



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101990900138373
Data Deposito	07/09/1990
Data Pubblicazione	07/03/1992

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

METODO PER L'IDENTIFICAZIONE E/O L'ISOLAMENTO DI GENI CHE CODIFICANO PER
RECETTORI DI MEMBRANA.

Descrizione dell'invenzione industriale a nome:

Enichem S.p.A., di nazionalità italiana, con sede in
Milano, Via Medici del Vascello, 26.

***** 7 SET. 1990

2140 2A/90

La presente invenzione si riferisce ad un metodo migliorato per l'identificazione e/o l'isolamento di cloni ricombinanti che codificano i geni dei recettori di membrana, metodo che sfrutta l'espressione funzionale di recettori in E. Coli e la loro interazione con ligandi specifici ed è basato sostanzialmente sulla replica su filtro delle colonie batteriche e sulla loro marcatura con ligandi radioattivi; l'invenzione si riferisce particolarmente ad un metodo per l'individuazione e/o l'isolamento di cloni che codificano per recettori β -adrenergici umani.

Diverse tecniche sono note per il clonaggio di geni, ma nel contempo sono parimenti note le difficoltà che si incontrano nei tentativi di assegnare una funzione specifica ai geni clonati. D'altra parte conoscere i geni che compongono il DNA umano è il passaggio fondamentale per poter sperare di diagnosticare tempestivamente e quindi curare un grandissimo numero di malattie, oggi considerate ancora incurabili.

I geni umani sono assai numerosi (si pensa siano nell'intorno di 100.000) ed ognuno di essi ha un compito particolare: da uno può dipendere il colore degli occhi, da un altro il gruppo sanguigno; da loro dipendono anche le malattie ereditarie, e così l'insorgere e la trasmissione di certe forme tumorali.

Identificare i singoli geni interessa pertanto il biologo, il medico e quanti altri devono trarre da una tale conoscenza, come detto, spunti per diagnosi e terapie curative con l'approntamento dei relativi kits e farmaci.

E' noto che la sequenza nucleotidica può portare alla predizione del prodotto proteico di un gene clonato, e può suggerire la classe alla quale la proteina potrebbe appartenere, ma in generale il problema della identificazione della funzione di un gene clonato rimane insoluto e finora, malgrado studi approfonditi in ogni parte del mondo, i geni umani identificati ed isolati sono stati poche decine.

La Richiedente ha ora trovato un metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori di membrana di qualsiasi origine biologica che si presenta molto più semplice

e rapido in confronto a metodi analoghi che si basano sull'espressione di recettori in cellule eucariotiche e che si presenta di estrema utilità qualora venga finalizzato al clonaggio degli stessi recettori di membrana.

I metodi convenzionali per il clonaggio di recettori per neurotrasmettitori richiedono la purificazione del recettore, la generazione di sequenza amminoacidiche parziali e l'uso di oligonucleotidi sintetici sonda per ottenere cloni di cDNA o genomici: tuttavia, nel caso della maggiore parte dei recettori per neurotrasmettitori, la loro rarità li rende estremamente difficili da purificare, e solo in rare occasioni il clonaggio di recettori mediante espressione ha avuto successo [Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M., Nakamishi, S. (1987) *Nature*, 329, 836-838; - Julius, D., MacDermott, A.B., Axel, R., Jessel, T.M. (1988) *Science*, 241, 558-564; - Yokota, Y., Sasai, Y., Tonaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shifamoto, R., Kakizuka, A., Obkuba, H., Nakanishi, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 17649-17652; - Shigemoto, R., Yokota, Y., Nakanishi, S. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 623-628; - Tanaka, K., Masu, M., Nakanishi, S. (1990) *Neuron*, 4, 843-854].

Molecole recettoriali funzionali vengono altresì ottenute mediante microneiezione in oociti di *Xenopus* di mRNA sintetizzato in vitro, e non mancano alcune indicazioni marginali sull'espressione funzionale in *E. coli* di alcuni geni per recettori umani [-Marullo, S., Delavier- Klutehko, C., Eshalat, Y., Strosberg, A. D., Eurarine. L. (1988) Proc. natl. Acad. USA 85, 7751-2555], nessuna di queste informazioni permettendo tuttavia un approfondimento pratico di una tecnica per l'individuazione e l'isolamento di geni con attività specifica.

Il metodo secondo la presente invenzione consente di superare tutti i limiti che fino ad ora devono essere ascritti alle tecnologie dell'arte nota e, sfruttando la summenzionata possibilità di espressione funzionale dei recettori in *E. coli* e la loro interazione con ligandi specifici, permette l'identificazione dei cloni ricombinanti che codificano per i geni di detti recettori, tale metodo consistendo sostanzialmente nella replica su filtro delle colonie batteriche e nella loro marcatura con ligandi radioattivi.

In particolare, il metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori di membrana umani secondo la presente invenzione

comprende le seguenti operazioni:

- preparazione di un adatto vettore modificato mediante inserimento in un vettore noto delle regioni codificanti per il recettore di interesse;
- trasformazione con tale vettore modificato di cellule batteriche di E. coli;
- assorbimento delle colonie batteriche da quelle derivate su filtri di nitrocellulosa opportunamente trattati;
- incubazione di dette colonie sul filtro, con un legante marcato;
- eventuale isolamento del complesso clone-ligando e risoluzione di questo stesso complesso.

Il metodo verrà ora dettagliato per l'individuazione dei cloni che codificano per recettori adrenergici umani: sarà facile, per l'esperto del ramo, scegliere le condizioni ottimali per l'individuazione (e l'isolamento) di cloni che codificano per altri recettori, qualunque sia la fonte biologica, anche vegetale o batterici.

Individuazione di cloni che codificano per recettori adrenergici umani

Sono stati utilizzati batteri che esprimono

recettori λ β -adrenergici umani. Le regioni codificanti il recettore $\lambda\beta 1$ - e $\lambda\beta 2$ -adrenergico umano sono state inserite nel sito EcoRI del vettore di espressione λ gt11 all'estremità 3' del gene della β -galattosidasi; i vettori modificati così ottenuti sono stati designati $\lambda\beta 1$ e $\lambda\beta 2$, ed utilizzati insieme a λ gt11 per infettare cellule di E. coli ceppo Y1089 allo scopo di ottenere tre lisogeni: [$\lambda\beta 1$], [$\lambda\beta 2$] e [λ gt11]. Un egual numero di cellule [$\lambda\beta 1$] e [λ gt11] è stato seminato su piastre di LB e lasciato crescere per 20 ore. Un'altra miscela contenente un numero uguale di cellule [$\lambda\beta 2$] e [λ gt11] è stata trattata nello stesso modo.

Le colonie batteriche sono state adsorbite su filtri di nitrocellulosa impregnati con isopropil- β -D-tiogalattoside (IPTG) per indurre l'espressione delle proteine di fusione corrispondenti e separati in due metà. Campioni di proteine di membrana da cervello di maiale sono stati depositati su ciascuna metà del filtro, come controllo interno. Le due porzioni di ciascun filtro sono state successivamente trattate per analizzare il legame di ICYP. La fig. 2A (metà sinistra di ciascun filtro) mostra che solo le

colonie batteriche che esprimono recettori $\beta 1$ - o $\beta 2$ -adrenergici sono in grado di legare ICYP. L'aggiunta di pindololo non marcato radioattivamente compete il legame, confermando che il legame stesso è saturabile e specifico (fig. 2A, metà destra di ciascun filtro).

La sensibilità del saggio è tale che, quando cellule [$\beta 2$] e [$\beta 1$] sono mescolate nel rapporto 1:1000, una singola colonia positiva può essere identificata tra centinaia di altre colonie sulla stessa piastra. Il numero medio di recettori attivi per cellula batterica risulta uguale a 23 per [$\beta 2$] e 11 per [$\beta 1$] (vedi tabella 1). Questi valori sono stati calcolati da curve di saturazione ottenute da sospensioni batteriche.

La fig. 2B mostra i risultati di un analogo saggio mediante replica su filtro da colonie batteriche che esprimono il recettore $\beta 2$ -adrenergico umano inserito nel vettore plasmidico pUEX1. Il plasmide pUEX- $\beta 2$ esprime una proteina di fusione β -galattosidasi- $\beta 2$ -adrenocettore producendo in media 13 recettori attivi per cellula (vedi tabella 1).

Per caratterizzare ulteriormente la specificità del saggio mediante replica su filtro 3 agonisti β -adrenergici sono stati sperimentati su cellule

[β 2] in saggi di competizione del legame. Il legame del ICYP alle colonie batteriche in presenza dei 3 agonisti mostra un ordine di potenza di competizione caratteristico del recettore β 2-adrenergico, ovvero isoproterenolo > epinefrina > norepinefrina (vedi fig. 3).

Come accennato in precedenza, la nuova metodologia può essere utilizzata per identificare ed isolare i geni che codificano recettori di membrana di qualsiasi natura. La tecnica descritta è basata sul legame di ligandi specifici a cellule batteriche che esprimono i recettori. Questo metodo è considerevolmente più semplice e rapido rispetto a metodi simili basati sull'espressione dei geni per recettori in cellule eucariote. [-Machida, C.A., Bunziw, J., Hanneman, E., Grandy, D., Cinelli, D. (1989) DNA 8, 447-455]. Sebbene l'efficacia di questo metodo sia stata testata soltanto per recettori β 1- e β 2- adrenergici umani, ripetiamo che lo stesso può essere impiegato in generale per l'analisi di genoteche di espressione da cDNA.

Il protocollo sperimentale descritto necessita l'espressione funzioanle del recettore in esame in E. coli e la disponibilità di ligandi specifici.

Diversi esempi di espresisione funzionale in batteri,

oltre a quella di recettori β -adrenergici umani, è stata riportata in letteratura.

L'espressione funzionale in *E. coli* di un recettore umano, come nel caso dei recettori adrenergici, suggerisce che l'ambiente di membrana necessario per la corretta interazione con ligandi specifici è mantenuto nei batteri e che recettori integrali di membrana sia batterici che eucariotici condividono una simile organizzazione trans-membrana. Per definire la topologia di una proteina di membrana politopica è necessario determinare quali domini proteici sono situati ai due lati della membrana stessa. In *E. coli* fusioni geniche possono essere utilizzate per ottenere informazioni topologiche. Per esempio si possono utilizzare fusioni tra la β -galattosidasi e la fosfatasi alcalina per studiare la topologia del recettore β_2 -adrenergico umano. La possibilità di studi topologici rappresenta uno dei vantaggi di un sistema di espressione batterico per proteine recettoriali in confronto a sistemi che utilizzano cellule di mammifero in coltura.

L'analisi dei recettori ricombianti richiede la disponibilità di ligandi con costanti di affinità relativamente alte, poichè soltanto questi saranno in grado di formare complessi a vita media

sufficientemente lunga da resistere ai vari lavaggi necessari. Recentemente si è resa disponibile un'ampia varietà di ligandi radioiodinati. La maggior parte delle K_d dei vari ligandi per recettori accoppiati a G-proteine hanno valori compresi dell'ordine di $10^{-9}M$, mentre il complesso recettore $\beta 2$ -adrenergico umano-ICYP ha una K_d di $10pM$. E' possibile ipotizzare l'uso di procedure come l'irraggiamento con UV per stabilizzare covalentemente complessi tra recettori e ligandi con minore affinità.

La progettazione di specifici vettori può inoltre contribuire ad accrescere il numero di molecole di recettore attive espresse in ciascuna cellula batterica.

ESEMPI

Costrutti derivati da geni dei recettori β -adrenergici.

Due frammenti BstEII-Apai e NcoI-PvuII (di dimensioni 1,4 Kb e 1,6 Kb, rispettivamente) dai cDNA dei recettori $\beta 1$ - e $\beta 2$ -adrenergico umano sono stati modificati con adattori per EcoRI e ligati in registro al sito unico EcoRI del gene lacZ del fago lgt11. Cellule Y1089 di E. coli sono state infettate con i fagi ricombinanti e le colonie contenenti fagi

lisogenici sono state selezionate mediante crescita a temperature appropriate. Il frammento EcoRI di 1,66 Kb del gene per il recettore β 2-adrenergico umano è stato anche subclonato in registro al sito unico EcoRI del plasmide pUEX1, ed il costrutto utilizzato per la trasformazione di cellule di E. coli MC1061. Il corretto registro di traduzione delle proteine di fusione derivate è stato verificato mediante sequenziamento del DNA corrispondente.

I saggi mediante replica su filtro delle colonie batteriche esprimenti β -adrenocettori umani sono stati effettuati come segue:

Le cellule batteriche sono state seminate su piastre di LB-agar del diametro di 10 cm. e cresciute per 12 ore a 30°C. Filtri di nitrocellulosa rotondi (diam. 8,5 cm.), precedentemente imbevuti in 10 mM IPTG nel caso dell'espressione di lisogeni [β gt11], [β 1] ed [β 2], sono stati poi distesi sopra le colonie batteriche; l'espressione delle proteine è stata indotta per 2 ore, a 30°C per le colonie lisogeniche, e a 42°C per le colonie trasformate con pUEX1 e pUEX β 2, prima della rimozione dei filtri. Le manipolazioni successive sono state eseguite a

temperatura ambiente con costante agitazione. Le repliche su filtro delle colonie batteriche sono state prima incubate per 60 minuti in 10 ml di tampone di legame (90 mM NaCl, mMTris-HCl pH 7,5) contenente 20 mg/ml albumina serica bovina, e successivamente trasferite per 90 minuti in 10 ml di tampone di legame contenente 20 mg/ml albumina serica bovina e 20 pM ICYP (2000 Ci/mmqole, Amersham, UK).

I filtri sono stati poi lavati 4 volte per 15 minuti in 10 ml di tampone di legame contenente 0,2% Tween 20, asciugati a temperatura ambiente per 5 minuti ed esposti per 6-16 ore a -70°C su lastra autoradiografica con schermi intensificanti.

Gli studi di competizione con ligandi adrenergici non marcati radioattivamente sono stati effettuati aggiungendo varie concentrazioni dei competitori durante l'incubazione con ICYP.

Preparazione ed uso delle membrane di cervello e polmone di maiale

Le membrane di cervello e polmone di maiale sono state preparate secondo il metodo di Benovic et al. [(1984) Biochemistry, 23, 4510-4518]. Le membrane sono state risospese ad una concentrazione proteica di 5-10 mg/ml in un tampone contenente 50 mM

Tris-HCl, pH 7,4,5 mM EDTA, 100 μ M fenilmetilsulfonilfluoruro, 2 μ M leupeptina e 50 μ g/ml inibitore della tripsina da soia, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

L'attività di legame da recettore β 2-adrenergico è stata saggiata nelle preparazioni di membrane con ICYP [Allen et al., (1988) EMBO J. 7, 133-138].

L'attività specifica media nelle preparazioni di membrane di cervello e polmone è stata, rispettivamente, di 0,07 pmole/mg e 0,16 pmole/mg di proteina. La concentrazione proteica è stata determinata secondo il microdosaggio colorimetrico di Bradford, utilizzando come riferimento gammaglobulina bovina [Bradford, H.B., (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254].

Le membrane di maiale sono state usate come controllo positivo nel saggio delle colonie batteriche replicate su filtro. Le membrane (0,1-2 μ g di proteina totale in 2-5 μ l) sono state depositate sui filtri di nitrocellulosa una volta rimossi dalle piastre di agar contenenti le colonie batteriche; i filtri sono stati poi asciugati rapidamente a temperatura ambiente ed utilizzati per il saggio di legame di ICYP come descritto precedentemente.

Le membrane da cellule di *E. coli* Y1090 di tipo selvatico sono state preparate come descritto in letteratura.

La parte sperimentale sin qui descritta trova una più precisa definizione della lettura delle figure in calce alla descrizione, figure una cui spiegazione è qui di seguito riportata.

Fig. 1 Saggio mediante replica su filtro di proteine di membrana di cervello e polmone

Diverse quantità (0,1, 0,5 e 2 µg) di proteine di membrana di cervello e polmone di maiale, e da batteri *E. coli* di tipo selvatico sono state depositate su filtri di nitrocellulosa; il saggio per il legame di ICYP è stato svolto in presenza (+) e in assenza (-) di competitore non marcato (10 µM pindololo).

Fig. 2 Saggio mediante replica su filtro di colonie di *E. coli* esprimenti recettori β -adrenergici umani

a) Un egual numero di colonie [$\lambda\beta 1$] o [$\lambda\beta 2$] e [$\lambda gt11$] è stato seminato in presenza di X-gal e IPTG su due piastre da 10 cm. di diametro e cresciuto a 30 °C per 16 ore. Le foto delle due piastre nella parte in alto permettono di distinguere le colonie blu corrispondenti a [$\lambda gt11$] dalle colonie bianche corrispondenti

a [$\lambda\beta 1$] e [$\lambda\beta 2$]. Entrambe le piastre sono state ricoperte con un filtro di nitrocellulosa imbevuto di IPTG ed incubate per ulteriore 2 ore a 30°C; i filtri sono stati rimossi e tagliati in due metà, su ciascuna delle quali sono state depositate proteine di membrana da polmone di maiale (1 μ g). Il saggio per il legame di ICYP è stato eseguito in assenza (metà sinistra di ciascun filtro) o in presenza (metà destra di ciascun filtro) di 10 μ M pindololo non marcato radioattivamente.

Dopo essere stati lavati, i filtri sono stati esposti su film autoradiografico per 14 ore.

- b) Le colonie batteriche trasformate con il vettore di tipo selvatico (filtri sul lato destro), e con il vettore contenente il cDNA per il recettore β 2-adrenergico sono state cresciute su piastre separate.

Fig. 3 Saggio mediante replica su filtro di [$\lambda\beta 2$] in presenza di diversi agonisti β -adrenergici

Il saggio per il legame di ICYP alle colonie batteriche trasferite su filtri è stato svolto in assenza (filtro in alto) o in presenza di varie concentrazioni (10^{-8} , 10^{-6} e 10^{-4} M) dei seguenti ligandi β -adrenergici non radioattivi: (-)-isopro-

terenolo, (-)-epinefrina e (-)-noropinefrina.

Tabella 1 Legame di ICYP ai batteri trasformati con differenti vettori esprimenti recettori β -adrenergici

Il numero medio di recettori attivi per cellula è stato calcolato da curve di saturazione dei legami di ICYP in sospensioni di batteri esprimenti recettori β -adrenergici. [-Marullo et al. (1988) Proc. Natl.; Acad. USA 85, 7551-7555]. I valori indicati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti. I batteri di controllo (cellule Y1089 infettate con lgt11 e cellule MC1061 trasfettate con pUEX1) non mostrano nessuna attività di legame.

Tornando infine alla descrizione del metodo, si possono sottolineare le seguenti condizioni ottimali per l'analisi funzionale dei recettori:

Sono stati utilizzati campioni di membrane di cervello e polmone di mammifero, tessuti che contengono un'alta concentrazione di recettori β -adrenergici [-Frielle, T. e al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924], per determinare le condizioni ottimali per il legame di ICYP a proteine recettoriali immobilizzate su un filtro di nitrocellulosa.

Campioni di membrane di cervello e polmone di

maiale, una volta adsorbiti su filtro, legano specificamente ICYP (fig. 1). Tre evidenze sperimentali indicano che il legame è specifico:

- 1) l'intensità del segnale autoradiografico appare proporzionale alla quantità di proteina immobilizzata su filtro;
- 2) le membrane di polmone mostrano un'attività specifica più alta rispetto alle membrane di cervello, come previsto dal momento che il polmone contiene una concentrazione di recettori β -adrenergici maggiore del cervello;
- 3) un eccesso di antagonista non marcato radioattivamente compete con il ligando radioattivo per il legame alle proteine di membrana.

La fig. 1 evidenzia inoltre come preparazioni di membrane da batteri E. coli di tipo selvatico non mostrino alcuna attività di legame per ICYP.

Diverse condizioni sperimentali sono state testate: i risultati migliori sono stati ottenuti mantenendo le proteine replicate su filtro in un tampone Tris-NaCl contenente 2% albumina serica bovina per 1 ora, e successivamente incubando per 2 ore nello stesso tampone in presenza di 20 pM ICYP.

I filtri sono stati poi lavati 4 volte in un tampone

Tris-NaCl contenente 0,2% Tween 20 (vedi Materiali e Metodi).

In assenza di albumina serica bovina durante la preincubazione e/o l'incubazione con ICYP si ha una riduzione marcata del legame specifico ai preparati di membrana. Il lavaggio in presenza di un detergente blando (0,2% Tween 20) si rende necessario per diminuire il legame aspecifico alla matrice di nitrocellulosa.

TABELLA 1

Vectors	Genes	Active Receptors per cell
gt11	$\beta 1$	11
	$\beta 2$	23
pUEX1	$\beta 2$	13

RIVENDICAZIONI

- 1) Metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori di membrana comprendente le seguenti operazioni:
 - preparazione di un vettore modificato per l'inserimento in un vettore noto delle regioni codificanti per il recettore di interesse;
 - trasformazione con tale vettore modificato di cellule di E. coli;

Tris-NaCl contenente 0,2% Tween 20 (vedi Materiali e Metodi).

In assenza di albumina serica bovina durante la preincubazione e/o l'incubazione con ICYP si ha una riduzione marcata del legame specifico ai preparati di membrana. Il lavaggio in presenza di un detergente blando (0,2% Tween 20) si rende necessario per diminuire il legame aspecifico alla matrice di nitrocellulosa.

TABELLA 1

Vectors	Genes	Active Receptors per cell
gt11	$\beta 1$	11
	$\beta 2$	23
pUEX1	$\beta 2$	13

RIVENDICAZIONI

- 1) Metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori di membrana comprendente le seguenti operazioni:
 - preparazione di un vettore modificato per l'inserimento in un vettore noto delle regioni codificanti per il recettore di interesse;
 - trasformazione con tale vettore modificato di cellule di E. coli;

- adsorbimento delle colonie batteriche da quelle derivate su filtri di nitrocellulosa preventivamente adattati;
- incubazione di tali colonie con un legante marcato;
- eventuale isolamento del complesso clone-ligando e risoluzione di questo stesso complesso.

2) Metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori adrenergici umani secondo la precedente rivendicazione caratterizzato dalla seguenti operazioni particolari.

- inserimento delle regioni codificanti il recettore β -1 e β 2-adrenergico umano nel sito EcoRI del vettore di espressione lgt11 all'estremità del gene della β -galattosidasi;
- trasformazione con il vettore modificato così ottenuto di cellule di E. coli e crescita di queste stesse cellule;
- adsorbimento delle colonie batteriche così ottenute su filtri di nitrocellulosa impregnate con isopropil- β -D-tiogalattoside;

- trattamento di tale colonie, su filtro,
con [125 I]-iodocianopindololo.

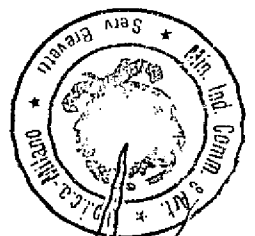
- 3) Metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori adrenergici umani secondo la precedente rivendicazione nel quale le cellule infestate con il vettore ottenuto nel primo stadio derivano dal batterio E. coli Y1089.
- 4) Metodo per l'identificazione e/o l'isolamento di geni che codificano per recettori adrenergici umani secondo le rivendicazioni 2 e 3 nel quale tuttavia il vettore sottoposto a modifica nella preliminare operazione di inserimento delle regioni codificanti il recettore β 2-adrenergico è il vettore plasmidico pUEX1.

Milano, - 7 SET. 1990

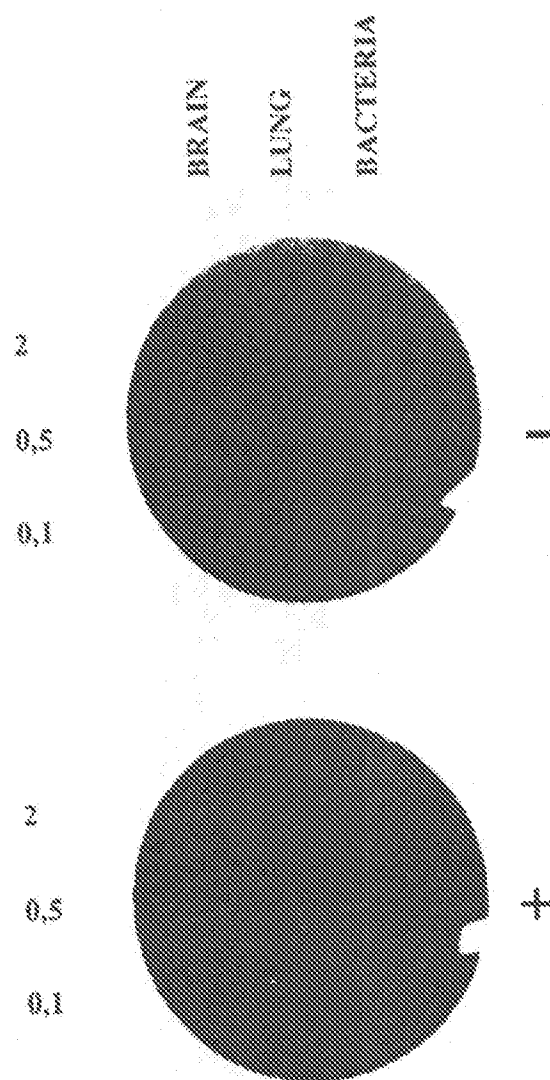
MG/mo

Enichem S.p.A.

Peter Schwarz



FIGORA 1



2140 2A/CO

Enichem S.p.A.
PETER SCHWARZ

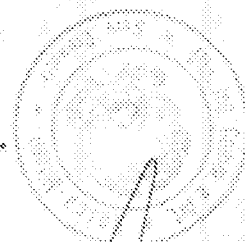
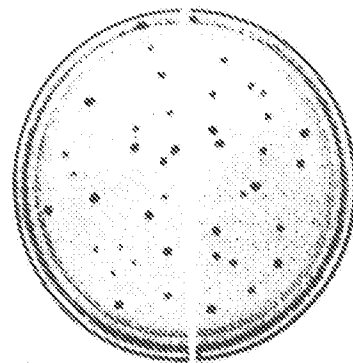
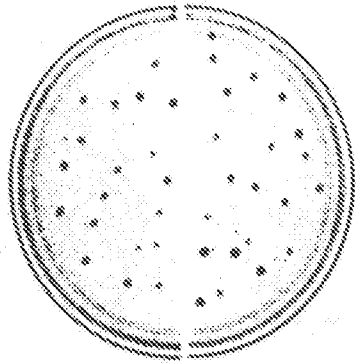


FIGURA 2

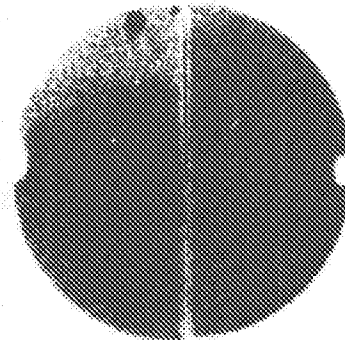
A

$\beta 1$

$\beta 2$



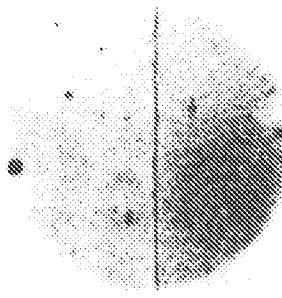
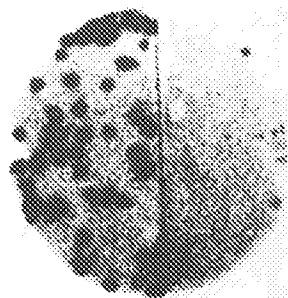
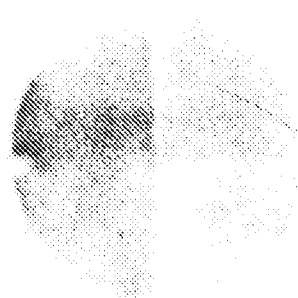
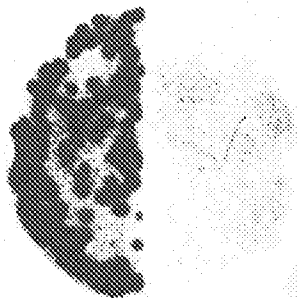
2140 2A/90



B

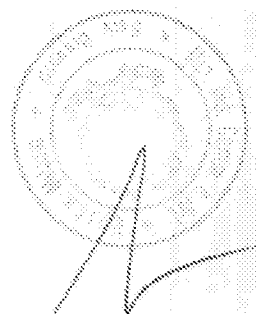
$\lambda \beta 2$

$\lambda gt11$



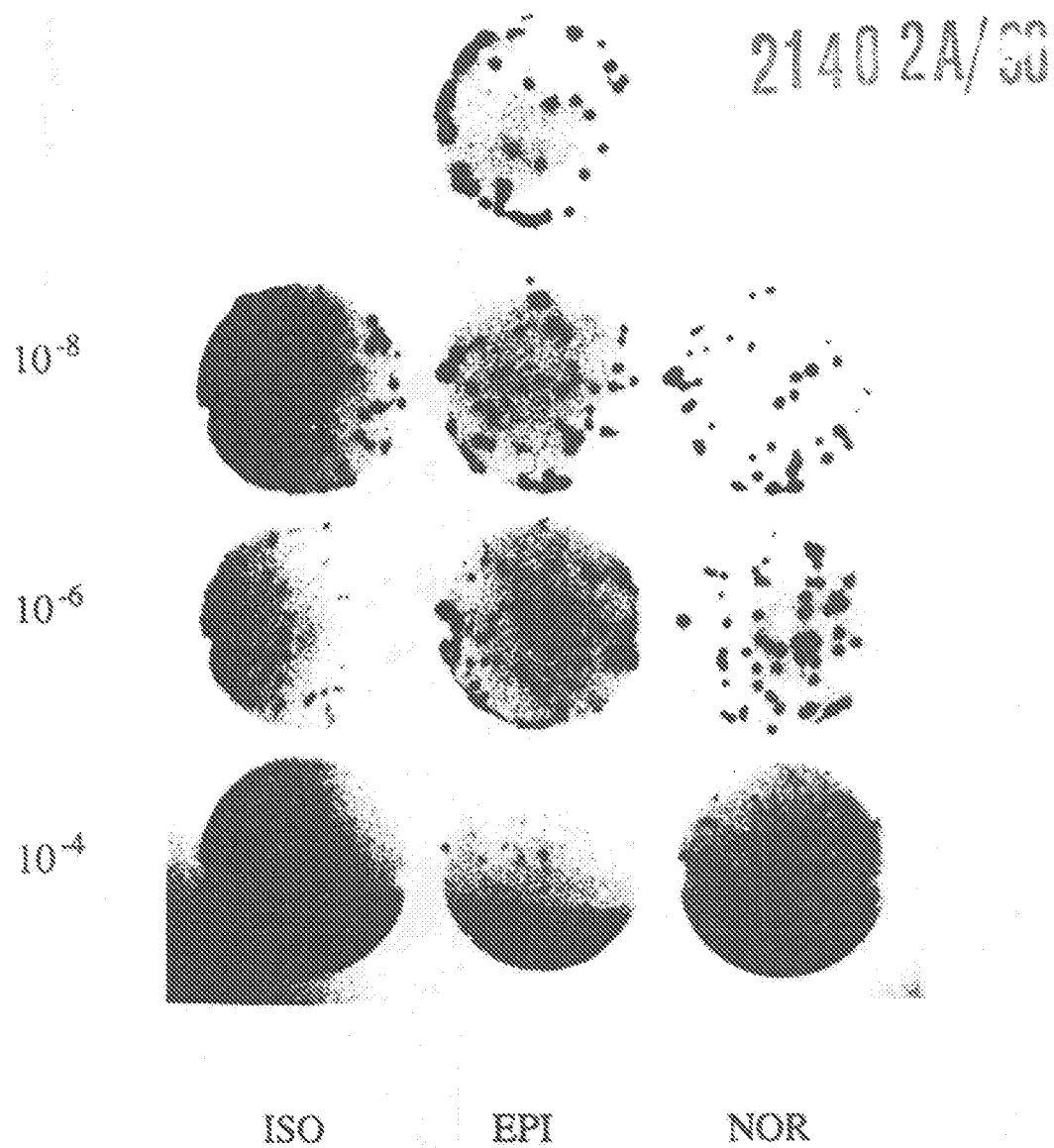
pUEX $\beta 2$

pUEX1



Enichem S.p.A.
PETER SCHWARZ

FIGURA 3



Epichem S.p.A.
FOTER SCHWARZ

