



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 053 T2** 2006.02.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 706 563 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 053.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/04694**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 916 597.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/001434**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1994**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.01.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.1996**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

86427 29.06.1993 US

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware),
Emeryville, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**GOSPODAROWICZ, J., Denis, Lafayette, US;
MASIARZ, Frank, San Francisco, US**

(54) Bezeichnung: **VERKÜRZTER KERATINOCYTENWACHSTUMSFAKTOR(KGF)MIT ERHÖHTER BIOLOGISCHER
AKTIVITÄT**

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 Erfindung bezieht sich allgemein auf den Keratinocytenwachstumsfaktor („KGF“). Spezifischer ausgedrückt, die vorliegende Erfindung betrifft ein verkürztes KGF-Fragment, das im Vergleich zu einem rekombinanten Vollängen-KGF, der in einem Insektenzellsystem exprimiert wird, erhöhte biologische Aktivität und verringerte Cytotoxizität hat. Diesem KGF-Fragment, das hier als KGF_{des1-23} bezeichnet ist, fehlen die ersten 23 Aminosäurereste des N-Terminus des reifen Vollängen-KGF, wobei dieser N-Terminus eine Glycosilierungsstelle an den Aminosäureresten 14 bis 16 ab dem N-Terminus umfasst, wie es von Finch, P.W. et al., Science 245:752–755 (1989) beschrieben wurde und von dem früher angenommen wurde, dass er dem KGF seine Epithelzell-spezifität verleiht.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] KGF gehört zu einer Familie von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren („FGFs“), deren Prototyp durch den basischen FGF („bFGF“) repräsentiert wird. KGF ist daher auch als FGF-6 bekannt. Wie andere FGFs ist KGF ein Heparin-bindendes Protein, hat aber anders als andere FGFs eine einzelne Zielzellenspezifität. FGFs sind im Allgemeinen insbesondere fähig, die Proliferation und Differenzierung einer Vielzahl von Zelltypen zu stimulieren, welcher aus dem primären oder sekundären Mesoderm wie auch aus dem Neuroektoderm stammen. KGF ist anderen FGFs bezüglich seiner Fähigkeit, die Epithelzellproliferation zu stimulieren, ähnlich, unterscheidet sich aber von anderen FGFs in seiner Unfähigkeit, die Endothelzellen oder Fibroblasten-Proliferation zu stimulieren, wie es bei Finch, P.W. et al. (loc. cit.) diskutiert wurde.

[0003] Von FGFs, einschließlich saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor („aFGF“) und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor („bFGF“) ist bekannt, dass sie Heparin-bindende Eigenschaften besitzen und die Fähigkeit haben, die Differenzierung und Proliferation von ventralem wie auch dorsalem Mesoderm in frühen Blastulae zu induzieren, wie es bei Gospodarowicz et al., Cell. Biol. Rev. 25:307–314 (1991) und Basilico et al., Adv. Cancer Res. 59:115–165 (1992) diskutiert wurde. Die Reaktion von Zellen auf FGF wird durch Bindung desselben an Zelloberflächenrezeptoren („FGFRs“) vermittelt, von denen es drei untereinander verwandte Typen gibt, wie es von Hou et al., Science 251:665–668 (1991) diskutiert wurde. Hochaffinitäts-FGFRs sind Tyrosinkinasen und umfassen den flg-Rezeptor („FGFR-1“), den bek-Rezeptor („FGFR-2“) und den K-Sam-Rezeptor („FGFR-3“), die in Lee et al., Science 245:57–60 (1989); Dionne et al., EMBO 9:2685–2692 (1990); Miki et al., Science

251:72–75 (1991); Miki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:246–250 (1992) und Dell et al., J. Biol. Chem. 267:21225–21229 (1992) beschrieben sind.

[0004] Sowohl FGFR-1 als auch FGFR-2 werden in großem Umfang in mesodermalen und neuroendodermalen Geweben exprimiert und beide sind fähig, aFGF und bFGF mit ähnlichen Affinitäten zubinden. FGFR-3 ist ein KGF-Rezeptor, der für Epithelialzellen spezifisch ist. Er ist ein alternatives Transkript von FGFR-2. Im Gegensatz zu FGFR-2, der sowohl für aFGF als auch für bFGF hohe Affinität und keine Affinität für KGF zeigt, bindet FGFR-3 KGF und aFGF mit einer etwa 20- bis 1000-fach höheren Affinität als bFGF, was bei Miki et al. (loc. cit.) und Dell et al. (loc. cit.) diskutiert wird.

[0005] Das eng beschränkte Aktivitätsprofil von KGF auf Epithelzellen ist zum Beispiel in vielen Typen der Wundheilungsanwendungen wie auch in der Behandlung von hyperproliferativen Krankheiten der Epidermis, zum Beispiel Psoriasis und Basalzellenkarzinom, wünschenswert. Derzeit gibt es für diese Anwendungen außer für KGF keinen hochgradig geeigneten mitogenen Faktor. Es wäre daher für therapeutische Anwendungen wünschenswert, dass KGF modifiziert werden könnte, um seine Wirksamkeit zu erhöhen und seine Cytotoxizität zu verringern.

[0006] In jüngerer Zeit stellten Ron et al., J. Biol. Chem. 268:2984–2988 (Februar 1993) fest, dass, wenn KGF₁₆₃ in einem prokaryotischen T7-Expressionssystem exprimiert wurde, ein rekombinantes KGF („rKGF“) Polypeptid erhalten werden konnte, das mitogene Aktivität besitzt. Als das rKGF-Molekül durch Deletion von 3, 8, 27, 38 bzw. 48 Aminosäurereste vom N-Terminus des reifen KGF₁₆₃-Polypeptids verkürzt wurde, war die biologische Aktivität der resultierenden Moleküle verändert. Mit Deletion von 3 bzw. 8 Aminosäureresten schien die mitogene Aktivität der resultierenden Moleküle im Vergleich zum Vollängen-rKGF („rKGF₁₆₃“) nicht verändert zu sein. Allerdings resultierte eine Deletion von 27 Aminosäureresten zu einer 10–20-fach verringerten mitogenen Aktivität. Eine Deletion von 38 bzw. 48 Aminosäureresten führte zu einem vollständigen Verlust der mitogenen Aktivität und des Heparin-Bindungsvermögens. So konnten Ron et al. keine verkürzten KGF-Fragmente produzieren, die im Vergleich zu dem rKGF₁₆₃-Molekül erhöhte mitogene Aktivität besaßen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Wie oben angegeben wurde, stellt die vorliegende Erfindung nun ein solches KGF-Fragment bereit, insbesondere ein KGF-Fragment, dem eine Sequenz fehlt, welche die ersten 23 N-Terminus-Aminosäurereste, C-N-D-M-T-P-E-Q-M-A-T-N-V-N-C-S-S-P-E-R-H-T-R

-, von rKGF₁₆₃ umfasst.

[0008] Dieses KGF-Fragment hat im Vergleich zu rKGF₁₆₃ eine verminderte Cytotoxizität. Auch bereitgestellt wird ein Konjugat, das das KGF-Fragment der Erfindung und ein Toxin-Molekül umfasst. Das Toxin-Molekül kann mindestens eins aus Ricin A, Diphtherie-Toxin und Saporin sein.

[0009] Nach einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine therapeutische Zusammensetzung bereit, die das KGF-Fragment, wie es oben beschrieben wurde, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, zum Beispiel einen, der für die topische Anwendung auf die menschliche Haut geeignet ist, enthält.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein DNA-Molekül bereit, das zur Expression unter Bereitstellung des oben beschriebenen KGF-Fragments fähig ist.

[0011] Ein derartiges DNA-Molekül kann in einem Expressionsvektor zusammen mit einer Regulationssequenz zur Expression des DNA-Moleküls bereitgestellt werden. Der Expressionsvektor kann zum Beispiel ein Baculovirus sein.

[0012] Nach noch einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Wirtszelle bereit, die mit dem Expressionsvektor, der oben beschrieben ist, transformiert ist. Die Wirtszelle kann zum Beispiel eine Bakterienzelle, eine Hefezelle, eine Säugetierzelle oder eine Insektenzelle sein.

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Herstellung des KGF-Fragments der Erfindung durch Kultivieren einer transformierten Wirtszelle, wie sie oben beschrieben wurde, und Isolieren des KGF-Fragments aus der Kultur bereit.

[0014] Das KGF-Fragment der Erfindung kann zur Stimulierung des Epithelzellwachstums verwendet werden, indem das KGF-Fragment auf einen Bereich aufgetragen wird, in dem das Epithelzellwachstum erwünscht ist, und die Zelle wachsen gelassen wird.

[0015] Das KGF-Fragment der Erfindung kann zur Wundheilung eingesetzt werden, indem die oben beschriebene therapeutische Zusammensetzung auf einen zu behandelnde Bereich einer Wunde aufgetragen wird und die Wunde heilen gelassen wird.

[0016] Noch eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Behandlung einer hyperproliferativen Krankheit der Epidermis durch Anwenden eines Konjugats der Erfindung, wie es oben beschrieben wurde, auf einen zu behandelnden Bereich.

ZUSAMMENFASSUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] [Fig. 1](#) zeigt die Aminosäuresequenz des reifen, humanen Vollängen-KGF-Polypeptids, beginnend mit dem N-Terminus und 163 Aminosäurereste und ein einzelnes N-gebundenes Glycosilierungssignal an den Aminosäureresten 14–16 enthaltend.

[0018] [Fig. 2](#) zeigt den pAcC13-Expressionsvektor, in dem die 163-Aminosäure-Sequenz von KGF inseriert worden ist.

[0019] [Fig. 3](#) veranschaulicht die weitere Reinigung des KGF-Fragments der vorliegenden Erfindung aus dem konditionierten SF9-Zell-Medium nach Elution in einer Heparin-Sepharose („HS“-Säule mit 1 M NaCl. Die bioaktiven Fraktionen aus der HS-Säule wurden gesammelt, 5-fach mit 10 mM Tris, pH 7,3, verdünnt und auf eine Mono S HRS/5-Kationenaustausch-FPLC aufgebracht.

[0020] [Fig. 4](#) vergleicht die biologische Aktivität der langen, d. h. rKGF₁₆₃, und der kurzen, d. h. KGF_{des1–23}, Form von KGF mit aFGF an Zellen der Balb/Mk-Zelllinie.

[0021] [Fig. 5](#) vergleicht die biologische Aktivität der langen, d. h. rKGF₁₆₃, und der kurzen, d. h. KGF_{des1–23} Form von KGF mit bFGF an Gefäßendothelzellen, die von großen Gefäßen (A:ABAE-Zellen) oder Kapillargefäßen (B:ACE-Zellen) stammen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0022] Es wurde überraschenderweise entdeckt, dass ein verkürzter, nicht glycosilierter KGF, der hierin als das KGF-Fragment oder KGF_{des1–23} bezeichnet wird, der eine Deletion aufweist, die die ersten 23 N-Terminus-Aminosäurereste von rKGF₁₆₃ betrifft, verglichen mit rKGF₁₆₃ eine größere biologische Aktivität und eine verringerte Cytotoxizität für Epithelialzellen besitzt. Im Allgemeinen behält das KGF-Fragment der vorliegenden Erfindung die Spezifität von KGF₁₆₃ zur Stimulation der Epithelzellproliferation bei.

[0023] Dementsprechend ist eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein neues, verkürztes, nicht glycosiliertes KGF-Fragment, KGF_{des1–23}, das nicht mit Verunreinigungen behaftet ist, die normalerweise dem nativen Molekül anhaften, wenn es in vivo produziert wird. Dieses Fragment hat ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 18 kDa, basierend auf seiner Migration in Na Dod SO₄/PAGE als einzelner Peak. Die spezifische Aktivität von gereinigtem KGF_{des1–23} für Balb/Mk-Zellen beträgt etwa 2,5 × 10⁷ Einheiten pro Milligramm (ED₅₀ 40 pg/ml), ist etwa 7- bis 10-fach größer als die des rKGF₁₆₃-Proteins oder von aFGF, wenn man Verglei-

che in einem Zellproliferationsassay anstellt, und 100-fach größer als die von rKGF₁₆₃ in einem Bioassay zur Untersuchung der Initiierung der DNA-Synthese in Balb/Mk-Zellen in einem chemisch definierten Medium, wie es in der PCT-Patentanmeldung Nr. WO 90/08771 beschrieben ist.

[0024] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird KGF_{des1-23} durch DNA-Rekombinationstechnik, besonders für die wirtschaftliche Produktion in großem Maßstab, produziert. Folglich werden auch rekombinante DNA-Moleküle, welche Expressionsvektoren enthalten, die zur Expression von KGF_{des1-23} fähig sind, gemäß der vorliegenden Erfindung durch Genexpressionstechnologie unter Verwendung der auf dem Fachgebiet gut bekannten Methoden bereitgestellt.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform kann die DNA oder der Vektor, der die DNA umfasst, die für KGF_{des1-23} codiert, in einem bakteriellen, Säuger-, Hefe- oder Insektenzellexpressionssystem exprimiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein bakterielles oder Hefezellexpressionssystem zur Produktion des KGF_{des1-23}-Fragments ideal. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA oder der Vektor in einem Insektenzellexpressionssystem exprimiert.

[0026] Das KGF-Fragment der vorliegenden Erfindung kann zur Identifizierung von Rezeptorerkennungsstellen wie auch zur Konzipierung von Peptidagonisten oder -antagonisten verwendet werden.

[0027] Im Hinblick auf die einzigartige Spezifität von KGF für Keratinocyten, seine Unfähigkeit, die Proliferation von vaskulären Endothelzellen oder Fibroblasten zu induzieren, und des Fehlens von Cytotoxizität wird KGF_{des1-23} in einer anderen Ausführungsform der Erfindung vorzugsweise für Wundheilungsanwendungen eingesetzt, insbesondere dann, wenn der Wunsch besteht, eine Reepithelialisierung der Haut zu fördern. In einer bevorzugten Ausführungsform wird KGF_{des1-23} bei der Reparatur des Cornea-Epithels eingesetzt. Andere Anwendungen von KGF_{des1-23} können auf der Basis seiner Spezifität für Epithelialzellen, die im gastrointestinalen Trakt gefunden werden, ins Auge gefasst werden.

[0028] Die Auswahl des KGF-Fragments hier vor anderen Wachstumsfaktoren, zum Beispiel epidermale Wachstumsfaktor („EGF“), platelet-derived growth factor („PDGF“) und anderen FGFs zur Hautreparatur liegt im Rahmen des Fachwissens eines Fachmanns. Die anderen Wachstumsfaktoren induzieren zum Beispiel Fibroplasie und Angiogenese zusätzlich zur Stimulation einer entweder direkten oder indirekten Keratinocyten-Proliferation. Bei der Hautreparatur könnten solche zusätzlichen Aktivitäten unerwünschte Nebenwirkungen wie zum Beispiel

Narbenbildung produzieren. Bei der Cornea-Reparatur, bei der entweder eine Wunde oder eine Operation involviert ist, könnte die Verwendung dieser anderen Faktoren eine Blutgefäßinvasion in die Cornea induzieren, was zu einer unerwünschten Cornea-Opazität oder Ödem führt. KGF hat andererseits eine einzigartige Spezifität für Keratinocyten und induziert keine Proliferation vaskulärer Endothelzellen oder Fibroblasten und wäre daher das Mittel der Wahl für diese besonderen Wundheilungsanwendungen.

[0029] Darüber hinaus kann das KGF-Fragment der vorliegenden Erfindung in einer anderen Ausführungsform der Erfindung in Form eines KGF-Fragment/Toxin-Konjugats eingesetzt werden. Ein derartiges Konjugat kann den Krankheitsprozess bei Krankheiten, zum Beispiel Psoriasis, die aus der Hyperproliferation der Basalschicht von Keratinocyten aus der Epidermis resultiert, verlangsamen oder stoppen. Dieses Konjugat würde die anderen zwei Hauptzelltypen, zum Beispiel vaskuläre Endothelzellen und Fibroblasten, die in diesen Geweben vorliegen, nicht beeinträchtigen.

[0030] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein KGF-Fragment/Toxin-Konjugat verwendet werden, um eine Tumorzellenproliferation, zum Beispiel ein Basalzellenkarzinom, auszurotten.

[0031] Die Praxis der vorliegenden Erfindung wird, wenn nichts anderes angegeben ist, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, DNA-Rekombinationstechnik und Immunologie, die im Rahmen des Fachwissens des Fachmanns liegen, verwenden. Solche Techniken sind in der Literatur vollständig erläutert. Siehe zum Beispiel Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); DNA CLONING, Band I und II, D.N. Glover, Herausg., IRL Press (1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS, M. J. Gait, Herausg., IRL Press (1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, B. D. Hames & S. J. Higgins, Herausg., IRL Press (1984); TRANSCRIPTION AND TRANSLATION, B. D. Hames & S. J. Higgins, Herausg., IRL Press (1984); ANIMAL CELL CULTURE, R.I. Freshney, Herausg., IRL Press (1986); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); die Serien METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, Inc.; GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS, J. H. Miller und M. P. Calos, Herausg., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 154 und Bd. 155, Wu und Grossman, und Wu, Herausg. (1987); IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Academic Press, London, Scopes (1987); PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE, 2. Ausgabe (Springer-Verlag, N.Y.); und HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY,

Band I-IV, D. M. Weir und C. C. Blackwell, Herausg. (1986); Kitts et al., *Biotechniques* 14:810–817 (1993); Munemitsu et al., *Mol. and Cell. Biol.* 10:5977–5982 (1990).

[0032] In [Fig. 1](#) und an anderen Stellen in dieser Beschreibung werden Standardabkürzungen für Aminosäuren verwendet. Alle Publikationen, Patente und Patentanmeldungen, die hier zitiert werden, werden durch Referenz hier aufgenommen. Aus Gründen der Klarheit werden die hierin verwendeten Ausdrücke unten besonders definiert.

Definitionen

[0033] Der hierin verwendete Ausdruck „Keratinocytenwachstumsfaktor“ oder „KGF“ bezieht sich auf ein Polypeptid, das zu einer Familie strukturell verschiedener Proteine, den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, FGFs, gehört, die unterschiedliche Grade der Sequenzhomologie zeigen, was nahe legt, dass sie durch eine verwandte Familie von Genen codiert werden. KGF hat die an anderer Stelle in dieser Beschreibung beschriebenen Charakteristika, beispielsweise bindet er an FGFR-3 und ist fähig, das Wachstum von Epithelzellen, speziell Keratinocyten, zu stimulieren. Vollängen-KGF besteht aus 163 Aminosäureresten.

[0034] Der hierin gebrauchte Ausdruck „rekombinantes Polynukleotid“ bezeichnet ein Polynukleotid mit halb-synthetischem oder synthetischem Ursprung, das durch cDNA oder genomischer DNA („gDNA“) codiert wird, so dass es (1) nicht mit dem gesamten oder einem Teil des Polynukleotids, mit dem es in der Natur assoziiert ist, assoziiert wird, (2) an ein anderes Polynukleotid gebunden ist als an das, an das es in der Natur gebunden ist, oder (3) in der Natur nicht auftritt.

[0035] Ein „Replikon“ ist ein beliebiges genetisches Element, zum Beispiel ein Plasmid, ein Chromosom, ein Virus, ein Cosmid, usw., das sich als autonome Einheit der Polynukleotidreplikation innerhalb einer Zelle verhält, d. h., es ist zur Replikation unter seiner eigenen Kontrolle fähig. Ein Replikon kann zum Beispiel selektierbare Marker umfassen.

[0036] Ein „rekombinanter Vektor“ ist ein Replikon, in dem ein anderes Polynukleotidsegment angeheftet ist, um so die Replikation und/oder Expression des angehefteten Polynukleotidsegments durchzuführen.

[0037] Eine „Regulationssequenz“ bezieht sich auf eine Polynukleotidsequenz, die zur Regulation der Expression einer codierenden Sequenz notwendig ist, an die die Polynukleotidsequenz funktionell gebunden ist. Die Natur solcher Regulationssequenzen differiert in Abhängigkeit von der Wirtszelle, in welcher die codierende Sequenz exprimiert werden soll.

In Prokaryoten umfassen solche Regulationssequenzen im Allgemeinen beispielsweise einen Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle und/oder eine Transkriptionsterminierungssequenz. In Eukaryoten umfassen solche Regulationssequenzen im Allgemeinen einen Promotor und/oder eine Transkriptionsterminierungssequenz. Der Ausdruck „Regulationssequenz“ kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Vorliegen vorteilhaft ist, zum Beispiele eine sekretorische Leadersequenz, die fair die Sekretion des zu exprimierenden Polypeptids codiert.

[0038] „Funktionell gebunden“ bezieht sich auf eine Nebeneinanderstellung, in der die so gebundenen Komponenten in einer Beziehung sind, die es ermöglicht, dass sie in der beabsichtigten Art wirken. Zum Beispiel ist eine Regulationssequenz „funktionell gebunden“ an eine codierende Sequenz, wenn sie so gebunden ist, dass eine Expression der codierenden Sequenz unter Bedingungen, die mit der Regulationssequenz kompatibel sind, erreicht wird.

[0039] Eine „codierende Sequenz“ ist eine Polynukleotidsequenz, die in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle einer geeigneten Regulationssequenz gestellt wird. Die Grenzen der codierenden Sequenz werden im Allgemeinen durch ein Translationsstartcodon an ihrem 5'-Terminus und ein Translationsstoppcodon an ihrem 3'-Terminus bestimmt. Eine codierende Sequenz kann zum Beispiel cDNA und rekombinante Polynukleotidsequenzen umfassen.

[0040] „PCR“ bezieht sich auf die Technik der Polymerasekettenreaktion, wie sie in Saiki et al., *Nature* 324:163 (1986) und Scharf et al., *Science* 233:1076–1078 (1986); US-Patent Nr. 4 683 195 und US-Patent Nr. 4 683 202 beschrieben ist.

[0041] Der hierin verwendete Ausdruck „Polypeptid“ bezieht sich auf ein Polymer aus Aminosäuren und bezieht sich auf keine spezifische Länge des Produktes. Somit sind Peptide, Oligopeptide und Proteine in diesem Ausdruck mit umfasst. Dieser Ausdruck beinhaltet auch Translationsmodifikationen des Polypeptids, zum Beispiel Glycosilierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen und dergleichen. Außerdem sind in dieser Definition zum Beispiel Polypeptide mit substituierten Verknüpfungen wie auch andere Modifikationen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, sowohl natürlich vorkommende wie auch nicht natürlich vorkommende, enthalten.

[0042] Der hierin verwendete Ausdruck „Terminatoren“ sind Regulationssequenzen, zum Beispiel Polyadenylierungs- und Transkriptions-Terminierungssequenzen, die 3' oder stromabwärts des Stoppcodons der codierenden Sequenzen lokalisiert sind.

[0043] „Rekombinante Wirtszellen“, „Wirtszellen“,

„Zellen“, „Zellkulturen“ oder andere derartige Ausdrücke bezeichnen beispielsweise Mikroorganismen, Insektenzellen und Säugerzellen, die verwendet werden können oder verwendet wurden als Empfänger zur Einführung eines rekombinanten Vektors oder anderer Transfer-DNA und umfassen die Nachkommenschaft der Zelle, die transformiert wurde. Solche Nachkommenschaften umfassen die, die bezüglich Morphologie oder genomischem oder Gesamt-DNA-Komplement mit den ursprünglichen Eltern nicht notwendigerweise identisch sind und die als Resultat natürlicher, zufälliger oder bewusster Mutation produziert werden können. Beispiele für Säugerwirtszellen umfassen chinesische Hamstereierstock („CHO“)- und Affennieren („COS“)-Zellen.

[0044] Der hierin verwendete Ausdruck „Mikroorganismus“ umfasst prokaryotische und eukaryotische mikrobielle Spezies, zum Beispiel Bakterien und Fungi, wobei die letztgenannten Hefe- und Fadenpilze umfassen.

[0045] Der hierin verwendete Ausdruck „Transformation“ bezieht sich auf den Transfer eines exogenen Polynukleotids in eine Wirtszelle, ungeachtet der für den Transfer verwendeten Methode, die zum Beispiel Infektion, direkte Aufnahme, Transduktion, F-Mating, Mikroinjektion oder Elektroporation sein kann. Das exogene Polynukleotid kann als nicht-integrierter Vektor, zum Beispiel ein Plasmid, beibehalten werden oder kann in das Wirtsgenom eingebaut werden.

[0046] „Gereinigt“ und „isoliert“ in Verbindung mit einem Polypeptid oder einer Nukleotidsequenz bedeutet, dass das angegebene Molekül im Wesentlichen ohne andere biologische Makromoleküle derselben Spezies oder desselben Typs vorliegt. Mit dem hierin verwendeten Ausdruck „gereinigt“ ist gemeint, dass mindestens 75 Gew.-%, vorzugsweise mindestens 85 Gew.-%, bevorzugter mindestens 95 Gew.-% und am vorteilhaftesten mindestens 98 Gew.-% biologische Makromoleküle desselben Typs vorliegen, wobei aber auch Wasser, Puffer und andere kleine Moleküle, speziell Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000, vorliegen können.

[0047] Mit „pharmazeutisch annehmbarer Träger“ ist ein Träger gemeint, der vom Fachmann zur Verabreichung an einen Menschen verwendet wird und der selbst keine unerwünschten Nebenwirkungen wie zum Beispiel Produktion von Antikörpern, Fieber usw. induziert. Geeignete Träger sind typischerweise große, langsam metabolisierte Makromoleküle, die ein Protein, ein Polysaccharid, Polymilchsäure, eine Polyglycolsäure, eine polymere Aminosäure, Aminosäurecopolymere oder ein inaktives Viruspartikel sein können. Weitere Träger sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt. Vorzugsweise enthält der Träger Thyroglobulin.

[0048] Eine therapeutische Zusammensetzung wird typischerweise pharmazeutisch annehmbare Träger, zum Beispiel Wasser, Kochsalzlösung, Glycerin, Ethanol usw. enthalten. Zusätzlich können Hilfssubstanzen, zum Beispiel Benetzungsmittel oder Emulgatoren, pH-Puffersubstanzen und dergleichen in solchen Zusammensetzungen vorliegen.

[0049] Der Ausdruck „eine therapeutisch wirksame Menge“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die Menge, die zur Erzeugung eines gewünschten Resultats wirksam ist. Diese Menge variiert in Abhängigkeit von der Gesundheit und dem physischen Zustand des Individuums, das behandelt werden soll, der Fähigkeit des Immunsystems des Individuums, Antikörper zu synthetisieren, dem gewünschten Schutzgrad, der Formulierung, der Beurteilung der medizinischen Situation durch den behandelnden Arzt und anderer relevanter Faktoren. Es wird erwartet, dass die Menge in einen relativ breiten Bereich fallen wird, der durch Routineversuche bestimmt werden kann.

[0050] Es wurde unerwarteterweise festgestellt, dass, wenn KGF in Insektenzellen, *Spodoptera frugiperda* („SF9“) durch Infektion eines rekombinanten Baculovirus, *Autographa californica*, das cDNA enthält, die für KGF₁₆₃ codiert, exprimiert wird, sie zusätzlich zu KGF₁₆₃ ein KGF-Fragment produzierten, dem die ersten 23 Aminosäurereste der N-terminalen Domäne von KGF₁₆₃, die eine einzelne Glycosilierungsstelle enthält, fehlen. Das verkürzte und unglycosylierte KGF-Fragment KGF_{des1-23} oder KGF₁₄₀ hat im Gegensatz zu der nativen langen Form, die als KGF₁₆₃ identifiziert wird, eine 7- bis 10-fach erhöhte Wirksamkeit auf Zielzellen. Die Zielzellenspezifität von KGF_{des1-23} ist unverändert. Außerdem wird bei hohen Konzentrationen des KGF-Fragments keine toxische Wirkung auf Keratinocyten beobachtet, während eine solche für KGF₁₆₃ beobachtet wird. Diese Beobachtungen legen nahe, dass im Gegensatz zu dem, was in der PCT-Anmeldung Nr. WO 90/08771 früher vorgeschlagen wurde, die Zielzellenspezifität von KGF nicht auf seiner N-terminalen Domäne basiert. Darüber hinaus zeigt die vorliegende Erfindung, dass eine N-terminal verkürzte Version des KGF tatsächlich eine verbesserte KGF-Version mit höherer biologischer Aktivität und verringerter Cytotoxizität für eine therapeutische Anmeldung darstellt.

[0051] Durch DNA-Rekombinationstechniken, die gegenüber dem alternativen Verfahren der Isolierung und Reinigung von KGF aus natürlichen Quellen und Abspalten der ersten 23 Aminosäurereste vom N-Terminus bevorzugt ist, kann eine große Menge des KGF-Fragments produziert werden. KGF, das durch Rekombinationstechniken produziert wird, erlaubt es, dass KGF in Abwesenheit von kontaminierenden Molekülen, die normalerweise in Zellen vor-

liegen, isoliert wird. In der Tat können KGF-Zusammensetzungen, die frei von einer Spur humaner Proteinkontaminanten sind, leicht zum Beispiel in Bakterienzellen, Hefezellen und Insektenzellen produziert werden. Durch Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken können auch KGF-Fragmente produziert werden, die in der Natur nicht gefunden werden, zum Beispiel Varianten, die durch ortsspezifische Mutagenese produziert werden können.

[0052] In der vorliegenden Erfindung kann ein beliebiger Promotor eingesetzt werden, der eine Expression des KGF-Fragments in dem gewünschten Wirt erlaubt. In *E. coli* kann zum Beispiel die regulatorische Promotorsequenz des lac-Operons verwendet werden. Ein anderes Beispiel ist der Hefealkohol Dehydrogenase („ADH“)-Promotor, der eine die Transkription erhöhende Sequenz stromaufwärts vom Promotor („UAS“) hat, welche die Aktivität des ADH-Promotors moduliert. Zusätzlich können hier auch bestimmte virale Enhancer verwendet werden. Solche Enhancer amplifizieren nicht nur, sondern regulieren auch die Expression in Säugerzellen. Diese Enhancer können in Säuger-Promotorsequenzen eingebaut werden, die nur in Gegenwart eines Inducers, zum Beispiel ein Hormon oder ein Enzymsubstrat, aktiviert werden, was in Sassone-Corsi und Borelli Trends Genet. 2:215 (1986); Maniatis et al. Science 236:1237 (1987) diskutiert ist. Promotoren, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen auch den Baculovirus-Polyhedron-Hybrid-Promotor und den p10-Promotor.

[0053] Beispiele für Terminationssequenzen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind der *Saccharomyces cerevisiae*-Alpha-Faktor-Terminator und der Baculovirus-Terminator. Darüber hinaus können auch virale Terminatoren, die in bestimmten Wirtszellen funktionell sind, eingesetzt werden. Beispielsweise ist der SV40-Terminator in chinesischen Hamstereierstock (CHO)-Zellen funktionell.

[0054] Eine cDNA, die für den verkürzten KGF gemäß der Erfindung codiert, ist in [Fig. 1](#) gezeigt. In der dargestellten Sequenz ist die Spaltungsstelle für das verkürzte Protein durch Pfeil (a) angezeigt, was zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 18.000 Da führt. Unter Verwendung der Sequenzdaten in [Fig. 1](#) liegt es im Rahmen des Fachwissens eines Fachmanns, andere DNA-Sequenzen zu erhalten, die für denselben verkürzten KGF codieren.

[0055] Die das KGF-Fragment codierende Sequenz kann konstruiert werden, indem die DNA-Sequenz, die für das KGF-Fragment codiert, synthetisiert wird oder indem eine existierende oder native, für KGF codierende Sequenz verändert wird, um so die gewünschte Sequenz zu produzieren. Die native, für KGF codierende Sequenz oder das Polypeptid sind

die, die in der Natur vorkommen. Die Aminosäuresequenz des nativen KGF ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Das synthetische KGF-Fragment kann auf der Basis der bekannten Aminosäuresequenz von KGF unter Verwendung von Codons, die von der ausgewählten Wirtszelle bevorzugt werden, hergestellt werden, wie es von Urdea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7461 (1983) vorgeschlagen wurde. Alternativ kann die für das gewünschte KGF-Fragment codierende Sequenz aus Nukleinsäurebibliotheken unter Verwendung von Sonden auf der Basis der in [Fig. 1](#) gezeigten Nukleinsäuresequenz kloniert werden. Techniken zur Herstellung und Sondierung der Nukleinsäuresequenzbibliotheken sind zum Beispiel in Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) beschrieben. Andere Rekombinationstechniken, zum Beispiel ortsspezifische Mutagenese, PCR, enzymatischer Abbau bzw. Verdau und Ligation können ebenfalls bei der Konstruktion von codierenden Sequenzen für das KGF-Fragment verwendet werden.

[0056] Ein Expressionsvektor im Rahmen der vorliegenden Erfindung enthält einen Promotor, der in der Wirtszelle funktionell ist und der funktionell an die codierende Sequenz des KGF-Fragments gebunden ist. Ein Expressionsvektor kann gegebenenfalls eine Signalsequenz zur Sekretion, einen Terminator, einen selektierbaren Marker, einen Replikationsursprung und Sequenzen, die zu Wirtszellsequenzen homolog sind, beinhalten. Diese zusätzlichen Elemente können enthalten sein, um eine Expression zu optimieren.

[0057] Es können auch funktionelle nicht-natürliche Promotoren verwendet werden, zum Beispiel synthetische Promotoren auf der Basis einer Konsensussequenz verschiedener Promotoren. Wirksame Promotoren können Hybridpromotoren sein, die eine Regulationsregion mit einer heterologen Expressionsinitiationsregion verknüpft enthalten. Beispiele für Hybridpromotoren sind der *E. coli*-lac-Operator, der mit der *E. coli*-tac-Transkriptionsaktivierungsregion verknüpft ist; die Hefealkoholdehydrogenase („ADH“)-Regulationssequenz, die an die Hefe-Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase („GAPDH“)-Transkriptionsaktivierungsregion gebunden ist, wie es im US-Patent Nr. 4 876 197 und 4 880 734 beschrieben ist, und der Cytomegalovirus („CMV“)-Enhancer, der mit dem Affen-Virus-SV40-Promotor verbunden ist.

[0058] Die codierende Sequenz für das KGF-Fragment der vorliegenden Erfindung kann auch im Leseraster mit einer Signalsequenz verknüpft sein. Die Signalsequenz codiert typischerweise für eine Aminosäuresequenz zur Sekretion, die aus hydrophoben Aminosäuren besteht, die das KGF-Fragment oder ein Analogon zur Zellmembran steuern. In einer be-

vorzugten Ausführungsform liegt eine Processing-stelle zwischen der Signalsequenz und dem KGF-Fragment, wodurch eine Spaltung zwischen der Signalsequenz und dem KGF-Fragment in vivo oder in vitro ermöglicht wird. Geeignete Signalsequenzen sind die, die von Genen für sezernierte endogene Wirtszellproteine stammen, zum Beispiel das Hefeinvertasegen, wie es im europäischen Patent Nr. 12873 und im japanischen Patent Nr. 62 096 086 beschrieben ist, ein A-Faktor-Gen, wie es im US-Patent Nr. 4 588 684 beschrieben ist, und eine Interferonsignalsequenz, wie sie in EP 60057 beschrieben ist.

[0059] Eine bevorzugte Klasse der Sekretionsleader zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zur Hefeexpression ist die verkürzte Hefe-Alpha-Faktor-Leadersequenz, die mindestens einen Teil der „Pre“-Signalsequenz und die „Pro“-Region enthält. Die Alpha-Faktor-Leadersequenzen, die hierin verwendet werden können, umfassen den Volllängen-Pre-Pro-Alpha-Faktor-Leader mit etwa 83 Aminosäureresten wie auch verkürzte Alpha-Faktor-Leader, typischerweise mit etwa 25 bis etwa 50 Aminosäureresten, wie es in den US-Patenten Nrn. 4 546 083 und 4 870 008 und dem europäischen Patent Nr. EP 324 274 beschrieben ist. Zusätzliche Leader, die ein Alpha-Faktor-Leader-Fragment verwenden, die hierin verwendet werden können, umfassen Hybrid-Alpha-Faktor-Leader, die aus einer Presequenz einer ersten Hefesignalsequenz, aber einer Pro-Region aus einem zweiten Hefe-Alpha-Faktor hergeleitet sind (siehe zum Beispiel PCT WO 89/02463).

f. Expressionssysteme

[0060] Das KGF-Fragment der Erfindung kann durch Rekombinationstechniken exprimiert werden, wenn eine DNA-Sequenz, die für das KGF-Fragment codiert, in einem geeigneten Leseraster und in geeigneter Orientierung funktionell in einem Vektor gebunden ist, was dem Fachmann bekannt ist. Bei der Herstellung eines genetischen Konstrukts zur Expression des KGF-Fragments ist cDNA, die für das KGF-Fragment codiert, ein bevorzugtes Ausgangsmaterial. Typischerweise wird das verkürzte KGF-Gen stromabwärts von einem Promotor inseriert werden und es wird sich eine Terminatorsequenz daran anschließen, obgleich das KGF-Fragment auch als Hybridprotein produziert werden kann, das gespalten werden kann, wenn dies gewünscht wird. Im Allgemeinen werden Wirtszellen-spezifische Sequenzen, die die Produktionsausbeute von verkürztem KGF verbessern, verwendet werden und an den Expressionsvektor werden geeignete Kontrollensequenzen, zum Beispiel Enhancersequenzen, Polyadenylierungssequenzen und Ribosomenbindungsstellen, angefügt werden. Sobald die geeignete codierende Sequenz isoliert ist, kann sie in einer Vielzahl verschiedener Expressionssysteme exprimiert werden; zum Beispiel in solchen, die mit Säugerzel-

len, Baculoviren, Bakterien und Hefe verwendet werden. Auch diese werden weiter unten diskutiert.

i. Säugersysteme

[0061] Säugerexpressionssysteme sind auf dem Fachgebiet bekannt. Ein Säugerpromotor ist eine beliebige DNA-Sequenz, die fähig ist, Säuger-RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts gerichtete (3')-Transkription einer codierenden Sequenz (zum Beispiel Strukturgen) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor wird eine transkriptionsinitiiierende Region, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der codierenden Sequenz liegt, und eine TATA-Box, die üblicherweise 25–30 Basenpaare (bp) stromaufwärts zur Transkriptionsinitiationsstelle lokalisiert ist, haben. Die TATA-Box soll die RNA-Polymerase II so steuern, dass die RNA-Synthese an der richtigen Stelle beginnt. Ein Säugerpromotor wird auch ein stromaufwärts gelegenes Promotorelement enthalten, das typischerweise innerhalb von 100 bis 200 bp stromaufwärts der TATA-Box liegt. Ein Upstream-Promotor-Element bestimmt die Rate, mit der eine Transkription initiiert wird, und kann in jeder Orientierung wirken (Sambrook et al. (1989) „Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells.“ In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe).

[0062] Säugervirusgene werden oft in hohem Maße exprimiert und haben einen weiten Wirtsbereich; daher stellen Säugervirusgene besonders nützliche Promotorsequenzen zur Verfügung. Beispiele umfassen den frühen SV40-Promotor, den mammären Tumovirus-LTR-Promotor der Maus, den Adenovirus-Major-Late-Promotor (Ad MLP) und den Herpes-Simplex-Virus-Promotor. Zusätzlich stellen auch Sequenzen, die von nicht-viralen Genen stammen, zum Beispiel das murine Metallothionein-Gen, nützliche Promotorsequenzen bereit. Die Expression kann entweder konstitutiv oder reguliert (induzierbar) sein, und kann in Abhängigkeit vom Promotor mit Glucocorticoid in Zellen, die auf Hormon ansprechen, induziert werden.

[0063] Das Vorliegen eines Enhancerelements (Enhancer), kombiniert mit den oben beschriebenen Promotorelementen, wird typischerweise Expressionslevel erhöhen. Ein Enhancer ist eine regulatorische DNA-Sequenz, die eine Transkription bis zum 1000-Fachen stimulieren kann, wenn sie an homologe oder heterologe Promotoren gebunden ist, wobei eine Synthese an der normalen RNA-Startstelle beginnt. Enhancer sind auch aktiv, wenn sie stromaufwärts oder stromabwärts vom Transkriptionsstartort, entweder in normaler oder in „flipped“ Orientierung, oder im Abstand von mehr als 1000 Nukleotiden vom Promotor platziert sind [Maniatis et al. (1987) Science 236:1237; Alberts et al. (1989) Molecular Biology of the Cell, 2. Ausgabe]. Enhancerelemente, die von Viren stammen, können besonders nützlich sein, da sie

typischerweise einen breiteren Wirtsbereich haben. Beispiele umfassen den frühen SV40-Genenhancer [Dijkem et al. (1985) EMBO J. 4:761] und die Enhancer/Promotoren, die aus der langen terminalen Wiederholung (LTR) des Rous-Sarcoma-Virus [Gorman et al. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777] und aus humanem Cytomegalovirus [Boshart et al. (1985) Cell 41:521] stammen. Außerdem sind einige Enhancer regulierbar und werden nur in Gegenwart eines Inducers, zum Beispiel ein Hormon oder Metallion [Sassone-Corsi und Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis et al. (1987) Science 236:1237], aktiv.

[0064] Ein DNA-Molekül kann intrazellulär in Säugerzellen exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft sein, wobei in diesem Fall die erste Aminosäure am N-Terminus des rekombinanten Proteins immer ein Methionin sein wird, das durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn es gewünscht wird, kann der N-Terminus durch in vitro-Inkubation mit Bromcyan vom Protein abgespalten werden.

[0065] Alternativ können auch Fremdproteine aus der Zelle in das Wachstumsmedium sezerniert werden, indem chimäre DNA-Moleküle geschaffen werden, die für ein Fusionsprotein codieren, das aus einem Leadersequenzfragment besteht, welches für die Sekretion des Fremdproteins in Säugerzellen sorgt. Vorzugsweise sind Processing-Stellen zwischen dem Leaderfragment und dem Fremdgen codiert, die entweder in vivo oder in vitro gespalten werden können. Das Leadersequenzfragment codiert typischerweise für ein Signalpeptid, das aus hydrophoben Aminosäuren besteht, welche die Sekretion des Proteins aus der Zelle steuern. Der dreiteilige Adenovirusleader ist ein Beispiel für eine Leadersequenz, die für die Sekretion eines Fremdproteins in Säugerzellen sorgt.

[0066] Typischerweise sind Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssequenzen, die von Säugerzellen erkannt werden, regulatorische Regionen bzw. Regulationsregionen, die 3' zum Translationsstoppcodon lokalisiert sind und somit zusammen mit den Promotorelementen die codierende Sequenz codieren. Der 3'-Terminus der reifen mRNA wird durch eine sequenzspezifische, posttranskriptionale Spaltung und Polyadenylierung gebildet [Birnstiel et al. (1985) Cell 41:349; Proudfoot und Whitelaw (1988) „Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. In Transcription and Splicing (herausg. B.D. Hames und D.M. Glover); Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14:105]. Diese Sequenzen steuern die Transkription einer mRNA, die in das Polypeptid, das durch die DNA codiert wird, translatiert werden kann. Beispiele für Transkriptionsterminator-Polyadenylierungssignale umfassen die, die von SV40 stammen [Sambrook et al. (1989) „Expression

of cloned genes in cultured mammalian cells". In Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

[0067] Einige Gene können effizienter exprimiert werden, wenn Introne (auch als Intervening-Sequenzen bezeichnet) vorhanden sind. Einige cDNAs wurden allerdings effizient aus Vektoren exprimiert, denen Spleiß-Signale fehlen (auch als Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Stellen bezeichnet) [siehe z. B. Gothing und Sambrook (1981) Nature 293:620]. Introne sind nicht-codierende Intervening-Sequenzen mit einer codierenden Sequenz, die Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Stellen enthält. Sie werden durch einen Prozess entfernt, der als „Spleißen“ bzw. „Splicen“ bezeichnet wird, worauf sich eine Polyadenylierung des primären Transkripts anschließt [Nevins (1983) Annu. Rev. Biochem. 52:441; Grenn (1986) Annu. Rev. Genet. 20:671; Padgett et al. (1986) Annu. Rev. Biochem. 55:1119; Krainer und Maniatis (1988) „RNA splicing“, in Transcription and Splicing (Herausg. B.D. Hames und D.M. Glover)].

[0068] Typischerweise werden die oben beschriebenen Komponenten, die einen Promotor, ein Polyadenylierungssignal und eine Transkriptionsterminationssequenz umfassen, in Expressionskonstrukten zusammengestellt. Enhancer, Introne mit funktionellen Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Stellen und Leadersequenzen können auch in einem Expressionskonstrukt enthalten sein, wenn dies gewünscht wird. Expressionskonstrukte werden oft in einem Replikon, zum Beispiel einem extrachromosomalen Element (zum Beispiel Plasmiden), die zur stabilen Haltung in einem Wirt, wie zum Beispiel Säugerzellen oder Bakterien, geeignet sind, gehalten. Säugerreplikationssysteme umfassen die, die von Tierviren abgeleitet sind, die transwirkende Faktoren zur Replikation benötigen. Plasmide, die die Replikationssysteme von Papovaviren enthalten, zum Beispiel SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] oder Polyomavirus, replizieren zu extrem hoher Kopienzahl in Gegenwart des geeigneten viralen T-Antigens. Weitere Beispiele für Säugerreplikone umfassen die, die von Rinder-Papillomavirus und Epstein-Barr-Virus stammen. Außerdem kann das Replikon zwei Replikationssysteme haben, was es ihm ermöglicht, zum Beispiel in Säugerzellen zur Expression und in einem prokaryotischen Wirt zur Klonierung und Amplifikation gehalten zu werden. Beispiele für solche Säuger-Bakterien-Shuttlevektoren umfassen pMT2 [Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946] und pHEBO [Shimizu et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:1074].

[0069] Das angewendete Transformationsverfahren hängt von dem zu transformierenden Wert ab. Verfahren zur Einführung von heterologen Polynukleotiden in Säugerzellen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen eine Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphatpräzipitation, Polybren-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektropo-

ration, Einkapselung des Polynukleotid (der Polynukleotide) in Liposome und eine direkte Mikroinjektion der DNA in Kerne.

[0070] Säugerzelllinien, die als Wirte zur Expression verfügbar sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen viele immortalisierte Zelllinien, die von der American Type Culture Collection (ATCC) verfügbar sind, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, chinesische Hamstereierstock (Chinese hamster ovary = CHO)-Zellen, HeLa-Zellen, Babyhamsternieren (BHK)-Zellen, Affennierenzellen (COS), humane hepatocelluläre Karzinomzellen (zum Beispiel Hep G2) und eine Reihe anderer Zelllinien.

ii. Baculovirus-Systeme

[0071] Das Polynukleotid, das für KGF codiert, kann in einen geeigneten Expressionsvektor, zum Beispiel einen Insektenzellexpressionsvektor, inseriert werden und funktionell an Kontrollelemente innerhalb dieses Vektors gebunden werden. Eine Vektorkonstruktion verwendet Techniken, die auf dem Fachgebiet bekannt sind. Zu Zwecken der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise ein Baculovirus-Expressionsvektor im Wesentlichen gemäß Kitts et al., Bio-Techniques 14:810–817 (1993) konstruiert.

[0072] Kurz ausgedrückt, eine KGF-Expressionskassette wird zuerst durch Insertion der für KGF₁₆₃ codierenden Sequenz in einen Transfervektor, der eine Polynukleotidsequenz enthält, die einem Teil des Baculovirusgenoms (hierin als „die Baculovirus-Sequenzen“ bezeichnet) homolog ist und zur homologen Rekombination damit fähig ist, konstruiert. Die Baculovirussequenzen enthalten wenigstens eine essentielle Polynukleotidsequenz, wie es weiter unten detaillierter beschrieben wird. Die für KGF codierende Sequenz wird derart in den Transfervektor inseriert, dass sie an beiden Enden durch Baculovirussequenzen flankiert wird.

[0073] Der Transfervektor, der die für KGF codierende Sequenz enthält, wird zusammen mit einer Mutanten des Wildtyp-Baculovirus, dem eine essentielle Polynukleotidsequenz fehlt, welche zur Produktion eines funktionellen Virus notwendig ist, transfiziert. Diesbezüglich kann ein funktionelles Virus in den Wirtszellen nach Transfektion produziert werden, wenn das Mutanten-Baculovirus mit der KGF-Expressionskassette rekombiniert.

[0074] Das auf diese Weise produzierte funktionelle Baculovirus baut die KGF-Expressionskassette ein und ist zur Transfektion in neue Wirtszellen zur Produktion von rekombinantem KGF und rekombinantem KGF_{des1–23} geeignet. Alternativ kann dieses Verfahren mit einer für KGF_{des1–23} codierenden Sequenz anstelle einer für KGF₁₆₃ codierenden Sequenz durchgeführt werden.

[0075] Das funktionelle Baculovirus: Im Allgemeinen umfassen die Komponenten des Expressionssystems einen Transfervektor, üblicherweise ein bakterielles Plasmid, das sowohl ein Fragment des Baculovirusgenoms als auch eine zweckdienliche Restriktionsstelle zur Insertion des heterologen Gens oder der heterologen Gene, das exprimiert werden soll (die exprimiert werden sollen) enthält; ein Wildtyp-Baculovirus mit einer Sequenz, die zu dem Baculovirus-spezifischen Fragment im Transfervektor homolog ist (dies ermöglicht die homologe Rekombination des heterologen Gens im Baculovirusgenom); und geeignete Insektenwirtszellen und Wachstumsmedium. Nach Insertieren der verkürzten KGF-DNA-Sequenz in den Transfervektor werden der Vektor und das Wildtyp-Virusgenom in eine Insektenzelle transfiziert, wo der Vektor und das Virusgenom rekombinieren gelassen werden. Das verpackte rekombinante Virus wird exprimiert und rekombinante Plaques werden identifiziert und gereinigt. Materialien und Methoden für Baculovirus/Insektenzell-Expressionssysteme sind in Kit-Form unter anderem von Invitrogen, San Diego, CA („Max-Bac“-Kit) erhältlich. Diese Techniken sind dem Fachmann im Allgemeinen bekannt und sind in Summers und Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin Nr. 1555 (1987) (nachfolgend „Summers und Smith“) beschrieben und gelten hier durch Referenz als aufgenommen.

[0076] Vor Einsetzen der verkürzten KGF-DNA-Sequenz in das Baculovirus-Genom werden die oben beschriebenen Komponenten, die einen Promotor, einen Leader (wenn gewünscht), eine codierende Sequenz von Interesse und eine Transkriptionsterminationssequenz umfassen, typischerweise zu einem Zwischenübertragungskonstrukt (Transfervektor) zusammengebaut. Dieses Konstrukt kann ein einzelnes Gen und funktionell verknüpfte Regulationselemente; mehrere Gene, von denen jedes mit einem eigenen Satz funktionell verknüpfter Regulationselemente bzw. regulatorischer Elemente ausgestattet ist; oder mehrere Gene, die durch denselben Satz an regulatorischen Elementen reguliert werden, enthalten. Zwischenübertragungskonstrukte werden oft in einem Replikon, zum Beispiel einem extrachromosomalen Element (zum Beispiel Plasmiden), die zu einem stabilen Verbleiben in einem Wirt wie einem Bakterium geeignet sind, gehalten. Das Replikon wird ein Replikationssystem haben, was es möglich macht, dass es zur Klonierung und Amplifizierung in einem geeigneten Wirt gehalten wird.

[0077] Derzeit ist der am häufigsten verwendete Transfervektor zur Einführung von Fremdgenen in AcNPV pAc373. Viele andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wurden ebenfalls entwickelt. Diese umfassen zum Beispiel pVL985 (welches das Polyhedrinstartcodon von ATG in ATT ändert und das eine BamHI-Klonierungsstelle 32 Ba-

senpaare stromabwärts vom ATT einführt; siehe Luckow und Summers, *Virology* (1989) 17:31.

[0078] Das Plasmid enthält üblicherweise auch das Polyhedrin-Polyadenylierungssignal (Miller et al. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177) und ein prokaryotisches Ampicillin-Resistenz (amp)-Gen und einen Replikationsursprung zur Selektion und Vermehrung in *E. coli*.

[0079] Baculovirus-Transfervektoren enthalten üblicherweise einen Baculovirus-Promotor. Ein Baculovirus-Promotor ist irgendeine DNA-Sequenz, die fähig ist, eine Baculovirus-RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts erfolgende (5' zu 3') Transkription einer codierenden Sequenz (zum Beispiel eines Strukturgens) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor wird eine Transkriptionsinitiationsregion haben, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der codierenden Sequenz lokalisiert ist. Diese Transkriptionsinitiationsregion umfasst typischerweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ein Baculovirus-Transfervektor kann auch eine zweite Domäne haben, die als Enhancer bezeichnet wird, die, wenn sie vorliegt, üblicherweise distal zum Strukturgen ist. Die Expression kann entweder reguliert oder konstitutiv sein.

[0080] Strukturgene, die zu späten Zeiten eines Virusinfektionszyklus reichlich transkribiert werden, liefern besonders nützliche Promotorsequenzen. Beispiele umfassen Sequenzen, die aus dem Gen, das für das virale Polyhedronprotein codiert, Friesen et al. (1986), „The Regulation of Baculovirus Gene Expression“, in: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (Herausg. Walter Doerfler); EPO Pub. Nrn. 127 839 und 155 476; und dem Gen stammen, das für das p10-Protein codiert, Vlcek et al. (1988), *J. Gen. Virol.* 69:765.

[0081] DNA, die für geeignete Signalsequenzen codiert, kann aus Genen für sezernierte Insekten- oder Baculovirus-Proteine abgeleitet sein, wie zum Beispiel vom Baculovirus-Polyhedringen (Carbonell et al. (1988) *Gene*, 73:409). Da die Signale für posttranslationale Modifikationen von Säugerzellen (zum Beispiel Signalpeptidspaltung, proteolytische Spaltung und Phosphorylierung) anscheinend von Insektenzellen erkannt werden und die Signale, die zur Sekretion und Kernakkumulierung erforderlich sind, auch zwischen den Invertebraten-Zellen und Vertebraten-Zellen anscheinend konserviert werden, können alternativ auch Leader Nichtinsektenursprungs, zum Beispiel die, die von Genen stammen, welche humanes α -Interferon codieren, Maeda et al. (1985), *Nature* 315:592; welche humanes Gastrin-freisetzendes Peptid codieren, Lebacqz-Verheyden et al. (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8:3129; welche humanes IL-2 codieren, Smith et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8404; die Maus-IL-3 codieren, Miyajima

et al. (1987) *Gene* 58:273; und die humane Glucocerebrosidase codieren, Martin et al. (1988) *DNA*, 7:99, verwendet werden, um eine Sekretion in Insekten zu erreichen.

[0082] Ein rekombinantes Polypeptid oder Polyprotein kann intrazellulär exprimiert werden oder, wenn es mit den geeigneten regulatorischen Sequenzen exprimiert wird, kann es sezerniert werden. Eine gute intrazelluläre Expression von nicht-fusionierten Fremdproteinen erfordert üblicherweise heterologe Gene, die Idealerweise eine kurze Leadersequenz, welche geeignete Translationsinitiationssignale enthält und der ein AGT-Startsignal vorangestellt ist, haben. Wenn es gewünscht wird, kann Methionin am N-Terminus durch Invitro-Inkubation mit Bromcyan vom reifen Protein abgespalten werden.

[0083] Alternativ können rekombinante Polyproteine oder Proteine, die natürlicherweise nicht sezerniert werden, aus der Insektenzelle sezerniert werden, indem chimäre DNA-Moleküle geschaffen werden, die für ein Fusionsprotein codieren, wobei diese aus einem Leadersequenzfragment bestehen, das zur Sekretion der Fremdproteine in Insekten sorgt. Das Leadersequenzfragment codiert typischerweise für ein Signalpeptid, das aus hydrophoben Aminosäuren besteht, welche die Translokation des Proteins in das endoplasmatische Reticulum steuern.

[0084] Nach Insertion der verkürzten KGF-DNA-Sequenz und/oder des Gens, das für den Expressionsproduktvorläufer codiert, wird ein Insektenzellenwirt mit der heterologen DNA des Transfervektors und der genomischen DNA des Wildtyp-Baculovirus üblicherweise durch Cotransfektion – cotransformiert. Der Promotor und die Transkriptionsterminationssequenz des Konstrukts wird typischerweise eine 2-5kb-Abschnitt des Baculovirusgenoms umfassen. Verfahren zur Einführung heterologer DNA in die gewünschte Stelle im Baculovirus-Virus sind bekannt (siehe Summers und Smith oben; Ju et al. (1987); Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3:2156 und Luckow und Summers (1989)). Zum Beispiel kann die Insertion in ein Gen, zum Beispiel das Polyhedringen, durch homologe doppelte Crossover-Rekombination erfolgen; die Insertion kann auch in einer Restriktionsenzymstelle, die in dem gewünschten Baculovirusgen entwickelt wurde, erfolgen. Miller et al. (1989), *Bioassays* 4:91. Wenn die DNA-Sequenz anstelle des Polyhedridgens im Expressionsvektor cloniert wird, ist sie 5' und 3' durch polyhedrinspezifische Sequenzen flankiert und befindet sich stromabwärts zum Polyhedrinpromotor.

[0085] Der neu gebildete Baculovirus-Expressionsvektor wird anschließend in ein infektiöses rekombinantes Baculovirus verpackt. Eine homologe Rekombination erfolgt bei niedriger Frequenz (zwischen etwa 1 % und etwa 5%); somit ist die Hauptmenge

des nach Cotransfektion produzierten Virus noch Wildtyp-Virus. Demnach ist ein Verfahren erforderlich, um rekombinante Viren zu identifizieren. Ein Vorteil des Expressionssystems ist ein visuelles Screening, das es ermöglicht, rekombinante Viren zu unterscheiden. Das Polyhedrinprotein, welches durch das native Virus produziert wird, wird in den Kernen infizierter Zellen in späten Zeiten nach viraler Infektion in sehr hohen Konzentrationen produziert. Akkumuliertes Polyhedrinprotein bildet Okklusionskörper, die auch eingebettete Partikel enthalten. Diese Okklusionskörper mit einer Größe von bis zu 15 µm sind in hohem Maße refraktil, was ihnen ein hell glänzendes Aussehen verleiht, so dass sie unter dem Lichtmikroskop einfach zu sehen sind. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert sind, haben keine Okklusionskörper. Um rekombinantes Virus von Wildtyp-Virus zu unterscheiden, wird der Transfektionsüberstand nach Techniken, die dem Fachmann gut bekannt sind, auf eine Monoschicht aus Insektenzellen plattiert. Die Plaques werden unter dem Lichtmikroskop auf das Vorliegen (Hinweis für Wildtyp-Virus) oder Fehlen (Hinweis für rekombinantes Virus) von Okklusionskörpern durchgemustert. „Current Protocols in Microbiology“, Bd. 2, (Ausubel et al. Herausg.) bei 16.8 (Erg. 10, 1990); Summers und Smith, oben; Miller et al. (1989).

[0086] Zur Infektion in verschiedene Insektenzellen wurden rekombinante Baculovirus-Expressionsvektoren entwickelt. Beispielsweise wurden rekombinante Baculoviren inter alia entwickelt für: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* und *Trichoplusia ni* (PCT Pub. Nr. WO 89/046699; Carbonell et al. (1985), J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith et al. (1983), Mol. Cell. Biol. 3:2156 und siehe allgemein: Fraser et al. (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225).

[0087] Zellen und Zellkulturmedien sowohl zur direkten Expression als auch zur Fusionsexpression heterologer Polypeptide in einem Baculovirus/Expressionssystem sind im Handel verfügbar; Zellkulturtechniken sind dem Fachmann allgemein bekannt. Siehe zum Beispiel Summers and Smith, oben.

[0088] Die modifizierten Insektenzellen können dann in einem geeigneten Nährmedium, welches für eine stabile Erhaltung des Plasmids (der Plasmide), das (die) im modifizierten Insektenwirt vorliegen, wachsen gelassen werden. Wenn das Expressionsproduktgen unter einer induzierbaren Kontrolle steht, kann der Wirt zu einer hohen Dichte wachsen gelassen werden und die Expression induziert werden. Wenn alternativ die Expression konstitutiv ist, wird das Produkt kontinuierlich in das Medium exprimiert und das Nährstoffmedium muss kontinuierlich umgewälzt werden, während das interessierende Produkt entfernt wird und verarmte Nährstoffe angesammelt

werden. Das Produkt kann durch Techniken wie Chromatographie, zum Beispiel HPLC, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, usw.; Elektrophorese; Dichtegradientenzentrifugation; Lösungsmittelextraktion oder dergleichen gereinigt werden. Wenn es geeignet ist, kann das Produkt bei Bedarf weiter gereinigt werden, so dass im Wesentlichen Insektenproteine, die auch in das Medium sezerniert werden oder aus der Lyse von Insektenzellen resultieren, entfernt werden, um so ein Produkt bereit zu stellen, das wenigstens im Wesentlichen von Wirtsdebris, zum Beispiel Proteinen, Lipiden und Polysacchariden, frei ist.

[0089] Um eine Expression von verkürztem KGF zu erhalten, werden rekombinante Wirtszellen, die von den Transformanten abgeleitet sind, unter Bedingungen inkubiert, welche eine Expression der rekombinanten, verkürzten KGF-codierenden Sequenz erlauben. Diese Bedingungen werden in Abhängigkeit von der gewählten Wirtszelle variieren. Allerdings sind die Bedingungen auf der Basis des Fachwissens durch einen Fachmann leicht bestimmbar.

iii. Bakterielle Systeme

[0090] Bakterielle Expressionstechniken sind auf dem Fachgebiet bekannt. Ein bakterieller Promotor ist irgendeine DNA-Sequenz, die fähig ist, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts erfolgende (3')-Transkription einer codierenden Sequenz (zum Beispiel Strukturgen) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor wird eine Transkriptionsinitiationsregion haben, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der codierenden Sequenz liegt. Diese Transkriptionsinitiationsregion umfasst typischerweise eine RNA-Polymerase-bindende Stelle und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ein bakterieller Promotor kann auch eine zweite Domäne, Operator genannt, haben, welche mit einer benachbarten RNA-Polymerase-Bindungsstelle überlappt, an der die RNA-Synthese beginnt. Der Operator ermöglicht eine negativ regulierte (induzierbare) Transkription, da ein Repressorprotein den Operator binden kann und dadurch die Transkription eines spezifischen Gens inhibiert. Eine konstitutive Expression kann in Abwesenheit von negativen Regulatorelementen, zum Beispiel dem Operator, erfolgen. Außerdem kann eine positive Regulierung durch eine Genaktivatorprotein-bindende Sequenz, welche, wenn sie vorliegt, üblicherweise proximal (5') zu der RNA-Polymerase-bindenden Sequenz ist, erreicht werden. Ein Beispiel für ein Genaktivatorprotein ist das Katabolit-Aktivatorprotein (CAP), das die Initiierung der Transkription des lac-Operons in *Escherichia coli* (*E. coli*) unterstützt [Raibaud et al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. Eine regulierte Expression kann daher positiv oder negativ sein, wodurch die Transkription entweder verstärkt oder verringert wird.

[0091] Sequenzen, die für Enzyme des Stoffwechsels codieren, liefern besonders nützliche Promotorsequenzen. Beispiele umfassen Promotorsequenzen, die von zuckermetabolisierenden Enzymen, zum Beispiel Galactose, Lactose (lac) [Chang et al. (1977) *Nature* 198:1056] und Maltose, abgeleitet sind. Zusätzliche Beispiele umfassen Promotorsequenzen, die von Biosyntheseenzymen wie Tryptophan (trp) [Goeddel et al. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton et al. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; US 4 738 921; EPO-Pub. Nrn. 036 776 und 121 775] abgeleitet sind. Das g-Laotamase (bla)-Promotorsystem [Weissmann (1981) „The cloning of interferon and other mistakes“, in *Interferon 3* (Herausg. I. Gresser)], Bakteriophagen-Lambda-PL [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128] und TS [US 4 689 406]-Promotorsysteme liefern ebenfalls einsetzbare Promotorsequenzen.

[0092] Zusätzlich fungieren auch synthetische Promotoren, die in der Natur nicht auftreten, als bakterielle Promotoren. Beispielsweise können Transkriptionsaktivierungssequenzen eines bakteriellen Promotors oder eines Bakteriophagen-Promotors mit den Operonsequenzen eines anderen bakteriellen Promotors oder Bakteriophagen-Promotors verknüpft werden, wodurch ein synthetischer Hybridpromotor gebildet wird [US-Patent Nr. 4 551 433]. Beispielsweise ist der tac-Promotor ein Hybrid-trp-lac-Promotor, der sowohl aus trp-Promotor- als auch lac-Operon-Sequenzen besteht und durch den lac-Repressor reguliert wird [Amann et al. (1983) *Gene* 25:167; de Boer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21]. Darüber hinaus kann ein bakterieller Promotor natürlich vorkommende Promotoren nicht-bakteriellen Ursprungs enthalten, welche die Fähigkeit haben, bakterielle RNA-Polymerase zu binden und die Transkription zu initiieren. Ein natürlich vorkommender Promotor nicht-bakteriellen Ursprungs kann auch mit einer kompatiblen RNA-Polymerase verknüpft werden, um hohe Expressionslevel einiger Gene in Prokaryoten zu erzeugen. Das Bakteriophage-T7-RNA-Polymerase/Promotor-System ist ein Beispiel für ein gekoppeltes Promotorsystem [Studier et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1074]. Außerdem kann ein Hybridpromotor auch aus einem Bakteriophagen-Promotor und einer *E. coli*-Operatorregion bestehen (EPO-Pub. Nr. 267 851).

[0093] Zusätzlich zu einer funktionierenden Promotorsequenz ist auch eine effiziente Ribosomenbindungsstelle zur Expression von Fremdgenen in Prokaryoten einsetzbar. In *E. coli* wird die Ribosomenbindungsstelle als die Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz bezeichnet und umfasst ein Initiationscodon (ATG) und eine Sequenz mit einer Länge von 3–9 Nukleotiden, die 3–11 Nukleotide stromaufwärts des Initiationscodons lokalisiert ist [Shine et al. (1975) *Nature* 254:34]. Es wird davon ausgegangen, dass die

SD-Sequenz eine Bindung der mRNA an das Ribosom über die Basenpaarung zwischen der SD-Sequenz und den 3' und *E. coli*-16S-rRNA begünstigt [Steitz et al. (1979) „Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA“ in *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (Herausg. R.F. Goldberger)], um eukaryotische Gene und prokaryotische Gene mit schwacher Ribosomenbindungsstelle zu exprimieren [Sambrook et al. (1989) „Expression of cloned genes in *Escherichia coli*“ in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

[0094] Ein DNA-Molekül kann intrazellulär exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft sein, wobei in diesem Fall die erste Aminosäure am N-Terminus immer ein Methionin sein wird, welches durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn es gewünscht wird, kann das Methionin am N-Terminus durch Invitro-Inkubation mit Bromcyan oder entweder durch Invivo- oder Invitro-Inkubation mit einer bakteriellen Methionin-N-Terminus-Peptidase vom Protein abgespalten werden (EPO-Pub. Nr. 219 237).

[0095] Fusionsproteine stellen eine Alternative zur direkten Expression dar. Typischerweise wird eine DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Teil eines endogenen bakteriellen Proteins oder eines anderen stabilen Proteins codiert, an das 5'-Ende der heterologen codierenden Sequenzen fusioniert. Bei Expression wird dieses Konstrukt eine Fusion der zwei Aminosäuresequenzen liefern. Beispielsweise kann das Bakteriophage-Lambda-Zellgen mit dem 5'-Terminus eines Fremdgens verknüpft werden und in Bakterien exprimiert werden. Das resultierende Fusionsprotein behält vorzugsweise eine Stelle für ein Processing-Enzym (Faktor Xa) zurück, um das Bakteriophagen-Protein vom Fremdgen abzuspalten [Nagai et al. (1984) *Nature* 309:810]. Fusionsproteine können auch mit Sequenzen aus lacZ- [Jia et al. (1987) *Gene* 60:197]; trpE- [Allen et al. (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff et al. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11] und Chey-Genen [EPO-Pub. Nr. 324 647] hergestellt werden. Die DNA-Sequenz an der Verknüpfung der zwei Aminosäuresequenzen kann für eine spaltbare Stelle codieren oder nicht. Ein anderes Beispiel ist ein Ubiquitin-Fusionsprotein. Ein derartiges Fusionsprotein wird mit der Ubiquitin-Region hergestellt, die vorzugsweise eine Stelle für ein Processing-Enzym zurückbehält (zum Beispiel Ubiquitin-spezifische Processing-Protease), um das Ubiquitin vom Fremdprotein abzuspalten. Durch dieses Verfahren kann natives Fremdprotein isoliert werden [Miller et al. (1989) *Bio/Technology* 7:698].

[0096] Alternativ können Fremdproteine auch aus der Zelle sezerniert werden, indem chimäre DNA-Moleküle erzeugt werden, die für ein Fusionsprotein codieren, das aus einem Signalpeptidsequenzfragment besteht, welches für die Sekretion des Fremdproteins

in Bakterien sorgt [US 4 336 336]. Das Signalsequenzfragment codiert typischerweise für ein Signalpeptid, das aus hydrophoben Aminosäuren besteht, die die Sekretion des Proteins aus der Zelle steuern. Das Protein wird entweder in das Wachstumsmedium (gram-positive Bakterien) oder in den periplasmatischen Raum, der sich zwischen der inneren und äußeren Membran der Zelle befindet (gramnegative Bakterien) sezerniert. Es gibt vorzugsweise Processing-Stellen, die entweder in vivo oder in vitro abgespalten werden können und die zwischen dem Signalpeptidfragment und dem Fremdggen codiert werden.

[0097] DNA codierende geeignete Signalsequenzen können aus Genen für sezernierte Bakterienproteine stammen, zum Beispiel das E. coli-Gen für das äußere Membranprotein (ompA) [Masui et al. (1983), in: Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghayeb et al. (1984) EMBO J. 3:2437] und die E. coli-Sequenz für die alkalische Phosphatase-Signalsequenz (phoA) [OKA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212]. Als weiteres Beispiel kann die Signalsequenz des Alpha-Amylase-Gens aus verschiedenen Bacillus-Stämmen verwendet werden, um heterologe Proteine aus B. subtilis zu sezernieren [Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EPO-Pub. Nr. 244 042].

[0098] Typischerweise sind Transkriptionsterminationssequenzen, die von Bakterien erkannt werden, regulatorische Regionen, die 3' zum Translationsstoppcodon liegen und somit zusammen mit dem Promotor die kodierende Sequenz flankieren. Diese Sequenzen steuern die Transkription einer mRNA, die in das durch die DNA codierte Polypeptid translatiert werden kann. Transkriptionsterminationssequenzen umfassen häufig DNA-Sequenzen aus etwa 50 Nukleotiden, die fähig sind, „stem loop“-Strukturen zu bilden, die eine Transkriptionsterminierung unterstützen. Beispiele umfassen Transkriptionsterminationssequenzen, die von Genen mit starken Promotoren, zum Beispiel das trp-Gen in E. coli, wie auch von anderen biosynthetischen Genen stammen.

[0099] Typischerweise werden die oben beschriebenen Komponenten, die einen Promotor, eine Signalsequenz (wenn erwünscht), eine codierende Sequenz von Interesse und eine Transkriptionsterminationssequenz umfassen, zu Expressionskonstrukten kombiniert. Expressionskonstrukte werden oft in einem Replikon gehalten, beispielsweise in einem extrachromosomalen Element (zum Beispiel Plasmide), das zu einer stabilen Haltung in einem Wirt wie einem Bakterium fähig ist. Das Replikon wird ein Replikationssystem haben, wodurch es möglich wird, dass es in einem prokaryotischen Wirt gehalten werden kann, und zwar entweder zur Expression oder zur Klonierung und Amplifikation. Ein Replikon kann außerdem ein Plasmid mit hoher oder niedriger Kopienzahl sein.

Ein Plasmid mit hoher Kopienzahl wird im Allgemeinen eine Kopienzahl im Bereich von etwa 5 bis etwa 200 und typischerweise etwa 10 bis etwa 150 haben. Ein Wirt, der ein Plasmid mit hoher Kopienzahl enthält, wird vorzugsweise mindestens etwa 10 und bevorzugter mindestens etwa 20 Plasmide enthalten. Es kann ein Vektor mit hoher oder niedriger Kopienzahl ausgewählt werden, was von der Wirkung des Vektors und des Fremdproteins auf den Wert abhängt.

[0100] Alternativ können die Expressionskonstrukte mit einem integrierenden Vektor in das Bakteriengenom integriert werden. Integrierende Vektoren enthalten typischerweise mindestens eine Sequenz, die zum bakteriellen Chromosom homolog ist, die eine Integration des Vektors ermöglicht. Integrationen scheinen das Resultat aus Rekombinationen zwischen homologer DNA in dem Vektor und dem bakteriellen Chromosom zu sein. Beispielsweise integrieren integrierende Vektoren, die mit DNA aus verschiedenen Bacillus-Stämmen konstruiert sind, eine Integration in das Bacillus-Chromosom (EPO-Pub. Nr. 172 328). Integrierende Vektoren können auch aus Bakteriophagen- oder Transposon-Sequenzen bestehen.

[0101] Typischerweise können extrachromosomale und integrierende Expressionskonstrukte selektierbare Marker enthalten, um für die Selektion von Bakterienstämmen zu sorgen, die transformiert wurden. Selektierbare Marker können im bakteriellen Wirt exprimiert werden und können Gene umfassen, die Bakterien gegenüber Arzneimitteln wie Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin (Neomycin) und Tetracyclin resistent machen [Davies et al. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]. Selektierbare Marker können auch biosynthetische Gene umfassen, zum Beispiel die in Histidin-, Tryptophan- und Leucin-Biosynthesewegen.

[0102] Alternativ können einige der oben beschriebenen Komponenten zusammen in Transformationsvektoren angeordnet werden. Transformationsvektoren bestehen typischerweise aus einem selektierbaren Marker, der entweder in einem Replikon gehalten wird oder zu einem integrierenden Vektor entwickelt wird, wie es oben beschrieben wurde.

[0103] Expressions- und Transformationsvektoren, entweder extrachromosomale Replikons oder integrierende Vektoren, wurden zur Transformation in viele Bakterien entwickelt. So wurden beispielsweise Expressionsvektoren inter alia für die folgenden Bakterien entwickelt: Bacillus subtilis [Plava et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EPO-Pub. Nrn. 036 259 und 063 953; PCT WO 84/04541]; Escherichia coli [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128; Amann et al. (1985) Gene 40:183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; EPO-Pub. Nrn. 036 776,

136 829 und 136 907]; *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]; *Streptomyces lividans* [US 4 745 056].

[0104] Methoden zur Einführung von exogener DNA in Bakterienwirte sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und umfassen typischerweise entweder die Transformation von Bakterien, die mit CaCl_2 oder anderen Agentien wie zweiwertigen Kationen und DMSO behandelt wurden. DNA kann auch durch Elektroporation in Bakterienzellen eingeführt werden. Transformationsverfahren variieren üblicherweise mit der Bakterienspezies, die zu transformieren ist. Siehe zum Beispiel [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EPO-Pub. Nrn. 036 259 und 063 953; PCT-Publikation Nr. WO 84/04541; *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*]; [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) „An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids“, in Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (Herausg. H.W. Boyer und S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*]; [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al (1988) Anal. Biochem. 170:38; *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*]; [Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) „Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, in: Streptococcal Genetics (Herausg. J. Ferretti und R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*];

iv. Hefeexpression

[0105] Hefeexpressionssysteme sind einem Fachmann auf dem Fachgebiet bekannt. Ein Hefepromotor ist irgendeine DNA-Sequenz, die fähig ist, Hefe-RNA-Polymerase zu binden und die stromabwärts erfolgende (3') Transkription einer codierenden Sequenz (zum Beispiel Strukturgen) in mRNA zu initiieren. Ein Promotor wird eine Transkriptionsinitiationsregion haben, die üblicherweise proximal zum 5'-Ende der codierenden Sequenz liegt. Diese Transkriptionsinitiationsregion umfasst typischerweise eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle (die „TATA-Box“) und eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ein Hefepromotor kann auch eine zweite Domäne haben, die Upstream-Aktivator-Sequenz (UAS) genannt wird, die, wenn sie vorliegt, üblicherweise distal zum Strukturgen ist. Die UAS erlaubt eine regulierte (induzier-

bare) Expression. Eine konstitutive Expression erfolgt in Abwesenheit einer UAS. Eine regulierte Expression kann entweder positiv oder negativ sein, wodurch eine Transkription entweder verstärkt oder verringert wird.

[0106] Hefe ist ein fermentierender Organismus mit einem aktiven Stoffwechselweg; daher liefern Sequenzen, die Enzyme im Stoffwechselweg codieren, besonders nützliche Promotorsequenzen. Beispiele umfassen Alkoholdehydrogenase (ADH) (EPO-Pub. Nr. 284 044), Enolase, Glucokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAP oder GAPDH), Hexokinase, Phosphofructokinase, 3-Phosphoglyceratmutase und Pyruvatkinase (PyK) (EPO-Pub. Nr. 329 203). Das Hefe-PHO5-Gen, das für saure Phosphatase codiert, liefert ebenfalls nützliche Promotorsequenzen [Myoanohara et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1].

[0107] Zusätzlich können auch synthetische Promotoren, die in der Natur nicht auftreten, als Hefepromotoren fungieren. Beispielsweise können UAS-Sequenzen eines Hefepromotors mit der Transkriptionsaktivierungsregion eines anderen Hefepromotors verknüpft werden, wodurch ein synthetischer Hybridpromotor geschaffen wird. Beispiele für solche Hybridpromotoren umfassen die ADH-Regulationssequenz, die an die GAP-Transkriptionsaktivierungsregion gebunden ist (US 4 876 197 und US 4 880 734). Andere Beispiele für Hybridpromotoren umfassen Promotoren, die aus den Regulationssequenzen jedes der ADH2-, GAL4-, GAL10- oder PHO5-Gene, kombiniert mit der Transkriptionsaktivierungsregion eines glycolytischen Enzymgens, zum Beispiel GAP oder PyK, bestehen (EPO-Pub. Nr. 164 556). Darüber hinaus kann ein Hefepromotor natürlich auftretende Promotoren mit Nicht-Hefeursprung umfassen, welche die Fähigkeit haben, Hefe-RNA-Polymerase zu binden und eine Transkription zu initiieren. Beispiele für solche Promotoren umfassen inter alia [Cohen et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff et al. (1981) Nature 283:835; Hollenberg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg et al. (1979) „The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*“, in: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (Herausg. K.N. Timmis und A. Puhler); Mercerau-Puigalon et al. (1980) Gene 11:163; Panthier et al. (1980) Curr. Genet 2:109].

[0108] Ein DNA-Molekül kann intrazellulär in Hefe exprimiert werden. Eine Promotorsequenz kann direkt mit dem DNA-Molekül verknüpft sein, wobei in diesem Fall die erste Aminosäure am N-Terminus des rekombinanten Proteins immer Methionin sein wird, welches durch das ATG-Startcodon codiert wird. Wenn es gewünscht wird, kann Methionin am

N-Terminus durch in vitro-Inkubation mit Bromcyan vom Protein abgespalten werden.

[0109] Fusionsproteine liefern eine Alternative für Hefeexpressionssysteme wie auch für Säuger-, Baculovirus- und Bakterienexpressionssysteme. Typischerweise wird eine DNA-Sequenz, die für den N-terminalen Teil eines endogenen Hefeproteins oder ein anderes stabiles Protein codiert, an das 5'-Ende heterologer codierender Sequenzen fusioniert. Nach Expression wird dieses Konstrukt eine Fusion der zwei Aminosäuresequenzen liefern. Beispielsweise kann das Hefe- oder humane Superoxid-dismutase (SOD)-Gen am 5'-Terminus eines Fremdgens gebunden sein und in Hefe exprimiert werden. Die DNA-Sequenz an der Verknüpfung der zwei Aminosäuresequenzen kann für eine spaltbare Stelle codieren oder nicht. Siehe zum Beispiel EPO-Pub. Nr. 196 056. Ein anderes Beispiel ist ein Ubiquitin-Fusionsprotein. Ein derartiges Fusionsprotein wird mit der Ubiquitinregion hergestellt, die vorzugsweise eine Stelle für ein Processing-Enzym (zum Beispiel Ubiquitin-spezifische Processing-Protease) beibehält, um das Ubiquitin vom Fremdprotein abzuspalten. Durch dieses Verfahren kann daher natives Fremdprotein isoliert werden (siehe zum Beispiel PCT-Publ. Nr. WO 88/024066).

[0110] Alternativ können Fremdproteine auch aus der Zelle in das Wachstumsmedium sezerniert werden, indem chimäre DNA-Moleküle gebildet werden, die für ein Fusionsprotein codieren, das ein Leadersequenzfragment umfasst, das für eine Sekretion des Fremdproteins in Hefe sorgt. Vorzugsweise gibt es Processingstellen, die zwischen dem Leaderfragment und dem Fremdgen codiert werden und die entweder in vivo oder in vitro gespalten werden können. Das Leadersequenzfragment codiert typischerweise für sein Signalpeptid, das hydrophobe Aminosäure umfasst, die die Sekretion des Proteins aus der Zelle steuern.

[0111] DNA, die für geeignete Signalsequenzen codiert, kann von Genen fair sezernierte Hefeproteine abgeleitet sein, zum Beispiel das Hefe-Invertasegen (EPO-Pub. Nr. 012 873; JPO-Pub. Nr. 62 096 086) und das A-Faktor-Gen (US 4 588 684). Alternativ existieren Leader eines Nicht-Hefeursprungs, zum Beispiel ein Interferon-Leader, der auch für eine Sekretion in Hefe sorgt (EPO Pub. Nr. 060 057).

[0112] Eine bevorzugte Klasse von Sekretionsleadern sind die, die ein Fragment des Hefe-Alpha-Faktor-Gens verwenden, das sowohl eine „pre“-Signalsequenz als auch eine „pro“-Region enthält. Die Typen von Alpha-Faktor-Fragmenten, die verwendet werden können, umfassen den Vollängen-pre-pro-Alpha-Faktor-Leader (etwa 83 Aminosäurereste) wie auch gekürzte Alpha-Faktor-Leader (typischerweise etwa 25 bis etwa 50 Aminosäureres-

te) (US 4 546 083 und US 4 870 008; EPO-Publ. Nr. 324 274). Zusätzliche Leader, die ein Alpha-Faktor-Leaderfragment verwenden, welches für eine Sekretion sorgt, umfassen Hybrid-Alpha-Faktor-Leader, die mit einer Presequenz, einer ersten Hefe, aber einer Proregion aus einem zweiten Hefe-Alpha-Faktor hergestellt sind. Siehe zum Beispiel PCT Publ. Nr. WO 89/02463.

[0113] Typischerweise sind Transkriptionsterminationssequenzen, die durch Hefe erkannt werden, regulatorische Regionen, die 3' zum Translationsstoppcodon liegen und damit zusammen mit dem Promotor die codierende Sequenz flankieren. Diese Sequenzen steuern die Transkription einer mRNA, die in das durch die DNA codierte Polypeptid translatiert werden kann. Beispiele für die Transkriptionsterminatorsequenz und andere von Hefe erkannten Terminationssequenzen sind solche, die für glycolytische Enzyme codieren.

[0114] Typischerweise werden die oben beschriebenen Komponenten, die einen Promotor, einen Leader (wenn gewünscht), eine codierende Sequenz von Interesse und eine Transkriptionsterminationssequenz umfassen, zu Expressionskonstrukten kombiniert. Expressionskonstrukte werden oft in einem Replikon, zum Beispiel einem extrachromosomalen Element (beispielsweise Plasmide), die zur stabilen Haltung in einem Wirt, zum Beispiel Hefe oder Bakterien, geeignet sind, gehalten. Das Replikon kann zwei Replikationssysteme haben, was es ihm ermöglicht, zum Beispiel in Hefe zur Expression und in einem prokaryotischen Wirt zur Klonierung und Amplifizierung gehalten zu werden. Beispiele für solche Hefe-Bakterien-Shuttlevektoren umfassen Yep24 [Botstein et al. (1979) Gene 8:17–24]; pCI/1 [Brake et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642–4646] und YRp17 [Stinchcomb et al. (1982) J. Mol. Biol. 158:157]. Außerdem kann ein Replikon ein Plasmid entweder mit hoher oder mit niedriger Kopienzahl sein. Ein Plasmid mit hoher Kopienzahl wird im Allgemeinen eine Kopienzahl im Bereich von etwa 5 bis etwa 200 und typischerweise etwa 10 bis etwa 150 haben. Ein Wirt, der ein Plasmid mit hoher Kopienzahl enthält, wird vorzugsweise mindestens etwa 10 und bevorzugter mindestens etwa 20 haben. In Abhängigkeit von der Wirkung des Vektors und des Fremdproteins auf den Wirt kann entweder ein Vektor mit hoher oder mit niedriger Kopienzahl ausgewählt werden. Siehe zum Beispiel Brake et al., oben.

[0115] Alternativ können die Expressionskonstrukte durch einen integrierenden Vektor in das Hefegenom integriert werden. Integrierende Vektoren enthalten typischerweise mindestens eine Sequenz, die zum Hefechromosom homolog ist, die den Vektor integrieren lässt, und enthalten vorzugsweise zwei homologe Sequenzen, die das Expressionskonstrukt flankieren. Eine Integration scheint das Resultat von Re-

kombinationen zwischen homologer DNA im Vektor und im Hefechromosom zu sein [Orr-Weaver et al. (1983) *Methods in Enzymol.* 101:228–245]. Ein integrierender Vektor kann auf einen spezifischen Ort in Hefe gerichtet werden, indem die geeignete homologe Sequenz zum Einschluss in den Vektor selektiert wird. Siehe Orr-Weaver et al., oben. Ein Expressionskonstrukt oder mehrere Expressionskonstrukte können integrieren, wobei möglicherweise die Level an rekombinantem Protein, das produziert wird, beeinträchtigt werden [Rine et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6750]. Die in dem Vektor enthaltenen chromosomalen Sequenzen können entweder als Einzelsegment im Vektor auftreten, was zu einer Integration des ganzen Vektors führt, oder können als zwei Segmente auftreten, die homolog zu angrenzenden Segmenten im Chromosom sind und das Expressionskonstrukt im Vektor flankieren, was zu einer stabilen Integration nur des Expressionskonstrukts führen kann.

[0116] Typischerweise können extrachromosomale und integrierende Expressionskonstrukte selektierbare Marker enthalten, um so die Selektion von Hefestämmen, die transformiert wurden, zu ermöglichen. Selektierbare Marker können biosynthetische Gene umfassen, die im Hefewirt exprimiert werden können, zum Beispiel ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 und ALG7, und das G418-Resistenzgen, das den Hefezellen Resistenz gegenüber Tunicamycin bzw. G418 verleiht. Außerdem kann ein geeigneter selektierbarer Marker auch Hefe mit der Fähigkeit ausstatten, in Gegenwart von toxischen Verbindungen wie zum Beispiel Metall zu wachsen. Beispielsweise erlaubt das Vorliegen von CUP1 Hefen, in Gegenwart von Kupferionen zu wachsen [Butt et al. (1987) *Microbiol. Rev.* 51:351].

[0117] Alternativ können einige der oben beschriebenen Komponenten zusammen in Transformationsvektoren kombiniert werden. Transformationsvektoren enthalten typischerweise einen selektierbaren Marker, der entweder in einem Replikon gehalten wird, oder zu einem integrierenden Vektor entwickelt wird, wie es oben beschrieben ist.

[0118] Expressions- und Transformationsvektoren, entweder extrachromosomale Replikons oder integrierende Vektoren, wurden zur Transformation in viele Hefen entwickelt. Beispielsweise wurden Expressionsvektoren inter alia für die folgenden Hefen entwickelt: *Candida albicans* [Kurtz et al. (1986) *Mol. Cell Biol.* 6:142]; *Candida maltosa* [Kurze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141]; *Hansenula polymorpha* [Gleeson et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132–3459; Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302]; *Kluyveromyces fragilis* [Das et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165]; *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 737; Van den Berg et al. (1990) *Bio/Technology* 8:135]; *Pi-*

chia guilliermondii [Kurze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141]; *Pichia pastoris* [Gregg et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3376; US 4 837 148 und US 4 929 555]; *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163]; *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706] und *Yarrowia lipolytica* [Davidow et al. (1985) *Cum. Genet.* 10:380–471; Gaillardin et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49].

[0119] Verfahren zur Einführung exogener DNA in Hefewirte sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen typischerweise entweder die Transformation von Sphäroblasten oder intakten Hefezellen, die mit Alkalikationen behandelt worden waren. Die Transformationsverfahren variieren üblicherweise mit der zu transformierenden Hefespezies. Siehe zum Beispiel [Kurtz et al. (1986) *Mol. Cell Biol.* 6:142; Kurze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141, *Candida*]; [Gleeson et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132–34599; Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302, *Hansenula*]; [Das et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158 :1165; De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 1165; Van den Berg et al. (1990) *Bio/Technology* 8:135, *Kluyveromyces*]; *Pichia guilliermondii* [Gregg et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3376; Kurze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; US 4 837 148 und US 4 929 555, *Pichia*]; [Hinnen et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163, *Saccharomyces*]; [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706, *Schizosaccharomyces*]; [Davidow et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:380–471; Gaillardin et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49, *Yarrowia*].

[0120] In der vorliegenden Erfindung können selektierbare Marker, ein Replikationsursprung und homologe Wirtszellsequenzen in einem Expressionsvektor eingeschlossen sein. Ein selektierbarer Marker kann verwendet werden, um Wirtszellen durchzumustern, die möglicherweise den Expressionsvektor enthalten. Solche Marker umfassen die, die die Wirtszelle gegenüber Arzneimitteln wie Ampicillin, Chloramphenicol, Erythromycin, Neomycin und Tetracyclin resistent machen. Marker können auch Biosynthesegene enthalten, wie zum Beispiel solche im Histidin-, Tryptophan- und Leucin-Stoffwechselweg, die zum Wachstum der Wirtszelle benötigt werden. Wenn demnach eine leu(–)-Wirtszelle als Empfänger bei der Transformation mit einem Expressionsvektor verwendet wird und Leucin im Medium fehlt, werden nur die Zellen überleben, die ein Plasmid mit einem leu(+)-Gen tragen.

[0121] In der vorliegenden Erfindung kann ein Replikationsursprung in einen Expressionsvektor eingebaut werden, um eine autonome Replikation in der Wirtszelle zu ermöglichen. Ein derartiger Replikationsursprung beinhaltet die, die es ermöglichen, dass ein Expressionsvektor bei einer hohen Kopienzahl in

Gegenwart der geeigneten Proteine innerhalb der Zelle reproduziert wird, zum Beispiel die 2 μ und autonom replizierenden Sequenzen, die in Hefe wirksam sind, und den Replikationsursprung des viralen T-Antigens, der in COS-7-Zellen wirksam ist.

[0122] Zum Zweck der vorliegenden Erfindung können Expressionsvektoren entweder in das Wirtszellgenom integriert werden oder können innerhalb der Zelle autonom bleiben. Zur Integration in das Wirtszellgenom kann der Expressionsvektor hierin Polynukleotidsequenzen umfassen, die zu Sequenzen innerhalb des Wirtszellgenoms homolog sind. Die homologen Sequenzen müssen nicht mit dem Expressionsvektor verknüpft werden. Beispielsweise können Expressionsvektoren über ein nicht gebundenes Dihydrofolatreduktasegen in das CHO-Genom integriert werden. Bei Hefe ist es bevorzugt, dass die homologen Sequenzen die Expressionskassette flankieren. Besonders nützliche homologe Hefegenomsequenzen für die vorliegende Erfindung sind die, die in PCT WO 90/01800 offenbart sind und die HIS4-Gen-Sequenzen, die in Genbank, Eingangsnummer J01331, beschrieben sind.

[0123] Die Auswahl von Promotor, Terminator und anderen optionalen Elementen eines Expressionsvektors wird auch von der gewählten Wirtszelle abhängen, was dem Fachmann bekannt ist. Die vorliegende Erfindung ist von der ausgewählten Wirtszelle nicht abhängig. Die Zweckdienlichkeit und der gewünschte Level der Proteinexpression wird die optimale Wirtszelle diktieren. Auf dem Fachgebiet sind eine Vielzahl von Wirten zur Expression bekannt und von der American Type Culture Collection (ATCC) verfügbar.

[0124] Bakterielle Wirte, die hierin zur Expression des KGF-Fragments geeignet sind, umfassen zum Beispiel: *Campylobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* und *Streptococcus*. Hefewirte aus den folgenden Gattungen können verwendet werden: *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* und *Yarrowia*. Immortalisierte Säugerkzellen, die als Wirte hierin verwendet werden können, umfassen CHO-Zellen, HeLa-Zellen, Babyhamsterlinien („BHK“-Zellen, Affennierenzellen („COS“) und humane hepatozelluläre Karzinomzellen, zum Beispiel Hep G2. Zur Expression des KGF-Fragments ist auch eine Reihe von Insektenzellwirten geeignet; diese umfassen: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* und *Spodoptera frugiperda*, wie sie in PCT WO 89/046699; Carbonell et al., *J. Virol.* 56:153 (1985); Wright, *Nature* 321:718 (1986); Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:2156 (1983) und allgemein Fraser et al., *in vitro Cell Dev. Biol.* 25:225 (1989) beschrieben sind.

[0125] Der Expressionsvektor, der das KGF-Frag-

ment enthält, wird in die Wirtszelle inseriert. Zum Insertieren von Expressionsvektoren in die Wirtszellen können beliebige Transformationstechniken, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, eingesetzt werden. Beispielsweise umfasst eine Transformation von bakteriellen Wirten typischerweise zunächst Behandeln der Bakterien mit entweder CaCl₂ oder anderen Agentien, wie zum Beispiel zweiwertigen Kationen und DMSO und ermöglichen, dass die exogene DNA in die behandelten Bakterienzellen eingeführt wird. DNA kann auch durch Elektroporation oder virale Infektion in Bakterienzellen eingeführt werden. Transformationsverfahren für bakterielle Wirte, die hierin verwendet werden können, umfassen die, die beschrieben sind: Masson et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 60:273 (1989); Palva et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582 (1982); EP-Publ. Nrn. 036 259 und 063 953; PCT WO 84/04541, *Bacillus*) Miller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:856 (1988); Wang et al., *J. Bacteriol.* 172:949 (1990), *Campylobacter*, Cohen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110 (1973); Dower et al., *Nucleic Acids Res.* 16:6127 (1988); Kushner "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids" in *Genetic Engineering; Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (Herausg. H.W. Boyer und S. Nicosia) (1978); Mandel et al., *J. Mol. Biol.* 53:159 (1970); Taketo *Biochim. Biophys. Acta* 949:318 (1988); *Escherichia*, Chassy et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173 (1987), *Lactobacillus*; Fiedler et al. *Anal. Biochem.* 170:38 (1988), *Pseudomonas*; Augustin et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 66:203 (1990), *Staphylococcus*, Barany et al., *J. Bacteriol.* 144:698 (1980); Harlander "Transformation of *Streptococcus lactis* by elektroporation", in *Streptococcal Genetics* (Herausg. J. Ferretti und R. Curtiss III) (1987); Perry et al., *Infec. Immun.* 32:1295 (1981); Powell et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655 (1988); Somkuti et al., *Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology* 1:412 (1987), *Streptococcus*.

[0126] Transformationsverfahren für Hefewirte sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und umfassen typischerweise eine Transformation entweder von Sphäroblasten oder intakten Hefezellen, die mit Alkalikationen behandelt worden waren. Hefewirte können auch durch Elektroporation transformiert werden, wie es in *Methods in Enzymology*, Band 194, 1991, „Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology“ beschrieben ist. Für die vorliegende Erfindung variiert das anzuwendende Transformationsverfahren mit den zu transformierenden Hefespezies und umfasst die, die in den folgenden Literaturstellen beschrieben sind: Kurtz et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:142 (1986); Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* 25:141 (1985); *Candida*; Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986); Roggenkamp et al., *Mol. Gen. Genet.* 202:302 (1986); *Hansenula*; Das et al., *J. Bacteriol.* 158:1165 (1984); De Louvencourt et al., *J. Bacteriol.* 154:1165 (1983); Van den Berg et al., *Bio/Tech-*

nology 8:135 (1990); Kluyveromyces; Cregg et al., Mol. Cell Biol. 5:3376 (1985); Kunze et al., J. Basic. Microbiol. 25:141 (1985); US-Patent Nrn. 4 837 148 und US 4 929 555; Pichia; Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978); Ito et al., J. Bacteriol. 153:163 (1983); Saccharomyces; Beach and Nurse, Nature 300:706 (1981); Schizosaccharomyces; Davidow et al., Curr. Genet. 10:39 (1985); Gaillardin et al., Curr. Genet. 10:49 (1985); Yarrowia.

[0127] Verfahren zur Einführung heterologer Polynukleotide in Säugerzellen sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen zum Beispiel eine virale Infektion, eine Dextran-vermittelte Transfektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Polybren-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, Einkapselung des Polynukleotids (der Polynukleotide) in Liposomen und eine direkte Mikroinjektion der DNA in Kerne.

[0128] Methoden zur Einführung heterologer DNA in das Baculovirus-Virus unter Bildung eines Expressionsvektors und zur Transformation einer Insektenwirtszelle sind auf dem Fachgebiet ebenfalls bekannt und in Smith et al., Mol. Cell. Biol. 3:2156 (1983) und Lucklow und Summers, Virology 17:31 (1989) beschrieben. Die KGF-Fragment-DNA kann zum Beispiel durch homologe Doppel-Crossover-Rekombination in das Polyhedrongen inseriert werden. Eine Insertion kann auch an einer Restriktionsenzymstelle, die entwickelt wurde, in das gewünschte Baculovirusgen erfolgen, wie es in Miller et al., Bioessays 4:91 (1989) beschrieben ist. Die DNA-Sequenz des KGF-Fragments wird, wenn sie anstelle des Polyhedrongens im Expressionsvektor kloniert ist, sowohl 5' als auch 3' durch Polyhedron-spezifische Sequenzen flankiert und ist stromabwärts des Polyhedronpromotors positioniert.

[0129] In der erfindungsgemäßen Ausführungsform kann der neu gebildete Baculovirus-Expressionsvektor anschließend in ein infektiöses rekombinantes Baculovirus verpackt werden. Im Baculovirus-Expressionssystem tritt eine homologe Rekombination mit niedriger Frequenz zwischen etwa 1% und etwa 5% auf. Somit ist die Mehrzahl der nach Transfektion produzierten Viren noch Wildtyp-Virus. Rekombinante Viren können allerdings nach bekannten Verfahren identifiziert werden. Beispielsweise produziert das native Virus Polyhedronprotein in den Nuklei infizierter Zellen während einer späten Stufe der viralen Infektion mit sehr hohen Konzentrationen. Akkumuliertes Polyhedronprotein bildet Okklusionskörper, die auch eingebettete virale Partikel enthalten. Diese Okklusionskörper mit einer Größe bis zu 15 µm sind in hohem Maße refraktil, was ihnen ein hell glänzendes Aussehen gibt, das unter dem Lichtmikroskop leicht sichtbar wird. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert sind, fehlen Okklusionskörper. Rekombinantes Virus und Wildtyp-Virus kann durch Plattieren des

Transfektionsüberstands oder Verdünnungen desselben auf eine Monolayer aus Insektenzellen durch Standardtechniken unterschieden werden. Die Plaques können dann unter dem Lichtmikroskop auf Vorliegen von Okklusionskörpern, was ein Hinweis für das Wildtyp-Virus ist, oder auf das Fehlen von Okklusionskörpern, was ein Hinweis für rekombinantes Virus ist, durchgemustert werden, wie es in „Current Protocols in Microbiology“, Bd. 2 (Ausubel et al., Herausg.) bei 16.8 (Erg. 10, 1990) beschrieben ist.

[0130] Immunoassays und Aktivitätsassays, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, können verwendet werden, um zu bestimmen, ob die transformierten Wirtszellen hierin das gewünschte KGF-Fragment exprimieren. Beispielsweise kann ein Immunfluoreszenzassay an den transformierten Wirtszellen ohne Abtrennen der KGF-Fragmente von der Zellmembran durchgeführt werden. In diesem Assay werden die Wirtszellen zuerst an einem festen Träger, wie zum Beispiel einem Mikroskop-Objektträger oder einer Mikrotitervertiefung, fixiert. Als nächstes werden die fixierten Wirtszellen einem Anti-KGF-Antikörper ausgesetzt. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Assays werden die fixierten Zellen vorzugsweise einem zweiten Antikörper ausgesetzt, der markiert ist und an den Anti-KGF-Antikörper bindet. Beispielsweise kann der sekundäre Antikörper mit einem fluoreszierenden Marker markiert sein. Die Wirtszellen, die die KGF-Fragmente exprimieren, werden fluoreszierend markiert sein und können unter dem Mikroskop sichtbar sein.

Beispiel 1

[0131] Eine humane KGF-cDNA wurde in ein Baculovirus-Expressionssystem inseriert, indem die cDNA in den Expressionsvektor pAcC13Pst/Not 1 kloniert wurde, wie es in [Fig. 1](#) gezeigt wird. Dieses Plasmid war von pAcC12 abgeleitet, wie es bei Munemitsu et al., Mol. Cell. Biol. 10:5977–5982 (1990) beschrieben ist.

[0132] Es wurden PCR-Oligonukleotid-Primer für den gekürzten 18 kD-KGF auf der Basis der verfügbaren N-terminalen Aminosäuresequenz von KGF entwickelt, wie es bei Finch et al., Science 2:752–755 (1989) beschrieben ist. Flankierende Restriktionsstellen (PstI und NotI) wurden in die Primer eingebaut, um eine Subklonierung in dem pAcC13-Expressionsvektor, ein Derivat des pVL941-Transfervektors, zu erleichtern, wie es in Luckow et al., Virology 170:31–39 (1989) und Quilliam et al., Mol. Cell. Biol. 10:2901–2908 (1990) beschrieben ist. Dieser Expressionsvektor wurde durch Insertion des KGF-codierenden Fragments in die PstI/NotI-Polylinkerstelle von pAcC13 konstruiert. Die KGF-cDNA codierte für die reife prozessierte Form von KGF, die aus 163 Aminosäureresten mit einer potenziellen N-Glycosylierungsstelle an den Resten 14 bis 16 besteht.

Herstellung von Konditionierungsmedium

[0133] *Spodoptera frugiperda*, Sf9-Insektenzellen, wurden mit Baculovirus, *Autographa californica*, das cDNA für KGF₁₋₁₆₃ enthält, infiziert. Nach Verdünnung auf $[X \times 10^x]$ Zellen/ml wurden die Zellen für 48 bis 72 h in Excell-400 in Abwesenheit von Serumergänzung, Antibiotika oder Fungiziden kultiviert. Kulturflüssigkeit wurde gesammelt und mit $10.000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert, um flottierende Zellen und anderes Zelldebris zu entfernen. Das Konditionierungsmedium wurde dann mit einem $0,8 \mu$ -Filter (Milipore) filtriert und etwa 5 Liter dieses Mediums wurden unter Verwendung eines Filtron-Kassetten-Systems (Omega-Membran) mit einer Molekulargewichtsausschlussgrenze von 3 kDa konzentriert.

[0134] Nach Konzentrierung wurde das konditionierte Medium aus den transfizierten Sf9-Zellen durch Zentrifugation mit $10.000 \times g$ für 20 Minuten gesammelt und das Medium wurde durch sequentielle Heparin-Sepharose („HS“-Affinitätschromatographie gereinigt. In einer Ausführungsform der Erfindung wurde etwa 1 Liter Sf9-Zellen-Konditionierungsmedium ultrafiltriert, um 200 ml Ultrafiltrationsretentat zu produzieren, wobei eine Omega-Membran (Filtron) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa verwendet wurde.

HSAC und Mono-S-Kationenaustausch-Chromatographie

[0135] Der Überstand wurde auf pH 7,2 eingestellt. Eine 30 ml-Probe wurde auf ein Heparin-Sepharose-Harz geladen, das in 10 mM Tris-HCl, pH 7,3, 150 mM NaCl äquilibriert worden war. Das Harz wurde dann ausgiebig mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Extinktion zur Basislinie zurückkehrte, und danach wurde stufenweise mit steigenden NaCl-Konzentrationen von 0,45 M bis 1 M und 2 M NaCl eluiert. Aliquots wurden zur Verwendung in Zellproliferationsassays aus den Fraktionen entfernt und 1 M NaCl-Fraktionen mit der höchsten Bioaktivität wurden gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden fünffach mit 10 mM Tris pH 7,2 (Endsalzkonzentration 0,2 M NaCl) verdünnt und die Probe wurde mit einer Superloop auf eine Mono-S-Säule aufgebracht, die mit einem FPLC-System (Pharmacia, Piscataway, NJ) verbunden war. Eine Elution wurde mit einem linearen Gradienten (10 mM Tris, pH 7,3, 0,2 M NaCl bis 10 mM Tris, pH 7,3, 1M NaCl) erreicht. Nach Fraktionierung wurden die Aliquots auf Bioaktivität getestet, die aktiven Fraktionen wurden gesammelt.

[0136] Das Retentat wurde auf pH 7,3 eingestellt und auf eine HS-Säule, die etwa 30 ml Bettvolumen enthielt, aufgebracht. Die Säule wurde für etwa 2 Stunden bei 4°C laufen gelassen. Die Säule wurde mit 150 ml Äquilibrierungspuffer, der 10 mM Tris-HCl und 0,15 M NaCl mit pH 7,3 enthielt, gewaschen. Das

zurückgehaltene Protein wurde mit 0,45 M NaCl und 1 M NaCl eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit der Säule wurde während der Elution auf etwa 90 ml/h eingestellt und es wurden 3 ml-Fraktionen gesammelt.

[0137] Die bioaktiven 1 M NaCl-Fraktionen der HS-Affinitätschromatographie-Schritte wurden gesammelt und 5-fach mit 10 mM Tris, pH 7,3, verdünnt und direkt auf eine Mono-S-HR-575-Säule (Pharmacia) aufgeladen. Die zurückgehaltenen Proteine wurden unter Verwendung eines Gradienten von 0,2 M NaCl bis 1 M NaCl eluiert. Bioassays der aktiven Fraktion wurden unter Verwendung der Balb-Mk-Zelllinie bestimmt. SDS-PAGE-Analyse der bioaktiven Proteinfractionen, die durch Mono-S-Kationenaustausch-Chromatographie isoliert worden waren, wurde durchgeführt. Die Fraktionen 37–39 und die Fraktionen 41–42 wurden gesammelt und 10 μ l-Aliquots wurden zu SDS und 10 mM DTT gegeben. Diese Proben wurde hitzedenaturiert und einer Elektrophorese in einem 12%-Polyacrylamidgel unterzogen, welches anschließend mit Silber gefärbt wurde. Es wurde ein ähnliches Migrationsmuster beobachtet, ganz gleich, ob die Proben in einer reduzierten Umgebung oder in einer nicht-reduzierten Umgebung laufen gelassen wurden. 25 kD war das scheinbare Molekulargewicht des Proteins, das in den Fraktionen 37–39 enthalten war, und 18 kD war das scheinbare Molekulargewicht des Proteins, das in den Fraktionen 41–42 enthalten war.

[0138] Das Chromatogramm der bioaktiven HS-Fraktion zeigt das Profil der Balb/Mk-Bioaktivität, die die Fraktionen 31 bis 47 abdeckt, was das Vorliegen von 2 Molekülspezies beweist, von denen eine mit 0,55 M NaCl eluiert und die andere mit 0,6 M NaCl eluiert.

KGF-Aktivitätsbestimmung

[0139] Das Vorliegen einer KGF-Aktivität in den erhaltenen Fraktionen wurde durch die Fähigkeit der Fraktionen, das Wachstum von BALB/C-Mk-Zellen zu fördern, bestimmt. Dazu wurden 10 μ l-Aliquots bestimmter Fraktionen in 1 ml 0,2 % Gelatine in phosphatgepufferter Salzlösung („PBS“) verdünnt und 10 μ l der verdünnten Fraktionen wurden auf Wachstum stimulierende Aktivität bei BALB/C-Mk-Zellen getestet, wobei die Zellen in Clusterplatten mit 12 Vertiefungen, die jeweils Vertiefungen mit 22 mm enthalten, mit 5×10^3 Zellen pro Vertiefung ausgesät wurden. Es wurde festgestellt, dass die gesamte KGF-Aktivität in der Säule zurückgehalten wurde und mit 1 M NaCl eluiert wurde.

[0140] Die bioaktiven KGF-Fraktionen, die mit 1 M NaCl von der HS-Säule eluiert wurden, wurden durch Kationenaustausch-FPLC-Säulenchromatographie weiter gereinigt. Diese Fraktionen wurden gesamt-

melt, 5-fach mit 10 mM Tris mit pH 7,3 verdünnt und direkt auf eine Mono-S HR-5/5-Säule von Pharmacia aufgebracht.

[0141] Das in der Mono-S HR-5/5-Säule zurückgehaltene Protein wurde mit einem Gradienten von 0,2 M NaCl bis 1 M NaCl eluiert. Die Bioaktivität der eluierten Fraktionen wurde, wie es oben beschrieben wurde, unter Verwendung von BALB/C-Mk-Zellen bestimmt. [Fig. 3](#) stellt das Aktivitätsprofil dar, das die Fraktionen 31 bis 47 abdeckt.

[0142] Im mitogenen Assay wurden 10^4 ABAE- und 5×10^3 ACE-Zellen pro Vertiefung in Clusterplatten mit 12 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro Vertiefung in einem 1 ml DMEM, ergänzt mit 10% Kälberserum und Antibiotika, wie es in Bohlen et al., EMBO 4:1951–1956 (1985) und Gospodarowicz et al., J. Cell. Physiol. 127:121–136 (1986) und Bellosa et al., J. Cell Biol. 121:705–713 (1993) beschrieben ist, ausgesät. Nach einer sechsständigen Inkubation wurde ein Satz aus dreifachen Vertiefungen trypsinisiert und die Zellen wurden gezählt, um die Plättierungseffizienz zum bestimmen. Zehn Mikroliter-Aliquots der geeigneten Verdünnung jeder Probe wurden dann in dreifacher Ausführungsform zu Vertiefungen in den Platten am Tag 0, Tag 2 und Tag 4 gegeben. Nach dem 5. Tag in Kultur wurden die Platten trypsinisiert und die Zelldichten wurden mit einem Coulter-Counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL) bestimmt.

[0143] Der Zusatz von KGF oder basischem FGF erfolgte am Tag 0 und jedem anderen Tag mit der angegebenen Konzentration. Nach 5 Tagen Kultur wurden die Zellen trypsinisiert und die Endzelldichte wurde mit einem Coulter-Counter bestimmt.

Elektrophorese (NaDodSO₄/PAGE)

[0144] Polyacrylamidgele wurden mit NaDodSO₄ nach dem Verfahren, wie es bei Laemmli et al., Nature 227:680–685 (1970) beschrieben ist, hergestellt. Proben wurden für 3 min in Gegenwart von 10 mM DTT gekocht und in einem 12%-Polyacrylamidgel der Elektrophorese unterworfen. Die Gele wurden fixiert und mit Silber gefärbt, wobei die Reagentien und das Protokoll von BioRad und so wie es in Merrill et al., Science 211:1437–1438 beschrieben ist, verwendet wurden. Geeignete Molekulargewichtsmarker waren von BioRad.

Zellproliferationsass

[0145] Die mitogene Aktivität von Säulenfraktionen und gereinigten Proben wurde unter Verwendung von Balb/Mk-Zellen als Zielzellen bestimmt. Stammkulturen wurden in modifiziertem Eagle-Medium mit geringer Calciumkonzentration, ergänzt mit 10% FCS, 50 µg/ml Gentamicin, 0,25 µg/ml Fungizon und

10 ng/ml aFGF, wie es in Gospodarowicz et al., J. Cell. Physiol. 142:325–333 beschrieben ist, wachsen gelassen und gehalten. Mitogene Assayzellen wurden in Clusterplatten mit 12 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^3 bis 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in 1 ml MEM mit niedrigem Calciumgehalt, ergänzt mit 10% FCS, wie es bei Gospodarowicz et al. ausgeführt ist, ausgesät. Probenzusätze und Endzelldichtebestimmungen erfolgten nach fünftägiger Kultur, wie bei Gospodarowicz et al. beschrieben.

[0146] Die mitogene Aktivität des gereinigten Endmaterials wurde an Aortaendothelialzellen von erwachsenen Rindern („ABAE“) und Kapillarendothelzellen des adrenalen Kortex („ACE-Zellen“) getestet, wie es bei Gospodarowicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 73:4120–4124 (1976) beschrieben ist. Stammkulturen wurden in Gegenwart von DMEM, ergänzt mit 10% CS, 50 µg/ml Gentamicin und 0,25 µg/ml, gehalten. Fungizon wurde wöchentlich auf gelatinisierten Gewebekulturplatten mit einem Aufspaltungsverhältnis von 1:10 durchgeführt.

[0147] Unter Verwendung der auf dem Fachgebiet bekannten Standardmethodologie wurde eine eindeutige Aminosäuresequenz für Position 1 bis 20 vom NH₂-Terminus des KGF_{des1–23} wie folgt geklärt: S₁YDM₃EGGDIRVRLFXRTQ

[0148] Die vorliegende Erfindung umfasst auch DNA-Segmente, die für KGF_{des1–23} codieren.

Proteinmikrosequenzierung

[0149] Zwei nominale 100 Picomol-Proben des KGF₁₆₃ und KGF_{des1–23} wurden durch Edman-Abbau und AA-Analyse nach Zentrifugationsadsorption an Polyvinylidendifluorid (PVDF, Applied Biosystems Biospin) analysiert. Die Proben wurden auf einen Applied Biosystems 477A-Gasphasen-Proteinsequensator aufgebracht. Es wurden zwanzig Runden Edman-Abbau durchgeführt, wobei Standardsoftware und Standardchemikalien, geliefert von Applied Biosystems, verwendet wurden; dann wurden die Identifizierung der PTH-Aminosäuren mit einer automatischen „On-line“-HPLC-Säule (Modell 120A, Applied Biosystems) durchgeführt.

Patentansprüche

1. Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz hat, die den Aminosäureresten 24–163 des reifen, Voll-längen-Keratinocytenwachstumsfaktors (KGF) entspricht.

2. Polypeptid nach Anspruch 1, das einen am N-Terminus angefügten Methioninrest hat.

3. Konjugat, umfassend:
(a) ein Polypeptid, wie es in Anspruch 1 oder An-

spruch 2 beansprucht wird, und
(b) ein Toxinmolekül.

4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei das Toxinmolekül aus Ricin A, Diphtherie-Toxin und Saporin ausgewählt ist.

5. Zusammensetzung, umfassend ein Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, oder ein Konjugat nach Anspruch 3 oder Anspruch 4 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

6. Nucleinsäuremolekül, das zur Expression unter Bereitstellung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 fähig ist.

7. Expressionsvektor, der ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6 und eine Regulationssequenz zur Expression des Nucleinsäuremoleküls umfasst.

8. Expressionsvektor nach Anspruch 7, wobei der Vektor ein Baculovirus ist.

9. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 7 oder 8 transformiert ist.

10. Wirtszelle nach Anspruch 9, die eine Bakterienzelle, eine Hefezelle, eine Säugetier-Zelle oder eine Insektenzelle ist.

11. Wirtszelle nach Anspruch 10, die aus der Gruppe bestehend aus einer CHO-Zelle, einer BHK-Zelle und einer COS-Zelle ausgewählt ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das die Schritte eines Einführens eines Expressionsvektors nach Anspruch 7 in eine Wirtszelle und Bewirken einer Expression des Polypeptids umfasst.

13. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das die Schritte Kultivieren einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 9, 10 und 11 und Isolieren des Polypeptids umfasst.

14. Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, ein Konjugat nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, oder eine Zusammensetzung nach Anspruch 5 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

15. Polypeptid nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 zur Verwendung in der Wundheilung.

16. Konjugat nach Anspruch 3 oder Anspruch 4 zur Verwendung in der Behandlung einer hyperproliferativen Krankheit der Epidermis, z.B. Psoriasis oder Basalzellen-Carcinom.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

	Start lange Form	CHO-Stelle
Sequenz	1 5 10 15 CYS-ASN-ASP-MET-THR-PRO-GLU-GLN-MET-ALA-THR-ASN-VAL-ASN-CYS-	
Sequenz	16 20 25 30 SER-SER-PRO-GLU-ARG-HIS-THR-ARG-SER-TYR-ASP-TYR-MET-GLU-GLY-	Start kurze Form
Sequenz	31 35 40 45 GLY-ASP-ILE-ARG-VAL-ARG-ARG-LEU-PHE-CYS-ARG-THR-GLN-TRP-TYR-	
Sequenz	46 50 55 60 LEU-ARG-ILE-ASP-LYS-ARG-GLY-LYS-VAL-LYS-GLY-THR-GLN-GLU-MET-	
Sequenz	61 65 70 75 LYS-ASN-ASN-TYR-ASN-ILE-MET-GLU-ILE-ARG-THR-VAL-ALA-VAL-GLY-	
Sequenz	76 80 85 90 ILE-VAL-ALA-ILE-LYS-GLY-VAL-GLU-SER-GLU-PHE-TYR-LEU-ALA-MET-	
Sequenz	91 95 100 105 ASN-LYS-GLU-GLY-LYS-LEU-TYR-ALA-LYS-LYS-GLU-CYS-ASN-GLU-ASP-	
Sequenz	106 110 115 120 CYS-ASN-PHE-LYS-GLU-LEU-ILE-LEU-GLU-ASN-HIS-TYR-ASN-THR-TYR-	
Sequenz	121 125 130 135 ALA-SER-ALA-LYS-TRP-THR-HIS-ASN-GLY-GLY-GLU-MET-PHE-VAL-ALA-	
Sequenz	136 140 145 150 LEU-ASN-GLN-LYS-GLY-ILE-PRO-VAL-ARG-GLY-LYS-LYS-THR-LYS-LYS-	
Sequenz	151 155 160 GLU-GLN-LYS-THR-ALA-HIS-PHE-LEU-PRO-MET-ALA-ILE-THR	

FIG. 2

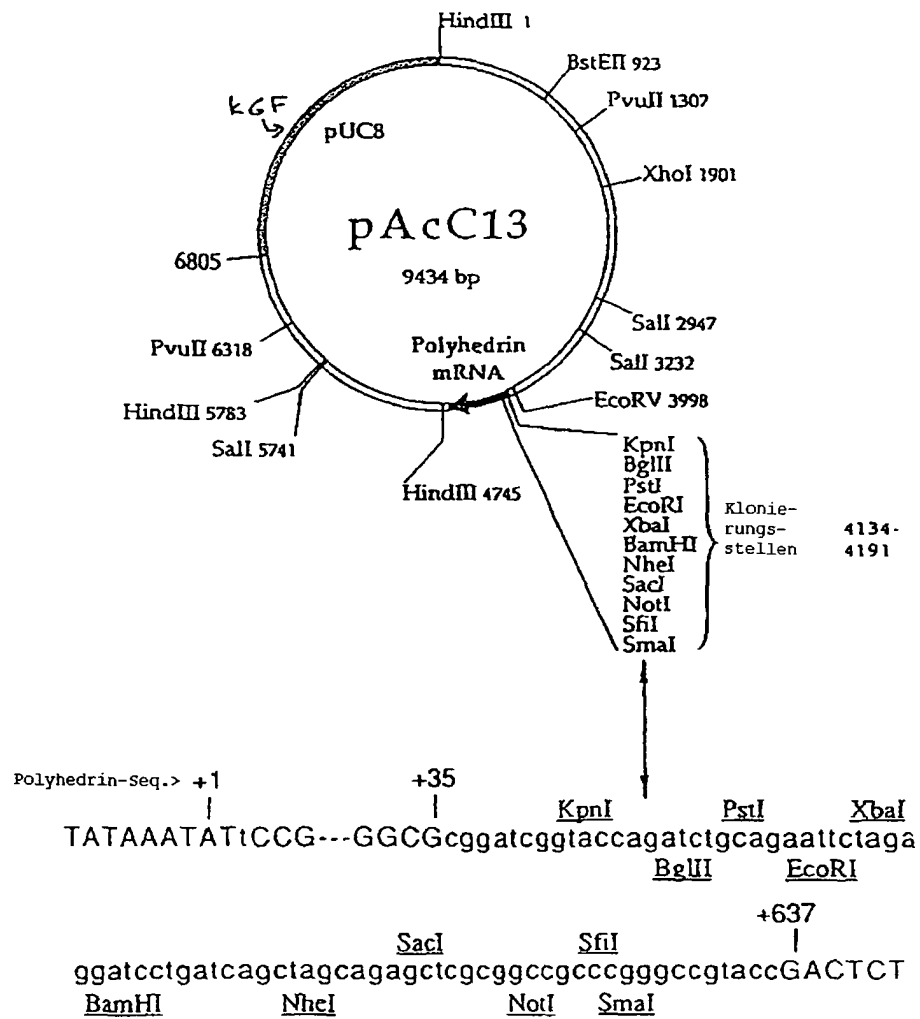


FIG. 3

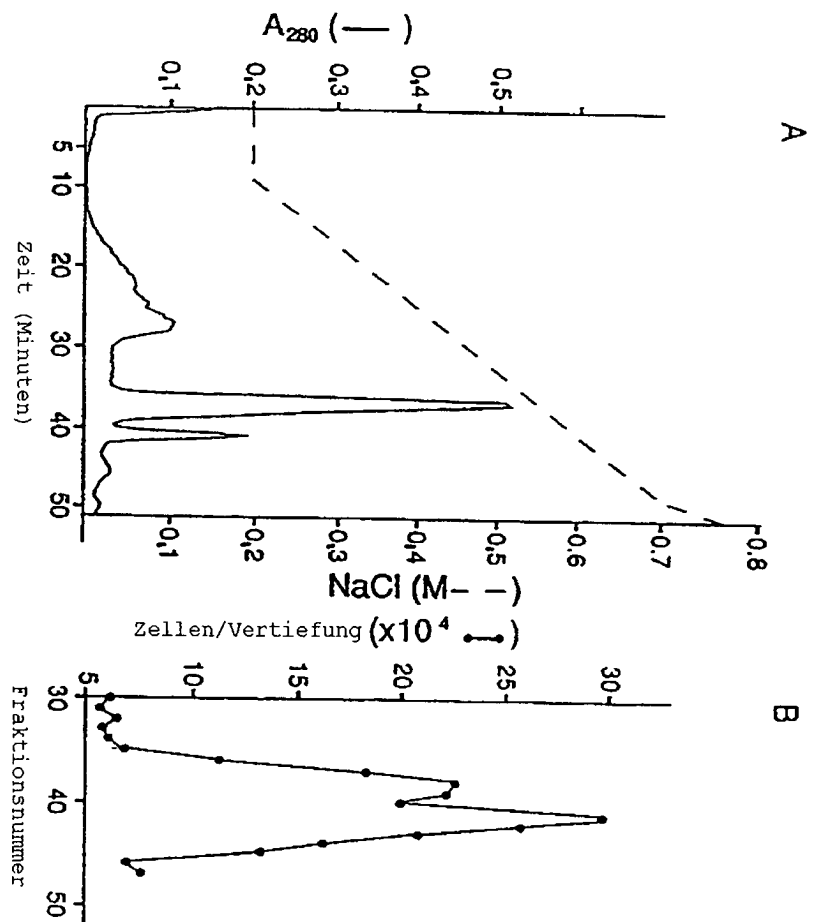


FIG. 4

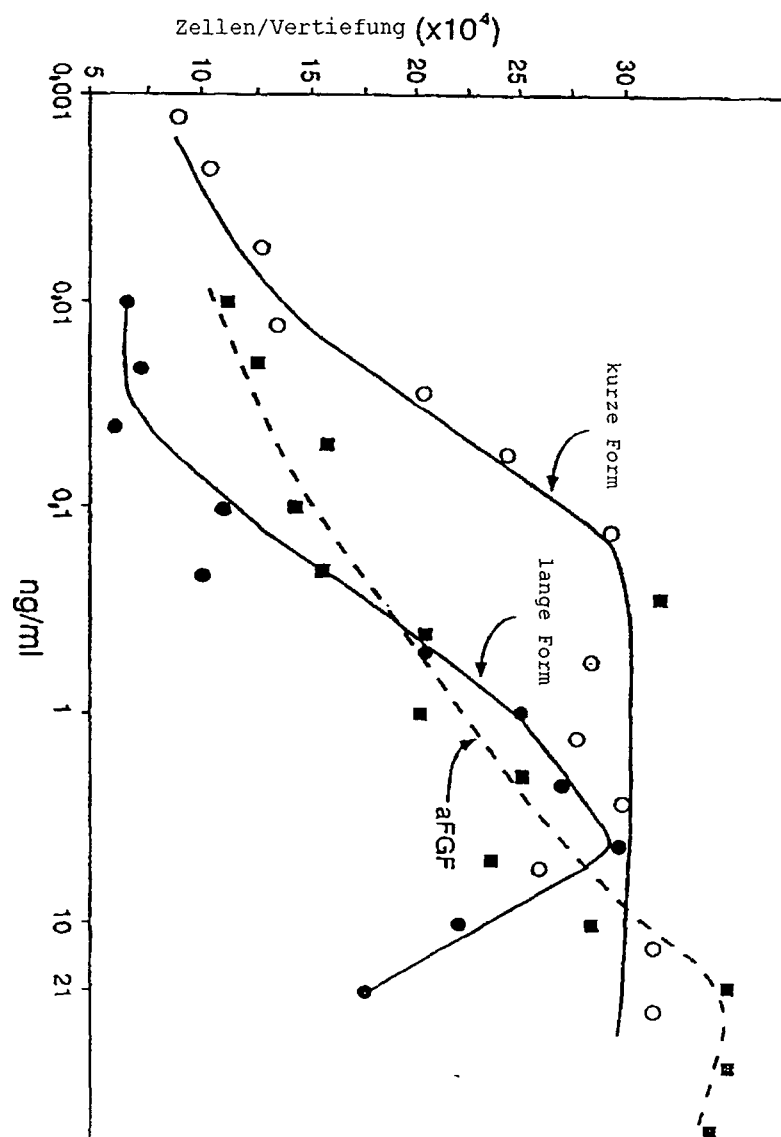


FIG. 5

