

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/20005 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/56,
9/24, 15/81

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08662

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. September 2000 (05.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 43 383.6 10. September 1999 (10.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): TAD PHARMA GMBH [DE/DE]; Heinz-Lohmann-
Strasse 5, 27472 Cuxhaven (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BECHER, Dietmar
[DE/DE]; Darsser Weg 5, 17493 Greifswald (DE). SIEK-
STELE, Rimantas [LT/LT]; Gedimino 33/17-22, 2001
Vilnius (LT). BARTKEVICIUTE, Danguole [LT/LT];
Kovo 11, 37-31, 4058, Traku distr., Grigiskes (LT). SAS-
NAUSKAS, Kestutis [LT/LT]; D. Gerbutavicius 1/42-87,
2050 Vilnius (LT). DÖHNER, Leopold [DE/DE]; Jo-
hann-Stelling-Strasse 1, 17489 Greifswald (DE). SALIM,
Salah [DE/DE]; Wolgaster Strasse 120, 17489 Greifswald
(DE).

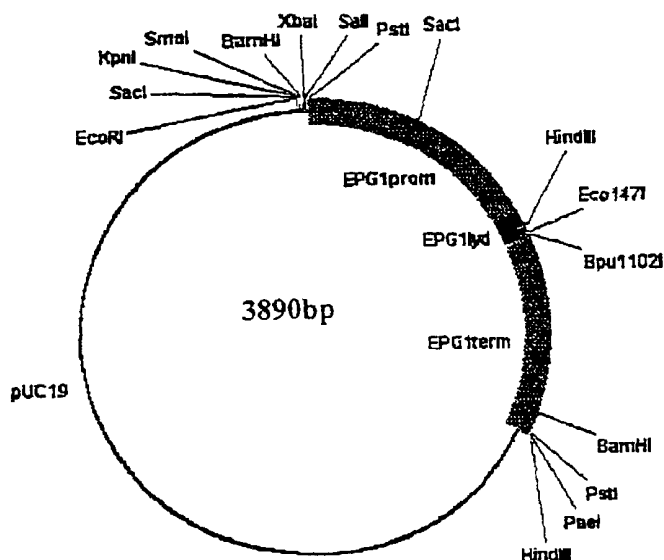
(74) Anwalt: LEISSLER-GERSTL, Gabriele; Eisenführ,
Speiser & Partner, Arnulfstrasse 25, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: REGULATORY SEQUENCES AND EXPRESSION CASSETTES FOR YEASTS

(54) Bezeichnung: REGULATORISCHE SEQUENZEN UND EXPRESSIONSKASSETTEN FÜR HEFEN



(57) Abstract: The invention relates to a DNA sequence which acts as a promoter in yeast cells, to an expression and optionally, secretion system containing said DNA sequence, to plasmids containing this system, to host cells that have been transformed with said DNA and to methods for producing proteins and polypeptides.

(57) Zusammenfassung: Es werden eine DNA-Sequenz, die als Promotor in Hefezellen aktiv ist, ein dieses enthaltendes Ex-
pressions- und gegebenenfalls Sekretionssystem, dieses System enthaltende Plasmide, mit der DNA transformierte Wirtszellen sowie
Verfahren zur Herstellung von Proteinen und Polypeptiden beschrieben.



WO 01/20005 A1



MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

— Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

REGULATIRISCHE SEQUENZEN UND EXPRESSIONKASSETTEN FÜR HEFEN

Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die als Promotor in Hefezellen aktiv ist, ein dieses enthaltendes Expressions- und gegebenenfalls Sekretionssystem, dieses System enthaltende Plasmide, mit der DNA transformierte Wirtszellen sowie Verfahren zur Herstellung von Proteinen und Polypeptiden.

Die Herstellung von Peptiden und Proteinen mit gentechnischen Verfahren ist mittlerweile üblich und es stehen hierfür viele verschiedene Systeme zur Verfügung. Häufig werden Bakteriensysteme verwendet, die allerdings Nachteile haben insbesondere bei der Gewinnung von Medikamenten oder Impfstoffen, z.B. daß sie pyrogene Substanzen erzeugen, die vor der Verwendung entfernt werden müssen, oder daß sie die Polypeptide nicht glykosylieren können. Es wurden daher auch eine Reihe anderer Systeme für die Expression von Polypeptiden in eukaryontischen Zellen entwickelt. Ein hierfür weitverbreiteter Organismus ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Genom inzwischen bekannt ist und für die Vektoren und Expressionssysteme erhältlich sind. Allerdings hat auch die Verwendung dieses Mikroorganismus Nachteile. So ist *Saccharomyces* zum Beispiel temperaturempfindlich, was aufwendige Einrichtungen zur Temperaturkontrolle bei der Züchtung erfordert.

Eine Gattung, die aufgrund günstiger Eigenschaften für biotechnologische Verfahren inbetracht gezogen wird, ist die Hefe *Kluyveromyces*. Die Arten *K.lactis* und *K.marxianus* werden als GRAS (Generally Recognized As Safe) eingestuft und können daher mit derselben Sicherheit wie *Saccharomyces* verwendet werden. Darüberhinaus kann *K.marxianus* eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen und Energiequellen für das Wachstum nutzen und ist nicht sehr temperaturempfindlich. *Kluyveromyces marxianus* kann bei Temperaturen bis zu 45°C wachsen und läßt sich daher im Gegensatz zu den temperaturempfindlichen *Saccharomyces*-Stämmen einfacher züchten. Die Zellen von schnell wachsenden *K.marxianus*-Stämmen können sich bei optimalen Bedingungen alle 35 Minuten teilen. Allerdings konnten diese guten Eigenschaften bisher nicht optimal ausgenutzt werden, da es für diese Hefeart an zuverlässigen, expressionsstarken variablen Promotoren mangelt und kaum Expressionssysteme zur Verfügung stehen, mit denen Proteine in guter Effektivität hergestellt werden können.

Es war nun Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Promotor, der für die Expression in Hefen, insbesondere Hefezellen der Gattung *Kluyveromyces* geeignet ist, sowie Expressionssysteme, die variabel zur Expression eingesetzt werden können, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst, indem erfindungsgemäß eine DNA-Sequenz, die die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 1

**GAGGCCTGTC CGATTATTAA ACTTGCGGCA CCCGAGTTTG TGACCTTCGA
CGACATGTTT TATTTCCACA CCGTAGCTAC ACTTTCTATG TAGTAAGTAG
GTAGTATGGA TGGTAGCTAG TAGAACTAA ACGAAACGAA ATAAATGTGA
AATGTTAGAC GTAAAGGGGA GGGGAAGGGA AGGGGGCGGC GGAGAGACAT
GCCAAGCCAT GCCATTTTCAT GGCATGGCAT GTCAAGGGAT ACTGCATGCA
TGCATGCATA CTTTACCAAT AGCAAAGTAA ATTGCTTTCT TCCCCCATTT
GAAACTATTC CACCTCAATC CATCTTTTCT ATAATGGGTA TCACCGATCT
CATGTGTTCT AATAATGCTG CAGGCAACAA CAAATCTTAA AGGCAACTTG
GAATGTAATT TGGTTAATGA TAGATATCAA ACAGCAATGG TGGGCTCCAA
CCGCATGGAT ATGCTCACCT TATTATCCGG AATTGTTGTT CCGCAGGAAA
AAAAAAAAAC CTCGAACCAG ATATTAATTA TCCTATCATT ACTGCGTACA
AAACCCGGGA ACGGTTAACC TGCAGCAGCC GTTTTGCTTA CAGTTCTCAT
GCACAATCAG CCAGATTTTG CAATAGTATT AACTTAGAAT TAAGGCAACA
TCTTTGGATA TGCATGTAGA GTAAGTCGTT CGAAACCATT ATTATTATTA
TTATTATTAT TATTATTATT ATTATTATTA TTATTAGTAT TATTGAAATT
GTTATTGTTT TTAGTTTCAC TACTATTATT ATTCATATTC ATGTTATTGA
CATCGCCGAA CGACCAGCCT CCATACCGAT TAGACAGGAT CTCAAACGTG
GGCTCCAGAG CTCACACATT ATGCTAAATA ACTATCTACT GTAACAGCTA
CAGAAAAAAA ACTATAAAAG AGCGAGGGAT AAACCACTCT CTTGTGAATC
AGGATCAGTA GGTAACTCAT AAACCTTCTT CTTTTCTCTC AAAATATCAA
ATAACAGTAG TATCAACAAC GATATCGAAT AATACTAACT ACTACAACAG
TAGGAACAGT AACGACAACG ACAACGATAG TAACGACAAT AACGACACCA
ACAAACAACA GGAACACAGA TTAAGCTCAG AAACAAAAAA AAAAAA**

umfaßt, zur Verfügung gestellt wird.

Die erfindungsgemäße Nucleotidsequenz umfaßt eine Sequenz, die als Promotor aktiv ist und liefert ein Expressionssystem, das sehr variabel ist und für *Kluyveromyces* geeignet ist, aber auch für andere Hefearten, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden kann.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 ist eine Nucleinsäuresequenz, die regulatorische Regionen eines Gens enthält, das für das Enzym Endopolygalacturonase codiert. Das Enzym Endopolygalacturonase baut Pektin ab, indem es 1,4- α -D-galactosiduronische Bindungen zwischen zwei nichtmethylierten Galacturonsäureresten spaltet. Dieses Enzym kommt unter anderem in Hefestämmen der Art *Kluyveromyces marxianus* vor. Die Sequenz des Endo-

polygalacturonasogens aus *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* wurde in Yeast 15, 311-322 (1999) veröffentlicht. Die aus der angegebenen Sequenz ableitbare Promotorregion führte jedoch nicht zuverlässig zur Expression verschiedener Proteine.

Es wurde nun gefunden, daß eine Sequenz, die zumindest einen Teil der Nucleotide von SEQ ID Nr. 1, bevorzugt mindestens die Nucleotide 1 bis 1134 und insbesondere die gesamte Sequenz umfaßt, die Expression von Proteinen in sehr vorteilhafter und reproduzierbarer Weise ermöglicht. Die beanspruchte Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 weist mehrere regulatorische Anteile auf, so daß sie unter verschiedensten Bedingungen ihre Funktion als Promotor ausüben kann.

Der erfindungsgemäße Promotor kann durch Zugabe von Pektin zum Kulturmedium induziert werden. Dies ist vorteilhaft, da Pektin eine gut verfügbare Substanz ist und somit ein günstiges Induktionsmittel für das erfindungsgemäße System zur Verfügung steht.

Die beschriebenen Nucleinsäuresequenzen mit regulatorischer Aktivität schließen solche Sequenzen ein, die durch Modifizierung, Substitution, Deletion oder Insertion oder Kombinationen hiervon entstanden sind, die die gleiche oder eine bessere regulatorische Aktivität als der Promotor, der Terminator oder die Signalsequenz besitzen. Hierzu kann auch die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 mit weiteren regulatorischen Upstream-Sequenzen mit Aktivator- und/oder Repressorfunktionen eingeschlossen sein.

Erfindungsgemäß werden weiterhin auch solche Sequenzen inbetracht gezogen, die mit den beanspruchten Nucleotiden oder Sequenzen eine Homologie von mindestens 80%, bevorzugter mindestens 90% und insbesondere 95% aufweisen, solange sie auch eine vergleichbare Aktivität haben.

Bevorzugt wird die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 in Form eines Expressionssystem bzw. einer Expressionskassette für die Expression von Proteinen und Peptiden bereitgestellt. Die erfindungsgemäße Expressionskassette umfaßt in ihrer einfachsten Form eine regulatorische Sequenz, wie sie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, oder einen als Promotor aktiven Teil davon, einen Insertionsklonierungsort, in den das Polynucleotid für das zu exprimierende Protein einkloniert werden kann, und die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2,

GCGTCTCT TTTTATTTTT TTTTTTTTTT TTATTAACGT GAAGAAGATA
AGGGAAGTCT TCAATGCGGT TCTGAATGGT TGATCCATTT CGATACCTCG
GGGACTTCCT TTGAATATAT TCTGAGAGTA TGACAGTTGG TTTTCTTTCT
TTCTTTCTAT TGTTTTTGTT TTTATGGAAA TATAGCTTTG ATGATTTAGG
ATATTTTTTG TAGTGAACCA ATACATGCTT GATTAATATA CGTACGAGGT
GGGCATTCTA CTCTCATTAT TGGTGTTTTA TTGGAGGGAA AAATTAAATC
TAGGAGTATC GTTTAGAGCG CGAACGTAAT ATCCATGTTC TTCTCTTTGA
AGAGGTCCCA CCATTGCTTC CCAGATAGCC AGCATTCTTC CATGATATTT
TGCGCTTGTT TTGCACTGGT GACACCCTTT CGAACCAAAG ATGTCAAGTG
CTGCTGATAC AACAACTGT ATTCATACAA TTCTGGATCC ATCAGCTCAC
AATCCACAGC TGAAGATACA GAAAATGATA CATGTCTCTG CAG

die die Terminatorsequenzregion des Endopolygalacturonasegens aus *Kluyveromyces marxianus* kodiert. Diese Expressionskassette kann vielfältig verwendet werden. Der Insertionsklonierungsort ist eine Schnittstelle, an der die Sequenz aufgeschnitten werden kann und das Polynucleotid für das gewünschte Protein oder Peptid einligiert werden kann. In dieser einfachsten Form wird nach Induktion bei der Expression das Protein intrazellulär produziert und nicht aus der Zelle ausgeschleust. Es kann dann nach Aufschluß der Zelle in an sich bekannter Weise gewonnen werden. Diese Ausführungsform eignet sich sowohl für kleine Peptide und Proteine, die außerhalb der Zelle instabil sind als auch für Proteine, die generell intrazellulär lokalisiert sind.

In einer weiteren Ausführungsform, die insbesondere für aus der Zelle auszuschleusende Proteine geeignet ist, wird ein erfindungsgemäßes Expressions- und Sekretionssystem verwendet. Dieses System umfaßt in operativer Verbindung die Nucleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 als Terminator und, zwischen diesen beiden Sequenzen, die Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3

ATGT TATTCAGCAA CACCTTATTG ATCGCAGCAG CTAGTGCATT
ATTAGCTGAA GCTTCTCCAT TGGAAAAGAG A

zum Ausschleusen des Proteins. In dieser Ausführungsform erfolgt die Züchtung in an sich bekannter Weise, wobei entweder in einem kontinuierlichen Verfahren das Protein ständig ins Medium abgegeben wird und aus der Fermentationsbrühe kontinuierlich gewonnen werden kann oder in einem diskontinuierlichen Verfahren die Zellen gezüchtet, geerntet und dann das Protein aus der Brühe gewonnen werden kann.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette eignet sich sowohl zur Expression von geeigneten sich autonom replizierenden Plasmiden als auch zum Einbau in Hefechromosomen über integrative Vektoren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die in den Figuren 1 bis 3 näher erläuterten Plasmide pEPG1-1, pEPG1-2 und pEPGsec, die die erfindungsgemäßen Expressionssysteme enthalten. Diese Plasmide sind rekombinante bakterielle Plasmide und können in der vorliegenden Form zur Amplifikation der Expressionskassetten verwendet werden. Die Plasmide sind in den Mikroorganismen DSM 12919, DSM 12920, DSM 12921 oder DSM 12922* enthalten und sind mit diesen hinterlegt.

Es ist jedoch bevorzugt, die Plasmide, nachdem das gewünschte Polynucleotid zur Expression eines Peptids oder Proteins einligiert wurde, in *E. coli* zu amplifizieren, dann die Plasmide zu gewinnen, die Expressionskassette mit geeigneten Restriktionsendonucleasen, für die Schnittstellen an den Rändern der Expressionskassette vorgesehen sind, auszuschneiden und die Expressionskassette in einen Hefvektor einzuligieren. Die Vektoren enthalten üblicherweise Selektionsmarker, um erfolgreich transformierte Zellen in an sich bekannter Weise selektieren zu können.

Die Plasmide können gegebenenfalls in *E. coli* vermehrt und dann in *Kluyveromyces marxianus* oder einen anderen *Kluyveromyces*-Stamm oder auch einen anderen Hefestamm eingesetzt werden. Als Transformationssystem können beispielsweise bekannte Plasmide auf Basis des *Kluyveromyces drosophilae*-Plasmides pKD1 verwendet werden. Abkömmlinge dieses Plasmids eignen sich zur Verwendung in *Kluyveromyces marxianus* und führen bei Verwendung des erfindungsgemäßen Expressionssystems zu einer effektiven Expression und Sekretion von Fremdproteinen im entsprechenden Wirt.

In einer anderen Ausführungsform kann aus den erfindungsgemäßen, wie oben vorbereiteten Plasmiden die Expressionskassette einschließlich des zu exprimierenden Polynucleotids herausgeschnitten und als linearer oder zirkularisierter DNA-Strang als Integrationskassette direkt mit Hefezellen in Kontakt gebracht werden, um von diesen aufgenommen zu werden. Aufgrund der Homologie mit dem Endopolyglacturonasegen wird dann in einem Teil der behandelten Zellen die DNA in das entsprechende Chromosom durch Austausch mit dem Endogalacturonase-Gen aufgenommen. Die Selektion erfolgreich transfizierter Hefe-

*Hinterlegt bei DSMZ, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig

zellen erfolgt bei dieser Ausführungsform über die unterschiedliche Verwertung von Pektin.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette wird stabil in Chromosomen eingebaut und führt, wenn die Zellen unter optimalen Bedingungen gezüchtet werden, zu einer guten Ausbeute des gewünschten Proteins. Abhängig von der Art des zu exprimierenden Proteins oder Peptids kann die Kopienzahl des Systems eingestellt werden. Da das Endopolygalacturonasegen in dem Chromosomensatz der Hefe nur einfach vorhanden ist, wird bei einer Transfektion oder Transformation mit dem erfindungsgemäß bereitgestellten Expressionssystem auch nur pro erfolgreich transformierter Zelle eine Kopie des Expressionsvektors vorhanden sein. Falls eine höhere Kopienzahl erwünscht ist, werden in an sich bekannter Weise an die Enden der Expressionskassette Sequenzen eines in größerer Kopienzahl in dem Chromosomensatz vorliegenden Gens, z.B. für rDNA, anligiert, um eine höhere Anzahl an Austauschereignissen zu bewirken.

Im letzteren Fall wird in an sich bekannter Weise zusätzlich noch ein Marker in die Sequenz miteingebaut, damit die erfolgreich transformierten Zellen selektiert werden können. Verfahren und hierzu geeignete Marker sind dem Fachmann bekannt und bedürfen hier keiner näheren Erläuterung.

Das erfindungsgemäße System ist sehr variabel. So kann z.B. nur die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein als Promotor aktiver Teil davon zusammen mit anderen Nucleinsäuresequenzen, die weitere regulatorische Sequenzen bereitstellen, und mit einer heterologen Nucleotidsequenz kombiniert werden. Es kann die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder ein als Promotor aktiver Teil davon mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 kombiniert werden, um ein in *Kluyveromyces marxianus* homologes regulatorisches System bereitzustellen, in das das Polynucleotid für das zu exprimierende Protein eingesetzt wird oder aber es kann ein System aus SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2 und SEQ ID Nr. 3 zusammen mit einem zu exprimierenden Gen, das ein gewünschtes Protein kodiert, kombiniert werden, um ein in die Kultur abzugebendes Produkt zu erzeugen. Da *Kluyveromyces*-Zellen mit vielen verschiedenen C-Quellen wachsen können und bezüglich weiterer Nährstoffe nicht sehr anspruchsvoll sind, darüber hinaus temperaturunempfindlich sind, wird hier ein sehr effektives System bereitgestellt. Die zuverlässige Expression der Fremdproteine wird durch die erfindungsgemäß bereitgestellte regulatorische Sequenz der Erfindung erreicht.

Erfindungsgemäß wird ein System bereitgestellt, das es zuläßt, die aufgrund ihrer außergewöhnlichen physiologischen Leistungen als Wirt vielversprechende Hefeart *Kluyveromyces marxianus* zu nutzen.

Das erfindungsgemäße System eignet sich zur Expression von Peptiden, Polypeptiden, Proteinen und Hybridmolekülen einschließlich glycosylierter Proteine.

So kann in einer weiteren Ausführungsform die Expressionskassette auch die vollständige Sequenz des Endopolygalacturonaseenzyms oder Teile davon enthalten, wobei zwischen das Endopolygalacturonasegen und die Terminatorsequenz eine Sequenz für ein gewünschtes Protein einligiert ist. Bei dieser Ausführungsform wird dann bei der Expression ein Hybrid erhalten, von dem in an sich bekannter Weise die Endopolygalacturonase abgespalten wird.

Im folgenden werden einige Definitionen für Begriffe angegeben, die in der Beschreibung verwendet werden.

Danach ist ein "Expressionsvektor" ein DNA-Molekül, das linear oder ringförmig sein kann und ein Segment enthält, das eine Sequenz für ein interessierendes Protein oder Peptid codiert, das operativ verbunden ist mit regulatorischen Sequenzen. Diese regulatorischen Sequenzen schließen mindestens Promotor- und Terminatorsequenzen ein. Der Expressionsvektor kann zusätzlich selektierbare Marker und weitere regulatorische Elemente enthalten und muß die Übertragung und Vermehrung in Wirtszellen ermöglichen. Die Replikation der Expressionsvektoren kann autonom oder durch Integration in das Wirtsgenom erfolgen.

Der Ausdruck "DNA" oder "Polynucleotid" schließt polymere Formen von Desoxyribonucleotiden und Ribonucleotiden beliebiger Länge und beliebiger Modifikation in einzel- und doppelsträngiger Form ein.

Der Ausdruck "operativ verbunden" bedeutet, daß die einzelnen Segmente so angeordnet sind, daß sie dem vorgesehenen Zweck dienen, d.h. die Transkription initiieren können und die Expression fördern können von dem Replikationsstartpunkt bis zur Terminationssequenz.

Die beanspruchten Sequenzen können weitere kurze Sequenzen aufweisen, die die biologische Aktivität des Moleküls nicht stören. Weiterhin umfassen die beanspruchten Sequenzen auch allelische Varianten der Sequenz, d.h. alternative Formen des Gens, die durch Mutation entstanden sind.

Der Begriff "Protein oder Peptid" bezieht sich auf eine molekulare Kette von Aminosäuren mit biologischer Aktivität. Die Proteine und/oder Polypeptide können in vivo oder in vitro modifiziert werden, z.B. durch Glycosylierung und Phosphorylierung. Unter Hybridmolekülen werden Moleküle verstanden, die sowohl homologe Teile als auch heterologe Teile umfassen, z.B. solche Proteine, die eine Kombination aus Endopolygalacturonase oder Teilen davon mit einem Fremdprotein umfassen, oder z.B. Nucleotidsequenzen, bei denen DNA aus *Kluyveromyces marxianus* mit DNA aus anderen Mikroorganismen kombiniert ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette ist unter anderem für Hefen der Stämme *Kluyveromyces* und *Saccharomyces* geeignet und wird bevorzugt in Hefestämmen der Art *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* verwendet. Ein besonders bevorzugter Stamm mit besonders günstigen Expressionseigenschaften ist *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* BKM Y-719, der bei Siekstele et al. 1999 (Yeast 15, 311 bis 322 (1999)) beschrieben wurde.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Hefezelle mit einem sich autonom replizierenden Plasmid, das eine erfindungsgemäße Expressionskassette und ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, umfaßt, transfiziert oder transformiert, die Hefezelle unter Bedingungen, die zur Expression des Fremdproteins geeignet sind, züchtet und das Protein gewinnt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine erfindungsgemäße Expressionskassette in eine Hefezelle bringt, wo die Expressionskassette in ein Chromosom eingebaut wird, die Zelle züchtet und anschließend das Protein gewinnt. Besonders bevorzugt wird die erfindungsgemäße Expressionskassette als Modul eingesetzt das die Konstruktion von episomalen oder integrativen Expressionsvektoren, die die regulatorischen Sequenzen gemäß SEQ ID Nr. 1, 2 und/oder 3 enthalten, ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Expressionssystem ist geeignet zur Expression verschiedener heterologer Proteine. Besonders bevorzugt wird das System verwendet zur Expression von HBVS-Antigen (Hepatitis-B-Virus, Surface-Antigen) und Virusprotein 1 aus Polyoma-Virus. Diese Proteine sind antigene Proteine und können besonders vorteilhaft als Impfstoffe eingesetzt werden.

Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und die folgenden Beispiele erläutert.

Die Figuren 1 bis 4 zeigen Plasmide mit den erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Figur 6 zeigt die in Beispiel 2 verwendeten Primer.

Fig. 1 zeigt das Plasmid pEPG1-1. Dieses Plasmid enthält eine Expressionskassette mit dem erfindungsgemäßen Promotor gemäß SEQ ID Nr. 1 (als EPG1prom bezeichnet), einem Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, und der erfindungsgemäßen Terminatorsequenz gemäß SEQ ID Nr.2 (als EPG1term bezeichnet). Diese Expressionskassette wurde in den Multicloning Site des Plasmids pUC19 einligiert. Der Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, ersetzt den offenen Leserahmen des Endopolygalacturonasegens, das entfernt wurde.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pEPG1-2. Dieses Plasmid enthält die erfindungsgemäße Expressionskassette, die eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 mit den Nucleotiden 572 bis 1134 (mit EPG1prom bezeichnet), die als Promotor aktiv ist, einen Insertionsklonierungsort, der mit BspT1 geschnitten werden kann, und eine Terminatorsequenz, die die Nucleotide 28 bis 541 von SEQ ID Nr. 2 (als EPG1term bezeichnet) umfaßt. Der Insertionsklonierungsort ersetzt den offenen Leserahmen des Endopolygalacturonasegens einschließlich der Sequenzen -1 bis -12 und 1087 bis 1115 dieses Gens.

Fig. 3 zeigt das Plasmid pEPGsec. Dieses Plasmid enthält ein Expressions- und Sekretionssystem der Erfindung. Das Plasmid enthält eine Expressionskassette mit einem Promotor gemäß SEQ ID Nr. 1 (als EPG1prom bezeichnet), einem Terminator gemäß SEQ ID Nr. 2 (als EPG1term bezeichnet), einer Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 (als EOG1lyd bezeichnet) und zwei Schnittstellen, um die gewünschte Nucleinsäuresequenz für das zu exprimierende Protein einzusetzen. Diese Expressionskassette wurde in den Multicloning Site des Plasmids pUC19 einligiert. Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens wurde von der Position 75 bis 1084 entfernt und durch einen Linker mit den Klonierungsorten Eco 147I und BpU 1102I ersetzt.

Figur 4 zeigt das Plasmid pUC19PG. Ein 2,198 kb PstI-DNA-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12-Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyces marxianus* wurde in den PstI-Restriktionsort des Multicloning Site des Plasmids pUC19 ligiert.

Fig. 5 zeigt das Plasmid pUC19-PG1a. Ein 2,735 kb großes StuI-PvuII-DNA-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12-Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyces marxianus* wurde im Plasmid pUC19 gegen das 321 kb große Fragment ausgetauscht. Der fett gedruckte Teil des Plasmids entspricht dem DNA-Fragment aus *K.marxianus*, der dünn gedruckte Teil stellt den Anteil des Plasmids pUC19 dar.

Figur 6 zeigt die für die Klonierung von Promotor und Signalsequenz verwendeten Primer gemäß SEQ ID Nr. 4 und 5.

Figur 7 zeigt die Signalsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 und das zugehörige Signalpeptid (mit Sequenz für Pre- und Prepropeptid) der Endopolygalacturonase aus *Kluyveromyces marxianus*.

Bei der DSMZ wurden 4 Mikroorganismen gemäß den Anforderungen des Budapester Vertrags hinterlegt, die die Plasmide gemäß Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 und Fig. 4 enthalten. Es sind dies *E. coli* pEPG1-1, hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 12919, *E. coli* pUC19PG, hinterlegt DSM 12920, *E. coli* pEPGseq, hinterlegt mit der Nummer DSM 12921 und *E. coli* pEPG1-2 mit der Hinterlegungsnummer DSM 12922.

Beispiel 1

Herstellung des Grundplasmids zur Erzeugung der Expressionskassetten

Ein PstI-DNA-Fragment mit 2,198 kb, das das komplette Gen der Endopolygalacturonase (EPG1) mit den regulatorischen Sequenzen enthält, wurde in die PstI-Schnittstelle des Multicloning Site des bakteriellen Plasmides pUC19 inseriert. In Fig. 4 ist dieses Konstrukt dargestellt. Unter Verwendung von jeweils zwei entgegengesetzten Primern, die am 5'-Ende einen Erkennungsort für das Restriktionsenzym BstT1 trugen und am 3'-Ende Homologie mit der Promotor-, Signal- und/oder der Terminatorsequenz des EPG1-Gens aufwiesen, konnte mittels um das Plasmid umlaufender PCR ein DNA-Fragment erzeugt werden, das nach Restriktion mit BspT1 mit einer Ligase zirkularisiert werden konnte. Bei Verwendung verschiedener Erkennungsorte für Restriktionsenzyme an den 5'-Enden der PCR-Primer mußten zur Zirkularisationsligation entsprechende Linker einligiert werden oder die Primer enthielten zusätzliche Sequenzen am 5'-Ende,

die einen gemeinsamen Erkennungsort für das Restriktionsenzym darstellten. Je nach Auswahl der Primer können definierte Bereiche der EPG1-Region durch Restriktion und anschließende Zirkularisierung aus dem Plasmid deletiert werden. Die rekombinanten Deletionsplasmide wurden in *Escherichia coli* amplifiziert und dienten als Grundlage für die Expressionskassetten. Über die verschiedenen Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme im Multicloning Site des Plasmids pUC19 kann dann die Kasette ausgeschnitten und in einen episomalen oder integrativen Vektor für einen entsprechenden Hefestamm kloniert werden. Die Kasette kann auch direkt als PstI-DNA-Fragment zur Integration in einen Hefe-Wirtsstamm verwendet werden.

Beispiel 2

Herstellung eines rekombinanten Plasmides mit Sequenz ID Nr.1, Nr.2 und Nr.3

Im bakteriellen Grundplasmid pUC19 wurde das 321bp lange PvuII Fragment gegen ein StuI/PvuII DNA Fragment von 2,735 kb, das das komplette Endopolygalacturonasegen, einschließlich der regulatorischen Sequenzen -1142 bis -1 und +1087 bis 1595 aus *Kluyveromyces marxianus* enthält, ausgetauscht. Das StuI/PvuII Fragment wurde dazu aus einem rekombinanten Lambda GEM™-12 Bakteriophagen einer genomischen Genbank von *Kluyveromyce marxianus* isoliert. Eine Karte des erzeugten Plasmides: „pUC19-PG1a“ ist in **Figur Nr. 5** dargestellt. Dieses Plasmid kann in analoger Weise zum Beispiel 1 für die Erzeugung von Expressionskassetten verwendet werden. Da durch die Klonierungsstrategie bei diesem Plasmid der Multicloning Site komplett deletiert wurde und der StuI Ort im Upstream-Promotorbereich des EPG1 Gens durch Ligation mit dem PvuII Ort im pUC19 zerstört wurde, können zum Ausschneiden der Kasette der downstream zum EPG1 Gen verbliebene PvuII Ort und z.B. der unikale NarI Ort im lacZ-Teil des pUC19 verwendet werden.

Mit Hilfe der PCR und unter Verwendung der in **Figur Nr.6** dargestellten Primer (SEQ ID Nr. 4 und 5) kann ein DNA Fragment generiert werden, das die Promotorregion und die Signalsequenz nach SEQ ID Nr.1 und Nr.3 enthält. Der degenerierte rPEPG Primer hat im 5' Bereich ein Mismatch zur EPG1 Sequenz im Bereich 1220 und generiert dadurch aus der EPG1 Sequenz: CAGTTG einen PvuII Ort (CAGCTG). Diese Punktmutation (Transition) führt zu einem Aminosäureaustausch, indem ein Cystein-Codon von TGT in ein Arginin-Codon nach CGT verändert wird. Dieser Austausch befindet sich aber im Anteil der Endopolygalacturonase, der durch den Leserahmen eines Fremdgenes ersetzt wird und hat somit keinen Einfluß auf die Expression. Das StuI/PvuII PCR-

Fragment kann als blunt End in den Multicloning Site eines entsprechenden Vectors inseriert werden. Über den PvuII Ort können „in Frame“ offene Leserahmen von Genen angefügt werden, deren Expressionsprodukt aus der Zelle ausgeschleust werden soll.

Beispiel 3

Herstellung von Polyoma JCV MAJOR COAT PROTEIN VP1:

Für die Expression des JCV VP1-Gens wurde die Expressionskassette pEPG1-1 verwendet. Das VP1Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer:

JC5 (SEQ ID NR.6): 5'TCAAGCTTAAGAATGGCCCCAACAAAAAGA 3'
und

JC3 (SEQ ID NR. 7): 5'GTAAGCTTAAGATTACAGCATTTTTGTCTG 3'

amplifiziert und als *Bsp*TI Fragment in die Expressionskassette von pEPG1-1 inkloniert. Die Kassette wurde mit *Pst*I aufgespalten und die DNA-Fragmente an ihren Enden mittels T4-Polymerase zu stumpfen Enden umgebaut.

Die „blunt ended“ Kassette wurden in den *Sma*I Ort des *Kluyveromyces* Vektors pKDSU inseriert. Die Transkriptionsrichtung des *VP1*-Gens ist dabei entgegengesetzt zur Transkription des *S.cerevisiae URA3* Gens.

Der Rezipient (BKM Y-719 *ura*) wurde mit dem Expressionskonstrukt transformiert und Uracil prototrophe Klone wurden isoliert. Das Vorhandensein der Expressionskassette mit dem Leserahmen des VP1 Gens wurde mittels PCR und den oben gezeigten Primern überprüft. Ausgewählte Klone wurden in verschiedenen flüssigen Medien kultiviert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Lysis Puffer (10mM TRIS-HCl, pH7.5, 0,01%TRITON X100, 1mM CaCl₂, 100mM NaCl mit 1mM PMSF) mit Mikrogaskugeln bei 0°C aufgebrochen. Die Glaskugeln wurden anschließend durch Zentrifugation (2000 rpm) für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde auf ein 20%iges Saccharosekissen (in Lysispuffer) geschichtet und 2 Stunden bei 4°C und 35000rpm (Beckman L8-75 rotor SW41) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer suspendiert und auf einen CsCl-Gradienten (1,24 bis 1,38 g/ml CsCl) geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 35000rpm für 16 Stunden im SW41 Rotor. „Virus like Particles“ des JCV VP1 mit einer durchschnittlichen

Partikelgröße von 45nm wurden aus den Fraktionen zwischen 1,3 und 1,34g/ml CsCl gewonnen.

Beispiel 4

Herstellung von Hepatitis BVirus Surface-Antigen (HBV s-Antigen):

Für die Expression des HBV s-Antigen Gens des Subtyps (AYW) wurden die Expressionskassetten pEPG1-1 und pEPG1-2 verwendet. Das HBS Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer:

HB5 (SEQ ID Nr. 8) : 5'AGCCTTAAGATAATGGAGAACATCACATCAGG 3'

und

HB3 SEQ ID Nr. 9): 5'TGACTTAAGTAAATGTATACCCAAAG 3'

amplifiziert und als *Bsp*TI Fragment in die Expressionskassetten inkloniert. Die Kassetten wurden mit *Bam*HI aufgespalten und die DNA-Fragmente an ihren Enden mittels Klenow-Polymerase zu stumpfen Enden aufgefüllt.

Die „blunt ended“ Expressionskassetten wurden in den *Sma*I Ort des Kluyveromyces Vektors pKDSU inseriert. Die Transkriptionsrichtung des HBS-Gens ist dabei entgegengesetzt zur Transkription des *S.cerevisiae* URA3 Gens. Der Rezipient (BKM Y-719 ura) wurde mit den Expressionskonstrukten transformiert und Uracil prototrophe Klone wurden auf Selektivmedium isoliert. Von ausgewählten Klonen wurde Gesamt-DNA isoliert und diese zum Nachweis der Expressionskassette mittels PCR eingesetzt. Positive Klone wurden in flüssigen, synthetischen und in Komplettmedien kultiviert und zur Erzeugung von S-Proteinpartikeln eingesetzt. Entsprechende Hefekulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und in PBS Puffer mit 1mM PMSF mit Mikroglasskugeln bei 0°C aufgebrochen. Die Glaskugeln wurden anschließend durch Zentrifugation (2000 rpm) für 10 Minuten sedimentiert. Aus dem Überstand wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm (J20 Rotor Beckman J2-21) die Hefemembranfraktion sedimentiert. HBV s-Antigen sedimentierte mit dieser Fraktion und wurde durch 0,5% Tween-20 in PBS aus der Fraktion eluiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000rpm wurde der Überstand gewonnen und durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Hochgereinigte HBV s-Antigenpartikel wurden aus der 1.2g/ml CsCl Fraktion isoliert.

Die Ausbeute an isolierbarem Antigen war bei Kultivierung in synthetischen Medien mit der pEPG1-2 Kassette zweifach höher als mit der pEPG1-1 Kassette.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz umfassend die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1.
2. Hefeexpressionssystem enthaltend in operativer Verbindung die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, eine Insertionsklonierungsstelle und die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 2 oder einen als Terminator aktiven Teil davon.
3. Hefeexpressions- und Sekretionssystem umfassend in operativer Verbindung eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 3, eine Insertionsklonierungsstelle und die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 2 oder einen als Terminator aktiven Teil davon.
4. Plasmid pEPG1-1 enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12919.
5. Plasmid pEPG1-2 enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12922.
6. Plasmid pUC19PG hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. 12920.
7. Plasmid pEPGsec enthaltend eine Hefeexpressionskassette gemäß Anspruch 3 hinterlegt mit der Hinterlegungsnr. DSM 12921.
8. Expressionsvektor enthaltend in operativer Verbindung einen Promotor mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder einen als Promotor aktiven Teil davon, ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, und eine Terminatorsequenz.
9. Expressionsvektor nach Anspruch 8, der zusätzlich noch eine Signalsequenz zwischen Promotor und Polynucleotid enthält.
10. Expressionsvektor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalsequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 ist.

11. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynucleotid ein antigenes Protein oder Peptid kodiert.
12. Expressionsvektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynucleotid ein Hepatitis-B-Surface-Antigen, VP1 aus Polyoma-Virus oder Protein A aus Staphylococcus kodiert.
13. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein integrativer oder episomaler Vektor ist.
14. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein in Hefe replizierbares Plasmid ist.
15. Wirtszelle transformiert mit einem Expressionsvektor oder einem Plasmid nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
16. Wirtszelle nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zelle der Art *Kluyveromyces marxianus* ist.
17. *E. coli* pEPG1-1 hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12919.
18. *E. coli* pUC19PG hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12920.
19. *E. coli* pEPGSeq hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12921.
20. *E. coli* pEPG1-2 hinterlegt mit der Hinterlegungsnummer DSM 12922.
21. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Hefezelle mit einem Plasmid, das die Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2 oder 3 und ein Polynucleotid, das ein Fremdprotein kodiert, umfaßt, transfiziert oder transformiert, die Hefezelle unter Bedingungen, die zur Expression des Fremdproteins geeignet sind, züchtet und das Protein gewinnt.

22. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette gemäß Anspruch 2 oder Anspruch 3 in eine Hefezelle bringt, wo die Expressionskassette in ein Chromosom eingebaut wird, die Zelle züchtet und anschließend das Protein gewinnt.
23. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 als Promotor zur Expression von Fremdprotein in Hefezellen.

Expressionskassette mit BspTI Insertions-Klonierungsort ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19
Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens wurde entfernt.

pEPG1-1

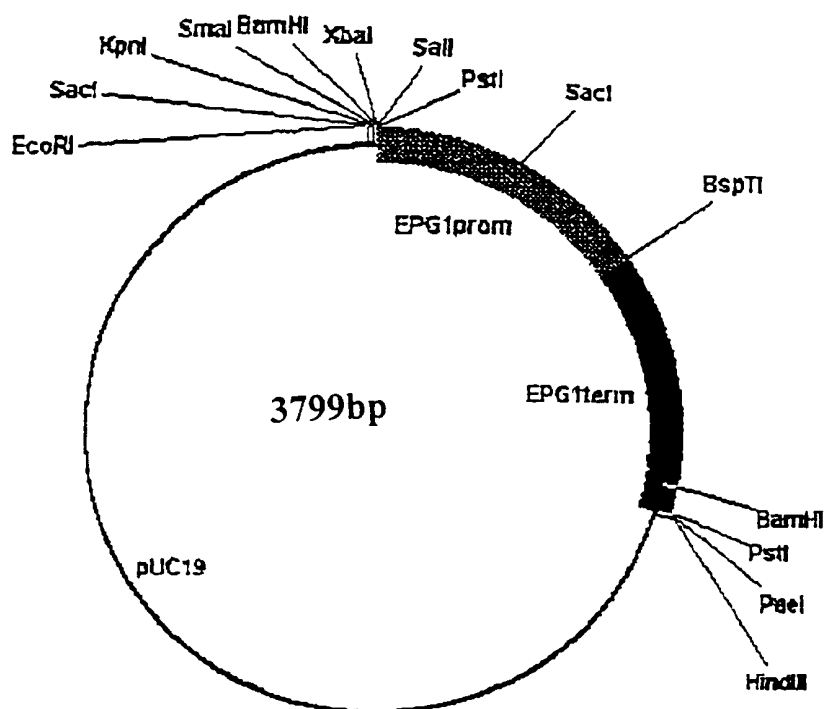
gaacaaaaaaaaaaaaaATG...(ORF EPG)...TAAgcgtctctttt

↓
1/ 1083

gaacaaaaaaaaaaaaaACTTAAGcgtctctttt

↑
BspTI

Fig. 1



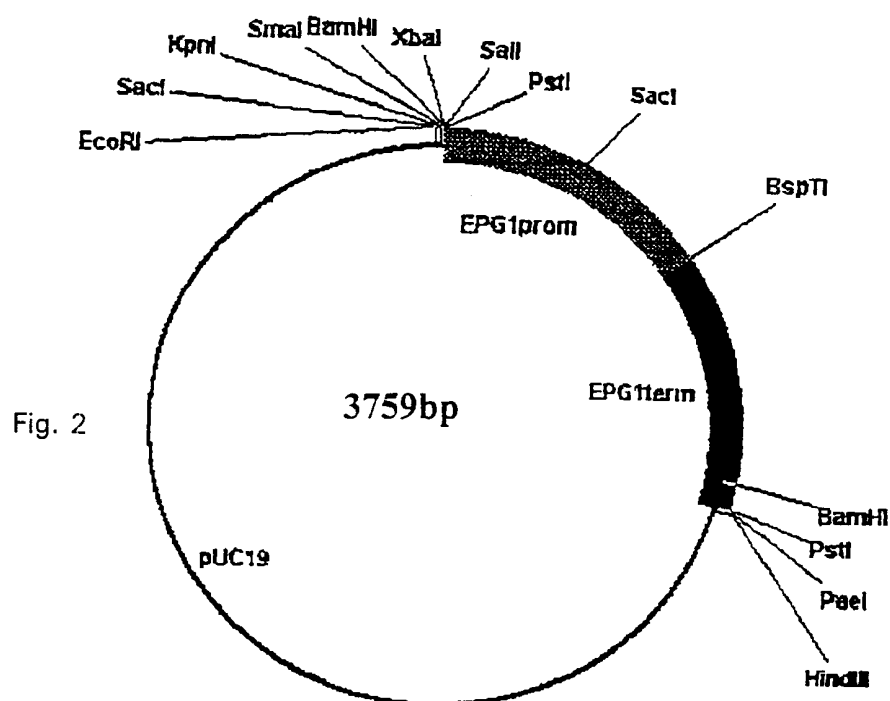
Expressionskassette mit BspTI Insertions-Klonierungsort ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19. Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens einschließlich der Sequenzen von -1 bis -12 und 1087 bis 1115 wurden entfernt und durch einen BspTI Klonierungsort ersetzt.

pEPG1-2

-32 cacagattaa gtcagaaaC(aaaaaaaa aa ATG...ORF EPG...TAA gc gtctctttt attttttt tttttt)Tat taacgtgaag aag

.....cacagattaa gtcagaaaCTTAAG Tat taacgtgaag aag.....

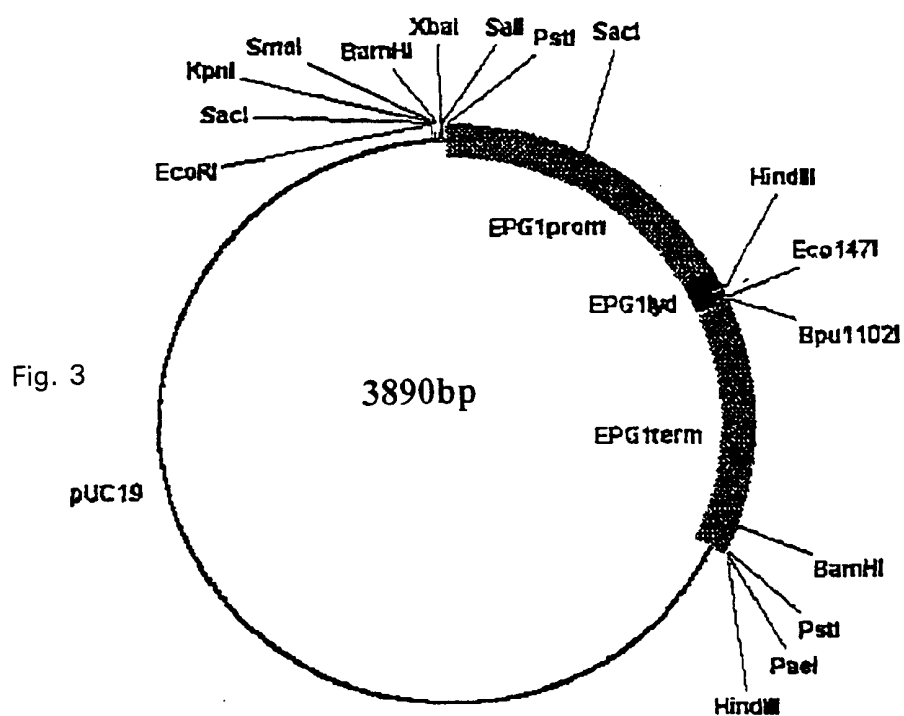
↑
BspTI



Expressionskassette mit Sekretionssignalsequenz ligiert in den Multicloning Site des Plasmides pUC19. Der offene Leserahmen des Endopolygalacturonasegens wurde von der Position 75 bis 1084 entfernt und durch einen Linker mit den Klonierungsorten Eco147I und BpU1102I ersetzt.

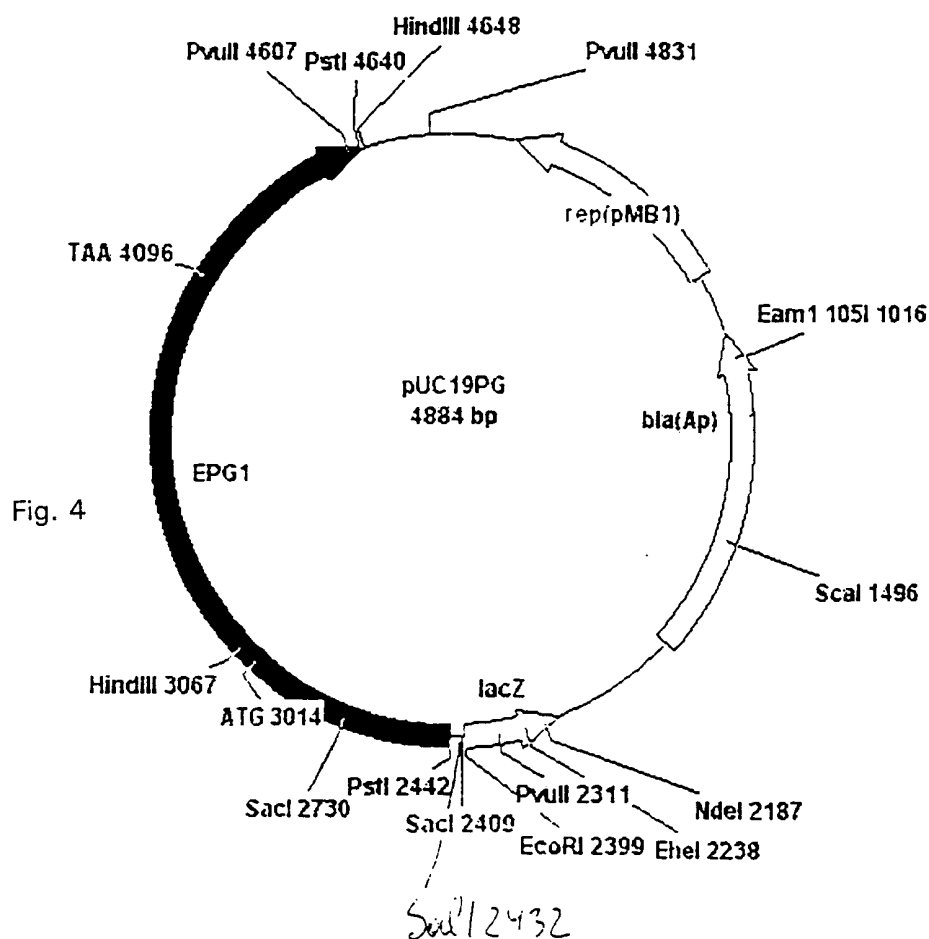
pEPGsec1

K R Stop
AAG AGA.....(ORF EPG).....TAA GCG TCT.....
 ↓
 K R Stop
AAG AGg cct agt gag cct tct gcT AAG CG TCT.....
 ↑ ↑
 Eco147I Bpu1102I



Plasmid pUC19PG

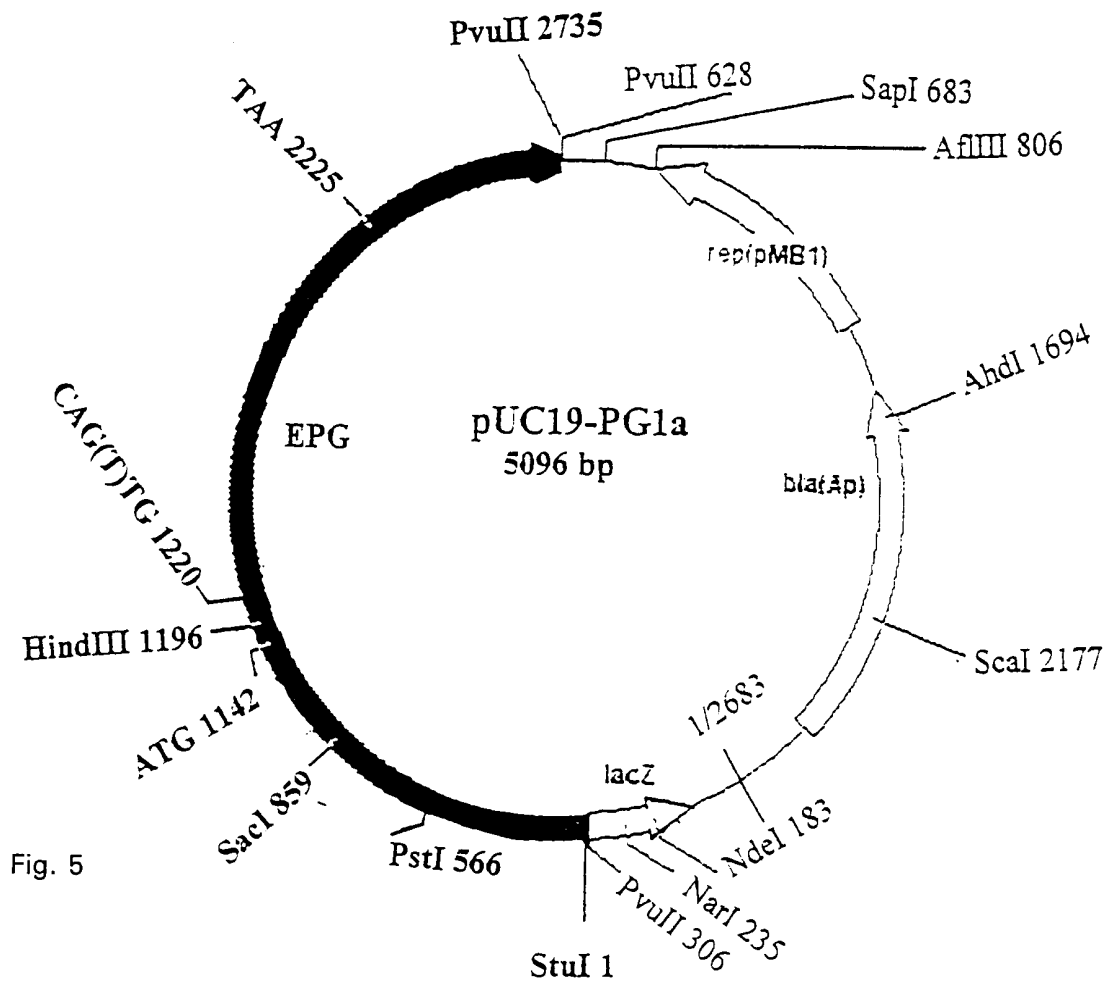
Ein 2,198kb großes PstI DNS-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12 der *Kluyveromyces marxianus* Genbank wurde in den PstI Restriktionsort des Multicloning Site des Plasmides pUC19 ligiert.



Plasmid pUC19-PG1a:

Ein 2,735 kb großes *Stu*I-PvuII DNS-Restriktionsfragment aus einem rekombinanten LambdaGEM™-12 der *Kluyveromyces marxianus* Genbank wurde im Plasmid pUC19 gegen das 321bp große PvuII Fragment ausgetauscht.

Der fett gedruckte Teil entspricht dem DNS-Fragment aus *K. marxianus*. Der dünn gedruckte Teil stellt den Anteil des Plasmides pUC19 dar.



PCR-Primer für die blunt End Klonierung von Promotor und
Signalsequenz des *EPG1* Gens aus *Kluyveromyces marxianus*

rPEPG: 5'TTAACCAGCTGTCTCTCTTTTCCAATGGAGAAGC 3'
PvuII

vPEPG: 5'TTAAGAGGCCTGTCCGATTATAAACTTGCGGC 3'
StuI

Fig. 6

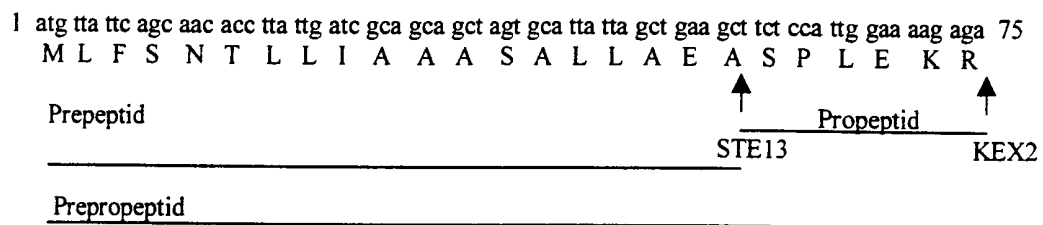
Abb.2: Signalsequenz und Signalpeptid der Endopolygalacturonase aus *Kluyveromyces marxianus*

Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> TAD Pharmazeutisches Werk

<120> Regulatorische Sequenzen und Expressionskassetten für
Hefen

<130> TM5071

<140> TM5071

<141> 1999-09-10

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1146

<212> DNA

<213> Kluyveromyces marxianus

<400> 1

```

gaggcctgtc cgattattaa acttgcgga cccgagtttg tgaccttoga cgacatgttt 60
tatttccaca cagtagctac actttctatg tagtaagtag gtagtatgga tggtagctag 120
tagaaactaa acgaaacgaa ataaatgtga aatgttagac gtaaagggga ggggaaggga 180
agggggcggc ggagagacat gccaaagccat gccatttcat ggcatggcat gtcaagggat 240
actgcatgca tgcattgcata ctttaccat agcaaagtaa attgctttct tccccattt 300
gaaactattc cacctcaatc catcttttct ataattgggtc tcaccgatct catgtgttct 360
aataatgctg caggcaacaa caaatcttaa aggcaacttg gaatgtaatt tgggtaata 420
tagatatcaa acagcaatgg tgggctccaa ccgcatggat atgctcacct tattatccgg 480
aattgttggt ccgcaggaaa aaaaaaaaaa ctcgaaccag atattaatta tcctatcatt 540
actgctgaca aaaccggga acgggttaacc tgcagcagcc gttttgctta cagttctcat 600
gcacaatcag ccagattttg caatagtatt aacttagaat taaggcaaca tctttggata 660
tgcattgtaga gtaagtcgtt cgaaaccatt attattatta ttattattat tattattatt 720
attattatta ttattagtat tattgaaatt gttattgttc ttagtttcac tactattatt 780
attcatattc atgttattga catcgccgaa cgaccagcct ccataccgat tagacaggat 840
ctcaaactg ggctccagag ctacacatt atgctaaata actatctact gtaacagcta 900
cagaaaaaaaa actataaaag agcgagggat aaaccactct cttgtgaatc aggatcagta 960
ggtaactcat aaaccttctt cttttctctc aaaatatcaa ataacagtag tatcaacaac 1020
gatattgaat aatactaact actacaacag taggaacagt aacgacaacg acaacgatag 1080
taacgacaat aacgacacca acaacaaca ggaacacaga ttaagctcag aaacaaaaaa 1140
aaaaaa                                     1146

```

<210> 2

<211> 541

<212> DNA

<213> Kluyveromyces marxianus

<400> 2

gcgtctcttt ttattttttt tttttttttt attaacgtga agaagataag ggaagtcttc 60
aatgcgggttc tgaatgggtg atccatttcg atacctcggg gacttccttt gaatatattc 120
tgagagtatg acagttgggtt ttctttcttt ctttctattg tttttgtttt tatggaaata 180
tagctttgat gatttaggat attttttgta gtgaaccaat acatgcttga ttaatatagc 240
tacgaggtgg gcattctact ctcatattg gtgttttatt ggagggaata attaaatcta 300
ggagtatcgt ttagagcgcg aacgtaatat ccatgttctt ctctttgaag aggtcccacc 360
attgcttccc agatagccag cattcttcca tgatattttg cgcttggttt gactgggtga 420
caccctttcg aaccaaagat gtcaagtgcg gctgatacaa caacctgtat tcatacaatt 480
ctggatccat cagctcacia tccacagctg aagatacaga aaatgataca tgtctctgca 540
g 541

<210> 3

<211> 75

<212> DNA

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 3

atgttattca gcaacacctt attgatcgca gcagctagtg cattattagc tgaagcttct 60
ccattggaaa agaga 75

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 4

ttaacagctg tctctctttt ccaatggaga agc 33

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 5

ttaagaggcc tgtccgatta taaacttgcg gc 32

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> *Polyomavirus sp.*

<400> 6

tcaagcttaa gaatggcccc aacaaaaaga 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Polyomavirus sp.

<400> 7

gtaagcttaa gattacagca tttttgtctg 30

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 8

agccttaaga taatggagaa catcacatca gg 32

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 9

tgacttaagt taaatgtata cccaaag 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/EP 00/08662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/56 C12N9/24 C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIEKSTELE RIMANTAS ET AL: "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1)." YEAST, vol. 15, no. 4, 15 March 1999 (1999-03-15), pages 311-322, XP000981653 ISSN: 0749-503X cited in the application ----	
A	BUSSINK H J D ET AL: "CHARACTERIZATION OF POLYGALACTURONASE-OVERPRODUCING ASPERGILLUS-NIGER TRANSFORMANTS" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 37, no. 3, 1992, pages 324-329, XP002093936 ISSN: 0175-7598 ----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 February 2001

Date of mailing of the international search report

23/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08662

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIRD CR ET AL: "The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants" PLANT MOLECULAR BIOLOGY., vol. 11, 1988, pages 651-662, XP002159864 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412 ---	
A	NICHOLASS FJ ET AL: "High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions" PLANT MOLECULAR BIOLOGY., vol. 28, 1995, pages 423-435, XP002159865 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412 -----	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/56 C12N9/24 C12N15/81

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, STRAND, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SIKSTELE RIMANTAS ET AL: "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1)." YEAST, Bd. 15, Nr. 4, 15. März 1999 (1999-03-15), Seiten 311-322, XP000981653 ISSN: 0749-503X in der Anmeldung erwähnt ---	
A	BUSSINK H J D ET AL: "CHARACTERIZATION OF POLYGALACTURONASE-OVERPRODUCING ASPERGILLUS-NIGER TRANSFORMANTS" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1992, Seiten 324-329, XP002093936 ISSN: 0175-7598 --- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIRD CR ET AL: "The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants" PLANT MOLECULAR BIOLOGY., Bd. 11, 1988, Seiten 651-662, XP002159864 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412 ----	
A	NICHOLASS FJ ET AL: "High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions" PLANT MOLECULAR BIOLOGY., Bd. 28, 1995, Seiten 423-435, XP002159865 NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT., NL ISSN: 0167-4412 -----	