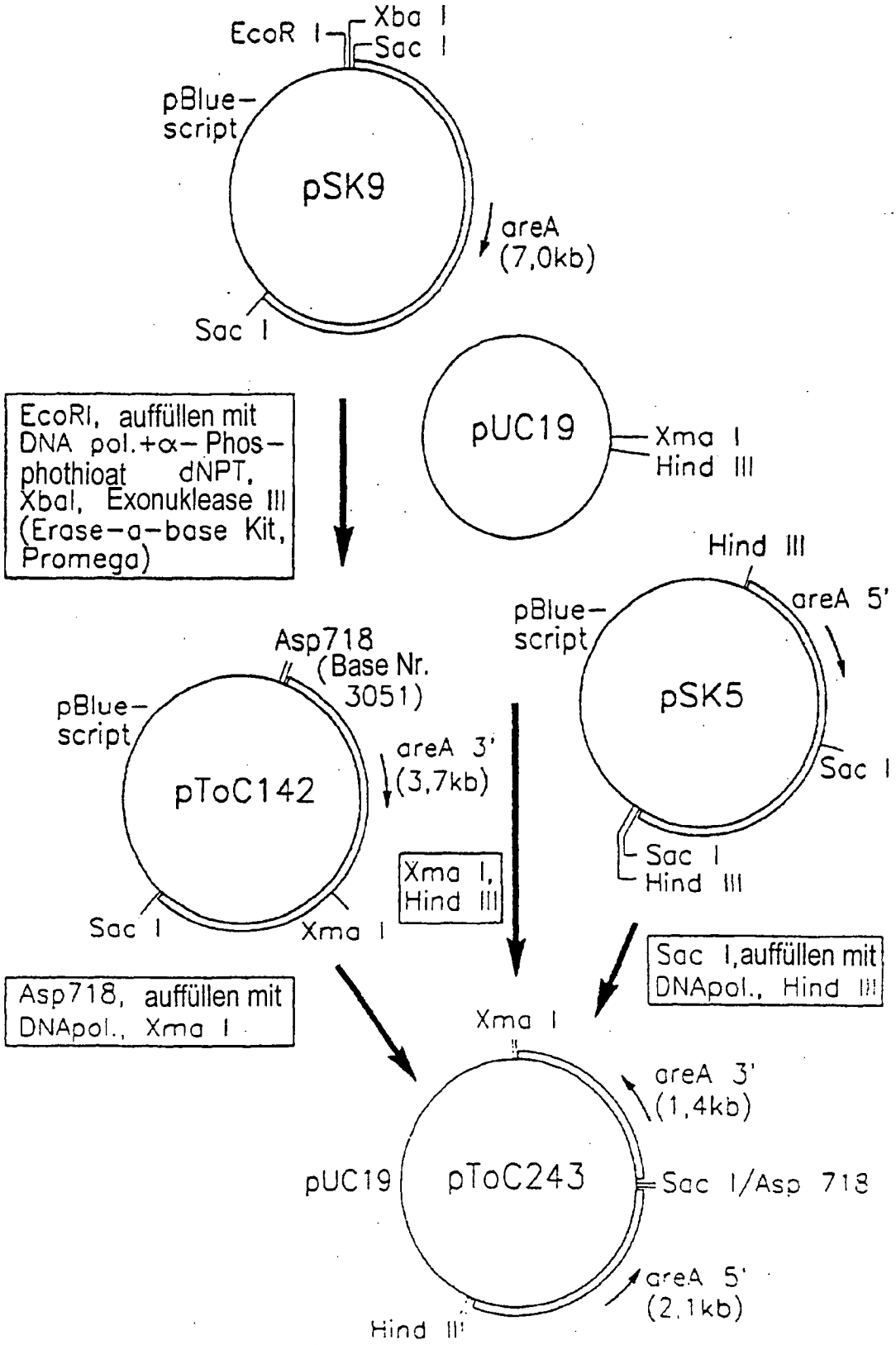
EcoR I
Xba I
Sac I
pBlue-script
pSK9
areA (7,0kb)
Sac I
EcoRI, auffüllen mit DNA pol.+α-Phosphothioat dNPT, XbaI, Exonuklease III (Erase-a-base Kit, Promega)
pUC19
Xma I
Hind III
Hind III
pBlue-script
areA 5'
pSK5
Sac I
Sac I
Hind III
Asp718 (Base Nr. 3051)
pBlue-script
areA 3' (3,7kb)
pToC142
Sac I
Xma I
Xma I, Hind III
Sac I, auffüllen mit DNApol., Hind III
Asp718, auffüllen mit DNApol., Xma I
Xma I
areA 3' (1,4kb)
pUC19
pToC243
Sac I/Asp 718
areA 5' (2,1kb)
Hind III

Fig. 3a

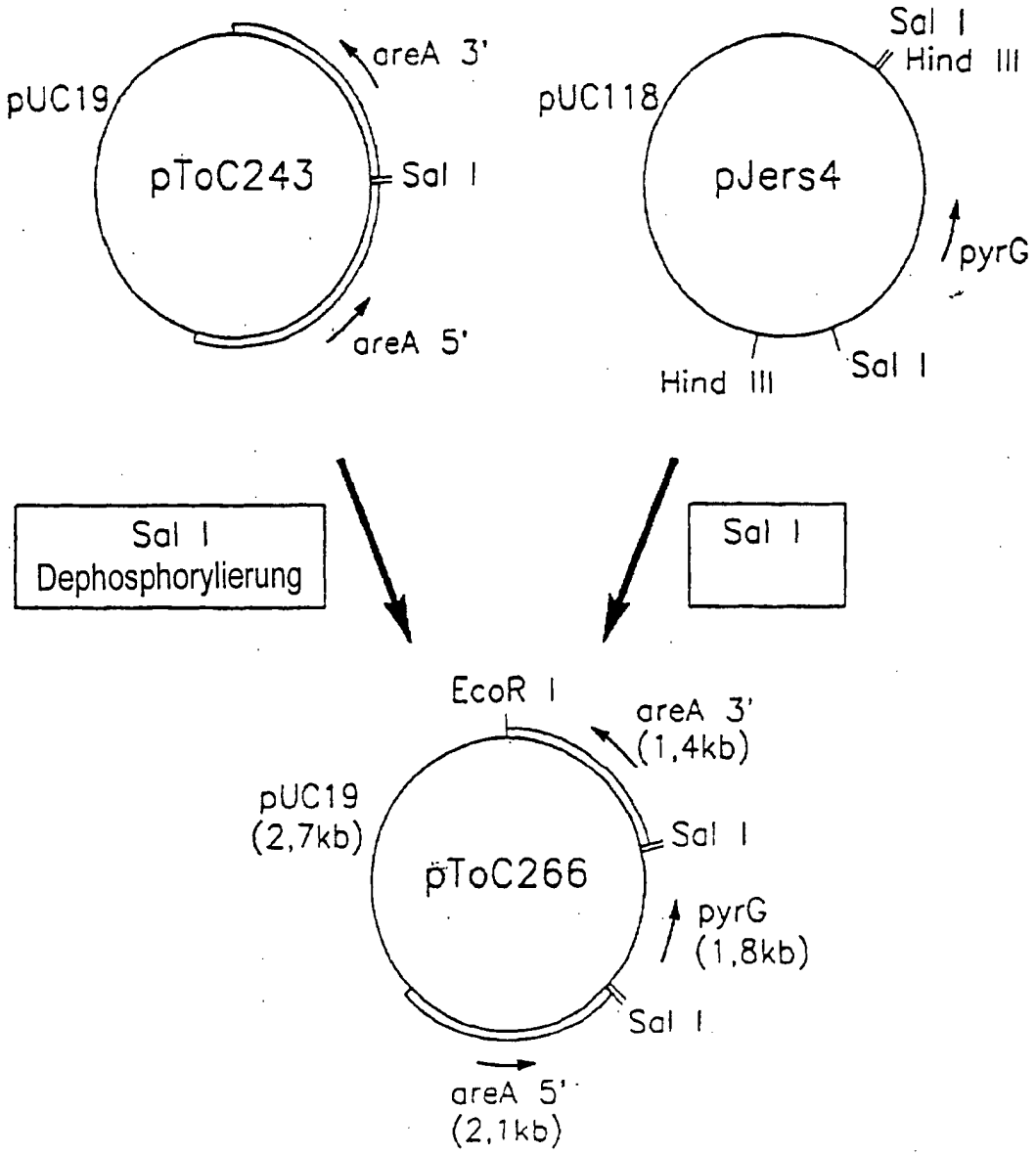
pUC19
areA 3'
pToC243
Sal I
areA 5'
pUC118
Sal I
Hind III
pJers4
pyrG
Hind III
Sal I
Sal I
Dephosphorylierung
Sal I
EcoR I
areA 3'
(1,4kb)
pUC19
(2,7kb)
Sal I
pToC266
pyrG
(1,8kb)
Sal I
areA 5'
(2,1kb)

Fig. 3b

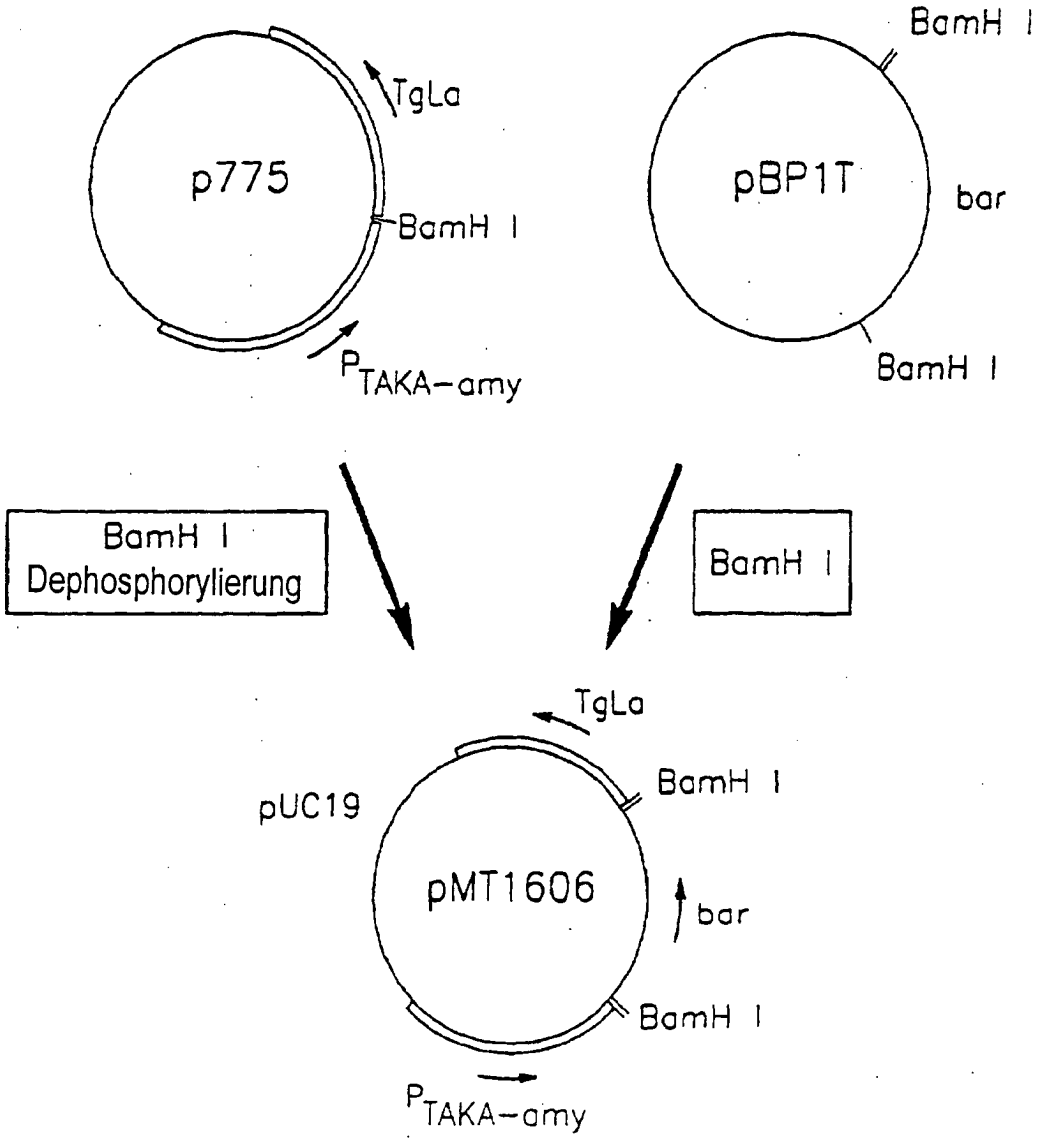
p775
TgLa
BamH I
P TAKA-amy
pBP1T
BamH I
bar
BamH I
BamH I
Dephosphorylierung
BamH I
pUC19
pMT1606
TgLa
BamH I
bar
BamH I
P TAKA-amy

Fig. 4

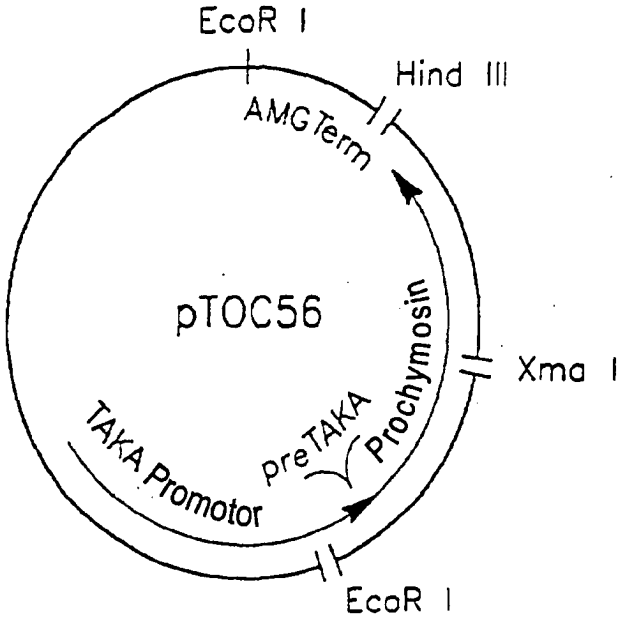
EcoR I
Hind III
AMG Term
pTOC56
Prochymosin
preTAKA
TAKA Promotor
Xma I
EcoR I

Fig. 5