



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 045 T2 2009.02.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 242 602 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/79 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 045.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/10794**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 983 103.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/032896**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.02.2009**

(30) Unionspriorität:
99122222 05.11.1999 EP

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

(73) Patentinhaber:
Jena Bioscience GmbH, 07749 Jena, DE

(72) Erfinder:
**ALEXANDROV, Kirill, 44141 Dortmund, DE; GRUN,
Mathias, Somerville, MA 02144, US**

(74) Vertreter:
**Ackermann, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
60313 Frankfurt**

(54) Bezeichnung: **NICHT-PATHOGENES KINETOPLASTID PROTEIN-EXPRESSIONSSYSTEM**

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

[0001] Die Erfindung betrifft *L.-tarentolae*-Wirtszellen, die bei der Produktion rekombinanter Proteine nützlich sind. Insbesondere betrifft die Erfindung *L.-tarentolae*-Wirtszellen, die bei der Überexpression rekombinanter Proteine, speziell Enzyme, verwendet werden können.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Rekombinationstechnik wurde erfolgreich benutzt, um heterologe DNA, die für Gene kodiert, in eine Reihe von Pro- und Eukaryoten zu übertragen. Gegenwärtig gibt es eine Auswahl von Expressionssystemen, aus denen für die Produktion jedes gegebenen Proteins, einschließlich prokaryotischer und eukaryotischer Wirte, ausgewählt werden kann. Die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems wird häufig nicht nur von der Fähigkeit der Wirtszelle abhängen, adäquate Ausbeuten des gesuchten Proteins in einem aktiven Zustand zu produzieren, sondern kann in großem Umfang auch von der geplanten Verwendung des Proteins bestimmt sein.

[0003] Die genomische oder episomale Integration des Gens für das gesuchte Protein, zusammen mit adäquaten Elementen, wie etwa Promotern, Polyadenylierungsstellen, 3'- und 5'- untranslatierten Regionen (UTRs), können heterologe Genexpression vermitteln. Diese Technik wurde erfolgreich auf eine Reihe von Zelltypen angewendet, wie etwa Bakterien, Hefe, fädige Pilze, Kulturen von Zellen oder vollständigen Insekten- und Säugetierorganismen. Jedes dieser Expressionssysteme ist mit spezifischen Nutzen und Defiziten hinsichtlich Proteinausbeute, Qualität und Kosten assoziiert, und es gibt keinen universellen Wirt für die Proteinexpression.

[0004] Ein Proteinexpressionswirt muss mehreren Kriterien genügen: Der Wirt sollte auf billigen Medien einfach zu kultivieren und mit molekularbiologischen Standardprozeduren leicht zu handhaben sein. Außerdem sollte der Wirt aktive Proteine in großen Mengen produzieren und die Extraktion der letztgenannten erlauben.

[0005] Die Kinetoplastiden sind primitive begeißelte Protozoen, die in terrestrischen und aquatischen Lebensräumen zu finden sind. Einige von ihnen verursachen Erkrankungen in Organismen, die von Pflanzen zu Wirbeltieren reichen. Die evolutionäre Position der Kinetoplastiden und die systematische Struktur der Gruppe sind anderswo beschrieben (z. B. Adoutte and Philippe, 1993). Zwei große Untergruppen der Kinetoplastiden sind *Leishmania* und *Trypanosomatidae*. Die Kinetoplastiden waren für die Untersuchung fundamentaler molekularer und zellulärer Phänomene, wie etwa RNA-Edierung (Stuart, 1991), trans-Spleißen von mRNA (Perry and Agabian, 1991), Glycosylphosphatidylinositol-Verankerung von Proteinen (Krakow et al., 1986), Antigenvariation (Gorst and Rudenko, 1994), und Telomerorganisation (Blackburn, 1991) besonders wertvoll. Ein anderes, unter Eukaryoten einmaliges Merkmal der *Trypanosomatidae* sind die polycistronischen Transkriptionseinheiten. In diesen Einheiten wird eine Reihe von Genen in Tandemstrukturen angeordnet und durch RNA-Polymerase als einzelnes 50-100-kb-Transkript transkribiert ((Myler et al., 1999; Teixeira, 1998)). Ein solches Transkript wird dann in Einzelgen-mRNAs durch die Zugabe eines Miniexons, das eine Capstruktur trägt, am 5'-Ende durch einen Prozess, der als trans-Spleißen bekannt ist, gefolgt von Polyadenylierung und Spalten des 3'-Endes, verarbeitet. Genexpression und deren Kontrolle scheint in Kinetoplastiden signifikant von denen anderer Eukaryoten abzuweichen. In wenigen Fällen, z. B. *Trypanosoma brucei*, wurden phasenspezifische Promoter, wie etwa VSG- und PARP-Promoter, identifiziert (Barry et al., 1998; Hotz et al., 1998). Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Eukaryoten rekrutieren diese Promoter RNA-Polymerase I und nicht RNA-Polymerase II für Protein kodierende Gene (Teixeira, 1998). Im Fall von *Leishmania*-Spezies mit Ausnahme des ribosomalen RNA-Promoters wurden keine Elemente, die einem Promoter ähneln, identifiziert, und gemäß einem aktuellen Modell ist die Initiation der Transkription in *Leishmania* mit RNA-Polymerase II ein zufälliger Prozess. Infolge einer solchen Genorganisation findet der Großteil der Genregulation auf einem posttranskriptionalen Level statt (Teixeira, 1998).

[0006] Seit den frühen neunziger Jahren wurde ein signifikanter Fortschritt hinsichtlich der Etablierung einer Methodologie der umgekehrten Genetik für die Kinetoplastiden-Forschung erzielt. Zum ersten Mal wurde über Vektoren berichtet, die die vorübergehende Expression fremder Gene in *Trypanosoma cruzi* erlaubten (Lu and Buck, 1991). Durch die Bereitstellung des Transfervektors mit einem NEO-Gen als einem Arzneimittelresistenz-Marker wurde die Transformation stabil gemacht und nacheinander für mehrere andere Spezies berichtet (Coburn et al., 1991). Der Transfer von DNA-Konstrukten wurde durch Elektroporation oder mit Partikelkanone ausgeführt (Beverley and Clayton, 1993; Sbicego et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass Kinetoplastiden in der Lage sind, sowohl fremde als auch vom Genom abgeleitete Plasmide zu replizieren (Coburn et al., 1991; Pat-

naik et al., 1994; ten Asbroek et al., 1993) (Papadopoulou et al., 1994). Es wurde nachgewiesen, dass ein oder beide Allele eines funktionellen Gens durch homologe Rekombination deletiert werden konnten und dass neue Gene in das Genom integriert werden konnten (Cruz et al., 1991; Ray and Hines, 1995). Es wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt, die die Expression von zytosolischen oder sekretierten Proteinen in *Leishmania* and *Trypanosomatidae* erlaubten. Diese Konstrukte könnten grob in drei Kategorien eingeteilt werden:

- A) Episomale Plasmide, die im Falle von *Leishmania*, keine definierten Promoter, oder im Falle von *Trypanosoma brucei*, phasenspezifische Promoter tragen (LeBowitz et al., 1990) (La Flamme et al., 1996)
- B) Konstrukte, die in aktiv transkribierte Gencluster integriert sind (Tubulingene, RNA-Gene der kleinen ribosomalen Untereinheit, RNA-Gene der großen ribosomalen Untereinheit) (Misslitz A. et al., 1999; Tobin and Wirth, 1992; Wirtz et al., 1999).
- C) Integration fremder Polymerasegene in einen aktiv transkribierten Genort und Transkription des interessierenden Gens durch diese Polymerase (speziell T7- oder T3-Polymerase) (Wirtz et al., 1994).

[0007] Unter Verwendung dieser Ansätze wurden mehrere Gene exprimiert und es wurde nachgewiesen, dass deren Produkte funktionell aktiv sind:

- p53 in *Leishmania donovani* (Zhang et al., 1995)
- Interferon-gamma in *Leishmania major* (Tobin and Wirth, 1992).
- Luciferase in *Trypanosoma brucei* (Biebinger et al., 1997)
- T7- und T3-Polymerase in *Trypanosoma brucei* (Wirtz et al., 1994)
- Therapeutische Proteine in *Leishmania major* (WO 00/58483)

[0008] Der Stand der Technik beinhaltet auch Veröffentlichungen, die sich mit Verfahren zur In-vitro-Kultivierung einer Reihe von Kinetoplastiden beschäftigen, einschließlich Wachstum auf festen (Platten) und flüssigen Medien (Kolben oder Fermentern) (Alfonzo et al., 1998). In den meisten Fällen enthielten die Medien eine Auswahl essentieller Aminosäuren und Spurenelementen, angereichert mit bovinem Kälberserum oder bovinem Blut (Beverley and Clayon, 1993; Hill and Fahey, 1987). Es wurde nachgewiesen, dass mehrere Spezies in Abwesenheit von Serum auf einfachem, nicht synthetischem Medium wuchsen. Die am besten beschriebenen und untersuchten dieser Spezies, wie *Leishmania tarentolae* Parrot (Geckoparasit), *Tarentola mauritanica* und *Tarentola annulais* (Elwasila, 1988); oder *Crithidia fasciculata* Leger Parasit der Mücke *Culex pipiens* (Leger 1902), konnten auf Hirn-Herz-Glucose-Medium (BHI) (Alfonzo et al., 1998) oder Luria-Bertani-Medium (LB) kultiviert werden. Es wurde auch nachgewiesen, dass diese Spezies gut in großen Fermentern wachsen. *Leishmania tarentolae* konnte die Dichte von 2×10^8 Zellen je ml in der späten stationären Phase in 15-l-Standardfermentern mit der Ausbeute von 10 g Zelltrockenmasse je 1 l Kultur erreichen (Alfonzo et al., 1998).

[0009] Andere Spezies der Kinetoplastiden - speziell Spezies von *Trypanosomatidae* und *Leishmania* - haben sich jedoch bei der Expression heterologer Proteine aufgrund der assoziierten Gesundheitsrisiken, der niedrigen Wachstumsraten oder ungebräuchlicher, teuer Kulturmedien nicht als nützlich erwiesen.

[0010] Ein ideales Expressions- und Freisetzungssystem ist eines, das im Wesentlichen keine Proteasen, Toxine und große Mengen anderer endogen synthetisierter und sekretierter Proteine des Wirts produziert, und das in der Lage ist, hohe Proteinexpressionslevel zu erreichen.

[0011] Auf dem Stand der Technik wurden alle Versuche und Untersuchungen mit pathogenen Spezies in vitro oder in vivo durchgeführt, und es wurden keine Versuche gemacht, die rekombinanten Proteine zu isolieren.

[0012] Versuche haben gezeigt, dass die gesuchte heterologe Proteinexpression mit nicht pathogenen Spezies von Kinetoplastiden etabliert werden kann, insbesondere aus *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Wallaceina inconstans* (früher *Proteomonas inconstans*), *Leptomonas collos*, *Leptomonas* sp. Cfm, *Leptomonas* sp. Nfm oder *Leptomonas seymouri*.

[0013] Die oben beschriebenen Spezies zeigten, verglichen mit anderen Kinetoplastiden, auf billigen Medien höhere Wachstumsraten und bewiesen daher die Nützlichkeit als Wirte für die Proteinproduktion.

[0014] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein neues Expressions- und Freisetzungssystem und/oder einen Proteinexpressionswirt nicht pathogener Kinetoplastiden bereitzustellen, das bei der Überexpression rekombinanter Proteins, speziell Enzyme, verwendet werden kann.

[0015] Die Aufgabe wird gemäß Anspruch 1 mit nicht pathogenen *Leishmania-tarentolae*-Wirtszellen erreicht, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die ein heterologes Protein kodiert.

[0016] Speziell mit:

Leishmania tarentolae Parrot ATCC-Nummer 30143 und *Crithidia fasciculata* Leger, ATCC-Nummer 12857 (American Type Culture Collection Number).

[0017] Unter heterologem Protein ist ein Protein zu verstehen, das für die Wirtszelle nicht native ist, oder ein natives Protein, in dem Modifikationen vorgenommen wurden, um die native Sequenz zu verändern. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein heterologes Enzym. Daher ist eine kodierende heterologe Nukleinsäuresequenz mit einer geeigneten Promotersequenz, und gegebenenfalls mit posttranskriptionalen Signalsequenzen operabel verknüpft, die in der Lage sind, die Expression der Nukleinsäuresequenz in den gewählten Wirtszellen zu steuern.

[0018] Organismen der Kinetoplastiden-Ordnung, wie die nicht pathogenen Spezies *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Wallaceina inconstans*, *Leptomonas collosus*, *Leptomonas* sp. Cfm, *Leptomonas* sp. Nfm oder *Leptomonas seymouri*, haben eine einzige Organelle, die Kinetoplast genannt wird, ein Appendix ihres einzigen Mitochondrions, das nahe des Basalkörpers der Geißel liegt, die ein Netzwerk von tausenden von kleinen ineinander greifenden zirkulärer DNAs enthält. Kinetoplastiden haben eine Größe von 50 bis 400 Mikron. Kinetoplastiden gehören zu den ältesten Eukaryoten, deren rRNA-Linie weiter zurückreicht als die von Tieren, Pflanzen und sogar Pilzen (Beverley, 1996). Kinetoplastiden-Spezies parasitieren in einem sehr diversen Wirtsspektrum, das von Pflanzen bis zu Menschen reicht. Viele Repräsentanten der Kinetoplastiden wurden isoliert und für einen längeren Zeitraum in Kultur erhalten. Die Kultivierung konnte sowohl auf vollständig oder teilweise definierten flüssigen und festen Medien durchgeführt werden (Melo, 1981). Kinetoplastiden, die in einem flüssigen Medium gewachsen werden, bilden Suspensionen, während das Plattieren auf festen Medien zur Bildung von Kolonien führt (Hill and Fahey, 1987).

[0019] Für die Ziele der vorliegenden Erfindung ist "nicht pathogen" durch die Klassifizierung der besagten Organismen der Biologische Sicherheitsstufe 1 gemäß der Richtlinien des US-Ministeriums für Gesundheit und Sozialdienste (U.S. department of Health and Human Services) (HHS Publication No. (CDCD 93-8395) oder unter <http://www.niehs.nih.gov/odhsb/biosafe/bio.htm> definiert.

[0020] Die Transformation der ausgewählten Spezies erfolgte unter Verwendung von DNA-Mengen, die zwischen 1 bis 100 µg lagen, und die Selektion mit adäquaten Plattierungstechniken und Bedingungen für eine antibiotische Selektion oder mit Limited-Dilution-Techniken. Die Transformationsleistung variieren, abhängig von den ausgewählten Spezies, stark, wobei die höchste für *Leishmania*-Spezies erreicht wurde und sich 10^{-4} /Zelle näherte (Kapler et al., 1990), (Coburn et al., 1991). Eine einzige Zelle kann mehrere Expressionskonstrukte erhalten, vorausgesetzt, dass sie alle verschiedene Selektionsmarker tragen (Wirtz et al., 1999). Die Expressionslevel variieren signifikant, abhängig vom Wirt und dem gewählten Konstrukt, wobei die episodischen Plasmide am unteren Ende der Skala liegen, aber dennoch in der Lage sind, rekombinantes Protein von bis zu 1 des gesamten zellulären Proteins zu bilden (LeBowitz et al., 1990).

[0021] Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die ausgewählten pathogenen Spezies in der Lage sind, ein heterologes Protein zu exprimieren und zu sekretieren. Es versteht sich somit, dass diese Fähigkeit nicht auf einen einzigen Stamm beschränkt ist, sondern vielmehr eine Charakteristik dieser Speziesgruppe als Ganzes ist. Der Fachmann wird erkennen, dass andere Stämme dieser Spezies auch für die Expression heterologer Proteine verwendet werden können. Viele Stämme sind für die Allgemeinheit verfügbar. Zum Beispiel *Leishmania tarentolae* Parrot ATCC-Nummer 30143 und *Crithidia fasciculata* Leger ATCC-Nummer 12857.

[0022] Der Fachmann wird auch erkennen, dass die erfolgreiche Transformation der Wirtsspezies, die hier beschrieben sind, nicht auf die Verwendung von Vektoren, Promotern und Selektionsmarkern beschränkt ist, die hier spezifisch durch Beispiele illustriert sind. Es sind auch jene Techniken eingeschlossen, die in Verbindung mit den Wirtszellen der vorliegenden Erfindung nützlich sind.

[0023] Der Begriff "nützlich" beinhaltet, ist aber nicht beschränkt auf Techniken, die ein Hygromycin-Phosphotransferasegen (HYG) in Kombination mit Hygromycin, ein Neomycin-Phosphotransferasegen (NEO) in Kombination mit G418, das Produkt des Streptoalloteichushindustanusgens BLE (BLE) in Kombination mit Phleomycin und das Streptothricin-Acetyltransferase (SAT) kodierende Gen in Kombination mit Nourseothricin umfassen, die für die Selektion rekombinanter Klone verwendet werden. Zusätzlich beinhaltet er, ist aber nicht beschränkt auf die intergenischen 5'- und 3'-Regionen der aktiv transkribierten Gene des Wirts, wie etwa der Calmodulin-, Dihydrofolatreductase-Thymidylatsynthase- und Cysteinproteinasegene.

[0024] Die Erfindung stellt einen Vektor bereit, der in der Lage ist, nicht pathogene Kinetoplastiden, insbeson-

dere die *L.-tarentolae*-Spezies, zu transformieren, wobei die Nukleinsäure für ein gesuchtes Protein kodiert, das von 5'- und 3'-UTRs eines aktiv transkribierten *L.-tarentolae*-Gens flankiert ist, einschließlich Signale für das wirksame trans-Spleißen und die Polyadenylierung, und die gegebenenfalls einen Selektionsmarker enthält.

[0025] Das Vektorsystem kann ein einzelner Vektor oder ein Plasmid oder ein System aus zwei oder mehreren Vektoren oder Plasmiden sein, die zusammen die gesamte DNA enthalten, die in die Wirtszelle übertragen werden soll. Die Vektoren oder Plasmide können lineare oder geschlossene zirkuläre Moleküle sein.

[0026] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfasst das Vektorsystem bevorzugt eine linearisierte Plasmidnukleinsäure und eine heterologe Nukleinsäure, die für ein interessierendes Protein kodiert, flankiert von intergenischen Regionen eines aktiv translatierten Wirtsproteins, das mit einem Resistenzmarkergen operabel verknüpft ist, das von Segmenten eines aktiv transkribierten Wirtsgens flankiert ist. Solche Gene beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf RNA-Gene der kleinen ribosomalen Untereinheit, RNA-Gene der großen ribosomalen Untereinheit, α - oder β -Tubulingene, das Calmodulingen oder das gp63-Gen. Das Konstrukt wird in die aktiv transkribierten Cluster integriert, wie etwa die RNA-Gencluster der kleinen ribosomalen Untereinheit, die RNA-Gencluster der großen ribosomalen Untereinheit, die alpha- oder beta-Tubulingencluster, durch homologe Rekombination und Selektion mit dem geeigneten Antibiotikum.

[0027] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfasst das Vektorsystem bevorzugt eine linearisierte Plasmidnukleinsäure und eine heterologe Nukleinsäure, die für ein interessierendes Protein kodiert, flankiert von intergenischen Regionen eines aktiv translatierten Wirtsproteins, das mit einem Resistenzmarkergen operabel verknüpft ist und von DNA-Fragmenten aus einem untranslatierten Spacer des rRNA-Genclusters flankiert ist. Das Gen, das für das interessierende Protein kodiert, wird eingeleitet mit dem ribosomalen RNA-Genpromoter und in einigen Fällen mit regulatorischen Elementen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Tet- oder Lac-Repressor-Response-Elementen. Das Konstrukt wird in einen untranskribierten Spacer der rRNA-Genregion durch homologe Rekombination und Selektion mit den geeigneten Antibiotika integriert.

[0028] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfasst das Vektorsystem bevorzugt eine episomal verfügbare zirkuläre Plasmidnukleinsäure und eine heterologe Nukleinsäure, die für ein interessierendes Protein kodiert, flankiert von intergenischen Regionen eines aktiv translatierten Wirtsproteins, das mit einem Resistenzmarker operabel verknüpft ist. Das Konstrukt wird in dem Organismus episomal unter dem Druck der antibiotischen Selektion erhalten und Transkripte können durch Zufallsinitiation und „runaround“-Transkription erzeugt werden.

[0029] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfasst das Vektorsystem bevorzugt eine episomal verfügbare zirkuläre Plasmidnukleinsäure und eine heterologe Nukleinsäure, die für ein interessierendes Protein kodiert, flankiert von intergenischen Regionen eines aktiv translatierten Wirtsproteins, das mit einem Resistenzmarker operabel verknüpft ist. Die Nukleinsäure, die für das interessierende Protein kodiert, wird entweder mit einem ribosomalen Promoter und dessen regulatorischen Elementen oder mit einem Promoter für eine fremde RNA-Polymerase, einschließlich, aber nicht beschränkt auf T7, T3 usw. eingeleitet. Das Konstrukt wird in dem Organismus episomal unter dem Druck der antibiotischen Selektion gehalten und Transkripte werden im Fall des ribosomalen RNA-Genpromoters durch RNA-Polymerase I erzeugt. Im Fall von anderen Promotern (T7, T3 usw.) wird die Transkription von fremder Polymerase gesteuert, die in das Genom integriert ist.

[0030] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Wirt mit drei Vektoren transformiert, wobei einer das Gen für eine fremde RNA-Polymerase (zum Beispiel T7- oder T3-Polymerase) mit intergenischen Regionen eines aktiv exprimierten Wirtsproteins beinhaltet, das mit einem Resistenzmarkergen operabel verknüpft ist und von Segmenten eines aktiv transkribierten Wirtsgens flankiert wird. Dieses Konstrukt wird in ein aktiv transkribiertes Gencluster des Wirts durch homologe Rekombination integriert.

[0031] Das andere Plasmid umfasst die heterologe DNA, die für einen Tet-Repressor mit intergenischen Regionen eines aktiv exprimierten Wirtsproteins kodiert, und beinhaltet einen Promoter, bevorzugt einen T3- oder davor einen abgeschwächten T7-Promoter. Dieses modifizierte Tet-Repressorgen ist mit einem Antibiotikaresistenz-Markergen operabel verknüpft und das gesamte Konstrukt wird von Segmenten eines aktiv transkribierten Wirtsgens flankiert. Dieses Konstrukt wird in das aktiv transkribierte Gencluster des Wirts durch homologe Rekombination integriert.

[0032] Der dritte Vektor umfasst ein episomal verfügbares Plasmid, das die heterologe DNA für das zu exprimierende interessierende Protein enthält, die von intergenischen Regionen eines aktiv exprimierten Wirtspoteins flankiert ist, und bevorzugt einen für T3 oder T7 spezifischen Promoter am 5'-Ende des oben genannten Gens für das gesuchte Protein trägt. Dieser Promoter wird zusätzlich mit der TET-Repressor-Erkennungssequenz versehen, um die Tetracyclin-abhängige Kontrolle der Transkription zu erlauben. Das resultierende Konstrukt ist mit einem Antibiotikaresistenzmarkergen operabel verknüpft und wird episomal erhalten oder mit geeigneten Zielsequenzen versehen, die das gesamte Konstrukt flankieren, und in einen transkriptional stummen Teil des Wirtsgenoms, wie etwa dem nicht transkribierten rRNA-Genspacer, integriert sind.

[0033] Die vorliegende Wirtszellspezies kann verwendet werden, um jedes prokaryotische oder eukaryotische heterologe interessierende Protein zu exprimieren, und wird bevorzugt verwendet, um eukaryotische Proteine zu exprimieren. Zum Beispiele kann das neuartige Expressions- und Freisetzungssystem verwendet werden, um Enzyme, wie etwa Catalase, Laccase, Phenoloxidase, Oxidase, Oxidoreductasen, Cellulase, Xylanase, Peroxidase, Lipase, Hydrolase, Esterase, Cutinase, Protease und andere proteolytische Enzyme, Aminopeptidase, Carboxypeptidase, Phytase, Lyase, Pektinase und andere pektinolytische Enzyme, Amylase, Glucoamylase, α -Galactosidase, β -Galactosidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, Mannosidase, Isomerase, Invertase, Transferase, Ribonuclease, Chitinase und Desoxyribonuclease, zu exprimieren. Der Fachmann wird verstehen, dass der Begriff "Enzyme" nicht nur native Enzyme beinhaltet, sondern auch jene Enzyme, die durch Aminosäuresubstitutionen, Deletionen, Additionen oder andere Modifikationen modifiziert wurden, die gemacht werden können, um die Aktivität, Thermostabilität, pH-Toleranz usw. zu verbessern.

[0034] Die vorliegenden Wirtszellen können auch verwendet werden, in der Rekombinationsproduktion von Proteinen, die in der Wirtszelle nativ sind. Beispiele für eine solche Verwendung beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf Anordnen eines nicht pathogenen nativen Proteins vom Typ Kinetoplastiden unter die Kontrolle eines anderen Promoters, um die Expression des Protein zu verbessern, um den Export eines nativen interessierenden Proteins aus der Zelle durch Verwendung einer Signalsequenz zu beschleunigen, oder um die Kopienanzahl eines Proteins zu erhöhen, das normalerweise von den betrachteten Wirtszellen produziert wird. Somit schließt die vorliegende Erfindung auch eine solche Rekombinationsproduktion homologer Proteine bis zu dem Grade ein, indem eine solche Expression die Verwendung eines genetischen Elements beinhaltet, das nicht nativ für die Wirtszelle ist, oder die Verwendung von nativen Elementen, die manipuliert wurden, um auf eine Weise zu funktionieren, die in der Wirtszelle normalerweise nicht beobachtet wird.

[0035] Um zu vermeiden, dass es notwendig ist, die Zellen zu zerstören, um das exprimierte Produkt zu erhalten, und um den Umfang möglicher Abbaus des exprimierten Produkts innerhalb der Zellen zu minimieren, ist es bevorzugt, dass das Produkt aus den Zellen sekretiert wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das interessierende Gen mit der DNA-Sequenz fusioniert für eine Prä-Region, wie etwa ein Signal- oder Leaderpeptid, das das exprimierte Produkt in den Sekretionsweg der Zelle vermitteln kann. Die Prä-Region kann von Genen für jedes sekretierte Protein aus jedem Organismus abgeleitet werden, bevorzugt ist jedoch eine native Prä-Region der selektierten Spezies oder des selektierten Proteins. Sie kann beinhalten, ist aber nicht beschränkt auf eine Sekretionssignalsequenz des Säuger-Interferongamma, eine Sekretionssignalsequenz der sekretierten sauren Phosphatase von *Leishmania mexicana*, eine Sekretionssignalsequenz der löslichen sauren Phosphatase von *Leishmania donovani*, eine Sekretionssignalsequenz des *L. tarentolae*-9P63-Gens oder andere Sekretionssignale anderer sekretierter Proteine.

[0036] Die Erfindung stellt auch stabil transformierte *L. tarentolae*-Zelllinien bereit, der mit dem offenbarten Vektor und dem Vektorsystem zu erhalten sind.

[0037] Weitere Merkmale der vorliegenden Erfindung werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

FIGUREN UND BEISPIELE

[0038] [Fig. 1](#): Proteinexpression aus episomalen Vektoren in Kinetoplastiden.

[0039] Schematische Darstellung eines episomalen Plasmidvektors für die heterologe Genexpression in Kinetoplastiden-Spezies. Das Plasmid enthält einen prokaryotischen Replikationsstartpunkt und ein prokaryotisches Resistenzmarkergen (Amp). Das interessierende Gen wird von intergenischen Regionen des Wirts und einem eukaryotischen Selektionsmarkergen (Hyg) flankiert. Die Transkription wird zufällig initiiert und erzeugt Transkripte von zufälliger Länge.

[0040] [Fig. 2](#): Durch RNA-Polymerase vermittelte Proteinexpression in Kinetoplastiden.

[0041] Schematische Darstellung heterologer Genexpression in Kinetoplastiden-Spezies, die auf einer Phagenpolymerase basiert und durch ein Tet-Response-Element kontrolliert wird. T7-RNA-Polymerase und Tet-Repressorgene werden in einen aktiv transkribierten Genort, bevorzugt in ein stark transkribiertes Gencluster integriert. Das interessierende Gen wird in die transkriptional stumme Region des Genoms unter der Kontrolle des T7-Promoters und des Tet-Response-Elements integriert. Die Transkription des interessierenden Gens wird durch die Zugabe von Tetracyclin zum Kulturmedium initiiert. Es folgt trans-Spleißen, Polyadenylierung und Translation der reifen mRNA in das interessierende Protein.

[0042] Fig. 3: Western-Blot von *Leishmania-tarentolae*-Zellen, die Proto-Onkogen Miz 1 (A) und humanes Erythropoetin (B) exprimieren.

[0043] Western-Blot von *Leishmania-tarentolae*-Zellen, die Proto-Onkogen Miz-1(A)-Zellen exprimieren, transformiert mit dem pIR-miz-Konstrukt, wurden für Antibiotikaresistenz selektiert und in BHI-Nährlösung gebracht, die 100 mg/l Nourseothricin enthielt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und entweder direkt im Laemmli-Puffer gekocht, oder zuerst mit Triton X-100 in lösliche und nicht lösliche Fraktionen geteilt. Die Lysate wurden auf 10%-iges SDS-PAGE separiert, auf die Nitrocellulose übertragen und das rekombinante Miz wurde mit polyklonalem Antikörper anti-miz-1 sondiert.

[0044] Spalte T (Fig. 3A) zeigt das gesamte Lysat von *L.-tarentolae*-Zellen, die miz exprimieren.

[0045] Spalte O (Fig. 3A) zeigt die mit 1%-igem Triton X-100 unlösliche Fraktion von *L.-tarentolae*-Zellen, die miz exprimieren.

[0046] Spalte S (Fig. 3A) zeigt die mit 1%-igem Triton X-100 lösliche Fraktion von *L.-tarentolae*-Zellen, die miz exprimieren.

[0047] Spalte M zeigt die Molekulargewichtsmarker, Spalte C zeigt das Lysat von Kontrollzellen.

[0048] Western-Blot der Kulturüberstände von *Leishmania-tarentolae*-Zellen, die humanes Erythropoetin (B) exprimieren. Für die Erythropoetinexpression wurden 200 Mikroliter der Kulturüberstände mit 10%-iger TCA (Trichloressigsäure) präzipitiert und auf dem 15%-igen SDS-PAGE separiert, auf die Nitrocellulose übertragen und das rekombinante Erythropoetin wurde mit polyklonalem anti-Erythropoetin-Antikörper sondiert.

[0049] Die Spalten T (Fig. 3B) zeigen die verschiedenen Mengen an Kulturüberstand von *L.-tarentolae*-Zellen, die humanes Epo exprimieren.

[0050] Spalte M zeigt die Molekulargewichtsmarker, Spalte C zeigt das Lysat von Kontrollzellen.

[0051] Die folgenden Beispiele dienen der ausführlicheren Beschreibung der Erfindung, ohne diese jedoch auf die Produkte und Ausführungsformen zu beschränken, die in den Beispielen beschrieben sind.

Beispiel 1.

Expression von Proto-Onkogen Miz-1 in *Leishmania tarentolae*

Klonieren des miz-1-Gens in den pIR-Vektor:

[0052] Der pIR-Vektor (Hubel A. and Beverley, 1999) {Wirtz, Leal, et al. 1999 ID: 267}, enthaltend

- den ColE1-Replikationsstartpunkt und das Ampicillin-Resistenzgen (Amp) zur Plasmidpropagierung and Selektion in *E. coli*,
- eine BglIII-Stelle zur Insertion von Genkassetten, flankiert von intergenischen Regionen der *cys2*-(Cysteinproteinase) und *LPG1*-(Glycosyltransferase)Gene von *Leishmania* mit Signalen zum trans-Spleißen und zur Polyadenylierung der mRNA des Gens für das gesuchte Protein,
- das Streptothricin-Acetyltransferase-(*sat*)Gen von Transposon Tn7, flankiert von den intergenischen Regionen der *LPG1*- und *DHFR-TS*(Dihydrofolat-Reductasethymidylat-Synthase)Gene von *Leishmania*, die die Resistenz von *Leishmania* gegenüber dem antibiotischen Nourseothricin verleihen,
- zwei Segmente von ungefähr 1 kbp (ein 5'- und ein 3'-Teil) des Gens für die RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit (ssu) von *Leishmania*, die die Expressionssignale einfasst, verknüpft mit dem *sat*-Resistenzmarker, und die Integration der DNA zwischen die *ssu*-Boxen in das Genom von *Leishmania tarentolae* durch homologe Rekombination, gefolgt von der Spaltung des rekombinanten pIR-Vektors mit dem Rest-

riktionsenzym Smil ermöglichen.

[0053] Die kodierende Sequenz des Miz-1 (Genbank-Zugangsnr. Y09723) wurde mittels PCR gemäß den Standardprozeduren aus einer Plasmidquelle (pFH50) amplifiziert, was die genetische Information für einen extra-Hexahistidin-Tag am N'-Terminus des Miz-1-Proteins lieferte. Die folgenden Primer wurden verwendet, um die Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym BclI an beiden Enden des 2,6-kbp-PCR-Fragments einzuführen:

- F2460 miz-1 Vorwärts-Primer: CTG CAG TGA TCA GTC GCC ACC ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT C (SEQ. ID No. 1, Startcodon unterstrichen) und
- F2461 miz-1 Rückwärts-Primer: CTG CAG TGA TCA AGA TCT TCA CTC GGC AGG CGG GGG AC (Seq. ID No. 2, Stoppcodon unterstrichen).

[0054] Es wurden Standardtechniken des molekularen Klonierens angewendet, um das miz-1-Gen in den Vektor pIR zu inserieren. Die Enden des PCR-Fragments wurden zuerst mit BclI geschnitten, dann wurde das PCR-Produkt mit dem mit BglIII linearisierten Vektor pIR ligiert. Nach der Transformation von E.-coli-TG1 mit der Ligationsmischung, wurden die Klone, die den rekombinanten pIR mit dem miz-1-Insert in der korrekten Orientierung (pIR-miz1) enthalten, mittels Colony-PCR unter Verwendung der Primer F2718 (pIR-BglIII-Vorwärts) CTG CAC CGT GGT CGA CTG C (Seq. ID No. 3) identifiziert, wobei upstream der BglIII-Stelle von pIR und Primer F2461 (miz-1-Rückwärts, zuvor beschrieben) aufgeschmolzen wurde. Die Plasmid-DNA wurde aus positiven Klonen extrahiert und die korrekte Struktur und Sequenz von pIRmiz1 wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Plasmidzubereitungen in großem Maßstab wurden mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) erreicht.

Transformation von Leishmania tarentolae mit pIRmiz1:

[0055] Für die chromosomale Integration des miz-1-Gens in das ssu-Cluster wurden ungefähr 10 µg pIRmiz1 mit dem Restriktionsenzym Smil gespalten, mit 0,5 µg/µl resuspendiert und mittels Elektroporation in Leishmaniatarentolae-Zellen eingeführt.

[0056] Die Elektroporation erfolgte mit einem Multiporator (Eppendorf) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Pro Transformation wurden 1,0 ml einer wachsenden L.-tarentolae-Kultur in BHI-Nährlösung mit 5 µg/ml Hemin ($OD_{600} = 1,0$) durch Zentrifugation (1 Min. bei $5.000 \times g$) geerntet, einmal in hypo-osmolarem Puffer (HOP) (Eppendorf Kat.-Nr. 4308 070 501) gewaschen und in 1,0 ml HOP resuspendiert. Je Transformation wurden 0,4 ml dieser Zellsuspension verwendet. Die Zellen wurden 10 Min auf Eis gelagert, DNA wurde zugefügt und die Elektroporation wurde in einer Küvette $d = 2$ mm bei 1.000 V und 160 µsec durchgeführt. Nach dem Impuls wurden die Zellen 10 Min. lang auf Eis gelagert, in 10 ml BHI mit 5 µg/ml Hemin resuspendiert und bei 26°C inkubiert. Die Selektion mit 100 µg/ml Nourseothricin wurden nach 20 Std. angewendet und die rekombinanten Linien wurde mittels Limited-Dilution selektiert. Die erwartete chromosomale Struktur der rekombinanten L.-tarentolae::pIRmiz1-Zellen (Integration der Expressionseinheit mit dem heterologen miz-1-Gen in das ssu-Cluster) wurde mittels PCR-Diagnose der genomischen DNA dieser Zellen mit drei spezifischen Primerpaaren bestätigt. Das erste Primerpaar bestand aus F2999 sat-Vorwärtsprimer (CCT AGT ATG AAG ATT TCG GTG ATC) (Seq. ID No. 4), aufgeschmolzen innerhalb der Rekombinationsregion (sat-Gen von pIR) und F3002 ssu-Rückwärts-Primer (CTG CAG GTT CAC CTA CAG CTA C) (Seq. ID No. 5), aufgeschmolzen außerhalb der Rekombinationsregion (3'-ssu-Genregion, auf pIR nicht vorhanden), und erzeugte ein charakteristisches 2,3-kbp-Fragment, das in der Wildtyp-Kontrolle fehlte. Die anderen beiden Primerpaare waren spezifisch für das integrierte Segment von pIRmiz1 und beinhalteten die bereits beschriebenen miz-1-Vorwärts-Primer F2460 und miz-1-Rückwärts-Primer F2461, die das charakteristische 2,6-kbp-miz-1-PCR-Fragment erzeugten. Das dritte Primerpaar waren der bereits beschriebene miz-1-Vorwärts-Primer F2460 und der sat-Rückwärts-Primer F3000 (GGC TAG TTA GGC GTC ATC CTG A) (seq. Id No. 6), die ein charakteristisches 4-kbp-PCR-Fragment erzeugten, das die sat- und miz-1-Gene einschloss.

[0057] Um das integrierte Konstrukt auf Nukleotidlevel zu bestätigen, wurde das miz-1-Gen mit dessen flankierenden Regionen aus genomischer DNA von rekombinanten L.-tarentolae::pIRmiz1-Zellen unter Verwendung des Primerpaars F2718 pIR-BglIII-vorw., bereits beschrieben, und F2719 pIR-BglIII-rev. (GGC CGA TTC ATT AAT GCA GGA C) (Seq. ID No. 7), die die BglIII-Stelle von pIRmiz1 flankieren, PCR-amplifiziert. Das 3-kbp-PCR-Produkt wurde sequenziert und es wurde festgestellt, dass es mit der vorhergesagten Nukleotidsequenz übereinstimmt.

Kultur von *Leishmania tarentolae*

[0058] *L. tarentolae* wurde in BHI-Nährlösung (Difco), angereichert mit 5 µg/ml Hemin gewachsen. Die Zellen wurden entweder in statischen Kulturen unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen oder in aktiv gemischten Kulturen unter Verwendung von 2-Liter-Kolben kultiviert. Die Schüttelrate wurde auf 50 U/Min. oder weniger festgelegt. Die Handhabung der Kulturen erfolgte gemäß den Standardverfahren, die in (Alfonzo et al., 1998) und hier zitierten Quellen beschrieben werden.

Identifikation des Miz-1-Proteins:

[0059] Rekombinante *L. tarentolae*::pIRMiz1-Zellen wurden in 10 ml BHI-Nährlösung mit 5 µg/ml Hemin inokuliert und bei 26°C inkubiert. 2 ml der wachsenden Kultur wurden bei einem OD₆₀₀-Wert von 1,0 durch Zentrifugation (1 Min. bei 10.000 × g) geerntet, das Zellpellet wurde in 200 µl Laemmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinelektrophorese wurde mit 10-µl-Proben auf einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel gemäß den Standardprozeduren ausgeführt. Das Miz-1-Protein wurde durch Western-Blotting mit monoklonalen Antikörpern gegen den Hexahistidin-Tag identifiziert, der am N'-Terminus des Miz-1 (Qiagen Kat.-Nr. 34610) eingeführt wurde, und mit polyklonalen Kaninchenantikörpern, die sich gegen das gereinigte Miz-1 entwickelten.

[0060] Die Ergebnisse werden in [Fig. 3A](#) gezeigt. Spalte T zeigt das gesamte Lysat, Spalte P zeigt die in 1% Triton-X-100 unlösliche Fraktion und Spalte S zeigt die in 1% Triton X-100 lösliche Fraktion von *L. tarentolae*-Zellen, die miz exprimieren. Spalte M zeigt die Molekulargewichtsmarker, Spalte C zeigt das Lysat von Kontrollzellen.

Beispiel 2

Beispiel des humanen Cytokin-Erythropoetin (Epo) aus dem episomalen Plasmid.

Konstruktion des *Leishmania tarentolae* T7-RNA-Polymerase(T7 RNAP)stamms.

[0061] Ein Vektor pT724, der T7RNA-Polymerase enthält, wurde konstruiert, indem das T7RNAP-Gen, das mit dem nuklearen Lokalisationssignal des SV40-Virus aus dem pLEW13-Plasmid fusioniert ist, (Misslitz A. et al.; Tobin and Wirth, 1992; Wirtz et al., 1999) mit BgIII- und BamHI-Stellen ausgeschnitten und indem es in die BgIII-Stelle des pIR-SAT-Vektors unter Verwendung von Standardtechniken der Molekularbiologie subkloniert wird. Die Integrität des offenen Leserahmens wurde durch Sequenzierung überprüft. *Leishmania tarentolae* wurde mit dem resultierenden Vektor transformiert, wie in Beispiel 1 beschrieben, und die gegen Arzneimittel resistenten Klone wurden selektiert. Die Gegenwart von T7RNAP-Protein wurde in den gesamten Lysaten aus transformierten Zellen durch Western Blotting mit polyklonalen Antikörpern gegen das T7RNAP identifiziert.

[0062] Konstruktion von durch pIR-SAT und T7RNAP gesteuerter Expression von humanem Erythropoetin.

[0063] Der verwendete pIR-Expressionsvektor wurde in Beispiel 1 beschrieben, jedoch wurde das Streptothricin-Acetyltransferase kodierende Gen mit Hygromycin-Phosphotransferase ersetzt, und ein T7-Promoter wurde am 5'-Ende der SSU-Region eingeführt. Die kodierende Vollängensequenz der den humanen Erythropoetin-Vorläufer enthaltenden Signalsequenz (EMBL-Zulassungsnr.; X02158) wurde durch PCR gemäß Standardprozeduren aus einer Plasmidquelle (pcDNA3.1/GS-epo, Invitrogen) mit Primer enthaltenden Sequenzen für das Restriktionsenzym BamHI an beiden Enden des Primers amplifiziert. Es wurden Standardtechniken des molekularen Klonierens angewendet, um das Epo-Gen in den Vektor pIR-Hyg in die BgIII-Stelle zu inserieren. Die Identifikation der positiven Klone wurde wie oben ausgeführt. Das resultierende Plasmid wurde in den *Leishmania tarentolae*-T7RNAP-Stamm wie Beispiel 1 elektroporiert, mit dem Unterschied, dass keine Linearisierung ausgeführt wurde, die gewährleistet, dass die DNA episomal gehalten wird. Positive Klone wurden wie in Beispiel 1 beschrieben selektiert, es wurden jedoch 50 µg/ml⁻¹ Hygromycin für die Selektion verwendet. Die resistenten Klone wurden selektiert, in das BHI-Medium mit 50 µg/ml⁻¹ Hygromycin gebracht, und die Zellen sowie die Kulturüberstände wurden durch Western-Blotting mit spezifischen polyklonalen Antikörpern analysiert. Die Ergebnisse werden in [Fig. 3B](#) gezeigt. Die Spalte T zeigt, dass die Überstände der Kulturen Proteine enthalten, die positiv mit den polyklonalen Antikörpern reagieren. Das Protein, das in dem Überstand gewonnen wurde, migrierte langsam. Dieses Verhalten wurde auf die posttranslationale Glycosylierung zurückgeführt, die für Epo typisch ist, und wurde durch die Deglycosylierung mit Nuromidase bestätigt, was in dem Entstehen von kleineren Spezies resultierte. Spalte M ([Fig. 3B](#)) zeigt die Molekulargewichtsmarker, Spalte C zeigt das Lysat von Kontrollzellen.

- Adoutte, A. and Philippe, H. (1993). The major lines of metazoan evolution: summary of traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. *EXS.* 63, 1-30.
- Alfonzo, J. D., Thiemann, O. H., and Simpson, L. (1998). Purification and characterization of MAR1. A mitochondrial associated ribonuclease from *Leishmania tarentolae*. *J. Biol. Chem.* 273, 30003-30011.
- Barry, J. D., Graham, S. V., Fotheringham, M., Graham, V. S., Kobryn, K., and Wymer, B. (1998). VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 93-105.
- Beverley, S. M. (1996). Hijacking the cell: parasites in the driver's seat. *Cell* 87, 787-789.
- Beverley, S. M. and Clayton, C. E. (1993). Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 21, 333-348.
- Biebinger, S., Wirtz, L. E., Lorenz, P., and Clayton, C. (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85, 99-112.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.
- Borst, P. and Rudenko, G. (1994). Antigenic variation in African trypanosomes. *Science* 264, 1872-1873.
- Coburn, C. M., Otteman, K. M., McNeely, T., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (1991). Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 169-179.
- Cruz, A., Coburn, C. M., and Beverley, S. M. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7170-7174.
- Elwasila, M. (1988). *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annulais* in the Sudan. *Parasitol. Res.* 74, 591-592.
- Ha, D. S., Schwarz, J. K., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 57-64.
- Hill, J. O. and Fahey, J. R. (1987). *Leishmania* spp.: agar plating as an alternative to limiting dilution and impression smears for the enumeration of viable parasites in tissue. *Exp. Parasitol.* 63, 108-111.
- Hotz, H. R., Biebinger, S., Flaspohler, J., and Clayton, C. (1998). PARP gene expression: control at many levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 131-143.
- Hubel A. and Beverley, S. M. A high-level chromosomal expression vector for *Leishmania*. Materials of the 2nd colloquium on *Trypanosoma* and *Leishmania* Research in Germany, 9.26-3-1999. ZMBH, Heidelberg.
- Kapler, G. M., Coburn, C. M., and Beverley, S. M. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol. Cell Biol.* 10, 1084-1094.
- Krakow, J. L., Hereld, D., Bangs, J. D., Hart, G. W., and Englund, P. T. (1986). Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 261, 12147-12153.
- La Flamme, A. C., Buckner, F. S., Swindle, J., Ajioka, J., and Van Voorhis, W. C. (1996). *Trypanosoma cruzi*: expression of interleukin-2 utilizing both supercoiled plasmids and linear DNAs. *Exp. Parasitol.* 83, 159-163.
- LeBowitz, J. H., Coburn, C. M., McMahon-Pratt, D., and Beverley, S. M. (1990). Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9736-9740.
- Lu, H. Y. and Buck, G. A. (1991). Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 109-114.
- Melo, M. N. (1981). Cultivation of *Leishmania* in chemically defined media. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 756
- Misslitz A., Mottram J., Overath P., and Aebischer T. Stable (1999) high-level expression of betagalactosidase and GFP in amastigotes of *Leishmania mexicana*. Abstracts of the 2nd colloquium on trypanosoma and leishmania research in Germany, 13-13
- Myler, P. J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A., and Stuart, K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome I has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2902-2906.
- Papadopoulou, B., Roy, G., and Ouellette, M. (1994). Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 39-49.
- Patnaik, P. K., Bellofatto, V., Hartree, D., and Cross, G. A. (1994). An episome of *Trypanosoma brucei* can exist as an extrachromosomal element in a broad range of trypanosomatids but shows different requirements for stable replication. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 153-156.
- Perry, K. and Agabian, N. (1991). mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia* 47, 118-128.
- Ray, D. S. and Hines, J. C. (1995). Disruption of the *Crithidia fasciculata* RNH1 gene results in the loss of two active forms of ribonuclease H. *Nucleic Acids. Res.* 23, 2526-2530.
- Sbicego, S., Schnauffer, A., and Blum, B. (1998). Transient and stable transfection of *Leishmania* by particle bombardment. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94, 123-126.

- Stuart, K. (1991). RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 412-416.
- Teixeira, S. M. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1503-1516.
- ten Asbroek, A. L., Mol, C. A., Kieft, R., and Borst, P. (1993). Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 133-142.
- Tobin, J. F. and Wirth, D. F. (1992). A sequence insertion targeting vector for *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 267, 4752-4758.
- Wirtz, E., Hartmann, C., and Clayon, C. (1994). Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucleic. Acids. Res.* 22, 3887-3894.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei* [In Process Citation]. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 89-101.
- Zhang, W. W., Charest, H., and Matlashewski, G. (1995). The expression of biologically active human p53 in *Leishmania* cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins. *Nucleic. Acids. Res.* 23, 4073-4080.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Jena Bioscience GmbH

<120> Proteinexpressionssysteme für nicht pathogene Kinetoplastiden

<130> 199jb01.wo

<140>

<141>

<150> 99122222.5

<1510> 1999-11-05

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 1

ctgcagtgat cagtcgccac catgcggggt tctcatcatc atc 43

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 2
ctgcagtgat caagatcttc actcggcagg cgggggac 38

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 3
ctgcaccgtg gtcgactgc 19

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4
cctagatga agatttcggt gatc 24

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5
ctgcaggttc acctacagct ac 22

<210> 6

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 6
 ggctagttag gcgcatcct ga 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7
 ggccgattca ttaatgcagg ac 22

Patentansprüche

1. Expressions- und Zufuhrsystem, umfassend einen nicht-pathogenen *L.-tarentolae*-Wirt und eine Nukleinsäuresequenz, die ein heterologes Protein codiert und operativ mit einem Promotor verbunden ist, und wobei die heterologe Nukleinsäuresequenz von 5'- und 3'-UTRs eines aktiv transkribierten *L.-tarentolae*-Wirtsgens flankiert ist.
2. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1, wobei die heterologe Nukleinsäuresequenz von Signalsequenzen für eine effiziente Sekretion, Trans-Spleißen und Polyadenylierung eines aktiv transkribierten *Kinetoplastidae*-Gens flankiert ist.
3. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 2, wobei die heterologe Nukleinsäuresequenz in einen linearen oder zirkulären Vektor oder ein lineares oder zirkuläres Plasmid eingebracht wird.
4. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 3, wobei zwei oder mehr Vektoren oder Plasmide eingebracht werden.
5. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 4, wobei das heterologe Protein ein Enzym ist, ausgewählt aus der Gruppe, die aus Katalase, Laccase, Phenoloxidase, Oxidase, Oxidoreduktasen, Cellulase, Xylanase, Peroxidase, Lipase, Hydrolase, Esterase, Cutinase, Protease und anderen proteolytischen Enzymen, Aminopeptidase, Carboxypeptidase, Phytase, Lyase, Pektinase und anderen pektinolytischen Enzymen, Amylase, Glucoamylase, α -Galactosidase, β -Galactosidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, Mannosidase, Isomerase, Invertase, Transferase, Ribonuklease, Chitinase und Desoxyribonuklease besteht.
6. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 5, wobei der nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Wirt oder der eingebrachte Vektor oder das eingebrachte Plasmid ein selektierbares Markergen umfasst.
7. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 6, wobei das Markergen aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem Hygromycin-Phosphotransferase-(HYG-)Gen in Kombination mit Hygromycin, einem Neomy-

cin-Phosphotransferase-(NEO-)Gen in Kombination mit G418, dem Produkt des Streptoalloteichus-hindustanus-BLE-Gens (BLE) in Kombination mit Phleomycin und dem Streptothricin-Acetyltransferase codierenden Gen (SAT) in Kombination mit Nourseothricin besteht.

8. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 7, wobei der Promotor ein Promotor eines aktiv transkribierten Kinetoplastidae-Gens oder ein stark die Transkription initiiierender heterologer Promotor ist.

9. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 8, wobei die Transkription der heterologen Nukleinsäure durch ein Repressor-responsives Element in Verbindung mit einem eingebrachten und exprimierten Regressorgen gesteuert wird.

10. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 9, wobei mindestens eine Kopie der heterologen Nukleinsäure sich in einem aktiv transkribierten Gen-Cluster der *L.-tarentolae*-Wirtszelle befindet.

11. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 10, wobei das aktiv transkribierte Gen-Cluster ein rRNA-Gen-Cluster ist.

12. Expressions- und Zufuhrsystem nach Anspruch 1 bis 9, wobei die heterologe Nukleinsäure sich in einem episomal transkribierten Plasmid befindet.

13. Vektor oder Plasmid, umfassend die heterologe Nukleinsäure, der ein Promotor vorausgeht und die von 5'- und 3'-UTRs eines aktiv transkribierten *L.-tarentolae*-Wirtsgens flankiert wird.

14. Vektor oder Plasmid nach Anspruch 13, umfassend Signalsequenzen für eine effiziente Sekretion, Trans-Spleißen und/oder Polyadenylierung eines aktiv transkribierten Kinetoplastidae-Gens.

15. Vektor oder Plasmid nach Anspruch 13 oder 14, umfassend ein Selektionsmarker-Gen.

16. Nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Zelllinien nach Anspruch 1, die mit der heterologen Nukleinsäure stabil transformiert sind.

17. Nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Zelllinien nach Anspruch 1, die mit der heterologen Nukleinsäure stabil transformiert sind und Vektoren oder Plasmide nach Anspruch 13 bis 15 umfassen.

18. Verfahren zur Produktion des heterologen Proteins in *L.-tarentolae*-Wirtszellen nach Anspruch 1, wobei eine stabil transformierte nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Zelllinie, umfassend
a) eine DNA-Sequenz, die für ein Gen eines selektierbaren Markers codiert, und
b) eine heterologe DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Protein codiert, operativ verbunden und integriert in das aktiv transkribierte Gen,
auf Selektionsmedien für die konstitutive heterologe Genexpression kultiviert wird.

19. Verfahren zur Produktion des heterologen Proteins in *L.-tarentolae*-Wirtszellen nach Anspruch 1, wobei eine stabil transformierte nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Zelllinie, umfassend
a) eine DNA-Sequenz, die für ein selektierbares Markergen codiert, und
b) eine heterologe DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Protein codiert, operativ verbunden in einer episomal aufrecht erhaltenen Plasmid-DNA mit einem aktiven Promotor,
auf Selektionsmedien für die konstitutive heterologe Genexpression kultiviert wird.

20. Verfahren zur Produktion eines heterologen Proteins in *L.-tarentolae*-Wirtszellen nach Anspruch 1, wobei eine stabil transformierte nicht-pathogene *L.-tarentolae*-Zelllinie, umfassend
a) eine DNA-Sequenz, die für eine heterologe RNA-Polymerase codiert, integriert in ein aktiv transkribiertes Gen-Cluster, und
b) eine DNA-Sequenz, die für einen selektierbaren Marker codiert, integriert in ein aktiv transkribiertes Gen-Cluster, und
c) eine DNA-Sequenz, die für ein Transkriptionsrepressor-Gen codiert, integriert in ein aktiv transkribiertes Gen-Cluster, und
d) eine heterologe DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Protein codiert, der der heterologe RNA-Polymerase-Promotor und ein Repressor-responsives Element vorausgehen,
mit einem selektierbaren Marker kultiviert wird und die Expression des heterologen Gens mit einem Inhibitor des heterologen Repressors induziert wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die heterologe RNA-Polymerase T7- oder T3-RNA-Polymerase ist.
22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Repressor ein heterologer Tet- oder Lac-Repressor ist.
23. Verwendung eines Expressions- und/oder Zufuhrsystems nach Anspruch 1 zur Expression heterologer Proteine.
24. Verwendung eines Expressions- und/oder Zufuhrsystems nach Anspruch 1 zur Zufuhr heterologer Proteine in Pflanzenzellen oder Tierzellen durch Transfektion mit dem nicht-pathogenen *L.-tarentolae*-Wirt.
25. Verwendung eines Expressions- und/oder Zufuhrsystems nach Anspruch 1 zur Expression und/oder Zufuhr heterologer eukaryotischer Proteine.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

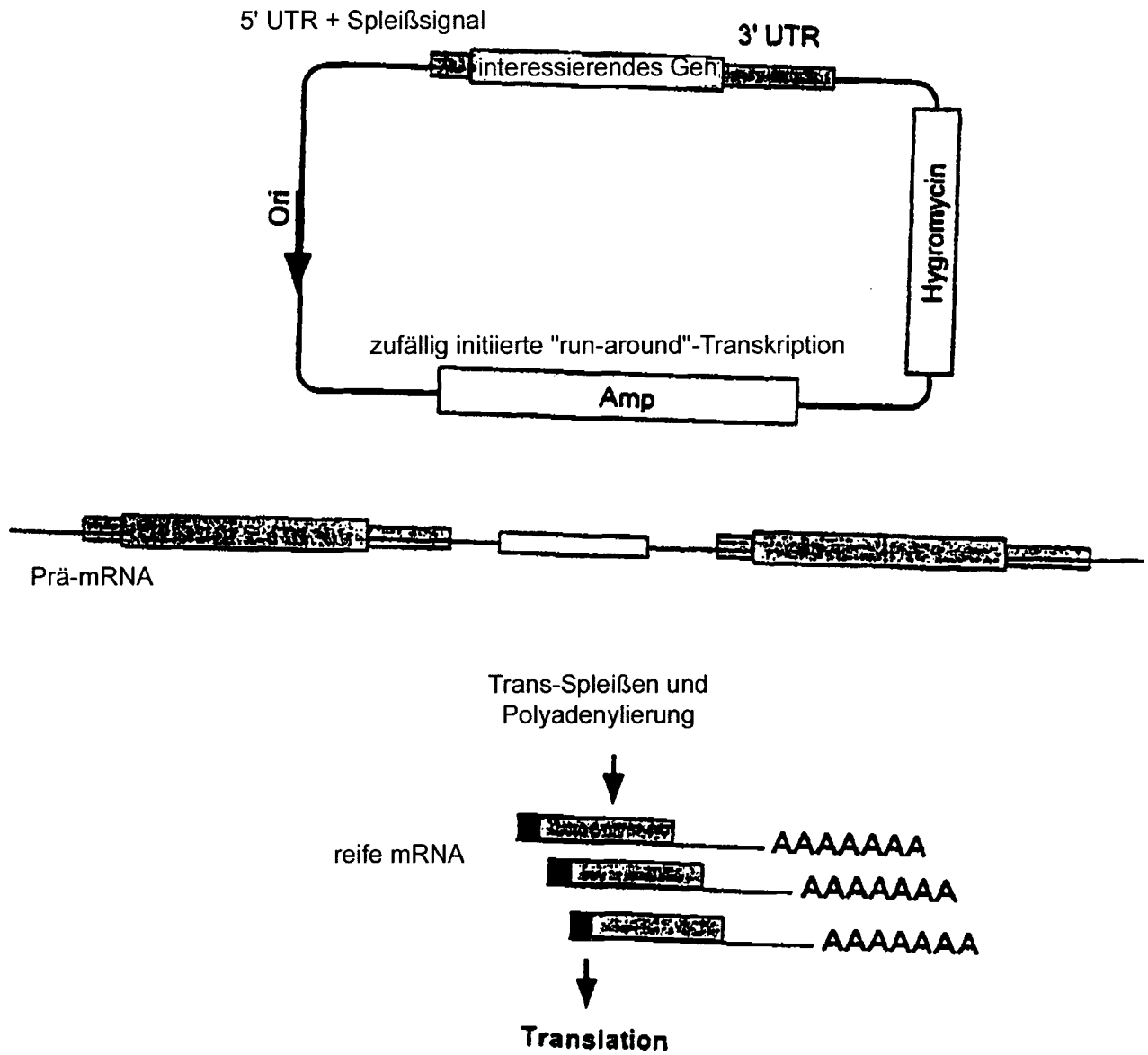


Fig. 1

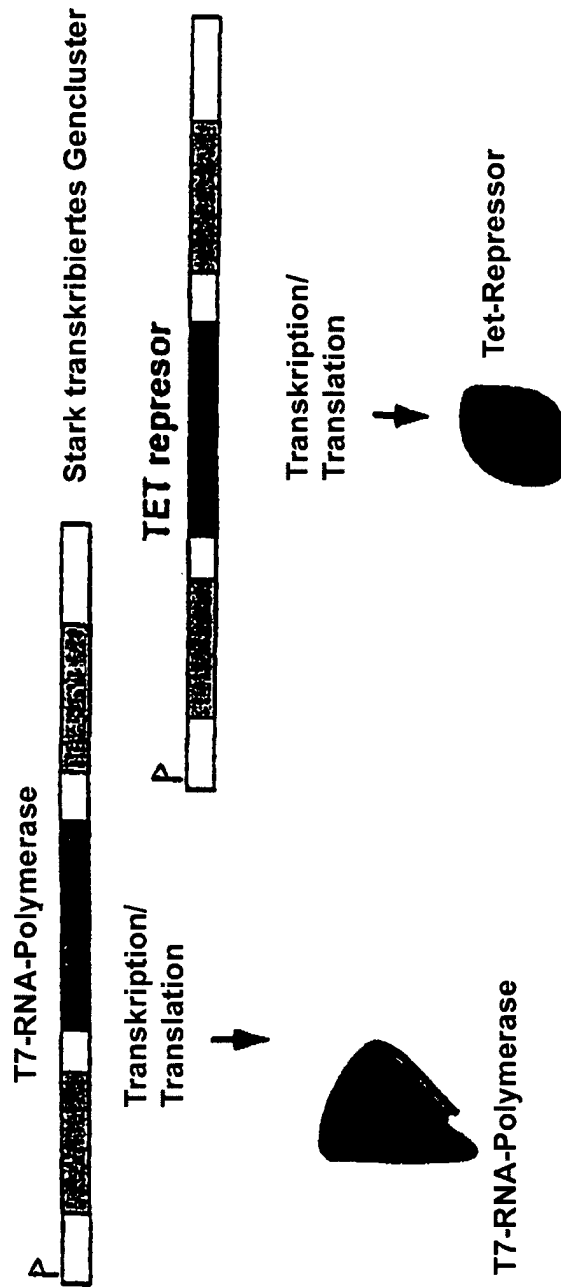


Fig. 2

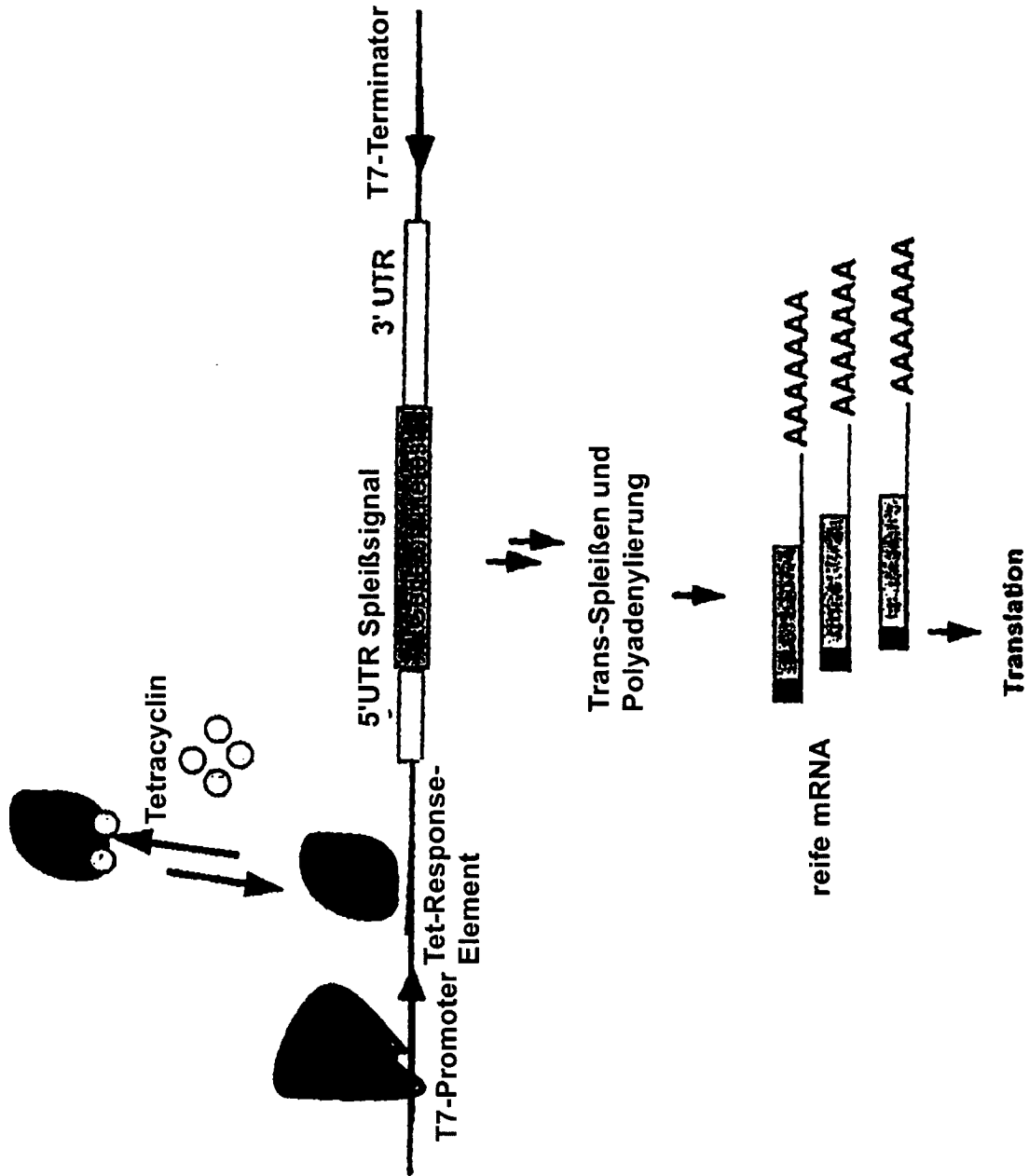


Fig. 2 (Fortsetzung)

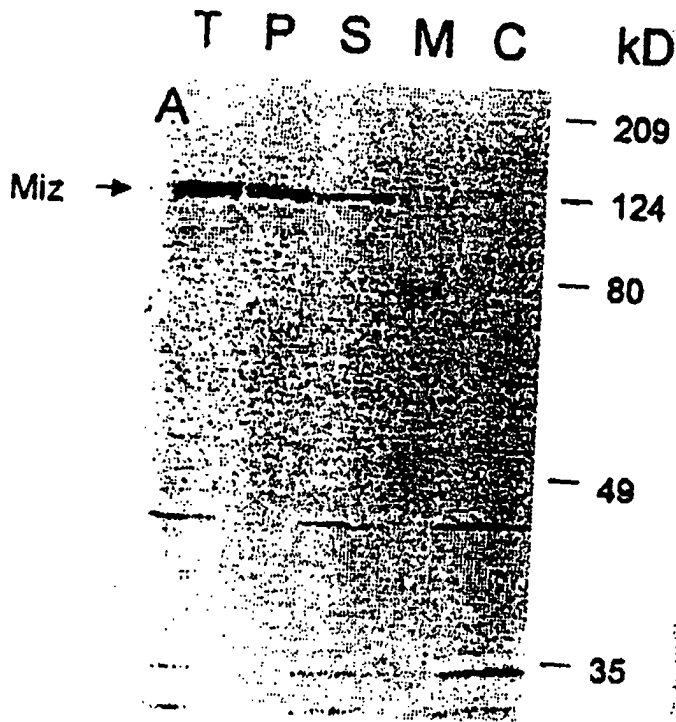


Fig. 3a

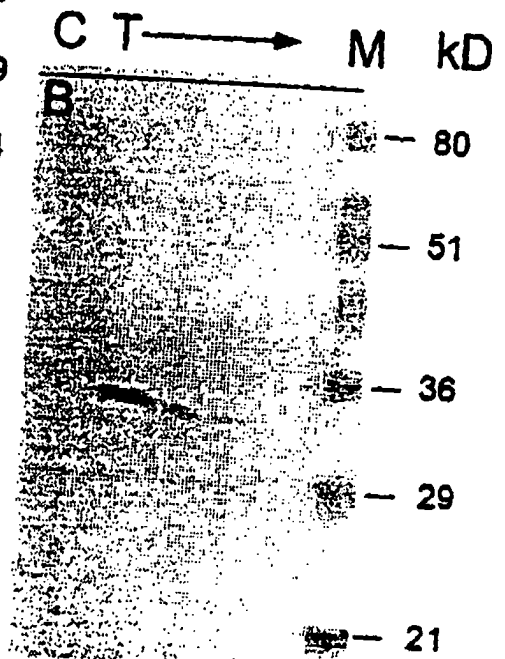


Fig. 3b