



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 079 T2** 2005.02.24

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 616 034 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 079.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 101 770.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.02.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.09.1994**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.02.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/77**

C12N 15/87, C12N 15/31, C12N 1/21

(30) Unionspriorität:

27283 05.03.1993 US

(73) Patentinhaber:

Wyeth Holdings Corp., Madison, N.J., US

(74) Vertreter:

Wächtershäuser und Kollegen, 80333 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Metcalf, Benjamin J., Rochester, New York 14618,
US**

(54) Bezeichnung: **Plasmid zur Herstellung von CRM-Protein und Diphtherie-Toxin**

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

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Herstellen von Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein, das kreuzreaktiv mit Diphtherie-Toxin ist, ein Verfahren zum Exprimieren von Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein, das kreuzreaktiv mit Diphtherie-Toxin in einem Wirt ist, und ein Mikroorganismus der Art *Corynebacterium diphtheria* Stamm C7, der mit einem solchen Plasmid transformiert ist.

Hintergrund

[0002] Das CRM197-Protein ist eine nicht toxische Form von Diphtherie-Toxin, doch ist es immunologisch nicht von Diphtherie-Toxin zu unterscheiden. CRM197 wird durch *C. diphtheriae* produziert, das durch die nicht toxische Phage β 197^{tox-}, erzeugt durch Nitrosoguanidin-Mutagenese der toxischen Corynephage β , infiziert ist (T. Uchida et al., 1971, *Nature New Biology*, 233:8–11). Das CRM197-Protein hat das gleiche Molekulargewicht wie das Diphtherie-Toxin, unterscheidet sich davon aber durch eine einzige Basenänderung (Guanin zu Adenin) im Strukturgen. Diese einzige Basenänderung erzeugt eine Aminosäure-Substitution (Glutaminsäure für Glycin) im ausgereiften Protein und beseitigt die toxischen Eigenschaften von Diphtherie-Toxin. Das CRM197-Protein ist ein sicherer und wirksamer T-Zellen-abhängiger Träger für Saccharide und wird derzeit im *Haemophilus influenzae* Typ b Oligosaccharid-CRM197-Konjugatvaccin (HibTiter™; Lederle Praxis Biologicals, Rochester, N.Y.) benutzt.

[0003] Die Produktion signifikanter Mengen des CRM197-Proteins zum Einsatz in Vaccinen wurde aufgrund eines geringen Protein-Überflusses gehindert. Es wurden Techniken entwickelt, um die Produktion von CRM-Proteinen unter Einsatz von Doppel-Lysogenen (R. Rappuoli, 1983, *Applied Eny. Microbio.* 46:560–564; US-PS 4,925,972 von R. Rappuoli und R. Rappuoli, 1983, *J. Bacteriol.* 153:1202-1210) der nicht toxischen Corynephage β 197 zu erhöhen. Rappuoli berichtet Ausbeuten an CRM197 von Doppel-Lysogenen, die bis zum Dreifachen höher sind als von den Einzel-Lysogenen. Die Produktions-Niveaus von CRM197 durch Einzel-Lysogene sind angemessen, jedoch wirtschaftlich unbefriedigend für die Produktion von Vaccinen, die CRM197-Protein benutzen.

[0004] Die Einführung von Mehrfach-Lysogenen der Corynephage β in *Corynebacterium diphtheriae* ist ein arbeitsreiches Screen-Verfahren zum Identifizieren von Stämmen, die das CRM197-Protein, Diphtherie-Toxin oder andere CRM-Proteine, die kreuzreaktiv mit Diphtherie-Toxin sind, stärker produzieren können. Außerdem ist dieses Verfahren in seiner Fähigkeit zum Manipulieren der Protein-Expression unter Benutzung; standardgemäßer rekombinanter Techniken beschränkt. Es wäre daher nützlich, ein Verfahren zu entwickeln, das signifikante Menge von Diphtherie-Toxin und CRM-Proteinen durch Erhöhen der Genkopienzahl ohne den Einsatz von Corynephage β oder durch Erhöhen der Produktions-Mengen dieser Proteine aus Stämmen erzeugen kann, die für Corynephage β lysogen sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren und Plasmid-System zum Manipulieren und Einführen des Gens, das für CRM197, Diphtherie-Toxin und andere aus dem Diphtherietoxin-Gen abgeleitete CRM-Proteine codiert ebenso wie Mikroorganismen, die durch diese Mittel transformiert sind. Ein besonders bevorzugtes DNA-Plasmid, das als pPX 3511 bezeichnet wird, das das Gen für CRM197 aus der nicht toxischen β -Phage und das Plasmid pNG2-22 kombiniert, wird beschrieben. Das neue Plasmid-System ist in der Lage, Stämme von *Corynebacterium diphtheriae* in Stämme zu transformieren, die zum Exprimieren hoher Niveaus des CRM197-Proteins ohne die Benutzung von Mehrfach-Lysogene in der Lage sind. Die Erfindung liefert ein elegantes Mittel zur Erhöhung der Protein-Expression von CRM197, Diphtherie-Toxin und anderen vom Diphtherietoxin-Gen abgeleiteten CRM-Proteinen. Die Gen-Expression kann auch durch Erhöhen der Promotor-Stärke oder durch Entfernen des Promotors aus der Eisen-Regulation manipuliert werden. In bevorzugten Ausführungsformen kann das Plasmid-System zum Exprimieren anderer Proteine, wie genetische Fusionen mit CRM197, Diphtherie-Toxin oder anderen vom Diphtherietoxin-Gen abgeleiteten CRM-Proteinen benutzt werden. Die Regulations- und Behandlungs-Sequenz von CRM197, Diphtherie-Toxin und anderen vom Diphtherie-Gen abgeleiteten CRM-Proteinen kann zum Exprimieren von Fremdproteinen in *Corynebacterium* spp. benutzt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0006] Fig. 1 ist ein rekombinantes DNA-Plasmid, das als pPX 3511 bezeichnet wird, das das Gen für CRM197, eine multiple Klonierungsstelle, die abgeleitet ist vom *E. coli*-Klonierungsvektor pUC 18, der den Chl-

oramphenicol-Resistenz(CmR)-Marker enthält und einen Replikationsursprung enthält, der vom Plasmid pNG2-22 (T.M. Serwold-Davis et al., FEM Microbiol. Lett. 66:119–124) abgeleitet ist.

[0007] Fig. 2 ist ein 12% SDS-PAGE-Gel, das die Produktion von CRM197 (61,8 Kilodalton) aus verschiedenen Stämmen von *C. diphtheriae* C7 zeigt. Spur A: Standards hohen Molekulargewichtes (BRL, 200-14,3 Kilodalton); Spur B: Einzel-Lysogen-C7(β 197)^{tox-}; Spur C: Doppel-Lysogen-C7(β 197)^{tox-}; Spur D: nicht lysogenes C7(-)^{tox-} mit pPX 3511, gezüchtet ohne Chloramphenicol (Cm2) (2 μ g/ml); Spur E: nicht lysogenes C7(-)^{tox-} mit pPX 3511, gezüchtet mit Chloramphenicol (2 μ g/ml); Spur F: Einzel-Lysogen-C7(β 197)^{tox-} mit pPX 3511, gezüchtet ohne Chloramphenicol (2 μ g/ml); Spur G: Einzel-Lysogen-C7(β 197)^{tox-}, gezüchtet mit Chloramphenicol (2 μ g/ml).

[0008] Fig. 3 zeigt die Stabilität von Plasmid pPX 3511 in *C. diphtheriae*-C7(β 197)^{tox-} unter Benutzung der Chloramphenicol-Resistenz als einem Indikator der Plasmid-Retention ohne antibiotische Selektion.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0009] Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren und Plasmid-System zum Erzeugen von Diphtherie-Toxin, CRM197 und anderer von Diphtherietoxin-Gen abgeleiteter CRM-Proteine in Mengen, die zum Einsatz in Vaccinen oder für andere Verwendung genügen, die angemessene verarbeitbare Mengen dieser Proteine erfordern. Das Plasmid-System liefert ein wirksames Mittel zum Einführen und Vergrößern der Kopienzahl des Diphtherietoxin-Gens oder CRM-Gens in *Corynebacterium* spp. Das Plasmid hat sein eigenes unabhängiges Episom mit seinen eigenen Replikations-Funktionen, was es dem Plasmid ermöglicht, Extrakopien von Diphtherietoxin- oder CRM-Gen in Wirtsstämme einzuführen, die zu einer solchen Integration nicht in der Lage sind, oder die vorher nicht durch die Phage β 197^{tox-} infiziert sind. So sind, z.B., die Mengen an CRM197-Protein, die durch *Corynebacterium* spp. erzeugt werden, das das Plasmid dieser Erfindung beherbergt, vergleichbar, wenn nicht besser, als Ausbeuten an CRM197-Protein, das durch Mehrfach-Lysogene von *C. diphtheriae* exprimiert werden, die mit der Corynephage β 197^{tox-} infiziert wurden.

[0010] Die Plasmide dieser Erfindung mit hohem Produktionsniveau umfassen ein für Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein kodierendes Gen, das seine Promotor- und Regulations-Signalsequenz einschließt, einen *Corynebacterium*-Replikationsursprung derart, dass das resultierende Plasmid in *Corynebacterium* spp. eingeführt werden kann und einen selektierbaren Marker, der wahlweise mit einer multiplen Klonierungsstelle verknüpft ist. Dieses Plasmid wird zum Transformieren von Mikroorganismen der Art *Corynebacterium* und besonders von *Corynebacterium diphtheriae* unter Bedingungen benutzt, die zum Erleichtern der Expression des Diphtherietoxin- oder CRM-Gens genügen. Geeignete Wachstums-Bedingungen sind in Abhängigkeit vom Wirtsorganismus für den Fachmann leicht zugänglich. So ist es, z.B., für die optimale CRM197-, Diphtherie-Toxin- oder andere CRM-Protein-Produktion aus *Corynebacterium* spp. erforderlich, den Mikroorganismus in einem Medium mit wenig Eisen oder einem enteisenen Medium zu halten.

[0011] Das Plasmid enthält ein Gen, das für das Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein codiert, das vom Diphtherietoxin-Gen abgeleitet ist. Beispiele von CRM-Proteinen, d.h., kreuzreagierende Materialien, die immunologisch kreuzreaktiv mit dem Diphtherie-Toxin sind, die in den Plasmid-Konstrukten dieser Erfindung eingesetzt werden können, schließen CRM197, CRM45, CRM30, CRM228 und CRM176 ein, sind jedoch darauf nicht beschränkt. Das für das CRM197-Protein codierende Gen ist von Diphtherie-Toxin (DT) abgeleitet, dessen Sequenz von Greenfield et al. (L. Greenfield et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:6853-6857) berichtet wurde. Der Unterschied zwischen dem DT-Gen und dem CRM197-Gen ist eine einzige Basen-Änderung im Strukturgenen. Die Nucleotid-Sequenzen für einige der CRM-Gene wurden von T. Uchida et al. (J. Biol. Chem., 248:3838-3844, 1975) berichtet. Das gesamte CRM-Gen, einschließlich seiner Regulations-Signalsequenz, kann durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) produziert werden. Zum Erzeugen des CRM197-Gens oder anderer CRM-Gene können andere Amplifikations-Techniken oder synthetische Techniken benutzt werden.

[0012] Die Regulations-Signalsequenz auf dem für Diphtherie-Toxin und CRM-Protein codierenden Gen gestattet das Absondern des Proteins in das Medium. Das abgesonderte Protein kann somit aus dem Medium gewonnen und unter Benutzung bekannter Techniken, wie Salz-Ausfällung und Säulenchromatographie, gereinigt werden.

[0013] Die Mehrfach-Klonierungsstelle ist vorzugsweise von pUC 18 abgeleitet, doch können Mehrfach-Klonierungsstellen, die von anderen Quellen abgeleitet sind, benutzt werden, z.B. pBluescript oder eine andere synthetische Mehrfach-Klonierungsstelle. Alternativ kann die mehrfache Klonierungsstelle vollständig beseitigt werden, ohne die Betriebsfähigkeit des Plasmids zu beeinträchtigen. In einem anderen Falle wird ein selektier-

barer Marker in das Plasmid eingebracht. Es kann irgendein antibiotischer Resistenz-Marker als der auswählbare Marker benutzt werden, wie Ampicillin, Erythromycin, Chloramphenicol, Kanamycin, doch ist er darauf nicht beschränkt. Zuerst wird die Empfindlichkeit des Corynebacter auf das Antibiotikum der Wahl getestet. Chloramphenicol ist bevorzugt, wenn die exprimierten Proteine für menschliche Verwendung beabsichtigt sind, da Chloramphenicol für einen solchen Zweck von der Food and Drug Administration genehmigt ist. Andere Verfahren der Plasmid-Selektion, wie Schwermetall-Resistenz oder Ernährungs-Anforderungen, können als Alternativen für antibiotische Resistenz-Marker benutzt werden.

[0014] Replikationsursprünge, die bei der Konstruktion von Hochproduktions-Plasmiden dieser Erfindung brauchbar sind, sind solche, die von Corynebacterium spp. abgeleitet sind. Der Replikationsursprung, der für pPX 3511 ausgewählt ist, ist vom Corynebacterium diphtheriae abgeleitet. Siehe Beispiel-Abschnitt. Andere Corynebacter-Replikationsursprünge können benutzt werden.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression von CRM197 mit hohem Niveau unter Einsatz eines neuen rekombinanten DNA-Plasmids, als pPX 3511 bezeichnet, erzielt, das zum Transformieren von Stämmen von C. diphtheriae C7 zu Stämmen in der Lage ist, die hohe Niveaus von CRM197-Protein produzieren. pPX 3511, gezeigt in **Fig. 1**, enthält das von Diphtherie-Toxin abgeleitete CRM197-Gen (L. Greenfield et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6853-6857). Der übrige Abschnitt des Plasmids ist vom Eltern-Plasmid pNG2-22 abgeleitet, in das das CRM197-Gen eingeführt ist.

[0016] Plasmid pPX 3511 wird produziert, indem man zuerst das CRM197-Gen von C. diphtheriae durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Das CRM197-Gen wird dann in ein C. diphtheriae-Plasmid geklont, das einen selektierbaren Marker enthält, wie pNG2 (J. Schiller et al., 1980, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 18:814-821) und pNG2-22 (T.M. Serwold-Davis et al., 1990, FEM Microbiol. Lett., 66:119-124). Diese beiden Plasmide haben einen weiten Wirtsbereich und sie sind zur Replikation in geringer Kopienzahl (5-10 Kopien/Zelle) in allen bisher getesteten Coryneformen in der Lage.

[0017] Das Eltern-Plasmid pNG2 ist ein natürlich vorkommendes C. diphtheriae-Plasmid, das ursprünglich aus gegen Erythromycin resistenten klinischen Stämmen isoliert wurde. Der Replikationsursprung für pNG2 ist auf einem 2,6 kb EcoRI-ClaI-Fragment vorhanden. Dieser Replikationsursprung wurde zum Erzeugen eines Chloramphenicol-Resistenzvektors benutzt, der als pNG2-22 (Serwold-Davis et al., a.a.O.) und pCM 2,6 bezeichnet wird (Schmit, 1991, Infect. Immun. 59:1899-1904).

[0018] Der Stamm C. diphtheriae C7 wird dann mit dem resultierenden pPX 3511-Plasmid durch Elektroporation transformiert, was es ermöglicht, dass das Bacterium CRM197 ohne die Anwesenheit des Phagen $\beta 197^{tox}$ produziert. Andere Transformations-Techniken können benutzt werden, wie bekannte physikalische und chemische Mittel (Serwold-Davis et al., a.a.O.). Diese Technik der Elektrottransformation mit pPX 3511 wird auch unter Benutzung von C. diphtheriae C7($\beta 197^{tox}$)-Einzel-Lysogen zur Erhöhung des Produktions-Niveaus von CRM197-Protein ausgeführt. Die Niveaus des durch die Transformanden exprimierten CRM197-Proteins sind mit Expressions-Niveaus des Einzel-Lysogen-C. diphtheriae C7($\beta 197^{tox}$ -ATCC Nr. 5328 und dem Doppel-Lysogen C. diphtheriae C7($\beta 197^{tox}$ -M1, ATCC Nr. 39255 verglichen, das das pPX 3511-Plasmid nicht beherbergt. Es wird beobachtet, dass, wenn Plasmid pPX 3511 in einen C. diphtheriae C7-Stamm eingeschleust wird, die Transformanden zur Expression von CRM197 in Niveaus in der Lage sind, die äquivalent sind C. diphtheriae-Doppel-Lysogen-Stämmen.

[0019] In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird der neue Plasmid-Vektor zur Erzeugung einer Reihe von Plasmid-Vektoren mit verschiedenen Fähigkeiten modifiziert. So kann, z.B., die Stellen-dirigierte Mutagenese zum Reparieren der einzigen Basenänderung in CRM197 benutzt werden, sodass das neue Plasmid Diphtherie-Toxin exprimieren würde. Andere Änderungen können an der geklonten CRM197-Gensequenz vorgenommen werden, um andere bekannte CRM-Proteine von Diphtherie-Toxin, wie CRM45, CRM30, CRM228 und CRM176, zu exprimieren (T. Uchida et al., 1973, J. Biol. Chem., 248:3838-3844).

[0020] Unter Benutzung rekombinanter DNA-Techniken können an den Regulations- oder Behandlungs-Sequenzen des Diphtherie-Toxins von CRM197 vorgenommen werden oder es können ähnlich geklonte Diphtherie-Toxin- oder CRM-Gene benutzt werden, um die Produktion dieser Proteine weiter zu erhöhen. So kann, z.B., die tox-Promotorregion modifiziert werden, um den Promotor von der Eisen-Regulierung zu befreien.

[0021] In einer anderen Ausführungsform kann das Plasmidvektor-System unter Einführung von Restriktionsenzym-Klonierungsstellen in das Aminoende des CRM197-Gens oder ähnlich geklonten Diphtherie-Toxin- oder CRM-Gens modifiziert werden. Das Klonen der DNA-Sequenzen von anderen Proteinen in die Klonie-

rungsstellen würde es dann gestatten, dass der Plasmid-Vektor andere rekombinante Proteine oder Antigene als Fusionen mit Aminoende mit dem CRM197-Protein oder ähnlich geklontem Diphtherie-Protein oder CRM-Protein koexprimiert und all dies unter Direktion des tox-Promotors und der Signal-Sequenz. Zusätzlich oder alternativ können Klonierungsstellen in den Carboxy-Endabschnitt von CRM197, Diphtherie-Toxin oder ähnlich geklontem CRM eingeführt werden, um andere Proteine als Fusionen mit Carboxyende zu exprimieren. Aufgrund der Anwesenheit der regulierenden CRM197-Signalsequenz würde das resultierende Fusionsprotein in das Kulturmedium abgegeben werden. Alternativ braucht nur die regulierende Signalsequenz von CRM197 als ein Mittel zum Expressieren anderer ins Kulturmedium ausgeschiedener Formen von Proteinen benutzt zu werden.

[0022] Geeignete Proteine und Antigene, die bei der Produktion des Plasmids nach der Erfindung brauchbar sind, schließen teilchenförmige Antigene, wie solche von Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen, und Mikrokomponenten von Zellen und lösliche Antigene, wie Proteine, Peptide, Hormone und Glycoproteine, ein. Antigene von speziellem Interesse sind virale, Pilz-, Parasiten- oder bakterielle Antigene, Allergene oder zur Autoimmunität in Beziehung stehende Antigene oder mit Tumoren in Verbindung stehende Antigene. Die Antigene können aus natürlichen Quellen erhalten werden oder sie können durch rekombinante DNA-Technologie oder andere künstliche Mittel produziert werden.

[0023] Zu den interessierenden bakteriellen Antigenen gehören solche, die mit menschlichen bakteriellen Pathogenen assoziiert sind, einschließlich, z.B., typisierbare und nicht typisierbare *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Branhamella catarrhalis*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium tetani*. Einige spezifische bakterielle Antigene schließen bakterielle Oberflächen- und äußere Membran-Proteine (z.B. von *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* oder *Branhamella catarrhalis*) und bakterielle Oberflächen-Proteine (z.B. das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* oder das 37 Kilodalton-Oberflächen-Protein von *Streptococcus pneumoniae*) ein.

[0024] Virale Antigene von pathogenen Viren schließen menschliches Immundefizienz-Virus (Typen I und II), menschliches T-Zellen-Leukämievirus (Typen I, II und III), RS-Virus, Hepatitis A-, Hepatitis B-, Hepatitis C-, nicht-A- und nicht-B-Hepatitisvirus, Herpes simplex-Virus (Typen I und II), Cytomegalovirus, Influenza-Virus, Parainfluenza-Virus, Poliovirus, Rotavirus, Coronavirus, Rubella-Virus, Masern-Virus, Varicella, Epstein Barr-Virus, Adenovirus, Papilloma-Virus und Gelbfieber-Virus ein, doch sind sie darauf nicht beschränkt.

[0025] Mehrere spezifische virale Antigene dieser pathogenen Viren schließen das F-Protein (speziell Antigene, die das F-Peptid 283-315 enthalten, das in W089/02935 mit dem Titel "Respiratory Syncytial Virus (RS-Virus): Vaccines and Diagnostic Assays" von P. Paradiso et al. beschrieben ist), und die N- und G-Proteine des RS-Virus (RSV), VP4- (früher als VP3 bekannt), VP6- und VP7-Polypeptide von Rotavirus, Hüllen-Glycoproteine des menschlichen Immundefizienz-Virus und die Oberflächen- und Voroberflächen-Antigene von Hepatitis und Herpes-Glycoproteine B und D ein.

[0026] Pilz-Antigene können solche sein, die von Pilzen abgeleitet sind, einschließlich *Candida* spp. (speziell *albicans*), *Cryptococcus* spp. (speziell *neoformans*), *Blastomyces* spp. (z.B. *dermatitidis*), *Histoplasma* spp. (speziell *capsulatum*), *Coccidioides* spp. (speziell *immitis*), *Paracoccidioides* spp. (speziell *brasiliensis*) und *Aspergillus* spp., doch sind sie darauf nicht beschränkt. Beispiele von Parasiten-Antigenen schließen *Plasmodium* spp., *Eimeria* spp., *Schistosoma* spp., *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Cryptosporidia* spp., *Toxoplasma* spp. und *Pneumocystis* spp. ein, doch sind sie darauf nicht beschränkt.

[0027] Die Erfindung wird weiter durch die folgenden nicht einschränkenden Beispiele veranschaulicht:

Beispiel 1: Konstrukte

Bakterienstämme

[0028] *E. coli* DH5 α (BRL, Gaithersburg, MD) wird für alle Klonierungs-Prozeduren benutzt. Stämme von nicht toxigenem, nicht lysogenem *C. diphtheriae*-C7(-)^{tox-}, nicht toxigenem Einzel-Lysogen-*C. diphtheriae*-C7(β 197)^{tox-} ATCC Nr. 5328 werden sowohl als Plasmid-Wirte als auch als Kontrollen bei CRM197-Protein-Expressions-Untersuchungen benutzt. Das nicht toxigene Doppel-Lysogen *C. diphtheriae*-C7(β 197)^{tox-} ATCC Nr. 39255 wird als eine Kontrolle in CRM197-Protein-Expressions-Experimenten benutzt.

Medien und Bedingungen für die Züchtung

[0029] *E. coli* DH5 α wird routinemäßig auf superoptimalem Brühe(SOB)-Agarmedium und in SOB-Flüssigkeit bei 37°C gezüchtet (J. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). *C. diphtheriae*-C7 Stämme werden routinemäßig auf SOC-Agar (J. Sambrook et al., a.a.O.) und -Flüssigkeit gezüchtet. Osmotisches ET-Agarmedium (G.R. Best und M.L. Britz, 1986, Appl. Microbiol. Biotech., 23:288-293) wird beim Plattieren elektroporierter Zellen benutzt. Enteisenertes CY-Medium (R. Rappuoli et al., 1983, J. Bacteriol., 153:1202) wird für Experimente bei der Expression von CRM197 benutzt. Chloramphenicol wird in einer Menge von 34 $\mu\text{g/ml}$ für *E. coli* DH5 α und von 2 $\mu\text{g/ml}$ für *C. diphtheriae* C7-Stämme hinzugegeben, die Plasmid pPX 3511 enthalten.

Klonen des CRM197-Gens

[0030] Das CRM197-Gen wird durch PCR(Polymerase-Kettenreaktion)-Amplifikation der Gensequenz von *C. diphtheriae* C7(β 197)^{tox-}-Einzellsogen-DNA unter Einsatz von Oligonucleotid-Primern auf der Grundlage der publizierten Sequenz von Diphtherie-Toxin (L. Greenfield et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6853-6857) geklont. Die Primer sind derart gebildet, dass ein Primer eine Sall/HincII-Restriktionsstelle zu Beginn des funktionalen Gens und der andere eine XbaI-Stelle nach dem Gen-Stopcodon des strukturellen Gens erzeugen würde. Diese und ähnliche Primer werden zum Amplifizieren und Klonen des CRM197-Gens, des Diphtherietoxin-Gens oder irgendeines CRM-Gens ähnlich dem Diphtherietoxin-Gen benutzt, das durch die Corynebophage β codiert wird.

[0031] Die CRM197-PCR-Produkte werden mit HincII und XbaI verdaut und in von SmaI/XbaI verdautem pNG2-22, einem Chloramphenicol-Resistenzvektor mit breitem Wirtsbereich mit der Fähigkeit, sowohl in *Escherichia coli* als auch *Corynebacterium* spp. zu replizieren, ligiert. Die Ligation wird benutzt, um *E. coli* DH5 α zu transformieren und rekombinante Kolonien werden durch Restriktionsanalyse auf die Anwesenheit des CRM197-Gens gescreent. Ein Isolat, pPX 3511, wird unter Benutzung überlappender Primer sequenziert, um irgendwelche Änderungen am CRM197-Gen zu überprüfen. Die Oligonucleotid-Primer, die in PCR und dem Sequenzieren eingesetzt werden, werden auf einer DNA-Synthetisier-Vorrichtung 380B von Applied Biosystems synthetisiert. PCR wird mit einem thermischen DNA-Zyklisierer Cetus von Perkin-Elmer ausgeführt. Das Sequenzieren erfolgt unter Benutzung einer Sequenzier-Vorrichtung 373A von Applied Biosystems. Das resultierende Plasmid (pPX 3511) wird durch Elektroporation in den nicht toxischen, nicht lysogenen Stamm *C. diphtheriae* C7(-)^{tox-} und den nicht toxischen Stamm *C. diphtheriae* C7(β 197)^{tox-}, ATCC Nr. 5328, transferiert.

Elektroporation von *C. diphtheriae* C7

[0032] *C. diphtheriae* C7 wird mit Plasmid pPX 3511-DNA durch Elektroporation unter Benutzung eines Protokolls transformiert, das für die Transformation von *Corynebacterium glutamicum* und *Brevibacterium lactofermentum* entwickelt wurde (J.A. Hayes und M.L. Britz, 1989, FEMS Microbiol. Lett., 61:329-334), mit der Ausnahme, dass das mit 0,2% Tween-80 ergänzte SOC-Medium benutzt wurde. BTX-Transfaktor 100 mit Power Plus und Optimizer Graphic Pulse Analyzer und Küvetten mit 1 mm Spalt wurden für die Elektroporation benutzt. Die Anwesenheit des Plasmids pPX 3511 in den transformierten *C. diphtheriae* C7-Stämmen wird durch Plasmid-Gewinnungs- und Restriktions-Analyse geprüft.

Beispiel 2: Expression

Quantitative CRM197-Expressions-Untersuchungen

[0033] Der Vergleich der CRM197-Produktion wurde durch Züchten von Stämmen von *C. diphtheriae* C7 unter ähnlichen Bedingungen und Vergleichen der Menge von CRM197 im Überstehenden der Kultur vorgenommen. Bei einem quantitativen Vergleich der Stämme wurden 4 ml Übernacht-Kulturen zu einem OD₆₀₀=0,1 in enteisenetem CY-Medium (30 ml Endvolumen in 250 ml Erlenmeyerkolben) verdünnt und unter Schütteln für 20 Stunden bei 37°C gezüchtet. pPX 3511 enthaltende Stämme wurden sowohl mit als auch ohne antibiotische Selektion (2 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) gezüchtet. Nach der Inkubation wurden die Kulturen dann zentrifugiert, um die Zellen zu entfernen, und 20 μl des Überstehenden der Kulturen wurden auf ein 12% SDS-PAGE-Gel gegeben. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und ein quantitativer Vergleich wurde unter Benutzung eines Durchlässigkeits/Reflexions-Abtast-Dichtemessgerät von Bio-Rad Modell 1650 mit einer Analyse-Packung GS 370 von Hoefer Scientific ausgeführt. Ein Vergleich der antigenen Eigenschaften des rekombinanten CRM197-Proteins und des lysogenen β 197^{tox-}-CRM197-Proteins wurde durch Immunoblotten des Gels und unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern auf CRM197 vorgenommen. Durch pPX 3511 erzeugtes CRM197

ist antigenmäßig identisch dem durch lysogene Stämme erzeugten CRM197.

Stabilitäts-Experimente an Plasmid pPX 3511

[0034] Die Stabilität von Plasmid pPX 3511 wurde unter Beibehaltung der Chloramphenicol-Resistenz, als einem Indikator der Plasmid-Beibehaltung, ohne antibiotische Selektion untersucht. Kulturen von *C. diphtheriae* C7(β 197)^{tox-}-pPX 3511 wurden in SOC-Brühe, die mit 0,1% Tween-80 ergänzt war, um das Zellklumpen zu verhindern, für 18 Stunden (14 – 17 Generationen) bei 37°C gezüchtet. Die Kulturen wurden dann zum Zählen der Kolonien auf SOC-Agar plattiert und auf 1/10 für die nächste Generation verdünnt. Die SOC-Agarplatten wurden wiederholt aus SOC-Agar mit 2 µg/ml Chloramphenicol plattiert und der Prozentsatz der Kolonien, der Chloramphenicol-Resistenz beibehält, errechnet. Dieses Verfahren wurde bis zu 60 Generationen wiederholt.

Beispiel 3: Biologische Resultate

[0035] Der quantitative Vergleich der CRM197-Produktion durch die verschiedenen *C. diphtheriae* C7-Stämme durch Dichtemessung der mit Coomassie gefärbten Gele (**Fig. 2**) zeigt, dass die Stämme mit pPX 3511 etwa zweimal soviel CRM197 erzeugen wie das Einzellysogen und ebensoviel wie das Doppellysogen (Tabelle 1). Die Stabilität von Plasmid pPX 3511 über 60 Generationen ist in **Fig. 3** gezeigt.

TABELLE 1

[0036] Produktion von CRM197 durch *C. diphtheriae* C7-Stämme, ausgedrückt durch das Mehrfache der des Einzellysogens (β 197)^{tox-}

	Mehrfaches des Einzellysogens (β 197) ^{tox-}
Doppellysogen (β 197) ^{tox-}	2,2
pPX 3511(-) ^{tox-} , kein Cm2	2,8
pPX 3511(-) ^{tox-} , Cm2	1,9
pPX 3511 (β 197) ^{tox-} , kein Cm2	2,0
pPX 3511 (β 197) ^{tox-} , Cm2	2,4

Biologische Hinterlegung

[0037] Plasmid pPX 3511 wurde unter den Bedingungen des Budapester Vertrages bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 am 12. Februar 1993 hinterlegt und erhielt die ATCC-Eingangsnummer 75415. Alle Beschränkungen über die Erhältlichkeit des hinterlegten Materials durch die Öffentlichkeit werden nach Erteilung eines Patentes auf diese Anmeldung unwiderruflich zurückgezogen. Die Hinterlegung erfolgt in einer öffentlichen Hinterlegungsstelle für eine Dauer von mindestens 30 Jahren vom Zeitpunkt der Hinterlegung oder für die Lebensdauer des Patentes oder für die Dauer von 5 Jahren nach dem letzten Antrag auf Lieferung einer Probe des biologischen Materials für den längeren Zeitraum statt. Die Hinterlegung wird ersetzt, falls sie nicht lebensfähig oder nicht replizierbar sein sollte.

[0038] Der Fachmann kennt viel Äquivalente der hier spezifisch beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung oder ist in der Lage solche zu finden, ohne mehr als Routine-Experimente auszuführen. Solche Äquivalente sollen vom Umfang der folgenden Ansprüche mit umfasst werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzeugen von Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein, das kreuzreaktiv mit Diphtherie-Toxin ist, wobei das Verfahren umfasst: Transformieren eines Mikroorganismus der Art *Corynebacterium diphtheria* Stamm C7 mit einem Plasmid, das a) ein für Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein codierendes Gen, b) einen *Corynebacterium*-Replikationsursprung und c) einen selektierbaren Marker enthält, und Expressieren des Toxins oder Proteins unter für die Expression des Gens durch den Mikroorganismus genügenden Bedingungen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Verfahren der Transformation durch Elektroporation ausgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das CRM-Gen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CRM197, CRM45, CRM30, CRM228 und CRM176.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Replikationsursprung vom Corynebacterium-Plasmid pNG2 stammt.

5. Plasmid zum Exprimieren von Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein, das mit Diphtherie-Toxin in einem Wirt kreuzreaktiv ist, umfassend:

- a) ein für Diphtherie-Toxin oder CRM-Protein codierendes Gen,
- b) einen Corynebacterium-Replikationsursprung und
- c) einen selektierbaren Marker, der gegebenenfalls an eine Mehrfach-Klonierungsstelle gebunden ist.

6. Plasmid nach Anspruch 5, worin das für das Protein codierende Gen betriebsmäßig an eine Nucleotid-Sequenz gebunden ist, die für ein oder mehrere Proteine, Peptide oder Epitope davon codiert.

7. Plasmid pPX 3511, ATTC-Eingangsnummer 75415.

8. Mikroorganismus der Art Corynebacterium diphtheria Stamm C7, der mit dem Plasmid von Anspruch 5 transformiert ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

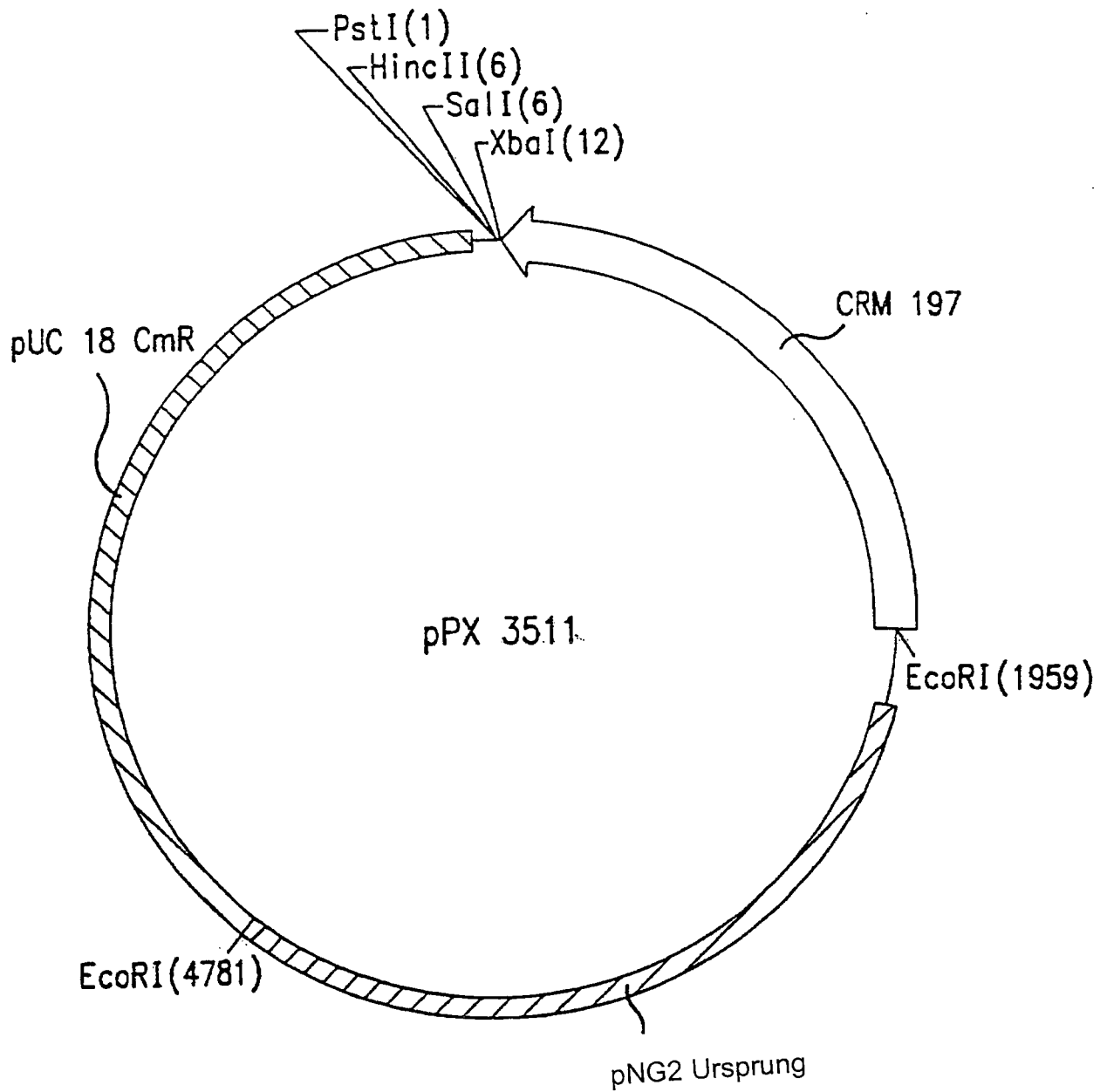


FIG. 1

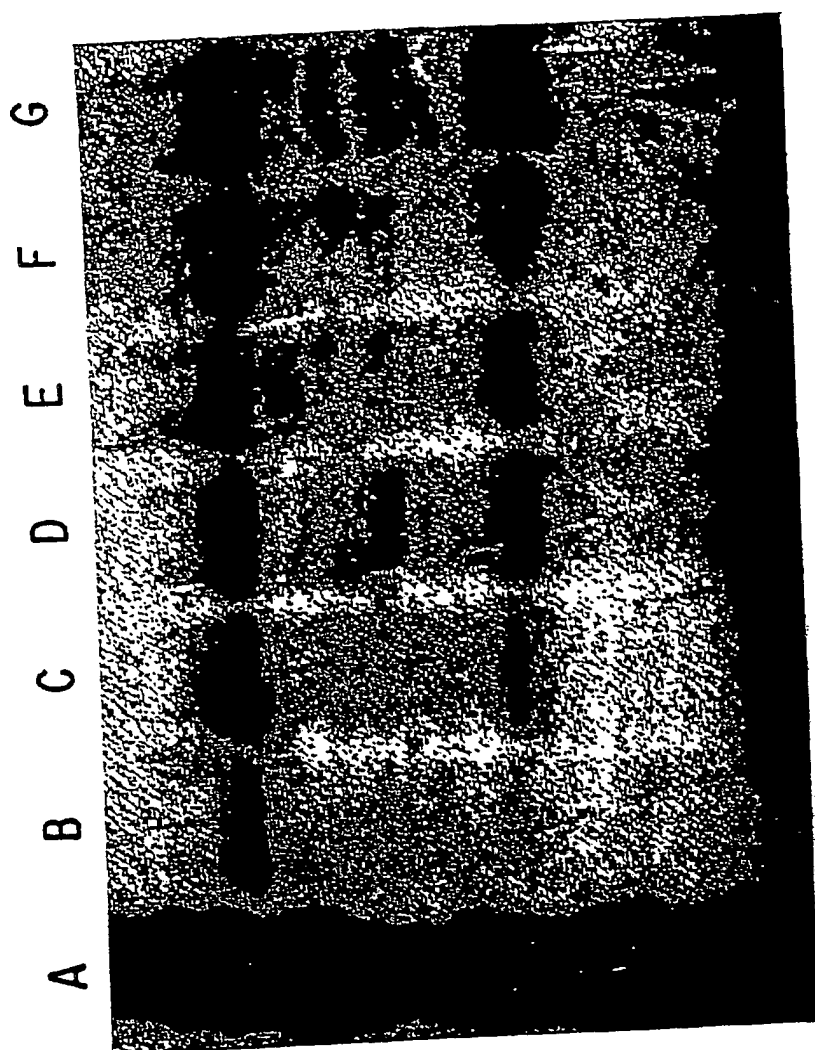


FIG. 2

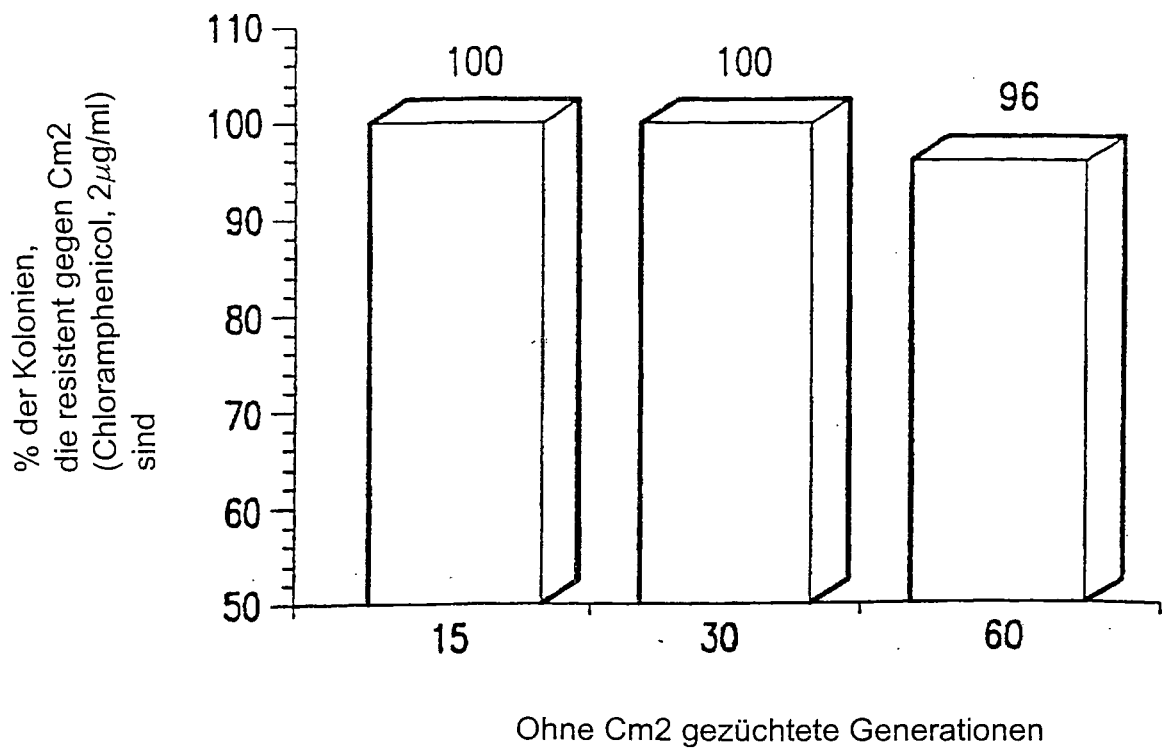


FIG.3