



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 29 576 T2** 2004.06.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 856 059 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 29 576.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA96/00693**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 933 294.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/014805**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.10.1996**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **24.04.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.08.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.08.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.06.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/67**

C12N 1/00, C12N 1/21, C12N 15/79,

C12N 5/10

(30) Unionspriorität:

548059 **17.10.1995** **US**

564973 **30.11.1995** **US**

(73) Patentinhaber:

Novartis AG, Basel, CH

(74) Vertreter:

Zumstein & Klingseisen, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

MORSEY, A., Mohamad, Saskatoon, CA

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN PLASMIDEN**

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

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Kombination genetisch erzeugter Bakterienzellen und rekombinanter Plasmide ist die Grundlage der industriellen Biotechnologie. Sie wird beispielsweise zur Herstellung industriell und medizinisch wichtiger Proteine, wie Enzyme, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Antigene, als auch lebender Bakterienimpfstoffe verwendet. Seit Beginn der DNA-Immunisierungs- und Gentherapietechnologien wurde der Verwendung genetisch erzeugter Bakterienzellen und deren Begleiter, der rekombinanten Plasmide, eine weitere Dimension hinzugefügt. Bei diesen Technologien ist die Expression von Proteinen in genetisch erzeugten Bakterienzellen nicht länger das Hauptziel; dies ist hingegen die Replikation und hochgradige Produktion strukturell und genetisch stabiler rekombinanter Plasmide mit fremder DNA. Dies liegt daran, dass die DNA anstelle eines darin kodierten Proteins das gewünschte Produkt ist, das man bei DNA-Immunisierungs- oder Gentherapien einsetzt.

[0002] Folglich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung genetisch erzeugter Bakterienzellen und deren Gefährten, der rekombinanten Plasmide, für die Klonierung fremder DNA. Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren bereit, mit dem fremde, für die Verwendung in der DNA-Immunisierungs- und Gentherapie geeignete DNA repliziert und in großen Mengen durch diese Gefährten, die rekombinanten Plasmide, erzeugt werden kann.

[0003] In einem frühzeitigen Entwicklungsstadium der rekombinanten DNA-Technologie wurde erkannt, dass eine Hauptherausforderung dieser aufsteigenden Technologie darin bestand, rekombinante Plasmide stabil in Bakterienzellen zu halten. Es wurde auch erkannt, dass dieses Problem größtenteils auf die schwerwiegende metabolische Last zurückzuführen ist, die genetisch erzeugten Bakterienzellen auferlegt wird, und zwar als Folge einer hochgradigen Expression für sie wertloser Proteine.

[0004] Daher treten bei der Vermehrung genetisch erzeugte Bakterienzellen, die keinen Anreiz haben, das rekombinante Plasmid zu behalten, im Laufe der Zeit Plasmid-freie Bakterienzellen mit zunehmender Häufigkeit auf. Aufgrund der schwereren metabolischen Last auf Plasmid-haltige Bakterienzellen haben Plasmid-freie Bakterienzellen höhere Wachstumsgeschwindigkeiten. Demnach kann die Bakterienkultur innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums von Plasmid-freien Bakterienzellen dominiert sein, wodurch sich die Plasmidausbeute verringert.

[0005] Da Plasmid-haltige Bakterienzellen fast immer einen Wachstumsnachteil im Vergleich zu Plasmid-freien Bakterienzellen haben, wird jede Plasmid-freie Bakterienzelle, die während ausgedehnter Kulturperioden auftritt, schließlich den Fermentations-Bioreaktor übernehmen. Diesbezüglich wird angenommen, dass ein 10%-iger Wachstumsvorteil für Plasmid-freie Bakterienzellen bei einer Verdünnungsrate von 1 Stunde pro Liter innerhalb von 150 Stunden in Kultur zur Übernahme des Bioreaktors führt, selbst wenn die Plasmidverlust-Häufigkeit nur 1×10^{-7} beträgt. Diese Berechnungen unterstreichen den Bedarf an einem Plasmidstabilisationssystem, das den Plasmidverlust mit 100%-iger Wirksamkeit verhindern kann, da es nicht unüblich ist, dass Bakterienzellen in industriellen Bioreaktoren kontinuierlich über 300 Stunden kultiviert werden.

[0006] Diese Beobachtungen zeigen, dass es ohne den Selektionsdruck, der rekombinante Plasmide in vermehrten, genetisch erzeugten Bakterienzellen hält, zu einer geringeren Häufigkeit Plasmid-haltiger Bakterienzellen kommt und dass der Plasmidverlust ferner durch die langsamere Wachstumsgeschwindigkeit von Plasmid-haltigen Bakterienzellen verstärkt wird.

[0007] Mehrere Verfahren wurden entwickelt, mit denen man die Stabilität rekombinanter Plasmide in Bakterienzellpopulationen verbessern kann. All diese Verfahren haben ein gemeinsames Grundprinzip: die Ausübung von Selektionsdruck zur Sicherung des Wachstums und das Manipulieren nur solcher Bakterienzellen, die das rekombinante Plasmid enthalten.

[0008] In einem dieser Verfahren wird ein Selektionsdruck auf die Bakterienzellen ausgeübt, indem man das gewünschte Gen in ein rekombinantes Plasmid kloniert, welches auch ein oder mehrere Gene mit einer Resistenz gegen bestimmte Antibiotika enthält. Die Zugabe des oder der bestimmten Antibiotika in die Kultur der wachsenden Bakterienzellen sichert daher, dass nur diejenigen, die das rekombinante Plasmid enthalten, überleben.

[0009] Obwohl Antibiotikaresistenz-Gene sehr nützlich und wirksam zur Bereitstellung eines Mittels für die Stabilität rekombinanter Plasmide sind, hat ihre Verwendung schwerwiegende Nachteile. Erstens ist die Zugabe von Antibiotika zu Kulturmedium während der Fermentation auf industriellem Maßstab sehr teuer. Zweitens können in manchen Fällen, bei denen der Mechanismus der Antibiotikaresistenz auf der Sekretion einer Antibiotika hemmenden Verbindung beruht, einige Plasmid-freie Bakterienzellen überleben, da benachbarte Plasmid-haltige Bakterienzellen ausreichende Mengen der Antibiotika-hemmenden Verbindung in das Kulturmedium abgeben, so dass sowohl die Plasmid-haltigen als auch die Plasmid-freien Bakterienzellen überleben können. Drittens wird die Verwendung rekombinanter Plasmid-DNA mit Antibiotikaresistenz-Genen bei der DNA-Immunisierungs- und Gentherapie als nachteilig betrachtet, da solche Gene in das tierische Genom oder

in das Genom endogener Mikroflora inkorporiert werden können. Viertens können zurückbleibende Antibiotika, welche die Plasmid-DNA kontaminieren (als Folge davon, dass man sie in das Kulturmedium zugibt) die Empfindlichkeit und/oder systemische allergische Reaktionen in bestimmten Tieren, die mit solcher Plasmid-DNA behandelt werden, hervorrufen.

[0010] Als Alternative zur Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen wurden mehrere Verfahren entwickelt, um die Stabilität rekombinanter Plasmide zu verbessern und die Anreicherung Plasmid-freier Bakterienzellen zu verhindern. Der gemeinsame Faden in diesen Verfahren liegt darin, das Überleben der genetisch erzeugten Bakterienzellen mit Hilfe eines Plasmid-stämmigen Gens von einem funktionalen Komplementationssystem abhängig zu machen.

[0011] Diese bekannten Verfahren können je nach Typ des von dem verwendeten Gen kodierten Polypeptids in drei Gruppen geteilt werden. Diese bekannten Verfahren sind jedoch alle entweder unpraktisch, um die Rate mit der Plasmid-freie Bakterienzellen unter industriellen Bedingungen auftreten zu vermindern, und/oder ungeeignet zur Produktion rekombinanter Plasmide für die Verwendung in Eukaryoten, wie für die DNA-Immunsierungs- und Gentherapie. Die einzelnen Verfahrensgruppen sind nacheinander beschrieben.

[0012] Die erste Gruppe umfasst Verfahren, bei denen ein chromosomaler Defekt zu einem Fehler bei der Herstellung eines essentiellen Nährstoffs führt und das Plasmid-stämmige Gen für ein Enzym kodiert, das für die Biosynthese dieses Nährstoffs (z.B. einer Aminosäure), der normalerweise in üblicherweise verwendetem Bakterienwachstumsmedium enthalten ist, essentiell ist (Dwivedi, C. P. et al. *Biotechnology and Bioengineering* (1982) 24: 1465–1668; Imanaka, T. et al. *J. Gen. Microbiol.* (1980) 118: 253–261). Diese Verfahren, wie im Stand der Technik beschrieben, erfordern, dass man die Plasmid-haltigen Bakterienzellen auf speziellem und teurem synthetischen Medium aufzieht, dem die fragliche Aminosäure fehlt. Dies ist unter Bedingungen industrieller Bioreaktoren ungeeignet.

[0013] Die zweite Gruppe umfasst Verfahren, bei denen ein chromosomaler Defekt zur fehlerhaften Produktion eines benötigten Endprodukts führt und das Plasmid-stämmige Gen für ein Enzym kodiert, das dieses Endprodukt synthetisiert, wobei das Endprodukt jedoch nicht in üblicherweise verwendetem Bakterienwachstumsmedium enthalten ist (Diderichsen, B. *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications* (1986) Seiten 35–46; Ferrari, E. et al. *BioTechnology* (1985) 3: 1003–1007; Galan, J. E. et al. *Gene* (1990) 94: 29; Nakayama, K. et al. *BioTechnology* (1988) 6: 696; Curtiss, R. et al. *Res Microbiol* (1990) 141: 797).

[0014] Bis heute hat sich dieses Verfahren auf die Synthese von Aminosäuren konzentriert, welche in die Bakterienzellwand eingebaut werden. Dieser Ansatz kann bei der DNA-Immunsierungs- und Gentherapie aus folgenden Gründen nicht verwendet werden.

[0015] Enzyme, die bislang in dieser Situation eingesetzt wurden (z.B. Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (asd) oder Alaninracemase (alr)), katalysieren die Bildung eines kleinen diffundierbaren Wachstumsfaktors (Aspartatsemialdehyd bzw. D-Alanin), und der Faktor lässt sich unter den Bedingungen in industriellen Bioreaktoren im Kulturmedium anreichern. Eine solche Anreicherung fördert den Plasmidverlust, da die Querversorgungswirkung der Plasmid-haltigen Bakterienzellen (die den kleinen diffundierbaren Wachstumsfaktor erzeugen) das Wachstum der Plasmid-freien Bakterienzellen unterstützt. Um solche Querversorgungseffekte zu verhindern, wurde dieser Gentyt in Plasmiden mit geringer Kopieanzahl verwendet, d.h. einer Art, die nur mit ein oder zwei Kopien pro Bakterienzelle auftritt. Klar ist, dass es für die Produktion industrieller Mengen Plasmid-DNA, bei der man Plasmidtypen wünscht, die zu einer hohen Kopiezahl führen, unpraktisch ist, rekombinante Plasmide mit geringerer Kopieanzahl einzusetzen. Rekombinante Plasmide mit hoher Kopiezahl sind solche Typen, die in einer Größenordnung von etwa 50 bis mehreren hundert Plasmidkopien pro Bakterienzelle vorkommen.

[0016] Das asd-Gen als Plasmid-stämmiges Gen hat einen weiteren Nachteil. Dieser Nachteil bezieht sich auf jüngste Erkenntnisse (Park, J. T. *Molecular Microbiology* (1995) 17: 421–426), dass Bakterienzellen (z. B. *E. coli*) tatsächlich etwa 50% ihrer Peptidoglycanschicht abbauen. Das Abbauprodukt ist ein Tripeptid, das aus L-Alanin/D-Glutamat/Mesodiaminopimelinsäure besteht, die von den Bakterienzellen zur Bildung von Peptidoglycan wiederverwendet wird, und so die Energie eingespart wird, welche die Bakterienzellen zum Synthetisieren neuer Tripeptidkomponenten von Peptidoglycan verbraucht hätten. Ein hoher Anteil dieses Tripeptids wird in das Kulturmedium freigesetzt und kann von benachbarten Bakterienzellen aufgenommen und in ihre eigene Peptidoglycanschicht eingebaut werden. Das asd-Gen kodiert für das erste Enzym in der Biosynthese der Aminosäuremesodiaminopimelinsäure (dap), die bereits in diesem Tripeptid enthalten ist. Da Bakterienzellen jedoch ihr eigenes Peptidoglycan wiederverwerten können und das Tripeptid mit der ersetzten Aminosäure dap sekretieren können, gibt es keinen Selektionsdruck auf Plasmid-haltige Bakterienzellen, ihre Plasmide zu behalten.

[0017] Die dritte Gruppe umfasst Verfahren, bei denen das Plasmid-stämmige Gen für ein Protein kodiert, das funktionelle und strukturelle Gegenstücke in eukaryotischen Zellen besitzt und/oder fähig ist, auf eine eukaryotische Zellkomponente zu wirken. Der Einsatz solcher Gene löst erhebliche Sicherheitsbedenken aus, da die von diesen Genen kodierten Proteine in eukaryotischen Zellen wirken könnten und das Gen selbst durch homologe Rekombination in das eukaryotische Genom integriert werden könnte. Beispiele umfassen Gene, die

für Proteine kodieren, welche an der vitalen Funktion der DNA-Replikation (Einzelstrang-DNA-Bindungsprotein; Proter, R. D. et al. *Biotechnology* (1990) 8: 47) oder einer tRNA-verwandten Funktion beteiligt sind (Valin-tRNA-Synthetase; Nilsson, J. und Skogman, G. *Biotechnology* (1986) 4: 901–903).

[0018] Die Verwendung als Marker für das für Alanin-Racemase (alr) kodierende Gen ist auch ungeeignet für die Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA für die DNA-Immunisierungs- und Gentherapie, da dieses Enzym in eukaryotischen Zellen wirken kann. Alanin-Racemase katalysiert die Umwandlung von L-Alanin zu D-Alanin. Da eukaryotische Zellen L-Alanin als eine natürliche Komponente in ihrer biochemischen Aufstellung enthalten, kann die Verwendung von Alanin-Racemase die biochemischen Reaktionen bei der L-Alanin-Biosynthese in eukaryotischen Zellen stören und könnte zur Bildung einer Aminosäure (D-Alanin) führen, die nicht natürlicherweise in eukaryotischen Zellen vorkommt.

[0019] Vor kurzem wurde ein Treffen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) einberufen, das dem Thema der DNA-Immunisierung und Gentherapie gewidmet war (*Nucleic Acid Vaccines*, WHO, Genf, wie berichtet in Cichutek, K. *Vaccine* (1994) 12: 1520; Robertson, J. S. *Vaccine* (1994) 12: 1526; Smith, H. *Vaccine* (1994) 12: 1515). Bei diesem Treffen von Experten auf dem Gebiet der DNA-Immunisierung und Gentherapie und Experten aus Regulierungsbehörden wurden mehrere Angelegenheiten zu Kernthemen erklärt, die angegangen werden müssen, um den Weg für diese Technologien für die Herstellung klinisch verwendbarer Produkte zu ebnet. Dieses umfassen die strukturelle und genetische Stabilität rekombinanter Plasmide, die potentielle Integration rekombinanter Plasmid-DNA in Wirts-Chromosomen sowie die Verwendung von Markergenen (z. B. [0020] Antibiotika-Resistenz-Genen) zur Selektion und Vermehrung der gewünschten Plasmidhaltigen Bakterienzellen.

[0021] Für das Einführen fremder DNA in Eukaryonten, wie für die DNA-Immunisierung und Gentherapie, besteht daher ein Bedarf für ein System, mit dem man genetisch erzeugte Bakterienzellen für die Herstellung Plasmid-stämmiger fremder Gene verwendet werden kann, ohne dass man dabei genetisches Material verwenden muss, das selbst in das eukaryotische Genom integriert werden oder das aufgrund seines kodierten Produkts in eukaryotischen Zellen oder auf eine eukaryotische Zellkomponente wirken kann.

[0022] Zudem wären verbesserte Verfahren für die stabile, hoch produktive Klonierung in Bakterien allein deshalb hilfreich, um große Mengen der gewünschten DNA herzustellen.

[0023] Loh et al., *Gene* 66 (1988) 259–268 berichtet von einer Nukleotidsequenz und der Transkriptionsanalyse einer Funktion (flm), die an der Erhaltung des F-Plasmids beteiligt ist.

[0024] Die GB-A-2177097 beschreibt unter anderem Replikons, die bekannte Zellen in Tierzellen oder Eukaryotenzellen replizieren, wobei die Replikons sowohl das hok-entsprechende als auch das sok-entsprechende Gen enthalten.

[0025] Steffes et al., *J. Bacteriol.* 174 (1992) 3242–3249 beschreibt das lysP-Gen.

[0026] Saqib et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 1219 (1994) 398–404 beschreibt das „LysA“-Gen.

Offenbarung der Erfindung

[0027] Die Erfindung stellt rekombinante Systeme zur Herstellung großer Mengen gewünschter DNA bereit und insbesondere DNA, die sicher in Eukaryoten integriert werden kann. Die erfindungsgemäßen Systeme bieten gegenüber bekannten Verfahren Vorteile bei der Wirksamkeit und Sicherheit.

[0028] Ein Aspekt der Erfindung betrifft daher Kultursysteme und die Komponenten davon, ausgelegt für die stabile, hochergiebige Produktion rekombinanter Plasmide. In diesen Kultursystemen werden Bakterienzellen verwendet, in denen das Bakterienzell-Chromosom irreversibel modifiziert wurde, um die Produktion einer für die Bakterienzellen toxischen Substanz zu bewirken. Die Bakterienzellen werden modifiziert, so dass sie rekombinante Plasmide enthalten, wobei die rekombinanten Plasmide genetisches Material umfassen, das zur Produktion einer zweiten Substanz führt, welche die Toxizität der ersten Substanz, die ansonsten unter den Kultursystembedingungen für die Zellen toxisch wäre, neutralisiert. Die Erfindung betrifft auch die Bakterienzellen und Plasmide, die in diesem Zellkultursystem verwendet werden können, sowie Verfahren zur Herstellung großer Mengen der gewünschten DNA mit Hilfe dieser Materialien. Die in diesem System verwendeten Plasmide können ferner eine fremde DNA enthalten, welche operativ an nur in Eukaryoten wirkende Kontrollsequenzen geknüpft ist, wobei die fremde DNA in Eukaryotenzellen exprimiert wird, nicht jedoch in Prokaryotenzellen.

[0029] Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft Zellkultursysteme für die stabile, hochergiebige Produktion rekombinanter Plasmide, bei denen das Bakterienzellchromosom der Bakterien in diesen Kulturen irreversibel modifiziert wurde, so dass die Zellen unfähig sind, einen essentiellen Metaboliten zu produzieren und auch unfähig sind, den Metaboliten aus dem Kulturmedium aufzunehmen. Das in diesem System verwendete rekombinante Plasmid ist ein Plasmid, welches genetisches Material enthält, das entweder die Fähigkeit besitzt, den Metaboliten zu synthetisieren oder die Fähigkeit besitzt, den Metaboliten aus dem Medium aufzunehmen, oder beides. Dieser Aspekt der Erfindung umfasst auch die Bakterienzellen und Plasmide, welches Komponenten des Zellkultursystems sind, sowie Verfahren zur Herstellung großer Mengen DNA mit Hilfe des Systems. Die

Plasmide können auch so modifiziert werden, dass sie eine fremde DNA enthalten, welche operativ an Kontrollsequenzen geknüpft ist, die nur in Eukaryoten wirken, so dass die fremde DNA nur in Eukaryotenzellen, nicht jedoch in Prokaryotenzellen exprimiert wird.

[0030] Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Kultursystem für die stabile und hochergiebige Produktion rekombinanter Plasmide für die DNA-Immunsierung und Gentherapie, umfassend genetisch erzeugte Bakterienzellen und rekombinante Plasmide. In diesem System ist das Bakterienzellchromosom irreversibel verändert und die Bakterienzellen werden unter solchen Bedingungen vermehrt, dass die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen von dem rekombinanten Plasmid abhängt. Das rekombinante Plasmid umfasst genetisches Material, welches die chromosomale Veränderung funktional ergänzt, jedoch besitzt das genetische Material kein funktionales oder strukturelles Äquivalent in Eukaryotenzellen und erzeugt kein Protein, das fähig ist, auf eine eukaryote Zellkomponente zu wirken. Das von dem kompensierenden genetischen Material kodierte Protein oder ein beliebiges Produkt davon wird auch nicht von den Bakterienzellen sekretiert oder in so hohen Mengen produziert, dass es für die Bakterienzellen toxisch ist. Das rekombinante Protein kann auch so angepasst werden, dass es fremde DNA enthält, die operativ an Kontrollsequenzen geknüpft ist, welche nur in Eukaryoten wirken, so dass die Expression der fremden DNA nur in eukaryotischen Zellen, nicht jedoch in prokaryotischen erfolgt. Die Erfindung betrifft auch Bakterienzellen und Plasmide mit hoher Kopiezahl, die in diesem Zellkultursystem verwendet werden können, sowie Verfahren für die stabile Herstellung fremder DNA, die mit Hilfe dieses Systems an Eukaryoten verabreicht werden kann.

[0031] Ein noch weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft Verfahren zur Bereitstellung einer gewünschten fremden DNA an eukaryote Zelle oder ein eukaryotes Subjekt, wobei das Verfahren umfasst, dass man die Zellen mit der durch die erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten DNA zusammenbringt oder diese verabreicht oder dem Subjekt die Bakterienzellen, die die gewünschte DN enthalten, verabreicht.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0032] **Fig. 1** zeigt die Konstruktion des rekombinanten Plasmids pCB237.

[0033] **Fig. 2** zeigt die Konstruktion eines genetisch erzeugten Bakterienstamms (CB101 E. coli) mit einer Deletion in den chromosomalen *galE*- und *galT*-Genen.

[0034] **Fig. 3** ist eine schematische Darstellung zur Klonierung des *murF*-Gens.

[0035] **Fig. 4** zeigt die Konstruktion des rekombinanten Plasmids pCB243.

[0036] **Fig. 5** zeigt die Konstruktion eines genetisch erzeugten Bakterienstamms (CB1031 E. coli) mit einer Deletion in dem chromosomalen *murF*-Gen.

[0037] **Fig. 6** ist eine Darstellung der Konstruktion von Plasmiden, die das *murF*-Gen enthalten.

[0038] **Fig. 7** zeigt Plasmidausbeuten für pMO 106, hergestellt in einem *murF*-defizienten Stamm bei 42°C.

[0039] **Fig. 8** zeigt die Stabilität von pMO 106 in TKL-50-Zellen.

[0040] **Fig. 9** zeigt die *in vitro*-Transfektionseffizienz eines Vektors, der *murF* enthält.

[0041] **Fig. 10** ist eine graphische Darstellung von ELISA-Titern, die aus Vektoren gewonnen wurden, welche Antigene mit und ohne dem *murF*-Gen enthalten.

[0042] **Fig. 11** zeigt die Nukleotidsequenz des Temperatur-empfindlichen *murF*-Gens, das von TKL-46 abstammt.

Erfindungsgemäße Ausführungsbeispiele

[0043] Die vorliegende Erfindung stellt Kultursysteme bereit, die die stabile Produktion einer gewünschten DNA ermöglichen. In manchen Fällen wird die gewünschte DNA eine fremde DNA sein, deren Expression in einer eukaryotischen Zelle entweder zur Immunsierung oder zur Gentherapie benötigt ist. Diese „Expression“ umfasst die einfache Transkription sowie die Produktion von Polypeptiden. Die fremde DNA kann in Eukaryoten zur Antisense- und Gentherapie, bei der therapeutische Proteine oder Marker hergestellt werden, verwendet werden.

[0044] Soll die fremde DNA einem Eukaryoten verabreicht werden, kann die amplifizierte replizierte DNA gewonnen und mittels üblicher Formulierungstechniken in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht werden. Geeignete Formulierungen zur Verabreichung von DNA umfassen verschiedene Träger, beispielsweise Liposomen, Dendrimere, Aquasomen, Cochleate, isotonische Kochsalzlösung oder PBS. Die DNA kann auch gewonnen und in einen retroviralen Vektor ligiert werden. Neben der DNA selbst können Bakterienzellen, die selbst die replizierte DNA enthalten, einem eukaryoten Subjekt verabreicht werden. Die Zellen werden so ausgewählt oder manipuliert, dass sie die geeigneten Merkmale haben, welche erlauben, dass die eingeschlossene DNA in den Nukleus, beispielsweise eines Makrophagen, gelangt, so dass die fremde DNA exprimiert werden kann. Die verabreichten Prokaryoten müssen daher fähig sein, das Lysosom zu verlassen, sich zu zersetzen und DNA muss in den Nukleus gelangen können. Manche Bakterienwirte, wie Shigella- und Listeria-Stämme besitzen die innewohnende Eigenschaft, die zu diesen Ergebnissen führt. Neben der experi-

mierbaren DNA waren Impfstoffe, die lediglich „nackte DNA“ beinhalten, auch erfolgreich.

[0045] Im allgemeinen erfolgt die Verabreichung der DNA, entweder als solche in einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder enthalten in Bakterienzellen, durch Injektion; üblicherweise intravenös, intramuskulär, intradermal oder subkutan. Die Verabreichung kann auch intranasal oder oral erfolgen oder durch ein Teilchenbeschussverfahren. Es kann jedoch jedes wirksame systemische Mittel der Verabreichung verwendet werden.

[0046] Alle erfindungsgemäßen Kultursysteme beruhen auf einer Komplementierung eines schädigenden Merkmals des Bakterienchromosom durch die Wirkung von genetischem Material, welches auf einem Plasmid, das selbst in der Bakterienkultur stabil repliziert wird, enthalten ist. In einer Ausführungsform erzeugt das bakterielle Chromosom eine Substanz, die für die Bakterienzellen toxisch ist, und diese Substanz wird durch eine durch das genetische Material auf dem Plasmid erzeugte Substanz bekämpft. In einer zweiten Ausführungsform wird das bakterielle Chromosom so modifiziert, dass die Zelle ihre Fähigkeit verliert, einen essentiellen Metaboliten zu produzieren und auch unfähig wird, diesen Metaboliten aus dem Kulturmedium aufzunehmen, und das rekombinante Plasmid stellt eine oder beide dieser Fähigkeiten wieder her. In jedem dieser Fälle kann die zu amplifizierende zusätzliche gewünschte DNA-Sequenz in dem Plasmid eingefügt sein; ferner kann die gewünschte DNA operativ an Kontrollsequenzen, die ausschließlich in eukaryoten Zellen exprimiert werden, geknüpft sein.

[0047] In einem dritten Ansatz, in diesem Fall zur Herstellung einer fremden DNA, die operativ an Kontrollsequenzen geknüpft ist, welche zur ausschließlichen Expression in Eukaryoten führen, verwendet die Erfindung insbesondere genetisch erzeugte Bakterienzellen, bei denen das native chromosomale Genom irreversibel verändert wurde. Die Veränderung kann aus einer Modifikation ein oder mehrerer chromosomaler Gene bestehen, die alleine oder in Kombination entscheidend für die Lebensfähigkeit der Zelle unter Bedingungen sind, unter denen sich die Bakterienzellen vermehren, oder sie kann aus der Insertion ein oder mehrerer fremder Gene bestehen, die für die Lebensfähigkeit der Bakterienzelle unter solchen Bedingungen schädlich sind.

[0048] Die Bakterienzellen werden dann weiter durch Einfügen eines rekombinanten Plasmids modifiziert, vorzugsweise eines rekombinanten Plasmids mit hoher Kopiezahl (ein Typ, der in einer relativ hohen Kopiezahl, von 50 bis mehreren hundert, pro Plasmid-haltige Bakterienzelle vorkommt). Das rekombinante Plasmid wird so konstruiert, dass es genetisches Material enthält, welches die oben genannte chromosomale Veränderung komplementiert. Die Einführung des rekombinanten Plasmids in die Bakterienzellen stellt die Lebensfähigkeit der Bakterienzellen wieder her und stellt sicher, dass nur Bakterienzellen, die das rekombinante Plasmid enthalten, überleben können.

[0049] Soll das Plasmid nur zur Herstellung eines nur in Eukaryoten wirksamen Expressionssystems für eine fremde, gewünschte DNA verwendet werden, muss das komplementäre genetische Material ein oder mehrere Gene betreffen, die kein funktionales oder strukturelles Äquivalent in den mit der Plasmid-DNA zu behandelnden Eukaryotenzellen haben. Das komplementäre genetische Material darf nicht für ein Polypeptid kodieren (oder eine mRNA erzeugen), das oder die fähig ist, auf eine Zellkomponente der mit der Plasmid-DNA zu behandelnden eukaryoten Zellen zu wirken. Ferner dürfen keine Faktoren oder Materialien, die auf Basis des komplementären genetischen Materials produziert werden, von den genetisch erzeugten Bakterienzellen sekretiert werden oder in Mengen produziert werden, die für die genetisch erzeugten Bakterienzellen toxisch sind.

[0050] Das komplementäre Genmaterial sichert daher die strukturelle und genetische Stabilität der genetisch erzeugten Bakterienzellen, indem ein selektiver Überlebensdruck nur auf Plasmid-haltige Bakterienzellen ausgeübt wird. Wie oben erwähnt, ist das Plasmid vorzugsweise, jedoch nicht zwingend, ein Plasmid mit hoher Kopiezahl.

[0051] Indem man ein oder mehrere fremde Gene in das gleiche rekombinante Plasmid kloniert, können die genetisch erzeugten Bakterienzellen zur Herstellung großer Mengen Plasmid-DNA, die das oder die fremden Gene enthält, verwendet werden, die ihrerseits bei der DNA-Immunsierung und Gentherapie, einschließlich der Antisensetherapie, eingesetzt wird. Die fremden Gene lassen sich vorzugsweise nicht in den genetisch erzeugten Bakterienzellen exprimieren, so dass eine unnötige metabolische Last oder Zelltoxizität vermieden wird. Dies lässt sich erreichen, indem man jedes fremde Gen operativ an einen Promotor knüpft, der nur in Eukaryoten wirkt.

[0052] In Abhängigkeit von dem oder den fremden Genen, die in das rekombinante Plasmid kloniert werden, kann die Plasmid-DNA bei der DNA-Immunsierung und/oder der Gentherapie verwendet werden. Die Plasmid-DNA kann zur in vivo-Behandlung verwendet werden, um ein oder mehrere gewünschte fremde Gene in einen eukaryoten Wirt zu übertragen. Das fremde Gen kann beispielsweise ein Säugetiergen sein, das für ein Polypeptid kodiert, welches für die Gesundheit oder das Überleben eines behandelten Säugetiers benötigt wird. Das fremde Gen kann auch ein virales Gen sein, welches für ein Polypeptid kodiert, gegen das man in einem behandelten Tier eine Immunität erzeugen will. Alternativ kann das in dem rekombinanten Plasmid enthaltene Expressionssystem eine Antisense-mRNA für die therapeutische Behandlung erzeugen. Andere Beispiele werden für den Fachmann auf dem Gebiet offensichtlich sein.

[0053] Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen be-

schrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf diese Ausführungsformen beschränkt und der Fachmann wird leicht alternative Ausführungsformen innerhalb des Umfangs der Beschreibung der erfindungsgemäßen Merkmale erkennen.

[0054] Eine Ausführungsform bezieht sich auf ein Aminosäure-addierendes Enzym, das zur Herstellung der Bakterienzellwand benötigt wird.

[0055] Peptidoglycane sind einzigartig in Bakterienzellen vorkommende Zellwandstrukturen. Demnach eignen sich einige der Gene, die für Enzyme kodieren, welche für die Biosynthese oder Anordnung der Peptidoglycanschicht verantwortlich sind, ausgezeichnet als Kandidaten für Markergene in rekombinanten Plasmiden für die DNA-Immunsierung und Gentherapie.

[0056] Die Peptidoglycanschicht besteht aus mehreren aneinander grenzenden Ketten. Jede Kette besteht aus sich abwechselnden Einheiten aus N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosamin-(NAG)-Resten. Bestimmte NAM-Reste auf jeder Kette sind an ein Tetrapeptid geknüpft, dessen Zusammensetzung leicht in Abhängigkeit davon variiert, ob das Bakterium Gram-positiv oder Gram-negativ ist. Die benachbarten Peptidoglycanketten sind miteinander über eine Peptidbindung verbunden, welche die dritte Aminosäure, Diaminopimelin (dap), eines Tetrapeptids mit der vierten Aminosäure, D-Alanin, des Tetrapeptids am NAM-Rest der benachbarten Kette verbindet. Die Aminosäure D-Alanin ist eine einzigartige Komponente des Peptidoglycans aller Bakterien. Diese Aminosäure wird durch die Wirkung des als Alanin-Racemase (alr) bezeichneten Enzyms aus L-Alanin synthetisiert. Die Bildung dieser letzteren Peptidbindung ist wesentlich für die Überlebensfähigkeit der Bakterienzelle, da die Bakterienzellen ohne diese Bindung in üblicherweise verwendetem bakteriellem Wachstumsmedium lysieren.

[0057] Die Tetrapeptidbildung erfordert die Wirkung zweier verschiedener Gengruppen, nämlich diejenigen, die für Enzyme kodieren, welche für die Biosynthese der einzelnen Aminosäuren der Tetrapeptide benötigt werden (z. B. Enzyme, die für die Biosynthese von L-Alanin, D-Glutaminsäure, dap und D-Alanin benötigt werden) und diejenigen, die für die sequentielle Addition und Ligierung dieser Aminosäuren aneinander benötigt werden, so dass das Tetrapeptid entsteht. Die letzteren Enzyme sind die sogenannten Aminosäure-Additions-Enzyme. Allgemein ist die Tetrapeptidsequenz in N→ C-Richtung L-Alanin/D-Glutaminsäure/Diaminopimelinsäure (dap)/D-Alanin. Die Reihe der Aminosäure-addierenden Enzyme umfasst das L-Ala-addierende Enzym, welches die Aminosäure L-Alanin an die Polysaccharidkette addiert; das Enzym, das die Aminosäure D-Glutaminsäure an das Polysaccharid-gebundene L-Alanin addiert (murD), das Enzym, welches die Aminosäure dap an das L-Alanin/D-Glutaminsäure-Dipeptid addiert (murF) und das Enzym, welches D-Alanin an das L-Alanin/D-Glutaminsäure/dap-Tripeptid addiert (murF).

[0058] Folglich lässt sich gemäß einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ein System zur Herstellung einer für die Verwendung bei der DNA-Immunsierung und Gentherapie geeigneten Plasmid-DNA durch genetisch erzeugte Bakterienzellen konstruieren, so dass ein chromosomales Gen, welches für eines der Aminosäure-addierenden Enzyme (z. B. das murF-Gen) kodiert, seine Funktionalität verliert. Die Lebensfähigkeit der genetisch erzeugten Bakterienzellen wird durch die Aufnahme eines rekombinanten Plasmids, auf dem ein funktionales murF-Gen kloniert ist, wieder hergestellt.

[0059] Temperatur-empfindliche Bakterienzellen mit einer Mutation in dem Gen, welches für eines der Aminosäure-addierenden Enzyme kodiert (z. B. murF), sind bekannt. Diese Zellen wachsen nicht bei nicht-zulässigen Temperaturen, obwohl sie die einzelnen Aminosäurekomponenten des Tetrapeptids synthetisieren können. Die Unfähigkeit dieser Mutanten bei nicht-zulässigen Temperaturen zu wachsen ist darauf zurückzuführen, dass sie bei dieser Temperatur kein vollständiges und funktionales Tetrapeptid zusammenfügen können. Weitere bakterielle Wirtszellen, die sich für die erfindungsgemäßen Zellkulturen eignen, umfassen daher solche vorhandenen Stämme, die bei nichtzulässigen Temperaturen kultiviert werden.

[0060] Die Verwendung des murF-Gens in dem gewonnenen System mit den genetisch erzeugten Bakterienzellen, einschließlich komplementärer rekombinanter Plasmide, hat mehrere Vorteile. Erstens ist das murF-Enzym ein intrazelluläres und nicht-diffundierbares Protein und erzeugt kein toxisches oder sekretiertes Produkt. Dadurch wird verhindert, dass sich die Anzahl der Plasmid-haltigen Bakterienzellen aufgrund der zuvor beschriebenen Querversorgungswirkung verringert. Zweitens ist das murF-Gen in Bakterienzellen einzigartig und hat kein funktionales oder strukturelles Gegenstück in Eukaryotenzellen, wie nachstehend insbesondere für humane Zellen gezeigt. Drittens hat das murF-Gen kein Substrat in eukaryoten Zellen. Es scheint daher kein Risiko einer Aktivität des murF-Enzyms zu bestehen, selbst wenn das murF-Gen in eukaryoten Zellen exprimiert wird, welche mit der Plasmid-DNA behandelt wurden. Diese Vorteile führen zu einer wirksamen Stabilisierung und Produktion des rekombinanten Plasmids unter industriellen Fermentationsbedingungen. Ferner ist das auf murF basierende System sicher für den Einsatz bei der DNA-Immunsierung und Gentherapie.

[0061] Jedes der vier oben beschriebenen Aminosäure-addierenden Enzyme kann als Grundlage für das erfindungsgemäß geeignete Komplementierungssystem verwendet werden. Das Bakteriengenom kann daher geändert werden, indem man das für das L-Alaninaddierende Enzym kodierende Gen deletiert und das für dieses Enzym kodierende Gen auf einem Plasmid bereitstellt; oder indem man das Chromosom so modifiziert, dass es nicht mehr fähig ist, murD, murE oder murF zu synthetisieren, und man die Fähigkeit das entsprechen-

de Enzym herzustellen, auf dem Plasmid bereitstellt.

[0062] Obwohl man jedes dieser Aminosäure-addierenden Enzyme auswählen kann, besteht eine Hierarchie bezüglich einer bevorzugten Auswahl von murF- > murE- > murD > L-Ala-addierendem Enzym. Diese Betrachtung bezieht sich auf die Wirksamkeit des Zellwandabbaus bei der Teilung der Bakterien. Der Abbau erfolgt unvermeidlich vom C-Terminus des Tetrapeptids aus und kann unvollständig sein. Daher benötigen die Tochterzellen die murF-Komponente allgemein dringender als murE, die jedoch wiederum dringender benötigt wird als murD oder das L-Alanin-addierende Enzym.

[0063] Eine zweite Ausführungsform beruht darauf, dass man die Funktion eines chromosomalen Gen ausschaltet, welches für ein Enzym kodiert, das für die Synthese einer natürlicherweise in üblichem Bakteriummedium für industrielle Anlagen vorliegenden Aminosäure verantwortlich ist. Allgemein ist eine solche chromosomale Genveränderung weder ein praktisches Verfahren zur Verbesserung der Stabilität rekombinanter Plasmide noch zur Produktion großer Mengen Plasmid-DNA. Werden jedoch, wie nachstehend als Beispiel beschrieben, zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen eingebaut, kann dieser Ansatz zur stabilen Produktion von Plasmid-DNA auf industriellem Maßstab verwendet werden.

[0064] Beispielsweise wird ein chromosomales Gen (als lysA bezeichnet), welches für ein Enzym kodiert, das für die Synthese der Aminosäure Lysin wesentlich ist, nicht-funktional gemacht. Ein zweites chromosomales Gen (als lysP bezeichnet), welches für ein Permease-Protein kodiert, das für die Aufnahme dieser Aminosäure aus der Umgebung oder dem Wachstumsmedium verantwortlich ist, wird ebenfalls nichtfunktional gemacht. Solche genetisch erzeugten Bakterienzellen können nicht länger alleine überleben. Sie können überleben, wenn sie mit einem rekombinanten Plasmid transformiert werden, das ein funktionales Gen für oder ein Äquivalent zu lysA oder lysP trägt. Daher bietet eine genetisch erzeugte Bakterienzelle, bei der die Lysinaufnahme (aufgrund eines nicht-funktionalen chromosomalen lysP-Gens) und die Lysinbiosynthese (aufgrund eines nicht-funktionalen chromosomalen lysA-Gens) gestört ist, und die mit einem rekombinanten Plasmid transformiert wird, das ein funktionales lysA-Gen oder ein Äquivalent davon trägt, ein wirksames System zur stabilen und hochgradigen Produktion von Plasmid-DNA für die DNA-Immunisierung und Gentherapie.

[0065] Das Plasmid-stämmige Komplementationsgen ist in diesem Beispiel das lysA-Gen, da bekannt ist, dass das lysA-Gen kein strukturelles oder funktionales Gegenstück in eukaryotischen Zellen besitzt. Ferner hat das lysA-Enzym, das von dem lysA-Gen kodiert wird, in eukaryoten Zellen kein Substrat und als solches kann dieses Enzym in eukaryoten Zellen nicht funktionieren, selbst wenn es darin exprimiert wird. Da Lysin eine essentielle Aminosäure für alle lebenden Mikroorganismen, einschließlich sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien, ist, stellt dieses System ein praktisches und vielseitiges System für die stabile und hochgradige Produktion von Plasmid-DNA in allen Bakterienzellen bereit.

[0066] In einer dritten Ausführungsform wird ein Selektionsdruck beibehalten, indem man einen Postsegregations-Tötungsmechanismus verwendet. Die natürlich vorkommenden E. coli-Plasmide R1 und F enthalten Genloki, die für diesen Ansatz geeignet sind. Bei dem R1-Plasmid ist dieser Locus parB (Gerdes, K. et al. PNAS (1986) 83: 3116–3120; Rasmussen, P. B. et al. Mol. Gen. Genetics (1987) 209: 122–128). Im Fall des F-Plasmids ist dieser Locus Flm (Loh, S. M. et al., Gene (1988) 66: 259–268). Diese Loci vermitteln eine wirksame Stabilisierung des rekombinanten Plasmids mittels eines Postsegregations-Tötungsmechanismus.

[0067] Sowohl der parB- als auch der flm-Locus bestehen aus zwei kleinen Genen, die im Fall von parB als das hok-Gen (Wirt-tötend) und sok-Gen (Supressor der Wirt-Tötung) und im Fall des F-Plasmids als das flmA-Gen (Wirt-tötend) und das flmB-Gen (Supressor der Wirt-Tötung) bezeichnet werden. Das hok- und das flmA-Gen sind daher in Struktur und Funktion analog, ebenso wie das hok- (Anmerkung des Übersetzers: sok-) und das flmB-Gen.

[0068] Die hok- und flmA-Genprodukte sind kleine hydrophile Proteine (52 Aminosäuren), die potente Wirt-tötende Faktoren sind. Die Expression des hok-Gens wird durch ein kleines (etwa 100 Basenpaar großes) RNA-Molekül reguliert, welches von dem sok-Gen transkribiert wird und als Antisense-RNA komplementär zu der mRNA des hok-Gens wirkt. In ähnlicher Weise wird die Expression des flmA-Gens durch ein etwa 100-Basenpaar-RNA-Molekül reguliert, welches von dem flmB-Gen transkribiert wird und als Antisense-RNA komplementär zu der mRNA des flmA-Gens wirkt. Die hok- und flmA-mRNAs sind hochstabil, wohingegen die sok- und flmB-RNAs schnell abgebaut werden. In beiden Fällen ist es die unterschiedliche Stabilität der zwei RNA-Arten, die zu dem Mechanismus der Tötung der Bakterienzelle führt. Verliert eine Bakterienzelle, die ein Plasmid mit dem parB-Locus enthält, ein solches Plasmid, führt das längere Vorliegen der hok-mRNA zur Synthese des hok-Proteins, wodurch ein schnelles und selektives Töten der neu gebildeten Plasmid-freien Bakterienzellen sichergestellt wird. Verliert eine Bakterienzelle, die ein Plasmid mit dem Flm-Locus enthält, das Plasmid, kommt es durch das längere Vorliegen der flmA-mRNA in ähnlicher Weise zur Synthese des flmA-Proteins, wodurch ein schnelles und selektives Töten der neu gebildeten Plasmid-freien Bakterienzellen sichergestellt wird.

[0069] Die kombinierte Wirkung der hok- und sok-Gene oder der flmA- und flmB-Gene kann vorteilhaft zur Konstruktion eines Systems für die Produktion von Plasmid-DNA für die DNA-Immunisierung und Gentherapie verwenden kann. Die Nützlichkeit dieser Systeme könnte dadurch beeinträchtigt werden, dass eukaryotische

Zellen, wie solche der Säugerwirte, denen man während der DNA-Immunisierung oder Gentherapie Plasmid-DNA mit der hok/sok- oder flmA/flmB-Kombination injiziert, getötet werden. Daher wird nur das sok-Gen (100 bp) oder das flmB-Gen (100 bp) in das rekombinante Plasmid eingebracht, wohingegen das hok-Gen oder das flmA-Gen in das Bakterienzellchromosom integriert wird.

[0070] Für das auf der hok/sok- oder flmA/flmB-Kombination beruhende Plasmidproduktionssystem wird genetisch ein Bakterienstamm erzeugt, indem man das für das hok- oder flmA-Protein kodierte Gen in einer nicht-essentiellen Region des Bakterienchromosoms einfügt (z. B. in dem lacZ-Gen). Genetisch erzeugte Bakterienzellen werden dann mit einem rekombinanten Plasmid transformiert, in dem der einzige Marker das entsprechende sok- oder flmB-Gen ist. Solange das rekombinante Plasmid in den Bakterienzellen verbleibt, reguliert das sok- oder flmB-Gen des rekombinanten Plasmids die Expression des hok- oder flmA-Gens und die Bakterienzelle gedeiht. Sobald das rekombinante Plasmid mit dem sok- oder flmB-Gen verloren geht, stirbt die Bakterienzelle, da der Tötungsfaktor von dem chromosomalen hok- oder flmA-Gen erzeugt wird.

[0071] Dieses System bietet folgende spezifische Vorteile für die Herstellung von Plasmid-DNA. Erstens ist das System in seiner Verwendung nicht auf einen bestimmten Bakterienstamm beschränkt. Zweitens, da nur 100 by DNA, die für das sok- oder das flmB-Gen kodiert, in dem rekombinanten Plasmid verwendet wird, kann ein viel kleineres und kompakteres Plasmid konstruiert werden. Dies selbst führt zu einer höheren Plasmidausbeute und bietet die Möglichkeit, mehr als ein fremdes Gen in ein rekombinantes Plasmid zu klonieren.

[0072] Der Fachmann wird weitere erfindungsgemäße Kombinationen genetisch erzeugter Bakterienstämme und rekombinanter Plasmide (die als Vektoren für fremde DNA dienen können) auffinden, bei denen das rekombinante Plasmid DNA enthält, die komplementär zu der veränderten (d.h. addierten oder durch Modifikation, Deletion oder Inaktivierung nicht-funktional gemachten) chromosomalen DNA ist, und welche man demnach als Marker für das Vorliegen oder die Abwesenheit des rekombinanten Plasmids und zur Ausübung von Selektionsdruck verwendet werden kann, um das rekombinante Plasmid in der genetisch erzeugten Bakterienzelle zu halten.

[0073] Die vorliegende Erfindung wird ausführlich in nachfolgenden Beispielen beschrieben. Diese Beispiele sind zur Verdeutlichung eingefügt und nicht so zu verstehen, dass sie die vorliegende Erfindung beschränken.

Beispiel 1

Konstruktion des chromosomal veränderten Wirts CB102

[0074] Die Peptidoglycanschicht ist unter gewöhnlichen Bedingungen absolut notwendig für die Lebensfähigkeit der Bakterienzelle, da sie die zerbrechliche zytoplasmatische Membran vor einem osmotischen Schock schützt. Unter bestimmten Bedingungen können Bakterienzellen, die einen Defekt in der Peptidoglycansynthese haben, dennoch in bestimmten Medientypen überleben, wie solchen, die mit Natriumchlorid oder Sucrose angereichert sind. Der Grund für die Fähigkeit dieser Bakterienzellen in diesen Medientypen zu überleben, wird auf die Wirkung dieser Zusatzverbindungen, wie osmotischer Stabilisatoren, zurückgeführt oder auf deren Fähigkeit, die Produktion von Colansäure („colanic acid“) zu induzieren, welche als Osmosestabilisator wirkt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Bakterienzellen daher genetisch so erzeugt, dass sie vollständig von der Gegenwart einer intakten Peptidoglycanschicht abhängig sind, unabhängig vom Medientyp, in dem die Bakterienzellen aufgezogen werden. Die Fähigkeit dieser Bakterienzellen, Colansäure zu synthetisieren, wurde in dieser Ausführungsform ausgeschaltet, zusätzlich dazu, dass eine Mutation oder eine Deletion eingeführt wurde, die zu einer defekten Peptidoglycananordnung führte.

[0075] Colansäure ist ein Polymer aus Glucose, Galactose, Fructose und Glucuronsäure. Da Galactose ein Bestandteil der Colansäure ist, besteht eine Möglichkeit, mit der man den Bakterien die Fähigkeit entziehen kann, Colansäure herzustellen, darin, dass man die Fähigkeit der Bakterienzellen hemmt, Galactose zu synthetisieren und zu verwenden. In diesem Beispiel wird dies durch Einführen irreversibler Deletionen in die chromosomalen galE- und galT-Gene erreicht, die an der Verwendung von Galactose beteiligt sind. Bei dem erhaltenen Bakterienstamm wird dann eine Deletion in dem chromosomalen murF-Gen durchgeführt, so dass ein Stamm entsteht, dessen Lebensfähigkeit von der Komplementierung mit einem rekombinanten Plasmid mit einem funktionalen murF-Gen abhängt, und zwar wie folgt:

[0076] Zunächst wurde der JM105-E. coli-Stamm, der eine Deletion in den galE- und galT-Genen enthielt, konstruiert. Um die galE- und galT-Gene zu klonieren, wurden zwei Oligonukleotidprimer (stromaufwärts und stromabwärts) auf Grundlage der bekannten Nukleotidsequenzen der galE- und galT-Gene synthetisiert. Um das Klonieren zu erleichtern, wurde eine XbaI-Stelle am Ende jeder dieser Primer erzeugt. Der stromaufwärts liegende Primer (als gal-3 bezeichnet) entsprach dem 5'-Ende des galE-Gens und hatte folgende Nukleotidsequenz:

5' gctctagaggctaaattctgtgtaaacga3'.

[0077] Der stromabwärts liegende Primer (als gal-4 bezeichnet) entsprach dem 3'-Ende des galT-Gens und hatte folgende Nukleotidsequenz:

5'gctctagatctgccagcatttcataaccaa3'.

[0078] Die Primer gal-3 und gal-4 (jeweils 100 pmol) wurden mit 2 µl einer Übernacht-Kultur der JM105-Bakterienzellen zusammengebracht. Zu diesem Gemisch gab man 4 µl einer 5 mM Desoxynukleosid-(dNTP) Lösung, 1 µl 100 mM MgSO₄, 5 µl 10 × Vent-Reaktionspuffer und 1 µl Vent-DNA-Polymerase (gekauft von NEB Biolab) hinzu. Das Reaktionsgemisch wurde über 30 Zyklen amplifiziert, wobei folgendes Zyklisierungsprofil verwendet wurde: Schmelzen: 94°C für 1 Minute, Annealing: 55°C für 1 Minute und Verlängerung: 72°C für 2 Minuten. Nach der Amplifikation wurde das Reaktionsgemisch durch Elektrophorese auf 1%-iger Agarose untersucht. Eine einzelne Bande der erwarteten Größe (etwa 2 Kilobasenpaare; entsprechend den gesamten galE- und galT-Genen) war nach der Ethidiumbromidfärbung der in dem Polymerasekettenreaktions-(PCR) Gemisch vorliegenden DNA erkennbar. Die obige DNA-Bande wurde ausgeschnitten und mit Hilfe eines GeneClean-(Marke) Kits (von BioCan) von der Agarose gereinigt. Wie in **Fig. 1** gezeigt, wurde das gereinigte DNA-Fragment mit T4-Polynukleotidkinase (Pharmacia) behandelt und in die HincII-Stelle des pTZ18-Plasmids ligiert. Das pTZ18-Plasmid mit den galE- und galT-Genen wurde als pCB233 bezeichnet.

[0079] Eine interne Deletion in den galE- und galT-Genen wurde, wie weiter in **Fig. 1** gezeigt, konstruiert. Ein pTZ18-Plasmid wurde mit dem HindIII-Enzym geschnitten, mit dem Klenow-Enzym behandelt und selbst-ligiert, so dass das Plasmid pCB234 entstand, in dem keine HindIII-Stelle mehr vorlag. Das Plasmid pCB233 wurde mit EcoRI- und PstI-Enzymen geschnitten, um ein DNA-Fragment zu gewinnen, welches die gesamten galE- und galT-Gene umfasste. Dieses letztere Fragment wurde in pCB234 ligiert, welches auch mit EcoRI- und PstI-Enzymen geschnitten war. Das Ligationsereignis führte zur Isolierung eines Plasmids, das als pCB235 bezeichnet wurde. Das Plasmid pCB235 wurde mit HindIII- und NcoI-Enzymen geschnitten, um einen internen Teil der Nukleotidsequenz in den galE- und galT-Sequenzen zu deletieren, mit Klenow-Enzym behandelt und dann selbst-ligiert, so dass das Plasmid pCB236 entstand. Das Plasmid pCB236 wurde mit EcoRI- und PstI-Enzymen geschnitten, so dass die gekürzten galE- und galT-Gene entstanden. Das DNA-Fragment mit den gekürzten galE- und galT-Genen wurde mit T4-DNA-Polymerase-Enzym behandelt. Gleichzeitig wurde das Suizid-Vektorplasmid, das als pCVD442 bezeichnet wird (J. B. Kaper; Universität von Pennsylvania), mit dem XbaI-Enzym geschnitten und dann mit dem Klenow-Enzym behandelt. Das DNA-Fragment, welches die gekürzten galE- und galT-Gene enthielt, wurde dann in das obige pCVD442 ligiert und dann in *E. coli* SY327 transformiert, so dass das Plasmid pCB237 entstand. Das Plasmid pCB237 wurde dann in *E. coli* SM10 transformiert und die letzteren Bakterienzellen, welche pCB237 enthielten, wurden für den weiteren Gebrauch wie nachstehend beschrieben ausgewählt.

[0080] Die galE- und galT-Deletionen wurden wie in **Fig. 2** gezeigt in JM105 *E. coli* eingefügt. SM10-Bakterienzellen, die das Plasmid pCB237 trugen, wurden verwendet, um die irreversibel nicht-funktionalen (d.h. mit internen Deletionen versehenen) galE- und galT-Gene in den *E. coli*-Stamm JM105 zu transferieren, und zwar durch das von Donnenberg, M. und Kaper, J. *Infection and Immunity* (1990) 59: 4310–4317 beschriebene Konjugationsprotokoll. Das Einfügen der irreversibel nicht-funktionalen galE- und galT-Gene in das Chromosom der JM105-Bakterienzellen und das Ersetzen der full-length-Wildtyp-galE- und galT-Gene der letzteren Bakterienzellen durch die irreversibel nicht-funktionalen galE- und galT-Gene wurde mittels PCR-Analyse der chromosomalen JM105-DNA bestätigt. Der JM105-*E. coli*-Bakterienstamm, der eine interne Deletion in den galE- und galT-Genen besaß, wurde als CB101 bezeichnet.

[0081] Um eine Deletion in dem murF-Lokus zu erzeugen, wurde zunächst das chromosomale murF-Gen aus JM105 *E. coli* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) isoliert. Zwei Oligonukleotidprimer wurden beruhend auf der bekannten Sequenz des murF-Gens synthetisiert. Diese Primer wurden als murF1 und murF2 bezeichnet und ihre Nukleotidsequenzen waren wie folgt:

Stromaufwärts liegender Primer (murF1):

5'cgagcactgcgagagatgattagcgtaaccttagccaactt3' und

Stromabwärts liegender Primer (murF2):

5'cagcgcgtgcagcaggctgacagtggcgcga3'.

[0082] Das murF-Gen scheint unter der Kontrolle des murE-Promotors transkribiert zu werden, folglich wurden die obigen PCR-Primer so gestaltet, dass sie eine In-Rahmen-Fusion der kodierenden murF-Sequenz an den murE-Promotor erlauben. Hierzu wurde das murE-Gen, einschließlich seines Promotorelements, mit Hilfe der als murE1 und murE2 bezeichneten PCR-Primer aus JM105-*E. coli* isoliert. Die Nukleotidsequenzen dieser Primer waren wie folgt:

Stromaufwärts liegender Primer (murE1):

5'gccgatccgcgccggtctttggtcca3' und

Stromabwärts liegender Primer (murE2):

5'aaggatccgctaatacatgcaatcacc3'.

[0083] Wie in **Fig. 3** gezeigt, wurde das murE-Gen nach der PCR-Amplifikation in das Plasmid pBR322 kloniert, so dass ein Plasmid entstand, welches als pCB238 bezeichnet wurde. Das murF-Gen wurde mit Hilfe der Primer murF1 und murF2 aus JM105-Bakterienzellen amplifiziert. Das Plasmid pCB238 wurde mit dem NruI-Enzym verdaut, um die kodierende Sequenz des murE-Gens zu entfernen, wobei die murE-Promotorse-

quenz zurückblieb. Das amplifizierte murF-Gen wurde dann in das Plasmid pCB238 ligiert, welches mit dem NruI-Enzym verdaut worden war, und das erhaltene Plasmid wurde als pCB239 bezeichnet.

[0084] Das Plasmid pCB239 wurde mit geeigneten Enzymen verdaut, um ein DNA-Fragment auszuschneiden, welches den murE-Promotor, fusioniert an das murF-Gen, umfasste und das Fragment wurde dann in das Plasmid pACYC184 kloniert, um das Plasmid pCB240 herzustellen.

[0085] Um einen E. coli-Stamm mit einer irreversiblen Veränderung (d.h. Deletion) in seinem murF-Gen zu konstruieren, wurde ein Plasmid, in dem ein deletiertes murF-Gen zusammen mit DNA-Sequenzen, die von stromaufwärts- und stromabwärts-liegenden flankierenden Sequenzen stammten, kloniert wurde, konstruiert. Hierzu wurde ein Oligonukleotidprimer auf Basis der bekannten Sequenzen des murE-Gens (stromaufwärts des murF-Gens) entworfen und ein zweiter Oligonukleotidprimer wurde auf Basis der bekannten Sequenz des OrfY-Gens (stromabwärts des murF-Gens) entworfen. Der stromaufwärts liegende Primer wurde als murE1 bezeichnet und hatte folgende Nukleotidsequenz:

5'gccgatccgcccggctcttgggtgcca3'.

[0086] Der stromabwärts liegende Primer wurde als OrfY-1 bezeichnet und hatte folgende Nukleotidsequenz: 5'taacgccagcgaacctacatc3'.

[0087] Die Primer murE1 und OrfY-1 wurden in der PCR-Reaktion verwendet, um das murF-Gen mit flankierenden Sequenzen, die von dem murE- und dem OrfY-Gen stammten, zu amplifizieren. Wie in **Fig. 4** gezeigt, wurde das amplifizierte DNA-Fragment in das Plasmid pBR322 kloniert, um das Plasmid pCB241 zu erzeugen. Das Plasmid pCB241 wurde mit geeigneten Enzymen verdaut, um den Großteil des murF-Gens zu entfernen, so dass nur ein kleiner Teil der murF-Gensequenz, flankiert durch eine von dem murE-Gen abstammende Sequenz auf einer Seite und einer Sequenz, die von dem OrfY-Gen abstammte, auf der anderen Seite, zurückblieb. Nach dem Verdau wurde das Plasmid selbst-ligiert, so dass das Plasmid pCB242 entstand. Das DNA-Fragment, welches die Sequenzen umfasste, die von dem murE-Teil der murF- und OrfY-Genen abstammten, wurde aus dem Plasmid pCB242 zurückgewonnen, indem das letztere mit geeigneten Enzymen verdaut wurde. Das DNA-Fragment, das die letzteren Sequenzen trug, wurde dann in den Suizidvektor pCVD442 ligiert und dann in SY327-E. coli-Zellen transformiert. Die letzteren Bakterienzellen wurden zur Herstellung des Plasmids pCVD442 verwendet, welches die flankierenden Sequenzen enthielt, und dieses letztere Plasmid wurde als pCB243 bezeichnet. Das Plasmid pCB243 wurde dann in E. coli-SM10-Zellen transformiert, so dass eine Bakterienzellpopulation entstand, die zur Übertragung der murF-Deletion in den E. coli-Stamm CB101 geeignet war.

[0088] Wie in **Fig. 5** gezeigt, wurden SM10-Bakterienzellen, die das Plasmid pCB243 trugen, verwendet, um das irreversibel nicht-funktionale (d. h. mit interner Deletion versehene) murF-Gen in den E. coli-Stamm CB101 zu transferieren, der mit dem Plasmid pCB240 transformiert war, und zwar durch das oben beschriebene Konjugationsprotokoll (Donnenberg und Kaper 1990). Die Inkorporation des irreversibel veränderten murF-Gens in das Chromosom der CB101-Bakterienzellen und der Ersatz des full-length-Wildtyp-murF-Gens der letzteren Bakterienzellen mit dem irreversibel veränderten murF-Gen wurde durch PCR-Analyse der chromosomalen CB101-DNA bestätigt. Der CB101-Bakterienstamm mit einer internen Deletion in dem murF-Gen wurde als CB102 bezeichnet.

[0089] Der Bakterienstamm CB102 kann dann mit dem Plasmid pCB239 transformiert werden, um das Plasmid pCB240 zu verdrängen. Der Bakterienstamm CB102, der das Plasmid pCB239 trug, wurde als CB103 bezeichnet.

Beispiel 2

Konstruktion eines alternativen murF-defizienten Bakterienwirts, TK-48

[0090] Bestimmte Temperatur-empfindliche Bakterienzellmutanten, die eine Mutation in dem murF-Gen enthalten, wie die TKL-46, können bei 30°C aufgezogen werden, wachsen jedoch nicht bei der nicht-zulässigen Temperatur von 42°C. Die Unfähigkeit dieser Mutanten, bei nicht-zulässigen Temperaturen zu wachsen, ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sie aufgrund der Mutation in dem murF-Gen kein vollständiges und funktionales Zellwand-Tetrapeptid aufbauen können. Diese Mutanten können als bakterielle Wirte in den erfindungsgemäßen Zellkultursystemen verwendet werden.

[0091] Ein System zur Herstellung rekombinanter Plasmide, das sich für die Verwendung bei der DNA-Immunisierung und der Gentherapie eignet, kann daher konstruiert werden, indem man in diese Temperatur-empfindlichen Bakterienzellen (z. B. des E. coli-Stamms TKL-46 oder seiner Derivate) ein rekombinantes Plasmid einführt, das ein bei 42°C funktionales murF-Gen enthält. Durch das Aufziehen der Bakterienzellen bei 42°C überleben dann nur diejenigen Zellen, die das rekombinante Plasmid tragen.

[0092] In diesem Beispiel wurde ein weiter bevorzugtes Derivat von TKL-46, das sich als Wirt eignet, hergestellt. Der E. coli-Stamm TKL-46 (Lugtenberg et al., J. Bacteriology (1972) 110: 35–40) stammte von dem Coli Genetic Stock Center (CGSC). TKL-46-Bakterienzellen wurden zunächst bei 30°C in LB-Nährmedium aufge-

zogen, welches das Antibiotikum Nalidixinsäure enthielt, um einen Nalidixinsäure-resistenten Stamm, der als TKL-47 bezeichnet wurde, zu selektieren. TKL-47-Zellen wurden recA-negativ gemacht, indem man sie mit dem (Nalidixinsäure-sensitiven, recA-negativen) Bakterienstamm JC10240 konjugierte, so dass die Fähigkeit der Zellen für eine homologe Rekombination verloren ging. Ihre Chromosomen nehmen daher kein genetisches Material von der eingeführten Plasmid-DNA auf. recA-negative Zellen, die von TKL-47-Zellen stammten, wurden als TKL-48 bezeichnet.

[0093] TKL-48-Bakterienzellen wurden bei 30°C aufgezogen und dann zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen verwendet. Kompetente TKL-48-Bakterienzellen wurden mit dem Plasmid pCB239 transformiert, welches ein funktionales murF-Gen trug, um einen Bakterienstamm herzustellen, der als TKL-49 bezeichnet wurde. TKL-49-Bakterienzellen wurden dann zum Erhalt des rekombinanten Plasmids und der Plasmid-DNA-Produktion bei 42°C aufgezogen.

[0094] Als Alternative zu CH102- oder TKL-48-Bakterienzellen als Wirte wurden zusätzliche verbesserte Formen konstruiert, indem man das murF-Gen in den Chromosomen der Zellen modifizierte, die native wünschenswerte Eigenschaften hatten. Einigen E. coli-Stämmen fehlt beispielsweise ein Enzym, wie Endonukleasen, die Plasmid-DNA abbauen. Gelingt es einem die Chromosomen dieser Wirte zu verändern, um beispielsweise die Temperatur-empfindliche Form von murF bereitzustellen, bieten diese Wirte vorteilhafte Alternativen zu TKL-48.

[0095] Das Temperatur-empfindliche murF-Gen aus TKL-46 wurde durch Amplifizieren der geeigneten Sequenz mittels PCR und der murF3- und murF4-Primer gewonnen:

murF3 (stromaufwärts liegender Primer):

5'gccggatcccgatcgcgtcagcgggtggcgcg3'

murF4 (stromabwärts liegender Primer):

5'gaagatcagcgcgtgcagcaggctgacagtggcgcga3'

[0096] Die amplifizierte Nukleotidsequenz wurde in die BamHI-Stelle von pUC19 kloniert, und die Nukleotidsequenz wurde mit Hilfe des Dideoxynukleotidverfahrens bestimmt. Die vollständige Nukleotidsequenz des amplifizierten Gens ist in **Fig. 11** gezeigt und unterscheidet sich von dem Wildtyp-Gen in den Positionen 862 und 990, wie in **Fig. 11** gezeigt. Der Austausch von G gegen A in Position 862 führt zu Threonin anstelle von Alanin; die Addition des GAC-Kodons in Position 990 führt zur Addition eines Asparaginsäurerests an die Peptidsequenz.

[0097] Der Wirtsstamm mit gewünschten Eigenschaften wird dann verändert, indem man das Wildtyp-murF-Gen gegen die Temperatur-empfindliche Form ersetzt, üblicherweise durch homologe Rekombination, um den verbesserten Bakterienwirt zu erhalten.

[0098] Daher können entweder CB102 oder TKL-48 oder weitere gewünschte Bakterien, die so modifiziert wurden, dass sie das Temperatur-empfindliche murF-Gen enthalten, und welches irreversible chromosomale Mutation in dem murF-Gen haben, die das Gen oder das davon kodierte murF-Protein unter den verwendeten Kulturbedingungen nichtfunktional machen, dort als geeignete Wirte verwenden, wo das eingeführte Plasmid ein unter den verwendeten Kulturbedingungen funktionales murF-Gen enthält. Die Produktionsmengen kann man mit der Produktion fremder DNA, die in dem Plasmid pBR322 enthalten ist, vergleichen, wobei ein Marker für Ampicillin kodiert.

Beispiel 3

Konstruktion weiterer murF-Gen-haltiger Plasmide

[0099] Mit Hilfe der in Beispiel 1 beschriebenen murE1- und murE2-Primer wurde das chromosomale murE-Gen mittels PCR aus der genomischen E. coli JM105-DNA amplifiziert und in die BamHI-Stelle von pUC18 kloniert. Das erhaltene Plasmid pMO101 wurde mit NruI geschnitten, wodurch der Großteil des murE-Gens, bis auf den murE-Promotor und etwa 330 by vom murE3'-Ende, entfernt wurden. Das wie in Beispiel 1 beschrieben amplifizierte murF-Gen wurde in die NruI-Stelle von pMO101 ligiert und das Ligationsgemisch wurde in E. coli JM109 transformiert. Zwei Plasmide, die als pMO102 und pMO106 bezeichnet wurden und die kodierende murF-Sequenz in entgegengesetzten Richtungen enthielten, wurden identifiziert. pMO106 enthielt das murF-Gen in der richtigen Orientierung, operativ an den murE-Promotor geknüpft, und exprimiert das murF-Protein; pMO102 enthielt die falsche Orientierung von murF und exprimiert das Gen daher nicht. Eine Zusammenfassung der Konstruktion von pMO102 und pMO106 ist in **Fig. 6** gezeigt.

[0100] Weitere Plasmide, die das murF-Gen enthielten, wurden wie folgt konstruiert: pHW203 wurde als System zum Testen der in vitro-Transfektionswirksamkeit in eukaryoten Zellen konstruiert. pCMVB, erhältlich von Clontech, welches das β -Galactosidasegen unter der Kontrolle eines in Säugetierzellen wirksamen Promotors enthielt, wurde mit EcoRI geschnitten, mit Klenow behandelt und mit dem BamHI, Klenow-gefüllten Fragment von pMO106 ligiert, welches das murF-Gen enthielt. Das resultierende Plasmid wurde mit BstHI geschnitten, um das Ampicillin-Resistenzgen zu entfernen, und religiert. Das religierte Produkt wurde in TKL-48 trans-

formiert und eine isolierte Kolonie, welche das Plasmid pHW203 enthielt, wobei die Kolonie TKL-52 genannt wurde, wurde zur Herstellung des Plasmids im Großmaßstab verwendet.

[0101] Das Plasmid pCB253 wurde konstruiert, um zu untersuchen, ob das murF-Gen eine Wirkung auf die DNA-Immunisierung in eukaryoten Wirten besaß. Das Wirtsplasmid, pSLRSVGIV.md1, erhalten von R. Braun, enthielt das Gen, das für das Glycoprotein IV (GIV) aus dem Rinder-Herpes-Virus kodierte und zwar unter der Kontrolle des Rous-Sarcoma-Virus-Promotors; daher enthielt dieses Plasmid ein Expressionssystem zur Herstellung eines Immunogens in Vertebraten. Das BamHI-DNA-Fragment aus pMO106, welches das murF-Gen unter der Kontrolle des murE-Promotors enthielt, wurde in die Msc-Stelle von pSLRSVGIV.md1 ligiert und das Ligationsgemisch wurde in JM109-Zellen transformiert (die von New England Biolabs stammten). Das aus erfolgreichen Transformanten isolierte Plasmid wurde mit BstHI verdaut, um das Ampicillin-Resistenz-Gen zu entfernen, religiert und dann in TKL-48 transformiert, um das Produktplasmid pCB253 zu erhalten. Die pCB253-Kolonie, die als TKL-51 bezeichnet wurde, wurde zur Herstellung dieses Plasmids im Großmaßstab verwendet.

[0102] In den vorstehenden Abschnitten wurde TKL-48 mit pMO102, pMO106, pCB253 oder pHW203 transformiert, indem man kompetente Zellen mit Plasmid-DNA mischte und 30 Minuten auf Eis inkubierte. Die Zellen wurden dann 90 Sekunden bei 42°C durch Hitzeschock behandelt und dann in 1 ml LB-Nährlösung 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB/0,1 %-Thymin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 42°C inkubiert. Die erhaltenen transformierten Zelllinien wurden wie folgt benannt:

pMO102-TKL-49A;

pMO106-TKL-50;

pCB253-TKL-51;

pHW203-TKL-52.

[0103] Natürlich erzeugten die TKL-49A-Zellen das murF-Genprodukt nur bei 30°C und sie wurden als Kontrolle verwendet, um die Plasmidausbeute in Gegenwart von Ampicillin als selektierbarer Marker bei 30°C zu ermitteln. Die Plasmidausbeute der restlichen Zell-Linien konnte bei 42°C ohne Zugabe von Ampicillin ermittelt werden.

Beispiel 4

Plasmidausbeute

[0104] TKL-50-, -51- und -52-Zellen wurden verwendet, um die Plasmidausbeute zu ermitteln, wenn Zellen bei 42°C ohne die Zugabe von Ampicillin aufgezogen wurden, TKL-49A-Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Einzelne Kolonien der LB/Thymin-Platten wurden gepicked und 2 ml TB/Thymin-Nährlösung wurde damit beimpft und 6 Stunden bei 42° inkubiert (30°C in Gegenwart von Ampicillin für TKL-49A). Mit den Zellen wurden dann 10 ml TB/Thymin-Nährlösung beimpft, man ließ die Zellen 4 oder mehr Stunden wachsen und beimpfte damit dann 250 ml TB/Thymin-Nährlösung und ließ die Zellen weitere 12 Stunden wachsen. Die Plasmide wurden mit Hilfe von Quiagen-(Marke) Säulen nach den Herstellerangaben extrahiert und die Plasmidausbeute wurde durch Berechnen der O. D. bei 260 und 280 bestimmt. Die Reinheit der Plasmide wurde durch die Analyse von Plasmid-Aliquots auf Agarosegelen bestimmt.

[0105] Die Plasmidausbeute wurde auch in einer Sauerstoff-angereicherten 10-Liter-„Fed-Batch“-Fermentation in einem 14-Liter-NBS-Microferm- (Marke) Apparat bestimmt, und zwar in TB-Nährlösung, angereichert mit 0,01% Thymin bei einer Rührgeschwindigkeit von 200 Upm, einem Luftfluss von 0,6 VVM (6 l/min, 5 psig) und einem pH-Wert, der bei 7,2 gehalten wurde. Die Plasmidausbeute wurde durch die anschließende Extraktion der Plasmid-DNA aus Aliquots des Kulturmediums mit Hilfe des Quiagen- (Marke) Säulenverfahrens bestimmt.

[0106] Die Ausbeute aus Zellen, die in Schüttelflaschen (3 Präparationen) oder einem 10-Liter-Gärbottich (zwei Läufe) aufgezogen wurden, sind in Tabelle 1 gezeigt.

<u>Tabelle 1</u>				
Plasmidausbeuten aus Zellen, die in Schüttelflaschen und in einem 10-Liter-Gärbottich aufgezogen wurden				
Kombination Stamm/Plasmid	Selektionsdruck	Absolute Plasmidausbeute (mg/l) ^a		Spezifische Plasmidausbeute (mg/g Trocken- gewicht) ^b
		Schüttelflaschen	Gärbottich	
TKL- 49/pMO102	30°C/Ampicillin	2,67 ± 0,16	43,85	3,3
TKL- 50/pMO106	42°C/ <i>murF</i>	6,13 ± 0,71	144	6,788
TKL- 51/pCB253	42°C/ <i>murF</i>	8,61 ± 0,51	107	N/D ^d
TKL- 52/pHW203	42°C/ <i>murF</i>	6,14 ± 2,2	N/D	N/D

^aPlasmidausbeute aus Schüttelflaschen und Gärbottichläufen wurden aus Aliquots des Kulturvolumens (5, 10 und 25 ml), die zur Herstellung der Plasmid-DNA verwendet wurden, extrapoliert.

^bGramm Trockengewicht pro Liter der Kultur (g/l) wurde durch folgende Gleichung bestimmt: $g/l = 0,08 + 0,63$ (O. D. 660)

^cAusbeute ist der Durchschnitt aus zwei Fermentationen von pMO102 und pMO106. Die Ausbeute von pCB253 stammte aus einem Fermentationslauf.

^d nicht bestimmt

[0107] **Fig. 7** zeigt die absolute und spezifische Plasmidausbeute, bestimmt für das Plasmid pMO106, hergestellt in dem TKL-50-Stamm.

Beispiel 5

Plasmidstabilität

[0108] Die Stabilität des Plasmids pMO106 in dem TKL-50-Stamm wurde über 170 Wachstumsgenerationen unter verschiedenen Selektionsdrücken für die Erhaltung des Plasmids wie folgt bestimmt. Zellen wurden in TB/0,1% Thymin-Nährlösung entweder bei 30°C oder bei 42°C aufgezogen. Nach unterschiedlichen Generationen wurden Proben bei der relevanten Temperatur entnommen, verdünnt und auf TB/Thyminplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Die Kolonien wurden dann auf TB/Thymin/Ampicillin-Platten repliziert und bei 30°C oder 42°C inkubiert. Der Prozentsatz Plasmid-haltiger Zellen wurde durch Vergleichen der Anzahl Kolonien, die in Gegenwart und Abwesenheit von Ampicillin bei 30°C oder 42°C wuchsen, ermittelt. Das Vorliegen von Plasmiden wurde ferner durch ein alkalisches Lyseverfahren zur Plasmidpräparation auf kleinem Maßstab bestätigt.

[0109] Das Plasmid pMO106 ging langsam aus Zellen verloren, die bei 30°C wuchsen, wurde jedoch in 100% der Zellen, die bei 42°C wuchsen, über 170 Wachstumsgenerationen erhalten, wie in **Fig. 8** gezeigt. Die Integrität des Plasmids pMO106 wurde durch Restriktionsanalyse bestätigt.

[0110] TKL-49A-Ze11en wurden auch getestet, indem man sie in Gegenwart von Ampicillin bei 30°C wachsen ließ; das Plasmid pMO102 blieb über 120 Generationen in 100% der Zellen erhalten.

Beispiel 6

Wirksamkeit der in vitro-Transfektion

[0111] Die oben beschriebenen Plasmide pCMVB und pHW203 wurden in diesem Assay verwendet. Jeweils 2 µg jedes Plasmids wurden getrennt mit verschiedenen Mengen Lipofectamin (Gibco/BRL) gemischt und gemäß den Herstellerangaben in Maus-Fibroblasten-L-929-Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde

in einem kolorimetrischen X-gal-Assay bestimmt, indem man die Anzahl Zellen zählte, die β -Galactosidase exprimierten, und zwar im Vergleich zur Gesamtzahl Zellen pro Well.

[0112] Es wurden, wie in **Fig. 9** gezeigt, ähnliche Transfektionseffizienzen für beide Plasmide gefunden.

Beispiel 7

Wirkung des murF-Gens auf die Immunisierung

[0113] Mäuse, jeweils in Gruppen von 10, wurden zweimal (im Abstand von zwei Wochen) intramuskulär mit jeweils 100 μ g eines der Plasmide pCB253, pSLRSVG1V.md1 (oben beschrieben) oder einem Null-Vektor immunisiert. Ein und drei Wochen nach der zweiten Injektion ließ man die Mäuse ausbluten und untersuchte ihre Seren auf das Vorliegen von Antikörpern, die im ELISA-Assay immunologisch spezifisch mit dem GN-Glycoprotein reagierten. Wie in **Fig. 10** gezeigt, wurden in beiden Fällen ähnliche Antikörpertiter gefunden.

Beispiel 8

Fehlen einer murF-Homologie mit humanen Sequenzen

[0114] Die Suche in Nukleotid- und Aminosäuresequenz-Datenbanken zeigte, dass Sequenzen, die mit dem murF-Gen/Protein assoziiert sind, keine Homologie zu einer bekannten humanen Gen/Protein-Sequenz besitzen. Um das Fehlen einer Homologie zu bestätigen, wurde humane genomische DNA, gekauft von der Promega Corporation, mit EcoRI und BamHI verdaut und mit BamHI geschnittenem pMO106 versetzt. Die genomische DNA wurde auf 0,7%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und zwar zusammen mit dem BamHI-Fragment, welches das murF-Gen aus pMO106, das für die Sequenz an sich kodierende murF-Gen und ein mit EcoRI linearisiertes Plasmid pMO106 enthielt. Nach dem Transfer auf Nylonmembranen mittels Kapillartransfer wurden die DNAs durch Vernetzung mit ultraviolettem Licht gemäß den Herstellerangaben fixiert. Die Membranen wurden 8 Stunden bei 50°C in 6 \times SSC, 0,5% Natriumdodecylsulfat vorhybridisiert und dann 12 Stunden mit einer ³²PdCTP-markierten full-length-murF-DNA-Sonde hybridisiert. Die Blots wurden zweimal 30 Minuten bei 22°C in 2 \times SSC, 0,5% SDS gewaschen und anschließend zweimal 30 Minuten bei 50°C in 1 \times SSC, 0,5% SDS. Nach dem Trocknen und Aussetzen gegenüber Röntgenfilmen, 16 Stunden bis 2 Wochen, wurde kein Hybridisierungssignal mit humaner genomischer DNA nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Kultursystem zur Herstellung rekombinanter Plasmide, umfassend genetisch erzeugte Bakterienzellen und rekombinante Plasmide, wobei die Plasmide fremde DNA enthalten, die operativ an eukaryotische Kontrollsequenzen geknüpft ist, so dass die fremde DNA in eukaryotischen, nicht jedoch in prokaryotischen Zellen exprimiert wird,

(a) worin das Bakterienzellchromosom irreversibel modifiziert ist, um eine erste, für Bakterienzellen toxische Substanz herzustellen, und

das rekombinante Plasmid genetisches Material enthält, das zur Herstellung einer zweiten Substanz führt, welche die Toxizität der ersten Substanz unter den Kulturbedingungen des Kultursystems neutralisiert, und wobei die erste Substanz das Produkt des hok-Gens ist und die zweite Substanz das Produkt des sok-Gens ist oder wobei die erste Substanz das Produkt des flmA-Gens und die zweite Substanz das Produkt des flmB-Gens ist; oder

(b) worin das Bakterienzellchromosom irreversibel verändert ist, so dass die Zelle unfähig ist, einen essentiellen Metaboliten herzustellen und auch unfähig ist, diesen Metaboliten aus einem Kulturmedium aufzunehmen, und

das rekombinante Plasmid genetisches Material enthält, welches entweder die Fähigkeit zur Synthese des Metaboliten oder die Fähigkeit zur Aufnahme des Metaboliten aus dem Medium, oder beides, wiederherstellt, kein funktionales oder strukturelles Äquivalent in eukaryotischen Zellen hat und wobei der essentielle Metabolit Lysin ist und die Unfähigkeit zur Synthese von Lysin durch eine Mutation in dem lysA-Gen und die Unfähigkeit, Lysin aus dem Medium aufzunehmen, durch eine Disruption in dem lysP-Gen bewirkt wird; oder

(c) worin das Bakterienzellchromosom derart verändert ist, dass die Bakterienzelle unfähig ist, ein Enzym zu synthetisieren, welches einen Schritt in der Biosynthese der Zellwand katalysiert, und das rekombinante Plasmid ein Expressionssystem für dieses Enzym umfasst; und wobei das Enzym eine Reaktion katalysiert, die aus der Gruppe aus

der Addition von L-Alanin an ein Zellwand-Polysaccharid (L-Ala-addierendes Enzym);

der Addition von D-Glutaminsäure an das die Polysaccharidkette (murD) gebundene L-Alanin;

der Addition von dap an das L-Alanin/D-Glutaminsäure-Dipeptid (murE); und

der Addition von D-Alanin an das L-Alanin/D-Glutaminsäure/dap-Tripeptid der Bakterienzellwand (murF); ausgewählt ist,

wobei alle von diesem genetischen Material exprimierten Proteine unfähig sind, auf eine Zellkomponente aus eukaryotischen Zellen, die mit der Plasmid-DNA zu behandeln sind, zu wirken, und

wobei keines der von diesem genetischen Material exprimierten Proteine oder Produkte, die auf das Vorliegen des Proteins zurückzuführen sind, von den Bakterienzellen sekretiert wird oder für diese toxisch ist.

2. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Plasmids, umfassend das Kultivieren der Zellen aus Anspruch 1 unter Bedingungen, unter denen die Lebensfähigkeit der Zellen von dem Vorliegen des Plasmids in den Zellen abhängt, und Zurückgewinnen des Plasmids.

3. Verfahren zur Herstellung von Bakterienzellen, welche replizierte Plasmid-DNA enthalten, wobei das Verfahren das Kultivieren der Zellen aus Anspruch 1 unter Bedingungen umfasst, unter denen die Lebensfähigkeit der Zellen von dem Vorliegen des Plasmids in den Zellen abhängt, und Zurückgewinnen der Zellen.

4. Verwendung eines durch das Verfahren nach Anspruch 2 hergestellten Plasmids bei der Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung einer gewünschten DNA an einen tierischen Wirt.

5. Verwendung der nach dem Verfahren aus Anspruch 3 hergestellten Zellen bei der Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung einer gewünschten DNA an einen tierischen Wirt.

6. Rekombinantes Plasmid, erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 2, umfassend fremde DNA, die operativ an eukaryotische Kontrollsequenzen geknüpft ist, zur Expression der fremden DNA in eukaryotischen, nicht jedoch in prokaryotischen Zellen, wobei das Plasmid ferner genetisches Material umfasst, welches (a) eine für das Produkt des sok-Gens kodierende Nukleotidsequenz ist, wobei dem Plasmid jedoch die für das Produkt des hok-Gens kodierende Nukleotidsequenz fehlt, oder eine für das Produkt des flmB-Gens kodierende Nukleotidsequenz, wobei dem Plasmid jedoch die für das Produkt des flmA-Gens kodierenden Nukleotidsequenzen fehlen; oder

(b) eine für das lysA- oder das lysP-Gen kodierende Nukleotidsequenz ist; oder

(c) eine Nukleotidsequenz ist, die für ein Enzym kodiert, welches eine aus der Gruppe aus:

der Addition von L-Alanin an ein Zellwand-Polysaccharid (L-Ala-addierendes Enzym);

der Addition von D-Glutaminsäure an das an die Polysaccharidkette (murD) gebundene L-Alanin;

der Addition von dap an das L-Alanin/D-Glutaminsäure-Dipeptid (murE); und

der Addition von D-Alanin an das L-Alanin/D-Glutaminsäure/dap-Tripeptid der Bakterienzellwand (murF);
ausgewählte Reaktion katalysiert.

7. Rekombinantes Plasmid nach Anspruch 6, worin das genetische Material eine für das Produkt des sok-Gens kodierende Nukleotidsequenz ist, wobei dem Plasmid jedoch die für das Produkt des hok-Gens kodierende Nukleotidsequenz fehlt, oder eine für das Produkt des flmB-Gens kodierende Nukleotidsequenz ist, wobei dem Plasmid jedoch die für das Produkt des flmA-Gens kodierende Nukleotidsequenz fehlt.

8. Rekombinantes Plasmid nach Anspruch 6, worin das genetische Material eine für das lysA-Gen oder das lysP-Gen kodierende Nukleotidsequenz ist.

9. Rekombinantes Plasmid nach Anspruch 6, worin das genetische Material eine Nukleotidsequenz ist, die für ein Enzym kodiert, welches eine aus der Gruppe aus:

der Addition von L-Alanin an ein Zellwand-Polysaccharid (L-Ala-addierendes Enzym);

der Addition von D-Glutaminsäure an das an die Polysaccharidkette (murD) gebundene L-Alanin;

der Addition von dap an das L-Alanin/D-Glutaminsäure-Dipeptid (murE); und

der Addition von D-Alanin an das L-Alanin/D-Glutaminsäure/dap-Tripeptid der Bakterienzellwand (murF);
ausgewählte Reaktion katalysiert.

10. Ex vivo-Zellen, enthaltend Plasmide einer der Ansprüche 6–9.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

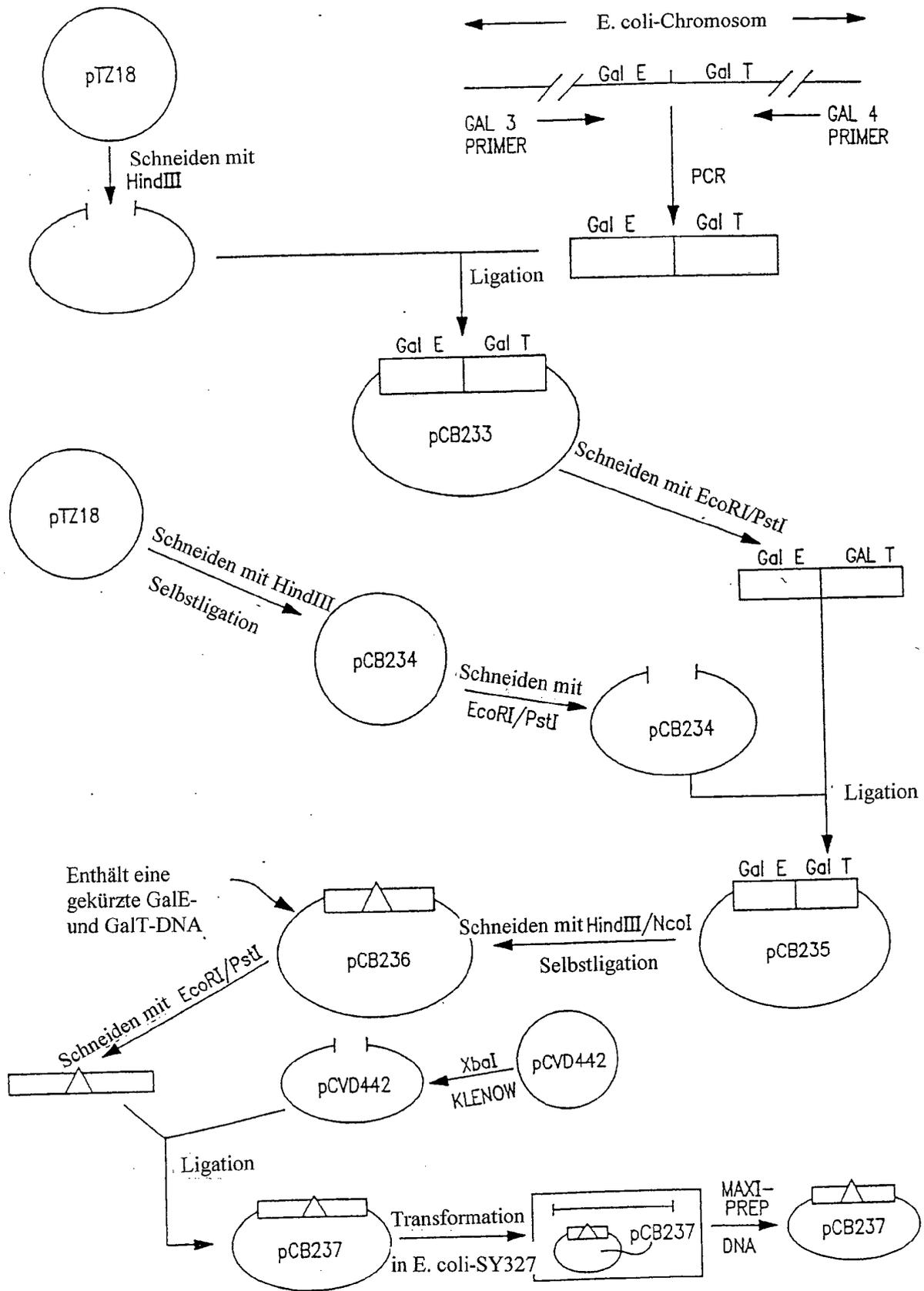


FIG. 1

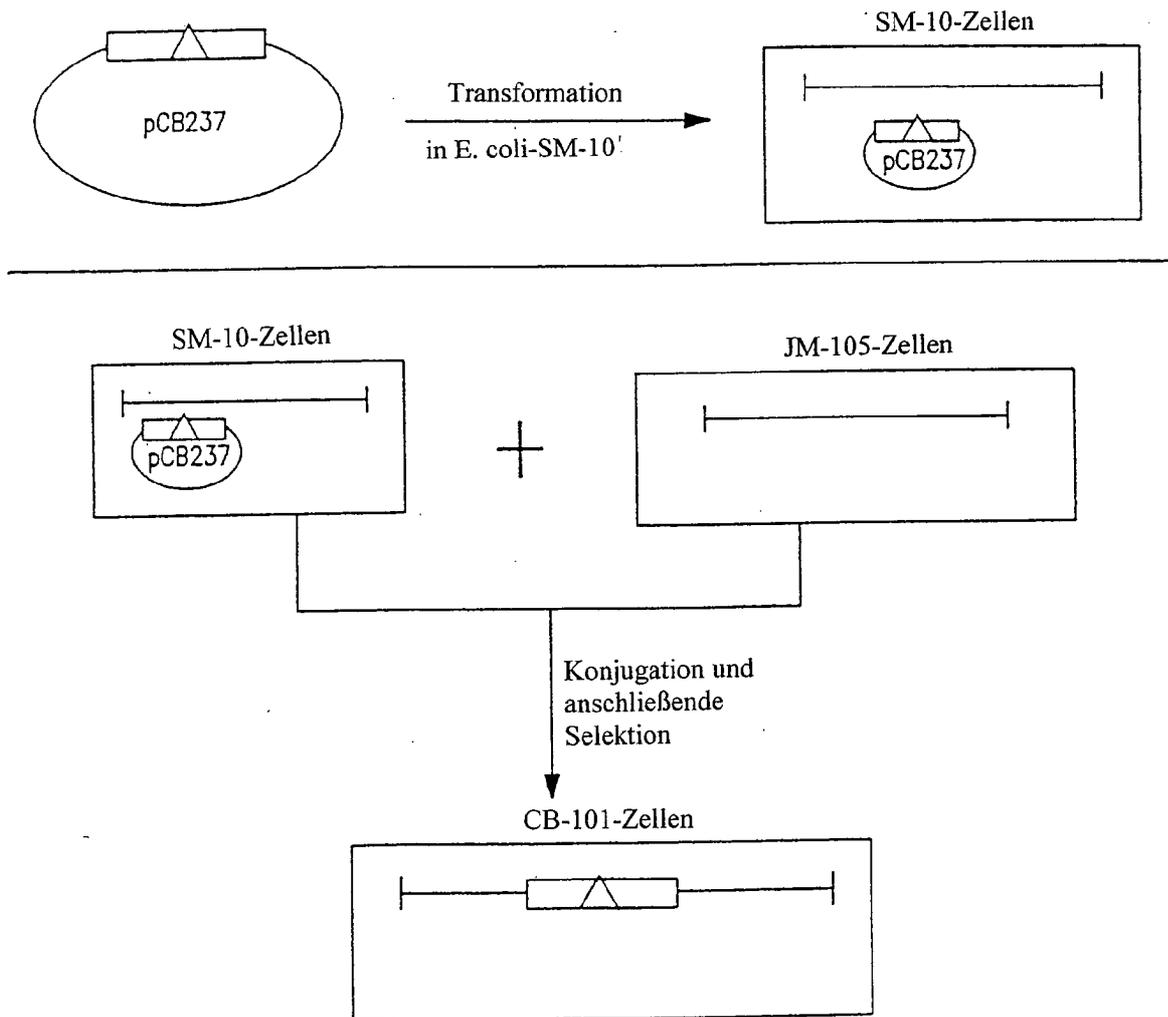


FIG. 2

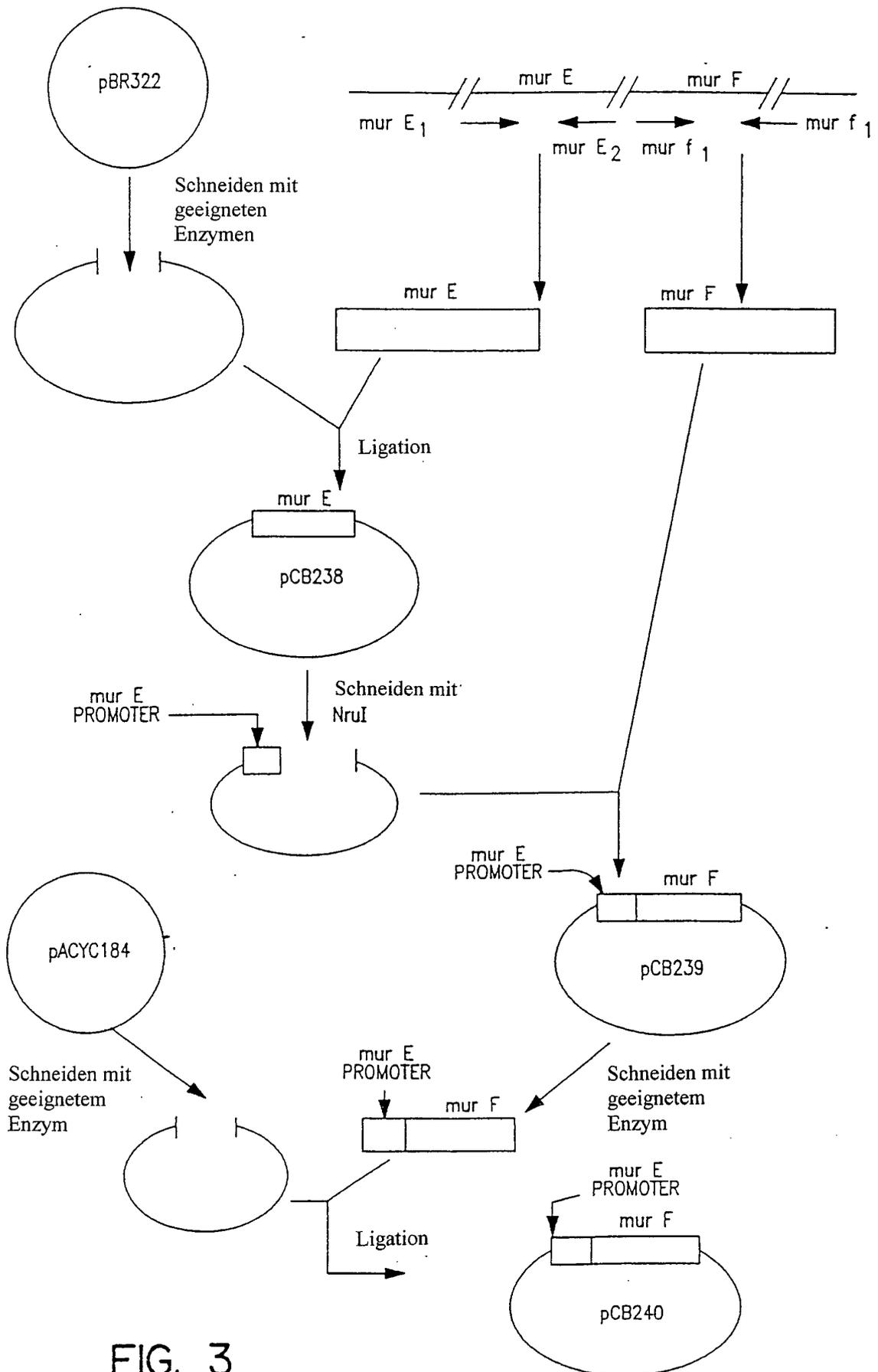


FIG. 3

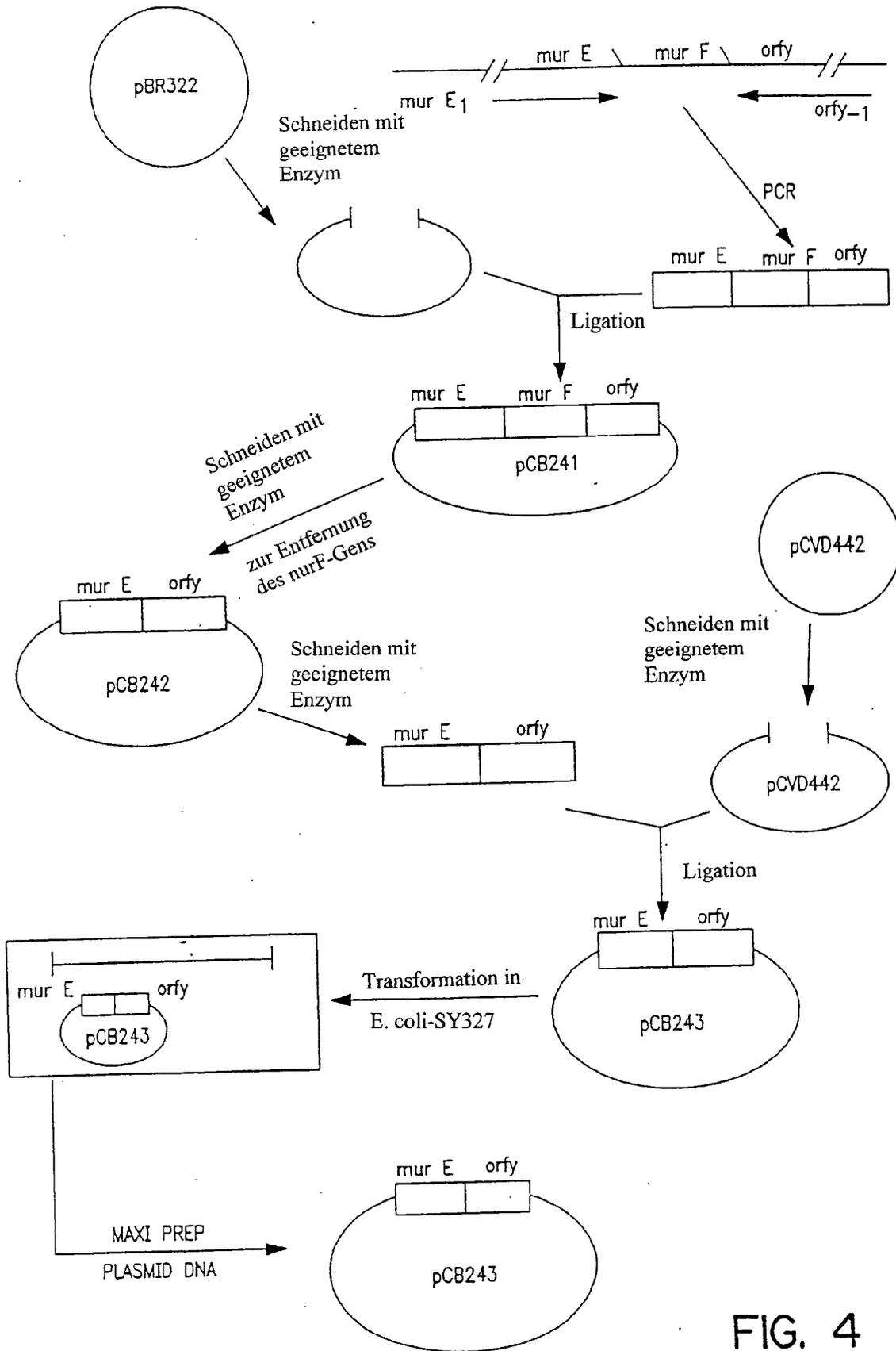


FIG. 4

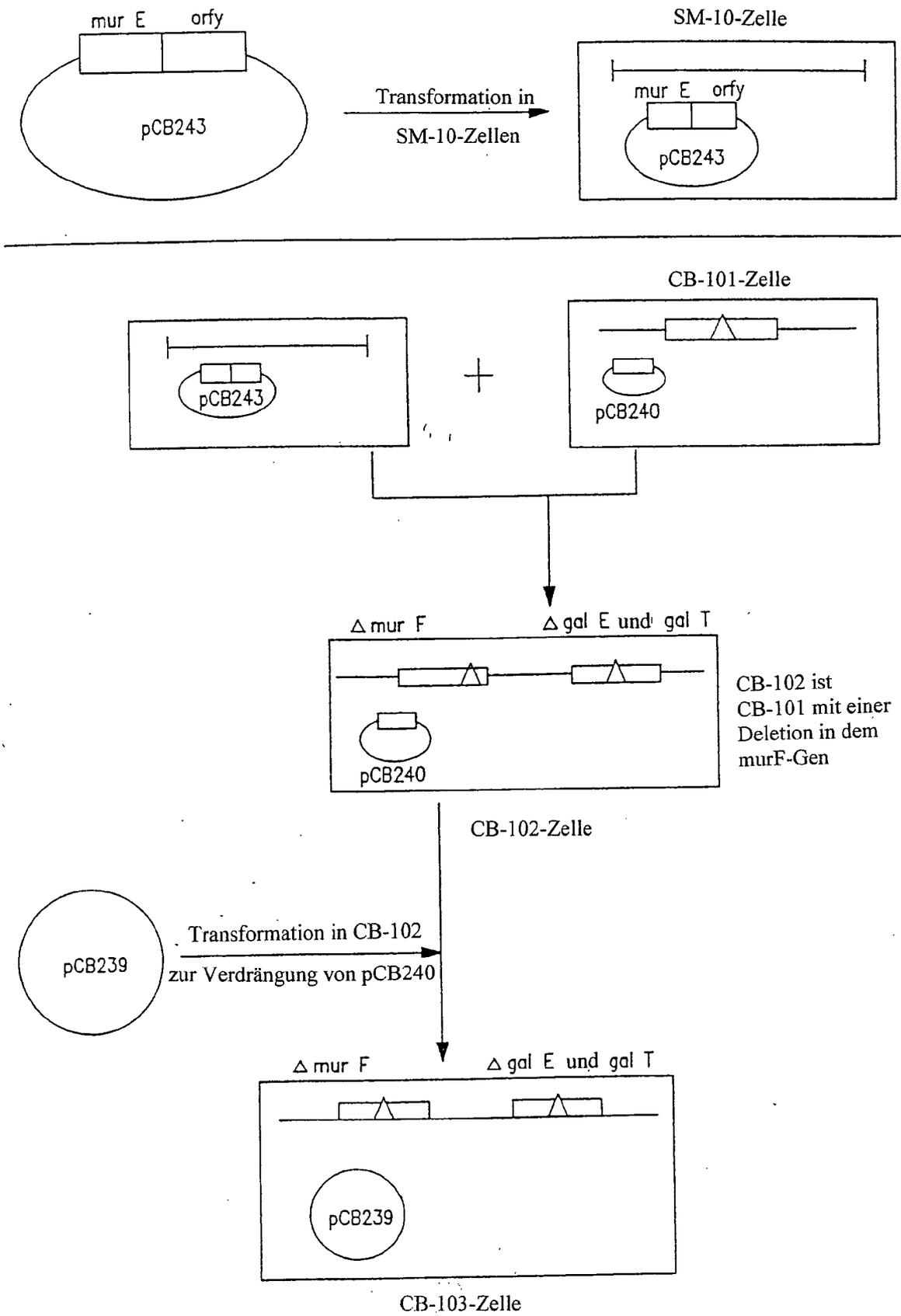
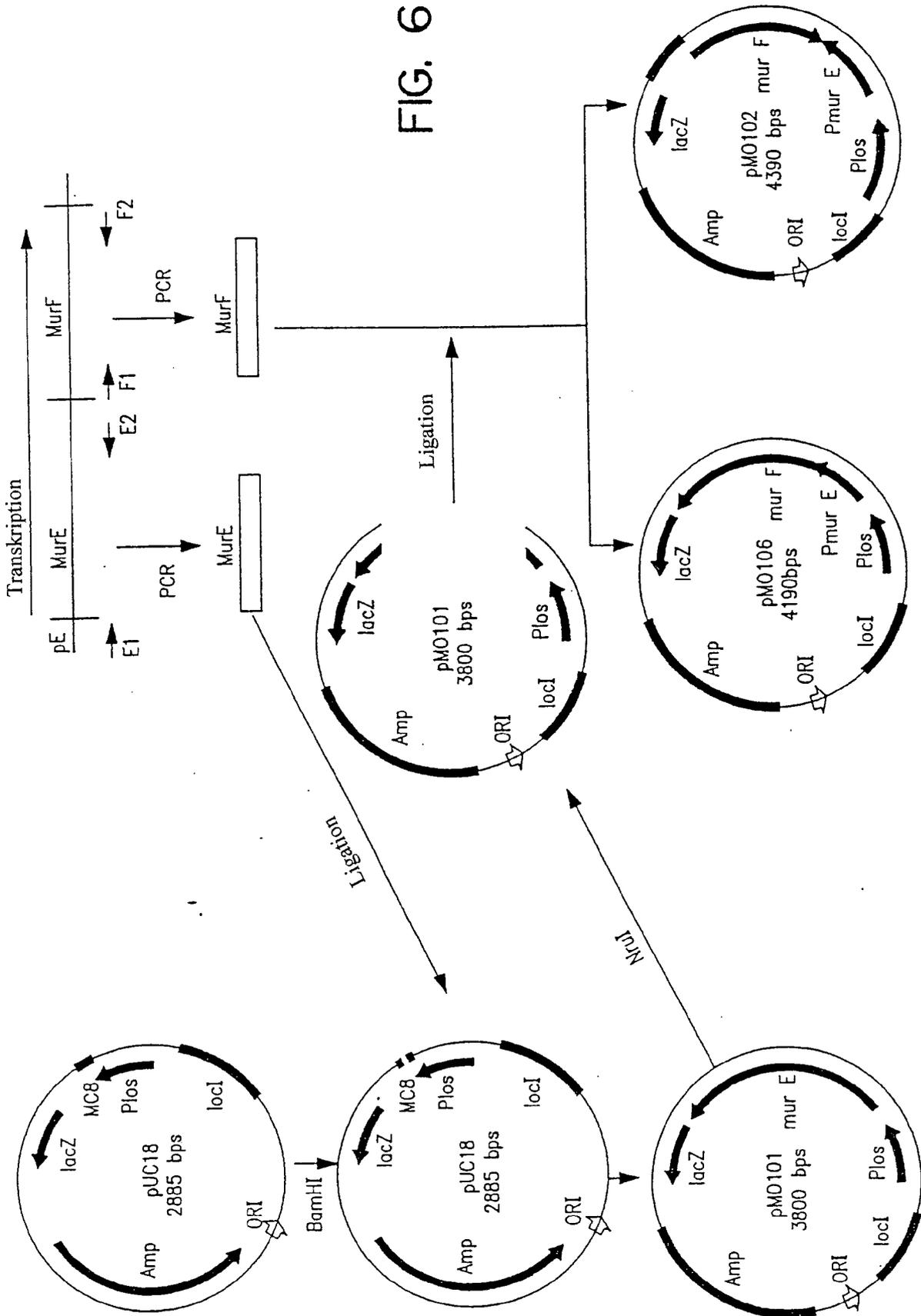


FIG. 5



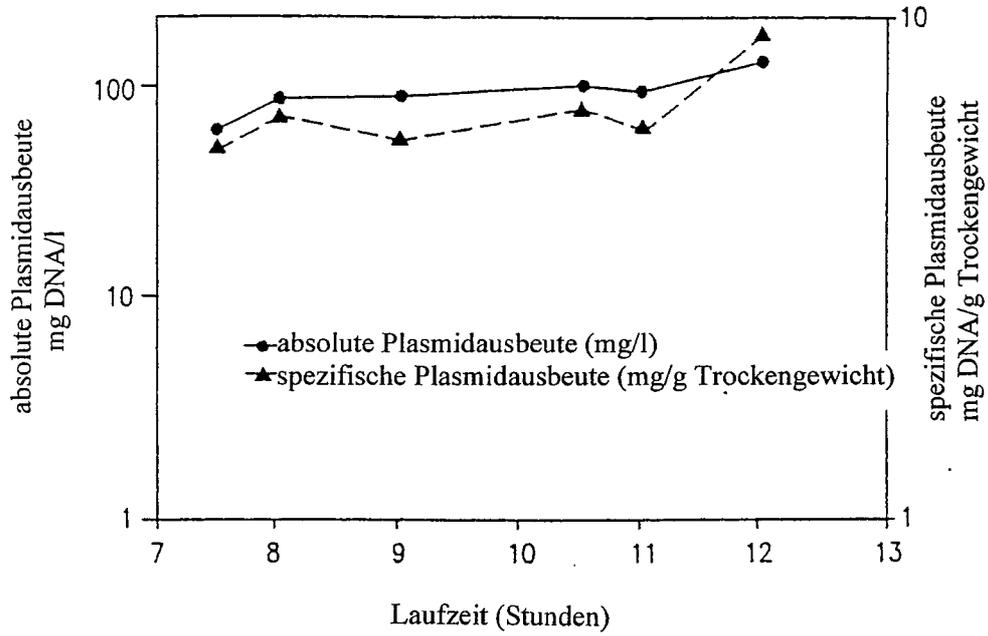


FIG. 7

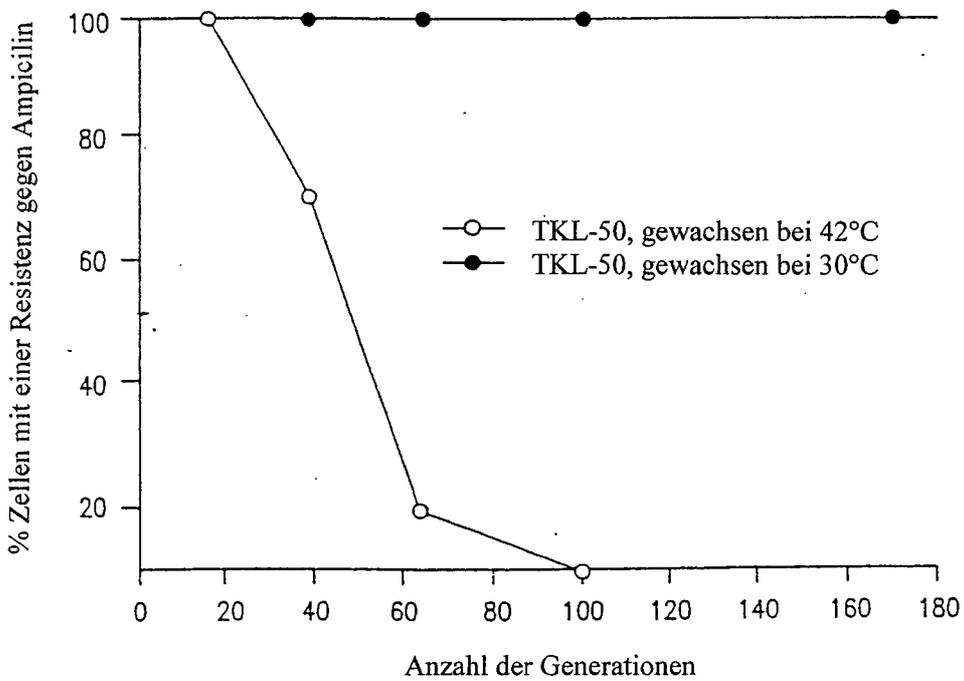


FIG. 8

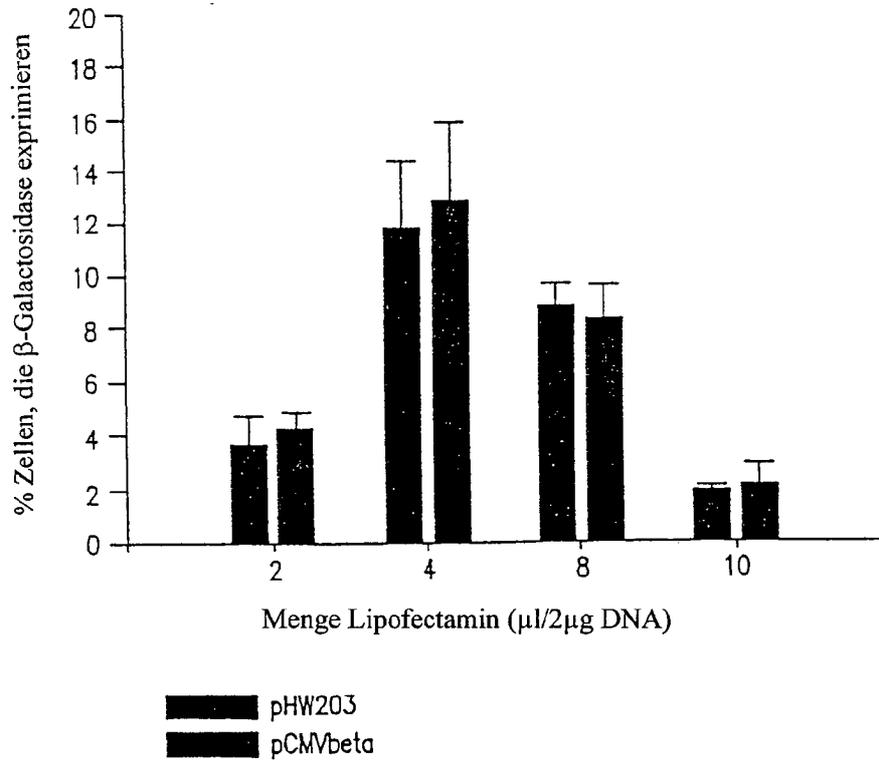


FIG. 9

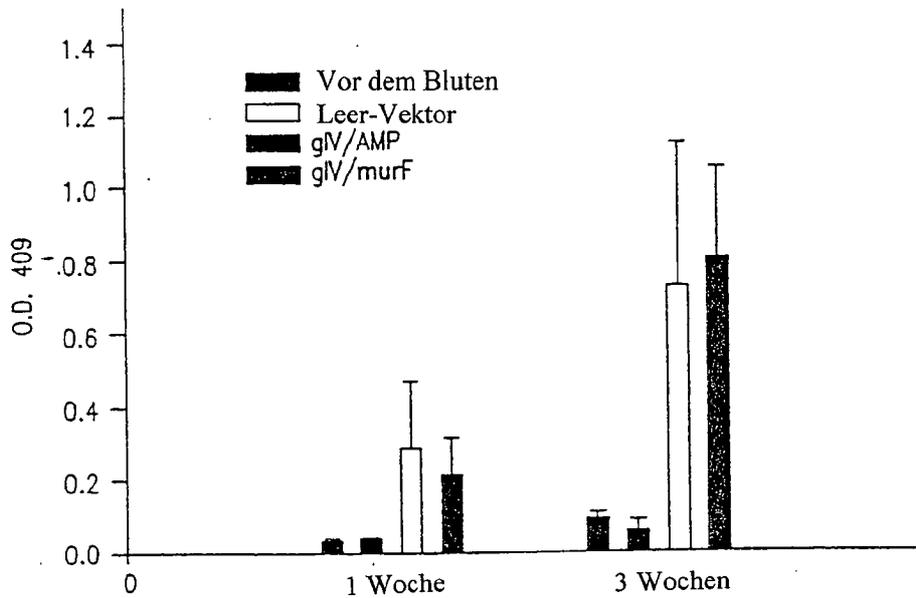


FIG. 10

1 ATGATTAGCG
 61 GATAACACCC
 121 GTTGCCTGA
 181 GCGGAGGCG
 241 AAGGATACGC
 301 CGCGGGTTG
 361 ATTTAAGCC
 421 GTACCGATGA
 481 GCGAACCATC
 541 GTCAAACAACC
 601 GCGAAAGGTG
 661 AACAAACGACT
 721 CCCAATGCCG
 781 GAAATTAACCC
 841 CACAATAATTG
 901 GATGCTATCA
 961 CAACTGGCAG
 1021 ACTGCAGCAG
 1081 ATGGCGGAAC
 1141 GCTGCTGGTA
 1201 CAGCGGCGTT
 1261 GATTGCTGAG
 1321 AGAGGTAGTA
 1381 GCGGCTTTAC
 1441 GGCAGGTA
 1501 CAACAGGTAA
 1561 TTACGATTTT
 1621 GCGGAACTAA
 1681 TTGCTGATAA
 1741 GTTAAGCGTG
 1801 AAGCGAAGCC
 1861 GGCTGAAATG
 1921 GCTGCTCGAC
 1981 GGCAAACTCG
 2041 GACAGCCGCT
 2101 AACCCGAGC
 2161 TTTCAACCGCC
 2221 GCAGAGCGTA
 2281 CCGCTGCGG
 2341 ACCGATGTTT
 2401 ACCGATGTTT
 2461 TTTGATGCTG
 2521 AACACIGAT
 2581 CCAACTIACC
 2641 GTCCTCGGC
 2701 CTCCTCGGC
 2761 GTCCTCGGC
 2821 TAGGTAAGT
 2881 TAGCGTCCG
 2941 TTTGATGCTG
 3001 AACACIGAT
 3061 CCAACTIACC
 3121 GTCCTCGGC
 3181 CTCCTCGGC
 3241 TAGGTAAGT
 3301 TTTGATGCTG
 3361 AACACIGAT
 3421 CCAACTIACC
 3481 GTCCTCGGC
 3541 CTCCTCGGC
 3601 TAGGTAAGT
 3661 TTTGATGCTG
 3721 AACACIGAT
 3781 CCAACTIACC
 3841 GTCCTCGGC
 3901 CTCCTCGGC
 3961 TAGGTAAGT
 4021 TTTGATGCTG
 4081 AACACIGAT
 4141 CCAACTIACC
 4201 GTCCTCGGC
 4261 CTCCTCGGC
 4321 TAGGTAAGT
 4381 TTTGATGCTG
 4441 AACACIGAT
 4501 CCAACTIACC
 4561 GTCCTCGGC
 4621 CTCCTCGGC
 4681 TAGGTAAGT
 4741 TTTGATGCTG
 4801 AACACIGAT
 4861 CCAACTIACC
 4921 GTCCTCGGC
 4981 CTCCTCGGC
 5041 TAGGTAAGT
 5101 TTTGATGCTG
 5161 AACACIGAT
 5221 CCAACTIACC
 5281 GTCCTCGGC
 5341 CTCCTCGGC
 5401 TAGGTAAGT
 5461 TTTGATGCTG
 5521 AACACIGAT
 5581 CCAACTIACC
 5641 GTCCTCGGC
 5701 CTCCTCGGC
 5761 TAGGTAAGT
 5821 TTTGATGCTG
 5881 AACACIGAT
 5941 CCAACTIACC
 6001 GTCCTCGGC
 6061 CTCCTCGGC
 6121 TAGGTAAGT
 6181 TTTGATGCTG
 6241 AACACIGAT
 6301 CCAACTIACC
 6361 GTCCTCGGC
 6421 CTCCTCGGC
 6481 TAGGTAAGT
 6541 TTTGATGCTG
 6601 AACACIGAT
 6661 CCAACTIACC
 6721 GTCCTCGGC
 6781 CTCCTCGGC
 6841 TAGGTAAGT
 6901 TTTGATGCTG
 6961 AACACIGAT
 7021 CCAACTIACC
 7081 GTCCTCGGC
 7141 CTCCTCGGC
 7201 TAGGTAAGT
 7261 TTTGATGCTG
 7321 AACACIGAT
 7381 CCAACTIACC
 7441 GTCCTCGGC
 7501 CTCCTCGGC
 7561 TAGGTAAGT
 7621 TTTGATGCTG
 7681 AACACIGAT
 7741 CCAACTIACC
 7801 GTCCTCGGC
 7861 CTCCTCGGC
 7921 TAGGTAAGT
 7981 TTTGATGCTG
 8041 AACACIGAT
 8101 CCAACTIACC
 8161 GTCCTCGGC
 8221 CTCCTCGGC
 8281 TAGGTAAGT
 8341 TTTGATGCTG
 8401 AACACIGAT
 8461 CCAACTIACC
 8521 GTCCTCGGC
 8581 CTCCTCGGC
 8641 TAGGTAAGT
 8701 TTTGATGCTG
 8761 AACACIGAT
 8821 CCAACTIACC
 8881 GTCCTCGGC
 8941 CTCCTCGGC
 9001 TAGGTAAGT
 9061 TTTGATGCTG
 9121 AACACIGAT
 9181 CCAACTIACC
 9241 GTCCTCGGC
 9301 CTCCTCGGC
 9361 TAGGTAAGT
 9421 TTTGATGCTG
 9481 AACACIGAT
 9541 CCAACTIACC
 9601 GTCCTCGGC
 9661 CTCCTCGGC
 9721 TAGGTAAGT
 9781 TTTGATGCTG
 9841 AACACIGAT
 9901 CCAACTIACC
 9961 GTCCTCGGC
 10021 CTCCTCGGC
 10081 TAGGTAAGT
 10141 TTTGATGCTG
 10201 AACACIGAT
 10261 CCAACTIACC
 10321 GTCCTCGGC
 10381 CTCCTCGGC
 10441 TAGGTAAGT
 10501 TTTGATGCTG
 10561 AACACIGAT
 10621 CCAACTIACC
 10681 GTCCTCGGC
 10741 CTCCTCGGC
 10801 TAGGTAAGT
 10861 TTTGATGCTG
 10921 AACACIGAT
 10981 CCAACTIACC
 11041 GTCCTCGGC
 11101 CTCCTCGGC
 11161 TAGGTAAGT
 11221 TTTGATGCTG
 11281 AACACIGAT
 11341 CCAACTIACC
 11401 GTCCTCGGC
 11461 CTCCTCGGC
 11521 TAGGTAAGT
 11581 TTTGATGCTG
 11641 AACACIGAT
 11701 CCAACTIACC
 11761 GTCCTCGGC
 11821 CTCCTCGGC
 11881 TAGGTAAGT
 11941 TTTGATGCTG
 12001 AACACIGAT
 12061 CCAACTIACC
 12121 GTCCTCGGC
 12181 CTCCTCGGC
 12241 TAGGTAAGT
 12301 TTTGATGCTG
 12361 AACACIGAT
 12421 CCAACTIACC
 12481 GTCCTCGGC
 12541 CTCCTCGGC
 12601 TAGGTAAGT
 12661 TTTGATGCTG
 12721 AACACIGAT
 12781 CCAACTIACC
 12841 GTCCTCGGC
 12901 CTCCTCGGC
 12961 TAGGTAAGT
 13021 TTTGATGCTG
 13081 AACACIGAT
 13141 CCAACTIACC
 13201 GTCCTCGGC
 13261 CTCCTCGGC
 13321 TAGGTAAGT
 13381 TTTGATGCTG
 13441 AACACIGAT
 13501 CCAACTIACC
 13561 GTCCTCGGC
 13621 CTCCTCGGC
 13681 TAGGTAAGT
 13741 TTTGATGCTG
 13801 AACACIGAT
 13861 CCAACTIACC
 13921 GTCCTCGGC
 13981 CTCCTCGGC
 14041 TAGGTAAGT
 14101 TTTGATGCTG
 14161 AACACIGAT
 14221 CCAACTIACC
 14281 GTCCTCGGC
 14341 CTCCTCGGC
 14401 TAGGTAAGT
 14461 TTTGATGCTG
 14521 AACACIGAT
 14581 CCAACTIACC
 14641 GTCCTCGGC
 14701 CTCCTCGGC
 14761 TAGGTAAGT
 14821 TTTGATGCTG
 14881 AACACIGAT
 14941 CCAACTIACC
 15001 GTCCTCGGC
 15061 CTCCTCGGC
 15121 TAGGTAAGT
 15181 TTTGATGCTG
 15241 AACACIGAT
 15301 CCAACTIACC
 15361 GTCCTCGGC
 15421 CTCCTCGGC
 15481 TAGGTAAGT
 15541 TTTGATGCTG
 15601 AACACIGAT
 15661 CCAACTIACC
 15721 GTCCTCGGC
 15781 CTCCTCGGC
 15841 TAGGTAAGT
 15901 TTTGATGCTG
 15961 AACACIGAT
 16021 CCAACTIACC
 16081 GTCCTCGGC
 16141 CTCCTCGGC
 16201 TAGGTAAGT
 16261 TTTGATGCTG
 16321 AACACIGAT
 16381 CCAACTIACC
 16441 GTCCTCGGC
 16501 CTCCTCGGC
 16561 TAGGTAAGT
 16621 TTTGATGCTG
 16681 AACACIGAT
 16741 CCAACTIACC
 16801 GTCCTCGGC
 16861 CTCCTCGGC
 16921 TAGGTAAGT
 16981 TTTGATGCTG
 17041 AACACIGAT
 17101 CCAACTIACC
 17161 GTCCTCGGC
 17221 CTCCTCGGC
 17281 TAGGTAAGT
 17341 TTTGATGCTG
 17401 AACACIGAT
 17461 CCAACTIACC
 17521 GTCCTCGGC
 17581 CTCCTCGGC
 17641 TAGGTAAGT
 17701 TTTGATGCTG
 17761 AACACIGAT
 17821 CCAACTIACC
 17881 GTCCTCGGC
 17941 CTCCTCGGC
 18001 TAGGTAAGT
 18061 TTTGATGCTG
 18121 AACACIGAT
 18181 CCAACTIACC
 18241 GTCCTCGGC
 18301 CTCCTCGGC
 18361 TAGGTAAGT
 18421 TTTGATGCTG
 18481 AACACIGAT
 18541 CCAACTIACC
 18601 GTCCTCGGC
 18661 CTCCTCGGC
 18721 TAGGTAAGT
 18781 TTTGATGCTG
 18841 AACACIGAT
 18901 CCAACTIACC
 18961 GTCCTCGGC
 19021 CTCCTCGGC
 19081 TAGGTAAGT
 19141 TTTGATGCTG
 19201 AACACIGAT
 19261 CCAACTIACC
 19321 GTCCTCGGC
 19381 CTCCTCGGC
 19441 TAGGTAAGT
 19501 TTTGATGCTG
 19561 AACACIGAT
 19621 CCAACTIACC
 19681 GTCCTCGGC
 19741 CTCCTCGGC
 19801 TAGGTAAGT
 19861 TTTGATGCTG
 19921 AACACIGAT
 19981 CCAACTIACC
 20041 GTCCTCGGC
 20101 CTCCTCGGC
 20161 TAGGTAAGT
 20221 TTTGATGCTG
 20281 AACACIGAT
 20341 CCAACTIACC
 20401 GTCCTCGGC
 20461 CTCCTCGGC
 20521 TAGGTAAGT
 20581 TTTGATGCTG
 20641 AACACIGAT
 20701 CCAACTIACC
 20761 GTCCTCGGC
 20821 CTCCTCGGC
 20881 TAGGTAAGT
 20941 TTTGATGCTG
 21001 AACACIGAT
 21061 CCAACTIACC
 21121 GTCCTCGGC
 21181 CTCCTCGGC
 21241 TAGGTAAGT
 21301 TTTGATGCTG
 21361 AACACIGAT
 21421 CCAACTIACC
 21481 GTCCTCGGC
 21541 CTCCTCGGC
 21601 TAGGTAAGT
 21661 TTTGATGCTG
 21721 AACACIGAT
 21781 CCAACTIACC
 21841 GTCCTCGGC
 21901 CTCCTCGGC
 21961 TAGGTAAGT
 22021 TTTGATGCTG
 22081 AACACIGAT
 22141 CCAACTIACC
 22201 GTCCTCGGC
 22261 CTCCTCGGC
 22321 TAGGTAAGT
 22381 TTTGATGCTG
 22441 AACACIGAT
 22501 CCAACTIACC
 22561 GTCCTCGGC
 22621 CTCCTCGGC
 22681 TAGGTAAGT
 22741 TTTGATGCTG
 22801 AACACIGAT
 22861 CCAACTIACC
 22921 GTCCTCGGC
 22981 CTCCTCGGC
 23041 TAGGTAAGT
 23101 TTTGATGCTG
 23161 AACACIGAT
 23221 CCAACTIACC
 23281 GTCCTCGGC
 23341 CTCCTCGGC
 23401 TAGGTAAGT
 23461 TTTGATGCTG
 23521 AACACIGAT
 23581 CCAACTIACC
 23641 GTCCTCGGC
 23701 CTCCTCGGC
 23761 TAGGTAAGT
 23821 TTTGATGCTG
 23881 AACACIGAT
 23941 CCAACTIACC
 24001 GTCCTCGGC
 24061 CTCCTCGGC
 24121 TAGGTAAGT
 24181 TTTGATGCTG
 24241 AACACIGAT
 24301 CCAACTIACC
 24361 GTCCTCGGC
 24421 CTCCTCGGC
 24481 TAGGTAAGT
 24541 TTTGATGCTG
 24601 AACACIGAT
 24661 CCAACTIACC
 24721 GTCCTCGGC
 24781 CTCCTCGGC
 24841 TAGGTAAGT
 24901 TTTGATGCTG
 24961 AACACIGAT
 25021 CCAACTIACC
 25081 GTCCTCGGC
 25141 CTCCTCGGC
 25201 TAGGTAAGT
 25261 TTTGATGCTG
 25321 AACACIGAT
 25381 CCAACTIACC
 25441 GTCCTCGGC
 25501 CTCCTCGGC
 25561 TAGGTAAGT
 25621 TTTGATGCTG
 25681 AACACIGAT
 25741 CCAACTIACC
 25801 GTCCTCGGC
 25861 CTCCTCGGC
 25921 TAGGTAAGT
 25981 TTTGATGCTG
 26041 AACACIGAT
 26101 CCAACTIACC
 26161 GTCCTCGGC
 26221 CTCCTCGGC
 26281 TAGGTAAGT
 26341 TTTGATGCTG
 26401 AACACIGAT
 26461 CCAACTIACC
 26521 GTCCTCGGC
 26581 CTCCTCGGC
 26641 TAGGTAAGT
 26701 TTTGATGCTG
 26761 AACACIGAT
 26821 CCAACTIACC
 26881 GTCCTCGGC
 26941 CTCCTCGGC
 27001 TAGGTAAGT
 27061 TTTGATGCTG
 27121 AACACIGAT
 27181 CCAACTIACC
 27241 GTCCTCGGC
 27301 CTCCTCGGC
 27361 TAGGTAAGT
 27421 TTTGATGCTG
 27481 AACACIGAT
 27541 CCAACTIACC
 27601 GTCCTCGGC
 27661 CTCCTCGGC
 27721 TAGGTAAGT
 27781 TTTGATGCTG
 27841 AACACIGAT
 27901 CCAACTIACC
 27961 GTCCTCGGC
 28021 CTCCTCGGC
 28081 TAGGTAAGT
 28141 TTTGATGCTG
 28201 AACACIGAT
 28261 CCAACTIACC
 28321 GTCCTCGGC
 28381 CTCCTCGGC
 28441 TAGGTAAGT
 28501 TTTGATGCTG
 28561 AACACIGAT
 28621 CCAACTIACC
 28681 GTCCTCGGC
 28741 CTCCTCGGC
 28801 TAGGTAAGT
 28861 TTTGATGCTG
 28921 AACACIGAT
 28981 CCAACTIACC
 29041 GTCCTCGGC
 29101 CTCCTCGGC
 29161 TAGGTAAGT
 29221 TTTGATGCTG
 29281 AACACIGAT
 29341 CCAACTIACC
 29401 GTCCTCGGC
 29461 CTCCTCGGC
 29521 TAGGTAAGT
 29581 TTTGATGCTG
 29641 AACACIGAT
 29701 CCAACTIACC
 29761 GTCCTCGGC
 29821 CTCCTCGGC
 29881 TAGGTAAGT
 29941 TTTGATGCTG
 29981 AACACIGAT
 30041 CCAACTIACC
 30101 GTCCTCGGC
 30161 CTCCTCGGC
 30221 TAGGTAAGT
 30281 TTTGATGCTG
 30341 AACACIGAT
 30401 CCAACTIACC
 30461 GTCCTCGGC
 30521 CTCCTCGGC
 30581 TAGGTAAGT
 30641 TTTGATGCTG
 30701 AACACIGAT
 30761 CCAACTIACC
 30821 GTCCTCGGC
 30881 CTCCTCGGC
 30941 TAGGTAAGT
 31001 TTTGATGCTG
 31061 AACACIGAT
 31121 CCAACTIACC
 31181 GTCCTCGGC
 31241 CTCCTCGGC
 31301 TAGGTAAGT
 31361 TTTGATGCTG
 31421 AACACIGAT
 31481 CCAACTIACC
 31541 GTCCTCGGC
 31601 CTCCTCGGC
 31661 TAGGTAAGT
 31721 TTTGATGCTG
 31781 AACACIGAT
 31841 CCAACTIACC
 31901 GTCCTCGGC
 31961 CTCCTCGGC
 32021 TAGGTAAGT
 32081 TTTGATGCTG
 32141 AACACIGAT
 32201 CCAACTIACC
 32261 GTCCTCGGC
 32321 CTCCTCGGC
 32381 TAGGTAAGT
 32441 TTTGATGCTG
 32501 AACACIGAT
 32561 CCAACTIACC
 32621 GTCCTCGGC
 32681 CTCCTCGGC
 32741 TAGGTAAGT
 32801 TTTGATGCTG
 32861 AACACIGAT
 32921 CCAACTIACC
 32981 GTCCTCGGC
 33041 CTCCTCGGC
 33101 TAGGTAAGT
 33161 TTTGATGCTG
 33221 AACACIGAT
 33281 CCAACTIACC
 33341 GTCCTCGGC
 33401 CTCCTCGGC
 33461 TAGGTAAGT
 33521 TTTGATGCTG
 33581 AACACIGAT
 33641 CCAACTIACC
 33701 GTCCTCGGC
 33761 CTCCTCGGC
 33821 TAGGTAAGT
 33881 TTTGATGCTG
 33941 AACACIGAT
 34001 CCAACTIACC
 34061 GTCCTCGGC
 34121 CTCCTCGGC
 34181 TAGGTAAGT
 34241 TTTGATGCTG
 34301 AACACIGAT
 34361 CCAACTIACC
 34421 GTCCTCGGC
 34481 CTCCTCGGC
 34541 TAGGTAAGT
 34601 TTTGATGCTG
 34661 AACACIGAT
 34721 CCAACTIACC
 34781 GTCCTCGGC
 34841 CTCCTCGGC
 34901 TAGGTAAGT
 34961 TTTGATGCTG
 35021 AACACIGAT
 35081 CCAACTIACC
 35141 GTCCTCGGC
 35201 CTCCTCGGC
 35261 TAGGTAAGT
 35321 TTTGATGCTG
 35381 AACACIGAT
 35441 CCAACTIACC
 35501 GTCCTCGGC
 35561 CTCCTCGGC
 35621 TAGGTAAGT
 35681 TTTGATGCTG
 35741 AACACIGAT
 35801 CCAACTIACC
 35861 GTCCTCGGC
 35921 CTCCTCGGC
 35981 TAGGTAAGT
 36041 TTTGATGCTG
 36101 AACACIGAT
 36161 CCAACTIACC
 36221 GTCCTCGGC
 36281 CTCCTCGGC
 36341 TAGGTAAGT
 36401 TTTGATGCTG
 36461 AACACIGAT
 36521 CCAACTIACC
 36581 GTCCTCGGC
 36641 CTCCTCGGC
 36701 TAGGTAAGT
 36761 TTTGATGCTG
 36821 AACACIGAT
 36881 CCAACTIACC
 36941 GTCCTCGGC
 37001 CTCCTCGGC
 37061 TAGGTAAGT
 37121 TTTGATGCTG
 37181 AACACIGAT
 37241 CCAACTIACC
 37301 GTCCTCGGC
 37361 CTCCTCGGC
 37421 TAGGTAAGT
 37481 TTTGATGCTG
 37541 AACACIGAT
 37601 CCAACTIACC
 37661 GTCCTCGGC
 37721 CTCCTCGGC
 37781 TAGGTAAGT
 37841 TTTGATGCTG
 37901 AACACIGAT
 37961 CCAACTIACC
 38021 GTCCTCGGC
 38081 CTCCTCGGC
 38141 TAGGTAAGT
 38201 TTTGATGCTG
 38261 AACACIGAT
 38321 CCAACTIACC
 38381 GTCCTCGGC
 38441 CTCCTCGGC
 38501 TAGGTAAGT
 38561 TTTGATGCTG
 38621 AACACIGAT
 38681 CCAACTIACC
 38741 GTCCTCGGC
 38801 CTCCTCGGC
 38861 TAGGTAAGT
 38921 TTTGATGCTG
 38981 AACACIGAT
 39041 CCAACTIACC
 39101 GTCCTCGGC
 39161 CTCCTCGGC
 39221 TAGGTAAGT
 39281 TTTGATGCTG
 39341 AACACIGAT
 39401 CCAACTIACC
 39461 GTCCTCGGC
 39521 CTCCTCGGC
 39581 TAGGTAAGT
 39641 TTTGATGCTG
 39701 AACACIGAT
 39761 CCAACTIACC
 39821 GTCCTCGGC
 39881 CTCCTCGGC
 39941 TAGGTAAGT
 39981 TTTGATGCTG
 40041 AACACIGAT
 40101 CCAACTIACC
 40161 GTCCTCGGC
 40221 CTCCTCGGC
 40281 TAGGTAAGT
 40341 TTTGATGCTG
 40401 AACACIGAT
 40461 CCAACTIACC
 40521 GTCCTCGGC
 40581 CTCCTCGGC
 40641 TAGGTAAGT
 40701 TTTGATGCTG
 40761 AACACIGAT
 40821 CCAACTIACC
 40881 GTCCTCGGC
 40941 CTCCTCGGC
 41001 TAGGTAAGT
 41061 TTTGATGCTG
 41121 AACACIGAT
 41181 CCAACTIACC
 41241 GTCCTCGGC
 41301 CTCCTCGGC
 41361 TAGGTAAGT
 41421 TTTGATGCTG
 41481 AACACIGAT
 41541 CCAACTIACC
 41601 GTCCTCGGC
 41661 CTCCTCGGC
 41721 TAGGTAAGT
 41781 TTTGATGCTG
 41841 AACACIGAT
 41901 CCAACTIACC
 41961 GTCCTCGGC
 42021 CTCCTCGGC
 42081 TAGGTAAGT
 42141 TTTGATGCTG
 42201 AACACIGAT
 42261 CCAACTIACC
 42321 GTCCTCGGC
 42381 CTCCTCGGC
 42441 TAGGTAAGT
 42501 TTTGATGCTG
 42561 AACACIGAT
 42621 CCAACTIACC
 42681 GTCCTCGGC
 42741 CTCCTCGGC
 42801 TAGGTAAGT
 42861 TTTGATGCTG
 42921 AACACIGAT
 42981 CCAACTIACC
 43041 GTCCTCGGC
 43101 CTCCTCGGC
 43161 TAGGTAAGT
 43221 TTTGATGCTG
 43281 AACACIGAT
 43341 CCAACTIACC
 43401 GTCCTCGGC
 43461 CTCCTCGGC
 43521 TAGGTAAGT
 43581 TTTGATGCTG
 43641 AACACIGAT
 43701 CCAACTIACC
 43761 GTCCTCGGC
 43821 CTCCTCGGC
 43881 TAGGTAAGT
 43941 TTTGATGCTG
 44001 AACACIGAT
 44061 CCAACTIACC
 44121 GTCCTCGGC
 44181 CTCCTCGGC
 44241 TAGGTAAGT
 44301 TTTGATGCTG
 44361 AACACIGAT
 44421 CCAACTIACC
 44481 GTCCTCGGC
 44541 CTCCTCGGC
 44601 TAGGTAAGT
 44661 TTTGATGCTG
 44721 AACACIGAT
 44781 CCAACTIACC
 44841 GTCCTCGGC
 44901 CTCCTCGGC
 44961 TAGGTAAGT
 45021 TTTGATGCTG
 45081 AACACIGAT
 45141 CCAACTIACC
 45201 GTCCTCGGC
 45261 CTCCTCGGC
 45321 TAGGTAAGT
 45381 TTTGATGCTG
 45441 AACACIGAT
 45501 CCAACTIACC
 45561 GTCCTCGGC
 45621 CTCCTCGGC
 45681 TAGGTAAGT
 45741 TTTGATGCTG
 45801 AACACIGAT
 45861 CCAACTIACC
 45921 GTCCTCGGC
 45981 CTCCTCGGC
 46041 TAGGTAAGT
 46101 TTTGATGCTG
 46161 AACACIGAT
 46221 CCAACTIACC
 46281 GTCCTCGGC
 46341 CTCCTCGGC
 46401 TAGGTAAGT
 46461 TTTGATGCTG
 46521 AACACIGAT
 46581 CCAACTIACC
 46641 GTCCTCGGC
 46701 CTCCTCGGC
 46761 TAGGTAAGT
 46821 TTTGATGCTG
 46881 AACACIGAT
 46941 CCAACTIACC
 47001 GTCCTCGGC
 47061 CTCCTCGGC
 47121 TAGGTAAGT
 47181 TTTGATGCTG
 47241 AACACIGAT
 47301 CCAACTIACC
 47361 GTCCTCGGC
 47421 CTCCTCGGC
 47481 TAGGTAAGT
 47541 TTTGATGCTG
 47601 AACACIGAT
 47661 CCAACTIACC
 47721 GTCCTCGGC
 47781 CTCCTCGGC
 47841 TAGGTAAGT
 47901 TTTGATGCTG
 47961 AACACIGAT
 48021 CCAACTIACC
 48081 GTCCTCGGC
 48141 CTCCTCGGC
 48201 TAGGTAAGT
 48261 TTTGATGCTG
 48321 AACACIGAT
 48381 CCAACTIACC
 48441 GTCCTCGGC
 48501 CTCCTCGGC
 48561 TAGGTAAGT
 48621 TTTGATGCTG
 48681 AACACIGAT
 48741 CCAACTIACC
 48801 GTCCTCGGC
 48861 CTCCTCGGC
 48921 TAGGTAAGT
 48981 TTTGATGCTG
 49041 AACACIGAT
 49101 CCAACTIACC
 49161 GTCCTCGGC
 49221 CTCCTCGGC
 49281 TAGGTAAGT
 49341 TTTGATGCTG
 49401 AACACIGAT
 49461 CCAACTIACC
 49521 GTCCTCGGC
 49581 CTCCTCGGC
 49641 TAGGTAAGT
 49701 TTTGATGCTG