



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **9020024**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Gezuiverde ciliaire neurotrofe factor.**
- ⑤1 Int.Cl.⁵: C07K 15/06, A61K 37/02, C12N 15/12.
- ⑦1 Aanvrager: Synergen, Inc. te Boulder, Colorado, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.J.G. Lips c.s.
Haagsch Octrooibureau
Breitnerlaan 146
2596 HG 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 9020024.
- ⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/US90/00022.
- ②2 Ingediend 5 januari 1990.
- ③2 Voorrang ingeroepen vanaf 5 januari 1989, 8 september 1989, 28 december 1989.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 293851, 404533, 458564.
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 oktober 1991.
- ⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke Internationale aanvraag: 12 juli 1990.
- ⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke Internationale aanvraag: WO90/07341.

Deze octrooiaanvraag werd ingediend als internationale octrooiaanvraag onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvraag wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvraag.

Gezuiverde ciliaire neurotrofe factor

5 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op neurotrofe factoren en in het bijzonder ciliaire neurotrofe factor (CNTF), alsmede werkwijzen voor het zuiveren van CNTF en het bereiden van recombinant CNTF.

Verscheidene mentale en fysieke gebreken zijn het
10 gevolg van de dood van zenuw en glioom cellen in het zenuwstelsel. De dood van zenuw en glioom cellen kan worden veroorzaakt door neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer en de ziekte van Parkinson en multiple sclerose, door de ischemie tengevolge van een beroerte,
15 door een traumatisch letsel, of door het natuurlijke verouderingsproces.

Neurotrofe factoren zijn een klasse moleculen, die de overlevings en functionele activiteit van zenuw of glioom cellen bevorderen. Er bestaan waarnemingen om te
20 veronderstellen, dat neurotrofe factoren bruikbaar zullen zijn als behandelingen om de dood of het slecht functioneren tengevolge van de boven opgesomde omstandigheden te voorkomen. Appel, 1981, Ann. Neurology 10, bl. 499.

25 Van dergelijke neurotrofe factoren is de zenuwgroeifactor (NGF) het beste gekenmerkt. Er is aangetoond, dat NGF een neurotrofe factor is voor de cholinergische zenuwcellen van de voorste hersenen, die sterven tijdens de ziekte van Alzheimer en met toenemende
30 ouderdom. Het verlies van deze zenuwcellen wordt in het algemeen verantwoordelijk gesteld voor vele waargenomen tekortkomingen, die gepaard gaan met de ziekte van Alzheimer en met toenemende ouderdom.

Dierproeven tonen aan, dat NGF de dood van cholinergische zenuwcellen van de voorste hersenen na
35 traumatisch letsel voorkomt en dat NGF waargenomen verliezen, die plaats vinden met toenemende ouderdom, kan terugdraaien. Hefti en Weiner, 1986, Ann. Neurology 20, bl.

9020024.

275; Fischer c.s., 1987, Nature, 329, bl. 65. Deze resultaten doen de potentiële klinische bruikbaarheid van deze neurotrofe factor bij de mens aan de hand bij de behandeling van waargenomen verliezen tengevolge van de
5 door van cholinergische zenuwcellen van de voorste hersenen door ziekte, letsel of ouderdom.

Een complicatie van het gebruik van neurotrofe factoren is hun specificiteit voor alleen die subpopulaties van zenuwcellen, die de juiste membraanreceptoren bevatten.
10 De meeste zenuwcellen in het lichaam hebben geen NGF receptoren en zijn klaarblijkelijk zonder respons op deze neurotrofe factor. Het is daarom van kritisch belang nieuwe neurotrofe factoren te ontdekken, die het overleven van andere soorten zenuw of glioom cellen kunnen ondersteunen
15 dan NGF doet.

Er is naar nieuwe neurotrofe factoren gezocht op grond van hun vermogen het overleven in een kweek te ondersteunen van zenuwcellen, die geen respons geven op NGF. Een algemeen gebruikte onderzoekproef is ontworpen om
20 factoren te ontdekken, die de overleving van ciliaire ganglion motorneuronen bevorderen, die skelet- en gladde spier bedienen. Deze ciliaire ganglion zenuwcellen behoren tot het parasympathische zenuwstelsel en hun overleving wordt niet ondersteund door NGF.

25 De aanwezigheid van factoren, die de overleving van ciliaire ganglion zenuwcellen bevorderen, is beschreven voor verschillende weefsels en soorten. Vele van deze ciliaire ganglion neurotrofe werkingen hebben de volgende overeenkomende chemische en biologische eigenschappen: (1)
30 de werking is aanwezig in hoge concentratie in heupzenuwen; (2) de neurotrofe werking overleeft blootstelling aan het ionogene detergens natriumdodecylsulfaat (SDS) en aan de reductiemiddelen β -mercaptoethanol (BME) of dithiothreitol (DTT) tijdens elektroforese op SDS polyacrylamide
35 reducerende gels; en (3) op dergelijke gels verplaatst de werking zich met een schijnbaar mol.gew. tussen 24-28 kd. Collins, 1985, Developmental Biology, 109, bl. 255-258; Manthorpe c.s.), 1986, Brain Research, 367, bl. 282-286.

Op grond van deze overeenkomende eigenschappen is voorgesteld, dat dezelfde of nauw verwante moleculen, karakteristiek aangeduid als "ciliaire neurotrofe factor" of "CNTF", verantwoordelijk zijn voor de ciliaire ganglion
5 neurotrofe werkingen. Aldus is de uitdrukking CNTF een gebruikte definitie, die betrekking heeft op middelen met de bovenstaande eigenschappen, die het overleven van ciliaire ganglion neurotrofe cellen in een kweek bevorderen. Zonder voldoende gegevens om vast te stellen,
10 dat de proteïnen , die verantwoordelijk zijn voor deze werking, identiek zijn, zullen CNTF's worden onderscheiden naar hun weefsel en oorsprongspecies. Aldus is, als de oorsprongspecies konijn is, de nomenclatuur konijn heupzenuw CNTF (konijn SN-CNTF).

15 Heupzenuw CNTF wordt blijkbaar in hoogste concentratie gevonden in perifere zenuwen zoals de heupzenuw. Het komt vrij uit cellen in de zenuw bij beschadiging. SN-CTNF ondersteunt het overleven en de groei van alle zenuwcellen van het perifere zenuwstelsel, die
20 zijn onderzocht, met inbegrip van sensibele, sympathische en parasymphatische zenuwcellen. Aldus heeft SN-CNTF een breder traject responsieve zenuwcellen dan NGF heeft. eEr is kortelings aangetoond, dat een rat SN-CNTF de vorming van bepaalde soorten glioomcellen in het centrale
25 zenuwstelsel regelt (Hughes c.s., 1988, Nature 335:70).

De redelijkste hypothese, die berust op de bovenvermelde feiten, is dat heupzenuw CNTF een bestanddeel is van de respons van het zenuwsysteem op beschadiging. Het valt te verwachten, dat SN-CNTF, dat is vrijgekomen uit
30 cellen in een beschadigde zenuw, het overleven en de hernieuwde groei van beschadigde zenuwcellen bevordert en de functionele activering van glioomcellen regelt, die voor regeneratie nodig is. Deze overwegingen geven aan, dat SN-CNTF van therapeutische waarde is voor het verminderen van
35 beschadiging van het zenuwstelsel, veroorzaakt door ziekte of beschadiging.

Ondanks wijdverspreide wetenschappelijke belangstelling voor SN-CNTF, hebben de moeilijkheid om

aanmerkelijke hoeveelheden uit natuurlijke bronnen te zuiveren en de niet-beschikbaarheid van humaan SN-CNTF pogingen belemmerd om zijn waarde aan te tonen voor het in stand houden van de levensvatbaarheid van zenuwcellen
5 tijdens ziekte of na beschadiging. Eerdere pogingen een rat SN-CNTF te zuiveren hebben geleid tot een 800-voudige verrijking ten opzichte van ruw zenuwextract op basis van specifieke werking. Manthorpe c.s., 1986, Brain Research 367:282-286.

10 Een achthonderdvoudige toename van specifieke werking was echter onvoldoende om een enkele proteïnespecies te verschaffen. Het produkt, dat verhoogde werking vertoont, verkregen volgens de werkwijze als beschreven door Manthorpe c.s. is derhalve ontoereikend, daar het
15 verscheidene proteïnespecies bevat. Het zou wenselijk zijn een zuivering van SN-CNTF te kunnen bereiken, zodanig dat een enkele proteïnesoort wordt verkregen met de geschikte biologische werking. Als eenmaal een enkele proteïnespecies is verkregen, zullen daaruit verkregen gegevens
20 nauwkeuriger zijn. Onder "enkele proteïnespecies" wordt, als die uitdrukking hierna in deze beschrijving en de bijbehorende conclusies wordt gebruikt, verstaan een polypeptide of polypeptidereeks met dezelfde aminozuurvolgorde over al hun actieve plaatsen. Met andere
25 woorden, als het werkzame deel van de aminozuurreeks dezelfde is voor twee of meer polypeptiden, zijn ze een "enkele proteïnespecies" zoals hierin gedefinieerd, zelfs als er ondergeschikte heterogeniteiten zijn ten aanzien van lengte of lading.

30 SAMENVATTING VAN DE UITVINDING

Een doel van de onderhavige uitvinding is een verbeterde werkwijze te verschaffen voor zuiveren van SN-CNTF.

Een ander doel van de onderhavige uitvinding is
35 een SN-CNTF te verschaffen, dat gezuiverd is in een mate, die groter is dan ooit eerder bereikt is, zodanig dat een enkele proteïnespecies wordt verkregen.

Nog een ander doel van de onderhavige uitvinding

is sonden te verschaffen, die het aftasten van cDNA en
genoom verzamelingen vergemakkelijken, teneinde de
dierlijke en humane genen, die SN-CNTF coderen, te clonen.

Een ander doel van de uitvinding is het nucleïne-
5 zuur en overeenkomstige aminozuurreeksen te verschaffen
voor dierlijk en humaan CNTF.

Een ander doel van de uitvinding is de recombinant
expressiesystemen te verschaffen, waarin de nucleïnezuur-
reeks voor humaan of dierlijk CNTF kan worden gebruikt om
10 humaan of dierlijk CNTF proteïne te vormen.

Deze en andere doeleinden worden bereikt door een
werkwijze te verschaffen voor het zuiveren van SN-CNTF,
zodanig, dat specifieke werking meer dan 25.000-voudig
wordt verhoogd van ruw extract tot gezuiverd SN-CNTF. Het
15 meer dan 25.000-voudig gezuiverde SN-CNTF wordt ook
verschafft.

Volgens andere voorkeurskenmerken van bepaalde
voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding
worden SN-CNTF sonden verschafft voor het aftasten van cDNA
20 en genoomverzamelingen op SN-CNTF.

Volgens andere voorkeurskenmerken van bepaalde
voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding
worden konijne en humane aminozuur en nucleïnezuur CNTF
reeksen verschafft.

25 Volgens andere voorkeurskenmerken van bepaalde
voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding
wordt een recombinant expressiesysteem verschafft om
biologisch werkzaam dierlijk of humaan CNTF te verschaffen.

Volgens andere gunstige kenmerken van bepaalde
30 voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding
wordt een werkwijze voor het zuiveren van SN-CNTF
verschafft, die de stappen omvat van behandelen met zuur,
ammoniumsulfaatfractionering, chromatocentreren, het
preparaat laten open op SDS-Page gel en omgekeerde fase-
35 HPLC.

Volgens andere voorkeurskenmerken van bepaalde
voorkeursuitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding
worden aanvullende zuiveringsstappen verschafft, waarin

9020024.

hydrofobe wisselwerking chromatografie wordt gebruikt onmiddellijk voorafgaand aan en na chromatocentreren.

Het zal duidelijk zijn, dat zowel de bovenstaande algemene beschrijving als de navolgende nadere beschrijving
5 slechts als voorbeeld en ter uitleg dienen en geen beperking inhouden van de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden gevraagd. De bijgaande tekeningen, die zijn opgenomen in en deel uitmaken van de beschrijving, lichten verschillende uitvoeringsvormen van de uitvinding toe, en
10 dienen samen met de beschrijving om de beginselen van de uitvinding uit te leggen.

KORTE BESCHRIJVINGEN VAN DE TEKENINGEN

Fig.1 toont als voorbeeld resultaten van chromatografie op een Mono P kolom;

15 Fig.2 toont als voorbeeld een uitzetting van de verdeling van neurotrofe werking in het eluaat van elk van de zeven stroken, die zijn gesneden van het SDS-Page gel na elektroforese;

Fig.3 toont als voorbeeld resultaten van
20 omgekeerde fase chromatografie;

Fig.4 toont als voorbeeld resultaten van een met zilver gekleurde reducerende SDS-Page gel loop voor fracties, die equivalent zijn aan die grenzend aan en met inbegrip van de piek van neurotrofe werking als weergegeven
25 in Fig.3;

Fig.5 toont een profiel van geëluëerde peptiden na digestie met endoprotease Asp-N; en

Fig.6 toont een profiel van geëluëerde peptiden na digestie met endoprotease Lys-C.

30 Fig.7 toont als voorbeeld resultaten van chromatografie van de ammoniumsulfaatfractie op een fenyl Sepharose HIC kolom;

Fig.8 toont als voorbeeld resultaten van chromatografie van een Mono P kolom chromatogeconcentreerde
35 fractie op een alkyl-Superose FPLC-HIC kolom;

Fig.9 toont als voorbeeld chromatografie van de preparatieve SDA-Page fractie op een C8 omgekeerde fase HPLC kolom. Plaat (A) laat de resultaten zien van de

oorspronkelijke zuiveringsprocedure. Plaat (B) laat de resultaten zien van de huidige zuiveringsprocedure na toevoeging van de twee HIC chromatografiestappen.

Fig.10 toont als voorbeeld resultaten van

5 SDS-Page en Western vlek analyse van het omgekeerde fase gezuiverd SN-CNTF. Laan 1 in elk van de twee platen bevat mol.gew. standaard proteïnen (SIGMA SDS-7). Laan 2 bevat gezuiverd SN-CNTF. Plaat (A) toont de resultaten van zilverkleuring. Plaat (B) toont de resultaten van Western
10 vlek analyse met op affiniteit gezuiverd anti-peptide-A antilichaam.

Fig.11 toont de nucleïnezuurreeks, die codeert voor konijne SN-CNTF. Translatie van deze nucleïnezuurreeks geeft de overeenkomstige aminozuurreeks, daaronder
15 afgedrukt in enkele letter code. Reeksen, die onderstreept zijn, werden bevestigd door de uit het SN-CNTF proteïne verkregen aminozuurreeks.

Fig.12 toont een het nucleïnezuur en bijbehorende aminozuurreeks (drie letter code) voor de coderingsreeks
20 voor humaan CNTF. De humane reeksen staan tussen de lijnen. Waar het konijne nucleïnezuur of aminozuurreeksen verschillen van het humane, worden ze respectievelijk boven en onder de lijnen geschreven.

Fig.13 toont de opbouw van de pCMVXVPL2 expressie-
25 vector.

Fig.14 toont de werkwijzen, die zijn gebruikt om CNTF-Syn1/3 op te bouwen voor expressie van CNTF. De tekening is representatief en niet op schaal. Zie Voorbeeld 7 voor experimentele bijzonderheden.

30 Fig.15 toont de werkwijzen, die zijn gebruikt om CNTF-Syn2/3 op te bouwen voor expressie van CNTF. De tekening is representatief en niet op schaal. Zie Voorbeeld 7 voor experimentele bijzonderheden.

Fig.16 toont synthetische oligonucleotiden 1 tot
35 en met 4, die zijn gebruikt bij de opbouw van CNTF-Syn1/3 en CNTF-Syn2/3.

Fig.17 toont synthetische oligonucleotiden 5 tot en met 10, die zijn gebruikt bij de opbouw van CNTF Syn2/3.

Fig.18 toont bepaalde kenmerken van de pT5T bacteriële expressievector, die een DNA-inlas bevat, die geschikt is voor expressie van CNTF. De tekening is representatief en niet op schaal. Zie Voorbeeld 7 voor
5 experimentele bijzonderheden.

Fig.19 toont bepaalde kenmerken van de pT3XI-2 bacteriële expressievector, die een DNA-inlas bevat, die geschikt is voor expressie van CNTF. De tekening is representatief en niet op schaal. Zie Voorbeeld 7 voor
10 experimentele bijzonderheden.

Fig.20 toont een reducerend SDS polyacrylamide gel, waarin extracten van cellen, die waarin getransformeerd met verschillende expressiebouwstenen, werden onderworpen aan elektroforese en werden gekleurd met
15 Coomassie Brilliant Blue.

Fig.21 toont een reducerend SDS polyacrylamide gel, waarin extracten van cellen, die waarin getransformeerd met verschillende expressiebouwstenen, werden onderworpen aan elektroforese en immunovlekken met
20 op affiniteit gezuiverd anti-CNTF peptide A antilichaam.

Fig.22 toont de biotest met serieverdunningen van bovenstaande vloeistoffen van bacteriecellen, die pT5T:CNTF-Syn1/3 of pT3XI-2:CNTF-Syn2/3 uitdrukken. De inzet toont de biotest van geëxtraheerde plakken van een
25 reducerend SDS polyacrylamide gel van pT5T:CNTF-Syn1/3 bovenstaande vloeistof in het gebied van het gel, onmiddellijk boven en beneden 24 kD.

BESCHRIJVING VAN DE VOORKEURSVORMEN

De op het ogenblik bevoorkeurde uitvoeringsvormen
30 van de uitvinding, die, samen met de volgende voorbeelden, dienen om de beginselen van de uitvinding uiteen te zetten, worden thans nader beschreven.

Zoals boven opgemerkt, heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een SN-CNTF, dat tenminste 25.000-
35 voudig gezuiverd is uit ruw extract. Dit SN-CNTF is een enkele proteïnespecies, zoals deze uitdrukking hierin is gedefinieerd. Als een enkele proteïnespecies kan de aminozuurreeks van het SN-CNTF worden bepaald en worden

gebruikt om DNA sonden te maken voor het verkrijgen van
genoom of cDNA klonen ten gebruike in recombinant bereiding
van SN-CNTF.

De aminozuurreeks van de enkele proteïnespecies
5 van SN-CNTF is gedeeltelijk bepaald. Deze reeks is:

I - R - S - D - L - T - A - L - T - E -
S - Y - V - K - H - Q - G - L - N - K - N
D - G - V - P - M - A - G
K - L - W - G - L - K

10 Aanvullende aminozuurreeks is bepaald uit
gezuiverd konijne SN-CNTF, die wordt vermeld in Voorbeeld
2. Deze aanvullende reeks maakt het mogelijk een deel van
de bovenvermelde aminozuurreeks te plaatsen binnen een
enkel groot peptide (Voorbeeld 2). Deze enkele peptidereeks
15 is gebruikt om die gedegenereerde oligonucleotide sonden te
maken (nrs. 1, 13, en 7 in Voorbeeld 4), die zeer bruikbaar
zijn voor het initiëren van de polymerase ketenreactie,
daar hun plaats ten opzichte van elkaar bekend is.

De nucleïnezuur (mRNA equivalent) reeksen, die
20 coderen voor konijne en humaan CNTF zijn bepaald en worden
weergegeven in Figs. 11 en 12.

Een recombinant systeem voor kortstondig
uitdrukken van biologisch werkzaam CNTF is ontwikkeld en
wordt beschreven in Voorbeeld 5.

25 De onderhavige uitvinding heeft bovendien
betrekking op een verbeterde werkwijze voor het zuiveren
van SN-CNTF. Ofschoon de onderhavige uitvinding betrekking
heeft op SN-CNTF van elke bron, is de navolgende
beschrijving gericht op dat, geïsoleerd uit konijnen.

30 In het kort omvat een voorkeursuitvoering van de
onderhavige werkwijze het verpoederen van
heupzenuwmateriaal van het konijn. Het ruwe extract wordt
dan gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof wordt
aangezuurd en het verkregen neerslag wordt verwijderd door
35 centrifugeren. De bovenstaande vloeistof wordt dan
getitreerd met NaOH en het verkregen neerslag wordt weer
verwijderd door centrifugeren.

Na pH neerslagen wordt verzadigde ammoniumsulfaat-

oplossing toegevoegd aan de bovenstaande vloeistof en het neerslagmiddel wordt door centrifugeren verwijderd. Bij de verdere toevoeging van ammoniumsulfaat aan de bovenstaande vloeistof wordt een neerslag van proteïne fractie, die het
5 grootste deel van de SN-CNTF werking bevat, gevormd.

Het bovenstaande preparaat wordt dan geladen op een Mono P chromatocentrerende FPLC kolom. Kolom fracties worden dan verzameld en geanalyseerd op pH en CNTF werking. De door een balk aangegeven fracties in Fig.1 met
10 piek S werking worden dan verder behandeld, zoals hieronder nader zal worden besproken.

De geconcentreerde fracties uit meervoudige doorvoering door de Mono P kolom worden onderworpen aan elektroforese op SDS polyacrylamide plaat gel. Een gebied
15 van het gel, dat overeenkomt met een mol.gew. tussen 22 en 27 kD wordt over de breedte van het gel uitgesneden tot een aantal stroken. De afzonderlijke stroken wordt in kleinere stukken gesneden en proteïnen worden elektroforetisch geëluëerd. Geëluëerde proteïnen worden verzameld, en de
20 fractie met de hoogste werking wordt verder gezuiverd met gebruik van omgekeerde fase HPLC. Deze werkwijze wordt nader beschreven in de Voorbeelden, die volgen.

Bovendien heeft de onderhavige uitvinding betrekking op aanvullende stappen, die kunnen worden
25 ingelast in de zuiveringsprocedure als boven vermeld teneinde het mogelijk te maken meer uitgangsmateriaal geschikt te verwerken. In een voorkeursuitvoeringsvorm van deze aanvullende stappen wordt hydrofobe wisselwerking chromatografie op fenyl-Sepharose ingelast tussen
30 ammoniumsulfaatfractioneren en chromatocentreren, terwijl hydrofobe wisselwerking chromatografie op een FPLC alkyl-Superose kolom wordt ingelast tussen chromatocentreren en preparatieve SDS-PAGE (Voorbeeld 1).

35 De door de onderhavige uitvinding verschaft werkwijze heeft geleid tot SN-CNTF in een gezuiverde vorm met een meer dan 25.000-voudige toename van specifieke werking ten opzichte van het ruwe extract. Verder is het

gevormde eindprodukt een enkele proteïnespecies. Dit betekent een toename van meet dan 30-voudig ten opzichte van het SN-CNTF, dat verscheidene proteïnespecies bevat, zoals beschreven door Manthorpe c.s. als boven besproken.

5 Daar SN-CNTF bij omgekeerde fase HPLC gedeeltelijk wordt gedesactiveerd, stelt de berekening van tenminste 25.000-voudige zuivering volgens de onderhavige uitvinding een minimumzuivering voor, en de werkelijke zuivering kan zelfs 100.000-voudig of meer zijn. Deze verhoogde zuivering

10 vergemakkelijkt de bepaling van de aminozuurreeks van SN-CNTF. Volgens de onderhavige uitvinding is reeds voldoende aminozuurreeks verkregen om oligonucleotide sonden te vormen, die het uitzoeken van cDNA en genoom verzamelingen vergemakkelijken teneinde de dierlijke en

15 humane genen te klonen, die coderen voor SN-CNTF.

De door de onderhavige uitvinding verschaftte werkwijzen hebben geleid tot de bepaling van de coderings (mRNA equivalent) reeks voor konijne en humaan CNTF.

Zoals hieronder nader zal worden besproken, maken

20 deze genen het op hun beurt produktie op grote schaal mogelijk van (1) dierlijk SN-CNTF voor onderzoeken van zijn vermogen om diermodellen van beschadiging aan het zenuwstelsel te behandelen, en (2) humaan SN-CNTF, dat geschikt is voor opname in farmaceutische preparaten die

25 bruikbaar zijn bij de behandeling van beschadiging van het humane zenuwstelsel.

De door de onderhavige uitvinding verschaftte werkwijzen hebben geleid tot de bereiding van biologisch werkzaam dierlijk CNTF in een recombinant expressiesysteem.

30 Met deze gezuiverde proteïnen kan de aminozuurreeks van de belangrijkste peptiden worden bepaald. De proteïnen worden eerste behandeld met endoprotease Asp-N, endoprotease Lys-C, endoprotease Glu-C, of chymotrypsine. Na digestie kan de aminozuurreeks van

35 de belangrijkste peptiden worden bepaald met gebruik van een Applied Biosystems gasfase proteïne volgorde apparaat.

Antilichamen, die reageren met gezuiverd SN-CNTF kunnen worden gebruikt voor uitzoeken van expressie-

verzamelingen teneinde het gen te verkrijgen, dat codeert voor SN-CNTF. Synthetische peptiden kunnen worden gesynthetiseerd, die overeenkomen met gebieden van de reeks van SN-CNTF met gebruik van een Applied Biosystems
5 geautomatiseerd proteïne synthese apparaat. Dergelijke peptiden kunnen worden gebruikt om de antilichamen te bereiden. Antilichamen voor synthetische peptiden zijn bereid en er is aangetoond, dat ze reageren met gezuiverd CNTF met de Western vlek analyse (Fig. 10).

10 Uit het bovenstaande werk is een uiteindelijk doel het humane SN-CNTF gen te klonen en uit te drukken teneinde materiaal te bereiden, dat geschikt is voor gebruik in humane farmaceutische preparaten. Als de genoomvolgorde eenmaal bekend is, kunnen genen, die SN-CNTF coderen,
15 worden uitgedrukt in dierlijke of bacteriecellen. De genreeksen van konijn en mens, die coderen voor CNTF zijn bepaald. Een kortstondig expressiesysteem voor het bereiden van biologisch werkzaam CNTF is ontwikkeld.

Een recombinant DNA werkwijze voor de bereiding
20 van CNTF wordt nu beschreven. In een uitvoeringsvorm van de uitvinding werkt de actieve plaats op een wijze, die biologisch equivalent is aan die van natief CNTF, dat uit de mens is geïsoleerd. Een natuurlijke of synthetische DNA reeks kan worden gebruikt om de produktie van CNTF te
25 sturen. Deze werkwijze omvat:

(a) Bereiding van een DNA reeks, die in staat is een gastheercel op te dragen een proteïne te vormen, dat CNTF werking heeft;

(B) De DNA reeks te klonen in een vector, die in
30 staat is te worden overgebracht in en te worden gecopieerd in een gastheercel, waarbij dergelijke vector werkzame elementen bevat, die nodig zijn om de DNA reeks uit te drukken;

(c) De vector, die de synthetische DNA reeks en
35 werkzame elementen bevat, over te brengen in een gastheercel, die in staat is het DNA coderende CNTF uit te drukken;

(d) Kweken van de gastheercellen onder omstandig-

heden, die geschikt zijn voor ontwikkeling van de vector en expressie van CNTF;

(e) Oogsten van het CNTF; en

(f) Het CNTF een werkzame tertiaire structuur
5 laten aannemen, waardoor het CNTF werking bezit.

In een uitvoeringsvorm kan een gedeeltelijk of geheel synthetische DNA reeks, die wordt gebruikt voor bereiding van recombinant CNTF, andere nucleotiden bevatten dan de natieve DNA reeks. In een voorkeursuitvoeringsvorm
10 zal de DNA reeks met andere nucleotiden een polypeptide nog coderen met dezelfde primaire structuur als CNTF gecodeerd door dierlijke of humane CNTF genen. In een andere voorkeursuitvoeringsvorm zal de DNA reeks met andere nucleotiden een polypeptide coderen met een primaire
15 structuur, die verband houdt met natuurlijk CNTF en die tenminste een van de biologische werkingen heeft van het hierin beschreven CNTF.

In een uitvoeringsvorm volgens de onderhavige uitvinding wordt de natieve DNA reeks, die CNTF codeert,
20 gemodificeerd om expressie in een gastheerorganisme of cel te bevorderen. Dergelijke modificaties kunnen de volgende omvatten;

(a) Als de natieve DNA reeks genoom DNA is, kan de verwijdering van tussengelegen, niet-coderende reeksen
25 (intronen) worden gebruikt als expressie in microorganismen wordt beoogd.

(b) Wijzigen van de nucleïnezuur reeks om reeksen op te nemen, die worden herkend door verschillende restrictie enzymen voor gemak van volgende stappen van
30 ligeren, klonen en mutagenese.

(c) Wijzigen van de nucleïnezuur reeks om codonen te vormen, die worden bevoorkeurd door het gastheerorganisme of cel, die wordt gebruikt om het recombinant proteïne te vormen.

35 (d) Binden van de nucleïnezuur reeksen aan werkzame elementen, die nodig zijn om het DNA in stand te houden en uit te drukken in een gastheerorganisme of cel.

In een uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvin-

ding wordt de uit te drukken DNA reeks bereid, zoals hierboven besproken en ingevoegd in een expressie vector, die in staat is in een gastheerorganisme of cel te verblijven en de expressie van CNTF te dicteren. Dergelijke
5 vectoren hebben bepaalde voorkeurskenmerken, die geschikt zijn voor expressie in een bepaald gastheerorganisme of cel:

(a) Microorganismen, in het bijzonder E.coli

De voor gebruik in de onderhavige uitvinding
10 beoogde vectoren omvatten elke vector waarin een zoals boven besproken DNA reeks kan worden ingelast, samen met elk bevoorkeurd of benodigd werkzaam element, en welke vector vervolgens kan worden overgebracht in een gastheer-cel en in een dergelijke cel worden vermenigvuldigd.
15 Voorkeursvectoren zijn degene, waarvan de restrictie-plaatsen goed gedocumenteerd zijn en die de voor transcriptie van de DNA reeks bevoorkeurde of benodigde werkzame elementen bevatten. Er worden echter ook bepaalde uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding beoogd, die
20 thans nog niet ontdekte vectoren gebruiken, die een of meer van de hierin beschreven DNA reeksen bevatten. In het bijzonder verdient het de voorkeur, dat al deze vectoren sommige of alle volgende kenmerken bezitten: (1) een minimum aantal gastheerorganisme reeksen; (2) stabiel
25 worden in stand gehouden en vermenigvuldigd in de gewenste gastheer; (3) in staat zijn aanwezig te zijn in een hoog aantal kopieën van de gewenste gastheer; (4) een instelbare promotor bevatten, die zo geplaatst is, dat deze transcriptie van het van belang zijnde gen bevordert; (5)
30 tenminste een merk DNA reeks heeft, die codeert voor een te kiezen eigenschap, die aanwezig is op een deel van het plasmide los van dat, waar de DNA reeks wordt ingelast; en (6) een DNA reeks, die in staat is transcriptie te beëindigen.

35 In verschillende voorkeursuitvoeringsvormen bevatten deze klonende vectoren, die in staat zijn de DNA reeksen uit te drukken en deze bevatten, verschillende werkzame elementen. Deze "werkzame elementen" zoals

9020024.

hierin besproken, bevatten tenminste een promotor, tenminste een Shine-Dalgarno reeks en starter codon, en tenminste een stopcodon. Deze "werkzame elementen" bevatten bij voorkeur ook een of meer van de volgende: tenminste een
5 operator, tenminste een leiderreeks voor proteïnen die uit intracellulaire ruimten moeten worden afgevoerd, tenminste een gen voor een regelproteïne, en elk andere DNA reeks, die nodig is of de voorkeur geniet voor geschikte transcriptie en opvolgende translatie van het vector DNA.

10 Sommige van deze werkzame elementen kunnen aanwezig zijn in elke voorkeursvector volgens de onderhavige uitvinding. Het wordt beoogd, dat elk aanvullend werkzaam element, dat nodig kan zijn, kan worden toegevoegd aan deze vectoren met gebruikmaking van de
15 gewone vakman op dit gebied bekende werkwijzen, in het bijzonder in het licht van de leer hierin.

In de praktijk is het mogelijk elk van deze vectoren op te bouwen op een manier, die het mogelijk maakt, dat ze gemakkelijk worden geïsoleerd, samengesteld
20 en uitgewisseld. Dit vergemakkelijkt de opbouw van talrijke functionele genen uit combinaties van deze elementen en het coderingsgebied van de DNA reeksen. Verder zijn vele van deze elementen toepasbaar in meer dan een gastheer. Er wordt verder beoogd, dat de vectoren in bepaalde voorkeurs-
25 uitvoeringsvormen DNA reeksen bevatten, die in staat zijn te fungeren als regelaars ("operatoren") en andere DNA reeksen, die in staat zijn regelende proteïnen te coderen.

(i) Regelaars

Deze regelaars dienen in een uitvoeringsvorm om
30 expressie van de DNA reeks te voorkomen in aanwezigheid van bepaalde milieuomstandigheden en, in aanwezigheid van andere milieuomstandigheden transcriptie en daaropvolgende expressie van het proteïne, waarvoor door de DNA reeks gecodeerd. Het verdient in het bijzonder de voorkeur, dat
35 regelende segmenten worden ingelast in de vector, zodanig dat de expressie van de DNA reeks niet plaats vindt, of in sterk verminderde mate plaats vindt, in afwezigheid van bijvoorbeeld isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). Onder

deze omstandigheden kunnen de getransformeerde micro-organismen, die de DNA reeks bevatten, tot een gewenste dichtheid worden gekweekt voorafgaand aan het starten van de expressie van CNTF. In deze uitvoeringsvorm wordt
5 expressie van het gewenste proteïne op gang gebracht door toevoeging van een stof aan de bacteriële omgeving, die in staat is expressie van de DNA reeks te veroorzaken, nadat de gewenste dichtheid is bereikt.

(ii) Promotors

10 De expressievectoren moeten promotors bevatten, die door het gastheerorganisme gebruikt kunnen worden voor expressie van zijn eigen proteïnen. Ofschoon gewoonlijk het lactosepromotor systeem wordt gebruikt, zijn andere bacteriële promotors geïsoleerd en gekenmerkt, waardoor de
15 vakman in staat is ze te gebruiken voor expressie van het recombinant CNTF.

(iii) Transcriptie beëindiger

De hierin beoogde transcriptie beëindigers dienen om de vector te stabiliseren. In het bijzonder worden die
20 reeksen, beschreven door M. Rosenberg en D. Court in Ann. Rev. Genet. 13: 319-353 (1979), hierin uitdrukkelijk door verwijzing opgenomen, beoogd voor gebruik in de onderhavige uitvinding.

(iv) Onomgezette reeks

25 Er wordt opgemerkt, dat het in de voorkeurs-uitvoeringsvorm ook wenselijk kan zijn het 3' of 5' einde van het koderingsgebied zo op te bouwen, dat het inbouw mogelijk maakt van 3' of 5' onomgezette reeks in de gen transcriptie. Tot deze onomgezette reeksen behoren die,
30 welke het mRNA stabiliseren, zoals ze worden geïdentificeerd door U. Schmeissner, K. McKenney, M. Rosenberg en D. Court in J. Mol. Biol. 176: 39-53 (1984), dat hierin door verwijzing uitdrukkelijk wordt opgenomen.

(v) Ribosoom bindingsplaatsen

35 De bacteriële expressie van vreemde proteïnen maakt bepaalde werkzame elementen nodig, die ribosoom bindingsplaatsen bevatten, maar niet daartoe beperkt zijn. Een ribosoom bindingsplaats is een reeks, die een ribosoom

herkent en daaraan bindt aan het begin van proteïne-synthese, zoals beschreven door L. Gold c.s., Ann. Rev. Microbio. 35: 557-580; of D.M. Marquis c.s., Gene 42: 175-183 (1986), die beide door verwijzing uitdrukkelijk hierin
5 worden opgenomen. Een bevoorkeurde ribosoom bindingsplaats is GAGGCGCAAAAA(ATG).

(vi) Leiderreeks en translatiekoppelaar

Het verdient bovendien de voorkeur dat DNA, dat codeert voor een geschikte afscheidingsleider (signaal)
10 reeks aanwezig is aan het 5' einde van de DNA reeks, zoals beschreven door M.E. Watson in Nucleic Acids Res. 12: 5145-5163, dat hierin door verwijzing uitdrukkelijk is opgenomen, als het proteïne moet worden afgescheiden uit het cytoplasma. Het DNA voor de leiderreeks moet op een
15 plaats zitten, die de vorming van een versmeltingsproteïne mogelijk maakt, waarin de leiderreeks onmiddellijk grenzend aan en covalent gebonden met CNTF zit, d.w.z. dat er geen transcriptie of translatiesignalen tussen de twee DNA koderingsreeksen moeten zijn. De aanwezigheid van de
20 leiderreeks is ten dele gewenst voor een of meer van de volgende redenen. Ten eerste kan de aanwezigheid van de leiderreeks verwerking van CNTF door de gastheer vergemakkelijken. In het bijzonder kan de leiderreeks splitsing van oorspronkelijk translatieprodukt door een
25 leiderpeptidase besturen om de leiderreeks te verwijderen en een polypeptide met de aminozuurreeks achterlaten, dat potentiële proteïnewerking heeft. Ten tweede kan de aanwezigheid van de leiderreeks zuivering van CNTF vergemakkelijken door het proteïne uit het cel cytoplasma
30 te sturen. In sommige species gastheer microorganismen maakt de aanwezigheid van een geschikte leiderreeks verplaatsing van het voltooide proteïne naar de periplasma ruimte mogelijk, zoals in het geval van sommige E.coli. In het geval van bepaalde E.coli, Saccharomyces en Bacillus en
35 Pseudomonas stammen, maakt de geschikte leiderreeks verplaatsing van proteïne door het celmembraan en naar het extracellulaire medium mogelijk. In deze omstandigheid kan het proteïne worden gezuiverd van extracellulair proteïne.

Ten derde kan in het geval van sommige proteïnen, die zijn bereid volgens de onderhavige uitvinding, de aanwezigheid van de leiderreeks nodig zijn om het voltooide proteïne te plaatsen in een omgeving, waarin het kan opvouwen om zijn
5 werkzame structuur aan te nemen, welke structuur de geschikte proteïnewerking heeft.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding wordt een aanvullende DNA reeks onmiddellijk voorafgaand geplaatst ten opzichte van de DNA reeks, die
10 kodeert voor CNTF. De aanvullende DNA reeks is in staat te werken als een translatiekoppelaar, d.w.z., dat het een DNA reeks is, die een RNA kodeert, dat dient om ribosomen onmiddellijk naast de ribosoom bindingsplaats van het inhibitor RNA te plaatsen, waarmee het aangrenzend is. In
15 een uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding kan de translatiekoppelaar zijn verkregen met gebruik van de DNA reeks

TAACGAGGCGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATCTTGGAGGATGATTAAATG
en tegenwoordig de vakman op het gebied van translatie-
20 koppelaars bekende werkwijzen.

(VII) Translatiebeëindiger

De hierin beoogde translatiebeëindigers dienen om de translatie van mRNA te stoppen. Ze kunnen ofwel natuurlijk zijn, zoals beschreven door J.Kohli, Mol. Gen.
25 Genet. 182: 430-439; of synthetisch, zoals beschreven door R.F. Pettersson, Gene 24: 15-27 (1983), welke beide literatuurplaatsen hierin uitdrukkelijk door verwijzing zijn opgenomen.

(viii) Verkiesbare markeerder

30 Het verdient bovendien de voorkeur dat de klonende vector een kiesbare markeerder bevat, zoals een markering voor bestendigheid tegen geneesmiddelen of ander markeerder, die expressie van een kiesbare eigenschap door het gastheer organisme veroorzaakt. In een uitvoeringsvorm van
35 de onderhavige uitvinding is het gen voor bestendigheid tegen ampicilline in de vector opgenomen, terwijl in andere plasmiden het gen voor bestendigheid tegen tetracycline of het gen voor bestendigheid tegen chlooramfenicol is

opgenomen.

Een dergelijke bestendigheid tegen geneesmiddelen of andere geschikte markeerder, is ten dele bedoeld om de keuze van transformanten te vergemakkelijken. Bovendien kan de aanwezigheid van een dergelijk kiesbare markeerder in de klonende vector kan van nut zijn om verontreinigende microorganismen in het kweekmedium in hun vermenigvuldiging te belemmeren. In deze uitvoeringsvorm wordt een zuivere kweek van de getransformeerde gastheer microorganismen verkregen door de microorganismen te kweken onder omstandigheden, die het geïnduceerde fenotype voor overleving nodig hebben.

De uitvoeringselementen, zoals hierin besproken, worden routinematig gekozen door de vakman aan de hand van eerdere literatuur en de hierin vervatte leer. Algemene voorbeelden van deze werkzame elementen zijn beschreven door B. Lewin, Genes, Wiley & Sons, New York (1983), dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing is opgenomen. Verschillende monsters van geschikte werkzame elementen kunnen op de bovenbesproken vectoren worden gevonden en kunnen worden toegelicht door beschouwen van de publikaties, die de beginselkenmerken bespreken van de voornoemde vectoren.

Bij synthese en isolatie van alle noodzakelijke en gewenste delen van de bovenbesproken vector wordt de vector samengesteld met de vakman algemeen bekende werkwijzen. Het samenstellen van dergelijke vectoren wordt aangenomen binnen de werkzaamheden en taken te liggen, die door de vakman op dit gebied worden uitgevoerd, en kan als zodanig zonder overmatige proefnemingen worden uitgevoerd. Bijvoorbeeld zijn dergelijke DNA reeksen geligeerd in geschikte klonende vectoren, zoals beschreven door Maniatis c.s. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1984), dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing is opgenomen.

Bij het opbouwen van de klonende vectoren van de onderhavige uitvinding dient aanvullend te worden opgemerkt, dat meervoudige kopieën van de DNA reeksen en

zijn bijbehorende werkzame elementen in elke vector kunnen worden ingelast. In een dergelijke uitvoeringsvorm maakt het gastheer organisme grotere hoeveelheden per vector van het gewenste CNTF. Het aantal meervoudige kopieën van de
5 DNA reeks, die in de vector kan worden ingelast, wordt alleen beperkt door het vermogen van de verkregen vector om, wegens zijn afmeting, te worden overgebracht in en te worden gerepliceerd en overgeschreven in een geschikte gastheercel.

10 (b) Andere microorganismen.

Vectoren, die geschikt zijn voor gebruik in andere microorganismen dan E.coli worden ook beoogd voor deze uitvinding. Dergelijke vectoren worden beschreven in Tabel 1. Bovendien worden hieronder bepaalde voorkeursvectoren
15 besproken.

TABEL 1

Gastheer	Ingestelde promotors	Opwekker	Transcriptie beëindiger	MRNA	Transcriptie startplaats & leiderpeptide	Merkteken	RS bindings-plaats
E.coli	Lac ¹ , Tac ¹ Lambda pL Trp ⁵	1PTG verhoogde temperatuur IAA toevoeging of tryptofaan uitputting	rrnB ⁶ rrnC ⁷	ompA ⁸ lambda int ⁹	blaa ¹¹ ompA ¹² phos	ampicilline ¹⁴ tetra-cycline ^{14,15} chloor-amenicol ¹⁶	
Bacillus	*α-amylase ¹⁷ *subtilisin ¹⁸ *P-43 ¹⁹ spac-126	E.coli rrn rrn BT.T ²⁰ 1PTG			B.amy neutraal protease ²¹ B.amy α-amylase ²² B.subt. subtilisin ²³	Kan ^{r 24} Cam ^{r 25}	B.amy neutr. protease B.amy α-amylase ²²
Pseudo-monas	Trp ²⁷ (E.coli) Lac (E.coli) Tac (E.coli)	IAA toevoeging, of tryptofaan uitputting			fosfolipase C ²⁸ exotoxine A ²⁹	sulfonamide ³⁰ streptomycine ³⁰	Trp (E.coli)
Gist	Gal 1 ³¹ , 10 ³² Adh 1 ³³ , 11 ³⁴ Pho 5	Glucose uitputting en galactose α-factor Glucose Sac 2 uitputting Fosfaat uitputting	Cyc ¹ Una		Invertase ³⁶ Zuur fosfatase ³⁶ α-factor	Ura 3 ³⁷ Leu 2 ³⁸ His 3 Tap 1	
* niet ingesteld							

1. K. Backman, M. Ptashne en W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).
2. H.A. de Boer, L.J. Comstock en M. Vasser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983).
- 5 3. H. Shimtake en M. Rosenberg, Nature 292, 128-132 (1981).
4. C. Derom, D. Gheysen en W. Fiers, Gene 17, 45-54 (1982).
5. R.A. Hallewell en S. Emtage, Gene 9, 27-47 (1980).
- 10 6. J. Brosius, T.J. Dull, D.D. Sleeter en H.F. Noller, J. Mol. Biol. 148, 107-127 (1981).
7. J. Normanly, R.C. Ogden, S.J. Horvath en J. Abelson, Nature 321, 213-219 (1986).
8. J.G. Belasco, G. Nilsson, A. von Gabain en S.N. Cohen, Cell 46, 245-251 (1986).
- 15 9. U. Schmeissner, K. McKenney, M. Rosenberg en D. Court, J. Mol. Biol. 176, 39-53 (1984).
10. J.E. Mott, J.L. Galloway en T. Platt, EMBO J. 4, 1887-1891 (1985).
- 20 11. D. Koshland en D. Botstein, Cell 20, 749-760 (1980).
12. N.R. Morva, K. Kakamura en M. Inouye, J. Mol. Biol. 143, 317-328 (1980).
13. B.P. Surin, D.A. Jane, A.L. Fimmel, D.C. Shaw, G.B. Cox en H. Rosenberg, J. Bacteriol. 157, 772-778 (1984).
- 25 14. J.G. Sutcliffe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741 (1978).
15. K.W.C. Peden, Gene 22, 277-280 (1983).
- 30 16. N.K. Alton en D. Vapnek, Nature 282, 864-869 (1979).
17. M. Yang, A. Galizzi, en D. Henner, Nuc. Acids Res. 11(2), 237-248 (1983).
18. S.-L. Wong, C.W. Price, D.S. Goldfarb en R.H. Doi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).
- 35 19. P.-Z. Wang, en R.H. Doi, J. Biol. Chem. 251, 8619-8625 (1984).

20. C.-K. Lin, L.A. Quinn, R.L. Rodriguez, J. Cell Biochem. Suppl. (9B), bl. 198 (1985).
21. N. Vasantha, L.D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle en D. Filpula, J. Bact. 159(3), 811-819 (1984).
22. I. Palva, M. Sarvas, P. Lehtovaara, M. Sibazkov en L. Kaariainen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5582-5586 (1982).
23. S.-L. Wong, C.W. Price, D.S. Goldfarb en R.H. Doi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).
24. M.A. Sullivan, R.E. Yasbin, en F.E. Young, Gene 29, 21-46 (1984).
25. N. Vasantha, L.D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle en D. Filpula, J. Bact. 159(3), 811-819 (1984).
26. D.G. Yansura en D.J. Henner, PNAS 81, 439-443 (1984).
27. G.L. Gray, K.A. McKeown, A.J.S. Jones, P.H. Seeburg en H.L. Heyneker, Biotechnology, 161-165 (1984).
28. S. Lory en P.C. Tai, Gene 22, 95-101 (1983).
29. P.V. Liu, J. Infect. Dis. 130 (suppl), 594-599 (1974).
30. D.G. Wood, M.F. Hollinger en M.B. Tindol, J. Bact. 145, 1448-1451 (1981).
31. T.P. St. John en R.W. Davis, J. Mol. Biol. 152, 285-315 (1981).
32. J.E. Hopper en L.B. Rowe, J. Biol. Chem. 253, 7566-7569 (1978).
33. C.L. Denis, J. Ferguson en E.T. Young, J. Biol. Chem. 258, 1165-1171 (1983).
34. L. Lutsdorf en R. Megnet, Archs. Biochem. Biophys. 126, 933-944 (1968).
35. B. Meyhack, N. Bajwa, H. Rudolph en A. Hinnen, EMBO J. 6, 675-680 (1982).
36. M.E. Watson, Nucleic Acid Research 12, 5145-5164 (1984).
37. C. Gerbrand en M. Guerineau, Curr. Genet. 1, 219-228 (1980).

38. A. Hinnen, J.B. Hicks en G.R. Fink, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).

39. M.A. Jabbar, N. Sivasubramanian en D.P. Nayak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2019-2023 (1985).

5 (i) Pseudomonas vectoren

Verscheidene vector plasmiden, die zich automatisch kopiëren in een brede reeks Gram negatieve bacteriën verdienen de voorkeur voor gebruik als klonende dragers in gastheren van het genus Pseudomonas. Sommige
10 hiervan worden beschreven door R.C. Tait, T.J. Close, R.C. Lundquist, M. Hagiya, R.L. Rodriguez en C.I. Kado in Biotechnology, mei 1983, bl. 269-275; N.J. Panopoulos in Genetic Engineering in the Plant Sciences, Praeger Publishers, New York, New York, bl. 163-185 (1981); en N.
15 Sakagucki in Current Topics in Microbiology and Immunology 96: 31-45 (1982), die elk uitdrukkelijk door verwijzing hierin worden opgenomen.

Een bijzonder bevoorkeurde opbouw gebruikt het plasmide RSF1010 en derivaten daarvan, zoals beschreven
20 door M. Bagdasarian, M.M. Bagdasarian, S. Coleman en K.N. Timmis in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, K.N. Timmis en A. Puhler, red., Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979), dat uitdrukkelijk door verwijzing hierin wordt opgenomen. De voordelen van RSF1010
25 zijn, dat het een betrekkelijk klein plasmide met hoog kopieaantal is, dat gemakkelijk wordt getransformeerd in en stabiel wordt gehandhaafd in zowel E.coli als Pseudomonas species. In dit systeem verdient het de voorkeur het Tac expressie systeem te gebruiken zoals beschreven voor
30 Escherichia, daar het blijkt, dat de E.coli trp promotor gemakkelijk wordt herkend door Pseudomonas RNA polymerase, zoals beschreven door K. Sagagucki in Current Topics in Microbiology and Immunology 96: 31-45 (1982) en G.L. Gray, K.A. McKeown, A.J.S. Jones, P.H. Seeburg en H.L. Heyneker,
35 Biotechnology, febr. 1984, bl. 161-165, die beide uitdrukkelijk door verwijzing hierin zijn opgenomen. Transcriptie werking kan verder zo groot mogelijk worden gemaakt door de uitwisseling van de trp promotor te

vereisen met b.v. een E.coli of P.aeruginosa trp promotor. Bovendien wordt ook het lacI gen van E.coli in het plasmide opgenomen om regulering te bewerkstelligen.

Translatie kan worden gekoppeld aan translatie
5 starten voor elk van de Pseudomonas proteïnen, alsmede aan startplaatsen voor elk van de in hoge mate uitgedrukte proteïnen van de gekozen soort om intracellulaire expressie van de inhibitor te veroorzaken.

In die gevallen waarin restrictie minus stammen
10 van een gastheer Pseudomonas species niet beschikbaar zijn, is de transformatie doeltreffendheid met plasmide opbouwen, die zijn geïsoleerd uit E.coli slecht. Daarom is doorvoering van de Pseudomonas klonende vector door een r- m+ stam van een andere species voorafgaand aan transformatie
15 van de gewenste gastheer, zoals beschreven in M. Bagdasarian, Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, bl.411-422, Timmis en Puhler, red., Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979), dat uitdrukkelijk door verwijzing hierin wordt opgenomen,
20 gewenst.

(ii) Bacillus vectoren

Verder omvat een voorkeurs expressiesysteem in gastheren van het genus Bacillus het gebruik van plasmide PUB110 als klonende drager. Zoals in andere gastheer vector
25 systemen, is het mogelijk in Bacillus het CNTF van de onderhavige uitvinding uit te drukken als ofwel een intracellulair of een afgescheiden proteïne. De onderhavige uitvoeringsvormen omvatten beide systemen. Heen en weer gaande vectoren die in zowel Bacillus als E.coli kopiëren
30 zijn beschikbaar voor het opbouwen en testen van verschillende genen, zoals beschreven door D. Dubnau, T. Gryczan, S. Contente en A.G. Shivakumar in Genetic Engineering, vol.2, Setlow en Hollander red., Plenum Press, New York, New York, bl. 115-131 (1980), dat uitdrukkelijk
35 door verwijzing hierin wordt opgenomen. Voor de expressie en afscheiding van het CNTF uit B.subtilis is de signaalreeks van α -amylase bij voorkeur gekoppeld aan het coderingsgebied voor het proteïne. Voor synthese van

intracellulair CNTF wordt de draagbare DNA reeks voor translatie gekoppeld aan de ribosoom bindingsplaats van de α -amylase leiderreeks.

Transcriptie van elk van deze opbouwen wordt bij
5 voorkeur bestuurd door de α -amylase promotor of een derivaat daarvan. Dit derivaat bevat de RNA polymerase herkenningsreeks van de natieve α -amylase promotor, maar bevat tevens de lac operator. Overeenkomstig is aangetoond, dat hybride promotors, die zijn opgebouwd uit de penicil-
10 linase gen promotor en de lac operator, op een regulerende wijze werken in Bacillus gastheren, zoals beschreven door D.G. Yansura en Henner in Genetics and Biotechnology of Bacilli, A.T. Ganesan en J.A. Hoch, red., Academic Press, bl. 249-263 (1984), door verwijzing uitdrukkelijk hierin
15 opgenomen. Het lacI gen van E.coli wordt ook opgenomen in het plasmide om regulering te bewerkstelligen.

(iii) Clostridium vectoren

Een voorkeurs opbouw voor expressie in Clostridium is in plasmide pJU12, beschreven door C.H. Squires c.s. in
20 J. Bacteriol. 159: 465-471 (1984) en hierin uitdrukkelijk door verwijzing opgenomen, dat is getransformeerd in C. perfringens met de werkwijze van D.L. Heefner c.s., zoals beschreven in J. Bacteriol, 159: 460-464 (1984), hierin uitdrukkelijk door verwijzing opgenomen.
25 Transcriptie wordt geleid door de promotor van het gen voor bestendigheid tegen tetracycline. Translatie wordt gekoppeld aan de Shine-Dalgarno reeksen van dit zelfde tet^r gen op een wijze die volledig overeenkomt met de procedures als hierboven beschreven voor vectoren, die geschikt zijn
30 voor gebruik in andere gastheren.

(iv) Gist vectoren

Het handhaven van vreemd DNBA, dat in gist is ingevoerd, kan tot stand worden gebracht op verschillende manieren, zoals beschreven door D. Botstein en R.W. Davis
35 in The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Cold Spring Harbor Laboratory, Strather, Jones en Broach red., bl. 607-636 (1982), dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing is opgenomen. Een voorkeurs expressiesysteem

voor gebruik met gastheer organismen van het genus Saccharomyces huisvest het CNTF gen op het 2 micron plasmide. De voordelen van de micron cirkel omvat betrekkelijk hoog kopie aantal en stabiliteit indien
5 ingevoerd in cir' stammen. Deze vectoren bevatten bij voorkeur de vermenigvuldigingsoorsprong en tenminste een markeerder voor bestendigheid tegen een antibioticum uit pBR322 om vermenigvuldiging en selectie in E.coli mogelijk te maken. Bovendien heeft het plasmide bij voorkeur twee
10 micro reeksen en het gist LEU2 gen om dezelfde doeleinden te dienen in gistmutanten, waarin LEU2 ontbreekt.

Indien beoogd wordt, dat het recombinant CNTF uiteindelijk wordt uitgedrukt in gist, verdient het de voorkeur dat de klonende vector eerst wordt overgebracht in
15 Escherichi coli, waar de vector de gelegenheid krijgt zich te vermenigvuldigen en waaruit de vector kan worden verkregen en gezuiverd na vermenigvuldiging. De vector wordt dan overgebracht in de gist voor uiteindelijke expressie van CNTF.

20 (c) Zoogdiercellen

Het cDNA of genoom DNA, dat CNTF codeert, dient als het gen voor expressie van CNTF in zoogdiercellen. Het dient een reeks te hebben, die doeltreffend is voor het binden van ribosomen, zoals dat, beschreven door Kozak in
25 Nucleic Acids Research 15: 8125-8132 (1987), dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing wordt opgenomen. Het DNA restrictie fragment, dat de DNA reeks draagt, die kodeert voor CNTF, kan worden ingevoerd in een expressievector, die een transcriptiepromotor bevat en een transcriptieverster-
30 ker, zoals beschreven door L. Guarente in Cell 52: 303-305 (1988) en J.T. Kadonaga c.s. in Cell 51: 1079-1090 (1987), die beide hierin uitdrukkelijk door verwijzing worden opgenomen. De promotor kan een reguleerbare zijn, zoals in het plasmide pMSG (Pharmacia Cat. Nr. 27450601) als
35 constitutieve expressie van de inhibitor schadelijk is voor celgroei. De vector dient een volledig polyadenylerings signaal te hebben, zoals beschreven door F.M.Ausubel c.s. in Current Protocols in Molecular Biology, Wiley (1987),

dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing wordt opgenomen, zodat het uit deze vector overgeschreven mRNA juist wordt verwerkt. Tenslotte heeft de vector de vermenigvuldigings- oorsprong en tenminste een markeerder voor bestendigheid
5 tegen antibiotica uit pBR322 om vermenigvuldiging en selectie in E.coli mogelijk te maken.

Teneinde een stabiele cellijn te kiezen, die CNTF vormt, kan de expressievector het gen dragen voor een verkiesbare markeerder, zoals een markeerder voor
10 bestendigheid tegen geneesmiddelen of een complementair gen dragen voor een deficiënte cellijn, zoals een dihydrofoliaat reductase (dhfr) gen voor transformeren van een dhfr⁻ cellijn, zoals beschreven door Ausubel c.s., zie boven. In plaats daarvan kan een afzonderlijk plasme, dat
15 de verkiesbare markeerder bevat, gecotransformeerd worden samen met de expressievector.

Gastheercellen/transformatie

De aldus verkregen vector wordt overgebracht in een geschikte gastheercel. Deze gastheercellen kunnen
20 microorganismen of zoogdiercellen zijn.

(a) Microorganismen

Er wordt aangenomen, dat elk microorganisme, dat het vermogen heeft exogeen DNA op te nemen en die genen en bijbehorende werkzame elementen uit te drukken, kan worden
25 gekozen. Nadat een gastheerorganisme gekozen is, wordt de vector overgebracht in het gastheerorganisme met gebruik- making van in het algemeen de vakman op dit gebied bekende werkwijzen. Voorbeelden van dergelijke werkwijzen kan men vinden in Advanced Bacterial Genetics van R.W. Davis c.s.,
30 Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1980), dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing wordt opgenomen. Het verdient in een uitvoeringsvorm de voorkeur, dat de transformatie plaats vindt bij lage temperatuur, daar temperatuurregulering wordt beoogd als een middel om
35 gen expressie te reguleren door gebruik van werkzame elementen zoals hierboven vermeld. In een andere uitvoe- ringsvorm is, als osmolaire regulatoren in de vector zijn ingevoerd, regulering van de zoutconcentraties tijdens de

transformatie nodig om geschikte controle van de vreemde genen te verzekeren.

Het verdient de voorkeur, dat het gastheer-organisme facultatief anaeroob of aeroob is. Bepaalde gastheren, die de voorkeur genieten voor gebruik in deze werkwijze omvatten gisten en bacteriën. Tot bepaalde gisten behoren die van het genus Saccharomyces, en in het bijzonder Saccharomyces cerevisiae. Tot bepaalde bacteriën behoren die van de genera Bacillus, Escherichia en Pseudomonas, in het bijzonder Bacillus subtilis en Escherichia coli. Verdere gastheercellen worden opgesomd in Tabel I, zie boven.

(b) Zoogdiercellen

De vector kan in zoogdiercellen in kweek worden ingevoerd met verschillende technieken, zoals calciumfosfaat:DNA coprecipitatie, elektroporatie of protoplasmaversmelting. De voorkeurswerkwijze is coprecipitatie met calciumfosfaat, zoals beschreven door Ausubel c.s., zie boven.

Er bestaan vele stabiele celsoorten, die transformeerbaar zijn en in staat zijn tot transcriptie bewerking en translatie van de DNA reeks en het vormen van CNTF proteïne. Celsoorten kunnen echter veranderlijk zijn ten aanzien van glycosylering van proteïnen en post-translatie wijziging van aminozuurgroepen, zo dat voorkomt. Derhalve zijn de ideale celsoorten degene, die een recombinant CNTF vormen, dat identiek is met het natuurlijke molecule.

De gastheercellen worden gekweekt onder omstandigheden, die geschikt zijn voor de expressie van CNTF. Deze omstandigheden zijn in het algemeen specifiek voor de gastheercel, en worden gemakkelijk bepaald door de gewone vakman aan de hand van gepubliceerde literatuur met betrekking tot groeiomstandigheden en de daarin vervatte leer. Bergey's Manual of Determination Bacteriology, 8ste ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore Maryland, dat hierin uitdrukkelijk door verwijzing wordt opgenomen, bevat bijvoorbeeld informatie omtrent omstandigheden voor het

kweken van bacteriën. Dergelijke informatie omtrent het kweken van gist en zoogdiercellen kan worden verkregen uit R. Pollack, Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1975), dat hierin uitdrukkelijk door 5 verwijzing wordt opgenomen.

Alle omstandigheden die nodig zijn voor het reguleren van de expressie van de DNA reeks, afhankelijk van eventuele werkzame elementen, die zijn ingevoerd in of aanwezig zijn in de vector, dienen te zijn vervuld tijdens 10 de transformatie en kweek stadia. In een uitvoeringsvorm worden cellen gekweekt tot een hoge dichtheid in aanwezigheid van geschikte regulerende omstandigheden, die de expressie van de DNA reeks belemmeren. Als optimale dichtheid wordt benaderd, worden de milieu-omstandigheden 15 gewijzigd tot die, geschikt voor expressie van de DNA reeks. Zo wordt aangenomen, dat de vorming van CNTF plaats vindt in een tijdsbestek, dat volgt op de groei van de gastheercellen tot nabij optimale dichtheid, en dat het resultaat wordt geoogst op enig tijdstip nadat de 20 regulerende omstandigheden, die voor zijn expressie nodig zijn, waren veroorzaakt.

In een uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding wordt recombinant CNTF na expressie in een gastheercel of organisme gezuiverd. In een 25 voorkeursuitvoeringsvorm wordt recombinant CNTF gezuiverd na expressie in microorganismen, in het bijzonder E. coli. In een voorkeursuitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding is CNTF aanwezig in zijn biologisch werkzame toestand bij terugwinnen uit de bacteriekweken. In een 30 andere voorkeursuitvoeringsvorm laat men CNTF weer opvouwen om zijn werkzame staat aan te nemen in een bepaalde stap van de zuiveringswerkwijze.

Voor zuivering van het recombinant proteïne wordt bij voorkeur een combinatie van de volgende stappen 35 gebruikt: chromatografische anion uitwisseling (Mono-Q, Mono-S, en/of DEAE-Sepharose), gelpermeatie chromatografie (Superose), chromatoconcentreren (Mono-P), en hydrofobe wisselwerkings chromatografie (octyl- en/of fenyl-

Sepharose).

Het zal duidelijk zijn, dat toepassing van de leer van de onderhavige uitvinding op een bepaald probleem of milieu binnen het kunnen van de gewone vakman ligt aan de hand van de hierin vervatte leer.

De volgende voorbeelden worden verschaft om bepaalde voorkeursvormen van de onderhavige uitvinding toe te lichten en zijn niet beperkend voor de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden gevraagd. Alle in deze Voorbeelden genoemde literatuurplaatsen, die hierin uitdrukkelijk door verwijzing worden opgenomen.

Voorbeeld 1

Proteïnebereiding

Materialen

Heupzenuwen van volwassen konijnen werden verkregen van Pel-Freez Biologicals, Arkansas. Ammoniumsulfaat (extra zuiver) werd gekocht bij Schwartz/Mann Biotech, Cleveland, Ohio. Fenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), epsilon-amionocapronzuur, benzamidine, pepstatine, dithiothreitol (DTT), poly-L ornithine (P3655) en 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromide (MTT) werden verkregen van Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. Mono P chromatocentrerende FPLC kolommen werden verkregen van Pharmacia, Inc., Phillipsburg, New Jersey. Trifluorazijnzuur werd verkregen van Pierce Chemicals, Rockford, Illinois. Endoprotease Asp-N en Lys-C werden verkregen van Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana. Kalverfoetusserum werd gekocht bij Hyclone Laboratories, Logan, Utah. Kweekmedia en zoutoplossingen werden verkregen van Irvine Scientific, Santa Ana, Californië. Kweekschalen werden verkregen van Costar, Cambridge, Massachusetts. Pathogeenvrije vruchtbare kipeembryo eieren van proefkwaliteit werden verkregen van Spafas, Roanoke, Illinois.

B. Test op SN-CNTF

Kweken van primaire ciliaire ganglia van kipeembryo werden bereid zoals eerder beschreven (Collins,

1978, Develop. Biol. 65: 50; Manthorpe c.s., 1986, Develop. Brain Res. 25: 191). Kortgezegd werden ciliaire ganglia verwijderd uit vruchtbare, pathogeenvrije kippeëieren, die van 9-10 dagen bij 38°C waren geïncubeerd in een vochtige
5 omgeving. De ganglia werden chemisch gedissocieerd door ze eerst bloot te stellen aan Hank's Balanced Salt Solution zonder tweewaardige kationen, dat 10 mmol HEPES buffer pH 7,2 bevat, gedurende 10 min bij 37°C, en dan door blootstelling aan een oplossing van 0,125% bactotrypsine
10 1:250 (Difco, Detroit, Michigan) in Hank's Balanced Salt Solution zoals boven gedurende 12 min bij 37°C. Trypinisatie werd gestopt door toevoeging van kalverfoetusserum tot een eindconcentratie van 10%.

Na deze behandeling werden ganglia overgebracht
15 naar een oplossing, die bestond uit Dubelco's sterk met glucose gemodificeerd Eagle medium zonder bicarbonaat, dat 10% kalverfoetusserum en 10 mmol HEPES, pH 7,2 bevat en werden mechanisch ontleed door ongeveer 10 maal tritureren door een glazen Pasteur pipet waarvan de opening in de vlam
20 was gepolijst en was vernauwd tot een zodanige diameter, dat er 2 sec nodig waren om de pipet te vullen.

De gedissocieerde ganglia werden dan op een plaat uitgezet in kweekmedium (Dubelco's gemodificeerd Eagle medium aangevuld met 10% kalverfoetusserum, 4 mmol
25 glutamine, 60 mg/L penicilline-G, 25 mmol HEPES, pH 7,2) in 100 mm diameter weefselkweekschalen (40 gedissocieerde ganglia per schaal) gedurende drie uur. Dit voorplateren werd gedaan om de niet-neurale cellen, die aan de schaal hechten, te scheiden van de zenuwcellen, die niet hechten.
30 Na drie uur werden de niethechtende zenuwcellen verzameld door centrifugeren, opnieuw gesuspenderd in kweekmedium, en op platen uitgezet in 50 µl per putje op microtiter weefselkweekplaten met halfgebied 96 putjes in een dichtheid van 1500 zenuwcellen per putje.. De microtiter
35 putjes waren vooraf een nacht lang bij 4°C blootgesteld aan een 1 mg/l oplossing van poly-L-ornithine in 10 mmol natriumboraat, pH 8,4, gewassen in gedestilleerd water en luchtdroog gemaakt.

Tien μ l van een serieverduunning van het op neurotrofe werking te testen monster werden aan ieder putje toegevoegd en de schalen werden 20 uur bij 37°C geïncubeerd in een vochtige omgeving, die 7,5% CO₂ bevat. Na 18 uur
5 werden 15 μ l per putje van een 1,5 mg/ml oplossing van de tetrazolium kleurstof MTT in Dubelco's sterk met glucose gemodificeerd Eagle medium zonder bicarbonaat, dat 10 mmol HEPES, pH 7,2, toegevoegd en de kweken werden 4 uur teruggezet in de 37°C incubator. Dan werden 75 μ l van een
10 oplossing van 6,7 ml met 12 mol HCl per liter isopropanol toegevoegd, en de inhoud van elk putje werd 30 maal getrittureerd om de cellen open te breken en de kleurstof te suspenderen. De absorptie bij 570 nm werd bepaald ten opzichte van een 690 nm referentie voor elk putje met
15 gebruik van een automatische microtiter plaat aflezer (Dynatech, Chantilly, Virginia). De absorptie van putjes, die niet enig neurotroof middel hadden gekregen (negatieve controle) werd afgetrokken van de absorptie van monster-bevattende putjes. De verkregen absorptie is evenredig met
20 het aantal levende cellen in elk putje, gedefinieerd als die zenuwcellen, die in staat zijn de kleurstof te reduceren. Het aantal trofische eenheden neurotrofe werking werd gedefinieerd als de reciproom van de verdunning, die 50% van maximum overleving van zenuwcellen gaf. De
25 concentratie van trofische werking in trofische eenheden per ml werd verkregen door het totaal aan trofische eenheden te delen door het testvolume (60 μ l). Specifieke werking werd bepaald door het aantal trofische eenheden te delen door de hoeveelheid proteïne, die in het monster
30 aanwezig is.

C. Zuivering van SN-CNTF

Aan het einde van elk van de volgende stappen werd het preparaat ofwel onmiddellijk verwerkt, of bij -70°C opgeslagen tot ten hoogste een week tot gebruik.

35 Stap 1. Bereiding van ruw extract

Een honderd gram (nat gewicht) heupzenuw van konijn (ongeveer 300 zenuwen) werden ontdood en verpulverd met gebruik van een Polytron roterende homogenisator (Kinematica, Zwitserland) gedurende 1 min in 10 volumina.

9020024.'

(gew./vol.) water, dat 10 mmol EDTA, 1 mmol epsilon-aminocapronzuur, 1 mmol benzamidine en 0,1 mmol PMSF bevat, en gecentrifugeerd met 140.000 x g gedurende 30 min bij 4°C. De bovenstaande vloeistof werd gefiltreerd door 5 glaswol om drijvend vet te verwijderen.

Stap 2. Zuurbehandeling en fractionering met ammoniumsulfaat

De centrifugeringsstappen, als onder vermeld, werden uitgevoerd bij 17.000 x g gedurende 20 min en alle 10 bewerkingen werden uitgevoerd bij 4°C tenzij anders vermeld. Het ruwe extract werd gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd aangezuurd met 5N HCl tot pH 3,6 en het verkregen neerslag werd door centrifugeren verwijderd. De bovenstaande vloeistof werd getitreerd tot pH 6,3 met 1N 15 NaOH en het verkregen neerslag werd weer door centrifugeren verwijderd. Aan de bovenvermelde bovenstaande vloeistof werd verzadigde ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd om 30% verzadiging te verkrijgen, en het neerslag werd door centrifugeren verwijderd. Verder toevoegen van 20 ammoniumsulfaat aan de bovenstaande vloeistof om 60% verzadiging te bereiken leidde tot het neerslaan van een proteïne fractie, die het grootste deel van de SN-CNTF werking bevatte. Het neerslag werd opgelost in 20 mmol natrium pH 6,7, dat 1 mmol EDTA, 0,1 mmol PMSF en 0,1 µmol 25 pepstatine bevatte, om een proteïneconcentratie te geven van 8-13 mg/ml.

Stap 3. Chromatocentreren

Het bovenvermelde preparaat werd een nacht lang gedialyseerd tegen een 500-voudig groter volume 10 mmol 30 natriumfosfaat, pH 6,7 met een verwisseling van buffer, en gecentrifugeerd bij 140.000 x g gedurende 30 min. De bovenstaande vloeistof werd door 0,22 µm poriediameter nylon filter geleid en met 3 injecties van elk 2 ml aangebracht op een Mono-P chromatocentrerende FPLC kolom 35 (bedvolume 4 ml), in evenwicht gebracht met 25 mmol bis-Tris-HCl buffer, pH 5,8. De kolom werd gewassen met dezelfde buffer tot de absorptie bij 280 nm van de effluent terugkeerde naar de basislijn. Het monster werd dan

gechromatografeerd met polybuffer, pH 4,0 (1-10 verdunning van PB74 van Pharmacia).

Kolomfracties werden verzameld en geanalyseerd op pH en CNTF werking. Fig. 1 toont de resultaten van chromatografie op Mono-P. Het profiel van geëluëerde proteïnen is uitgezet als de optische dichtheid (O.D.) bij 280 nm. Daarop gesuperponeerd zijn uitzettingen van de pH en SN-CNTF werking, die in elke fractie zijn gemeten. De fracties, aangegeven door de staaf met piek SN-CNTF werking (omstreeks pH 5) werden bijeen gebracht en behandeld met vast ammoniumsulfaat om 95% verzadiging te verkrijgen en de prop werd door centrifugeren verzameld, opnieuw gesuspenseerd in verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing en weer gecentrifugeerd om de polybuffer te verwijderen. Het neerslag werd opgelost in voldoende 10 mmol natriumfosfaat buffer, pH 6,7, om een proteïne eindconcentratie te geven van 3-5 mg/ml (aangeduid als "geconcentreerde fractie"). Karakteristiek werd 1 liter van het oorspronkelijke extract behandeld in 8 afzonderlijke doorlopen op de Mono P kolom.

20 Stap 4. Preparatieve natriumdodecylsulfaat (SDS)
 gel-elektroforese

De geconcentreerde fracties uit verscheidene doorlopen over de Mono P kolom werden gecombineerd en gedialyseerd tegen een 100-voudig groter volume 10 mmol natriumfosfaatbuffer (pH 6,7, gedurende 8 uur met een verwisseling van buffer, dan geleid op een 15% reducerende SDS polyacrylamide gel volgens de werkwijze van Laemmli, 1970. Elk ontwikkelend gel was 0,3 cm dik, 14 cm hoog, en 11,5 cm breed. 5,5 mg proteïne werd op elk gel geladen. Elektroforese werd uitgevoerd bij 15°C en 40 mA/gel tot de 20 kd voorgekleurde mol.gew.standaard net de bodem van het ontwikkelende gel bereikte.

Om de kromming van afzonderlijke proteïnebanden over de breedte van de plat gel te laten zien werd het gel afgedekt met een vel nitrocellulose (0,45 µm poriegrootte in rol vorm, verkregen van Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) voorbevochtigd met water, 2 vellen

voorbevochtigd en 2 vellen droog chromatografiepapier (3MM Chr, verkregen van Whatman, Hillsboro, Oregon), een glasplaat en een 500 ml glazen fles voor gewicht. Na 30-45 min werd de omtrek van het gel op het nitrocellulosepapier
5 opgespoord met gebruik van een in water onoplosbaar merkmiddel. Het papier werd 3 maal gewassen met 10 mmol Tris-HCl buffer, pH 8,0, die 0,15% NaCl en 0,3% NP-40 detergens bevat, en dan gekleurd gedurende 15-30 min met een 1:1000 verdunning van Kohinuor Rapidograph Ink
10 (verkrijgbaar bij kantoorbehoefte winkels) in bovenvermelde buffer.

Het oorspronkelijke gel werd op een glasplaat gebracht en met zijn omtrek uitgelijnd op het gekleurde nitrocellulosepapier onder de glasplaat. Het gebied van het
15 gel, dat overeenkomt met een mol.gew. tussen 22-27 werd gevonden aan de hand van voorgekleurde mol.gew. standaards (BRL, Bethesda, MD) die in smalle banen aan beide einden van elk gel zijn uitgevoerd. Dit gebied werd over de breedte van het gel uitgesneden tot zeven evenwijdige
20 stroken van 2,5 mm met gebruik van de bandkromming als getoond door het gekleurde nitrocellulosepapier. Elke afzonderlijke gel strook werd in kleinere stukken (2,5 x 2 cm) gesneden en proteïnen werden elektroforetisch geëluëerd gedurende 6 uur in een 1:1 verdunning van de Laemmli
25 lopende buffer met gebruik van een elektroforetische concentreerinrichting (ISCO, Lincoln, Nebraska). Geëluëerd proteïne werd verzameld in een volume van 0,2 ml. Fig.2 zet de verdeling uit van neurotrofe werking in het eluaat van elk van de 7 stroken (gemerkt a-g in volgorde van afnemend
30 mol.gew.). De fractie met de hoogste werking (strook d) werd verder gezuiverd met gebruik van omgekeerde fase HPLC.

Stap 5. Omgekeerde fase HPLC

Dithiothreitol (DTT) en 10% trifluorazijnzuur (TFA) werden toegevoegd aan het gel eluaat om
35 eindconcentraties te bereiken van respectievelijk 2% en 0,3%. Het monster werd gefiltreerd door een 0,22 µm nylon filter, geladen op een C8 omgekeerde fase HPLC kolom en geëluëerd met een H₂O/0,1% TFA:acetonitrile/0,1% TFA

gradient. Fracties werden verzameld in met siliconen beklede buizen, die 5 μ l 0,4% Tween 20 detergens bevatten. Monsters van elke fractie werden getest op neurotrofe werking. Proteïneconcentratie wordt aangegeven door
5 absorptie bij 215 nm en de verdeling van neurotrofe werking is gesuperponeerd. Fracties met de piek SDN-CNTF werking (fracties 37-40, Fig.3) werden verenigd voor reeksbeplating zoals beschreven in Voorbeeld 2. In een afzonderlijke bereiding werden fracties nabij en met inbegrip van de piek
10 CNTF werking, overeenkomend met fracties 36-44 in Fig.3, ook geanalyseerd op zilverkleurig reducerend SDS-PAGE (Fig.4).

Twee aanvullende chromatografische stappen zijn ook uitgevoerd. Deze stappen bevestigden de zuiverheid van
15 het bovenvermelde CNTF preparaat.

De twee aanvullende chromatografische stappen gebruiken beide het principe van hydrofobe wisselwerking chromatografie (HIC). De eerste HIC stap is een gebruikelijke kolomchromatografische procedure, ingelast na
20 stap 2: pH en fractionering met ammoniumsulfaat. Het opgeloste materiaal na neerslaan met ammoniumsulfaat werd verder verdund met 10 mmol natriumfosfaatbuffer, pH 6,7 (Buffer B), tot de ionensterkte (gemeten met een geleidingsmeter) gelijk was aan die van Buffer B, die 0,3
25 mol ammoniumsulfaat en 5% isopropanol bevat (Buffer A). Isopropanol werd dan toegevoegd aan het verdunde monster tot een eindconcentratie van 5% en het mengsel werd opgebracht op een fenyl Sepharose CL4B kolom (Pharmacia, Inc., Piscataway, New Jersey), in evenwicht gebracht met
30 Buffer A. Niet meer dan 3 mg monster proteïne werd opgebracht per ml bedvolume van de kolom. Karakteristiek leverde 1 liter ruw heupzenuwextract 50 ml van de weer opgeloste ammoniumsulfaat prop, die dan werd verdund tot 70-100 ml, zoals boven, en werd opgebracht op een 110 ml
35 fenyl sepharose kolom. De kolom werd stapsgewijze geëluëerd beginnende met 3 bedvolumina Buffer A, gevolgd door 3 bedvolumina Buffer B, gevolgd door 2 bedvolumina Buffer B, die 50% ethyleenglycol bevat (Buffer C), dan gewassen met 5

bedvolumina water. Achttien ml fracties geëluëerd materiaal werden verzameld.

Fig.7 toont de resultaten van een dergelijke chromatografische loop. Het profiel van geëluëerde proteïnen werd continu gevolgd met O.D. 280 (getrokken lijn). Gesuperponeerd op de O.D. lijn is het profiel van geëluëerde SN-CNTF biowerkzaamheid in elke fractie (lijn die de x'en verbindt), zoals gemeten in de ciliaire ganglion overlevingstest, beschreven in de oorspronkelijke octrooiaanvraag. SN-CNTF biowerkzaamheid trad uit de kolom tijdens elutie met Buffer C. De kolomfracties, die de massa aan biowerkzaamheid bevatten (aangeduid door de staaf in Fig. 7) werden verenigd en geconcentreerd door drukanalyse met gebruik van een Amicon YM-10 membraan (Amicon Division, W.R. Grace & Co, Danvers, MA) tot ongeveer 1/10 van het oorspronkelijke volume, dat karakteristiek leidde tot een proteïne eindconcentratie van 2,5-3,0 mg/ml. Het concentraat werd gedialyseerd gedurende totaal 6 uur tegen 3 wisselingen van 55-voudig groter volume B. Het gedialyseerde materiaal werd gevoerd door een 0,2 μ m porie diameter Acrodisc filter (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI) en in meervoudige injecties van elk 2 ml geladen op een Mono P chromatoconcentrerende kolom, zoals beschreven in de oorspronkelijke octrooiaanvraag.

Zonder deze HIC kolom stap vereiste 1 liter ruw heupzenuwextract 8 afzonderlijke lopen op de Mono-P chromatoconcentrerende kolom, zoals beschreven in de oorspronkelijke octrooiaanvraag, wegens de beperkte proteïneladingcapaciteit van de kolom. met de toevoeging van de HIC kolomstap kon 1 liter ruw extract worden behandeld in een enkele chromatoconcentrerende loop.

De tweede HIC stap werd ingelast na de oorspronkelijke stap 3: gechromatoconcentreerd op Mono-P. Aan elke 1 ml gechromatoconcentreerd materiaal (met 3-5 mg/ml proteïne) werden 2 ml 50 mmol fosfaatbuffer, pH 6,7, die 15 mol ammoniumsulfaat bevat (Buffer D), toegevoegd. Het mengsel werd dan door een 0,2 μ m poriediameter Acrodisc filter gevoerd en in meervoudige injecties van elk 2 ml

geladen op een Alkyl-Superose HR10/10 FPLC kolom (Pharmacia), in evenwicht gebracht met Buffer D. De kolom werd gewassen met Buffer D tot de absorptie van de effluent bij O.D. 280 terugkeerde tot de basislijn. De kolom werd
5 dan geëluëerd met een 60 ml lineaire gradient, die loopt van Buffer D naar Buffer E (50 mmol fosfaatbuffer, pH 6,7) en 1 ml fracties werden verzameld.

Fig. 8 toont de resultaten van een dergelijke FPLC-HIC kolom-loop. De doorlopende lijn geeft het profiel
10 weer van geëluëerd proteïne, gemeten bij O.D. 280. Gesuperponeerd is een uitzetting van de SN-CNTF biowerking in elke gradientfractie. De fracties, die biowerkzaamheid bevatten (aangegeven door de staaf in Fig. 8) werden verenigd en geconcentreerd in een Centricon-10
15 concentreerinrichting (Amicon) tot 0,5 ml. Het monster werd verdund door toevoegen van 2 ml Buffer B aan het bovenste reservoir en opnieuw concentreren door centrifugeren tot een eindvolume van 0,5 ml. Verdunning en opnieuw concentreren werd 2 aanvullende keren herhaald en het
20 uiteindelijke geconcentreerde monster werd op een reducerende SDS-15% polyacrylamide preparatieve plaat gel zoals boven beschreven gebracht, behoudens dat voorafgaande dialyse niet nodig was.

Fig. 9 vergelijkt de eindzuiveringsstap op
25 omgekeerde fase HPLC in de oorspronkelijke zuiveringsprocedure (bovenste grafiek) en in de zuiveringsprocedure na toevoeging van de twee HIC stappen (onderste grafiek). Elke grafiek laat het profiel zien van geëluëerde proteïnen (getrokken lijn is O.D. 280 en de gesuperponeerde SN-CNTF
30 biowerking (lijn die x'en verbindt). Het is uit de Figuur duidelijk, dat er veel minder verontreinigend proteïne aanwezig is in het monster, dat aan omgekeerde fase HPLC is onderworpen in de nieuwe zuiveringsprocedure. Het is van belang op te merken, dat de specifieke werking van CNTF,
35 dat gevormd is met de nieuwe procedure binnen experimentele fout identiek is met de specifieke werking van CNTF, dat bereid is door de eerdere procedure (Tabel 1), hetgeen er op wijst, dat het met de oorspronkelijke procedure bereide

CNTF, als boven beschreven, tot homogeen werd gezuiverd. Het voordeel van de nieuwe zuiveringsprocedure is, dat 8 liter uitgangsmateriaal nu even gemakkelijk verwerkt kunnen worden als 1 liter bij gebruik van de oorspronkelijke
5 procedure.

Voorbeeld 2

Reeksbepaling van de gezuiverde neurotrofe factor

Fracties met de piek SN-CNTF werking (nrs.37-40, Fig.3) werden verenigd en geconcentreerd tot 50 μ l op een
10 vacuum verdamper centrifuge. Het geconcentreerde monster bevatte 0,14% Tween 20. Het werd verdund met 1% ammoniumbicarbonaat tot een eindvolume van 350 μ l en een nacht bij 37°C lang behandeld met endoprotease Asp-N of endoprotease Lys-C. Het mengsel werd geconcentreerd tot
15 ongeveer 50-100 μ l op een vacuum verdamper centrifuge en via een 1 ml monsterlus geladen op een nauwe porie Agapore RP-300 C8 omgekeerde fase HPLC kolom (Brownlee Labs), 2,1x220 mm, geëluëerd met een H₂O/0,1%TFA:acetonitrile/0,1% TFA gradient. Peptide bevattende fracties werden met de
20 hand verzameld in Eppendorf buizen gebaseerd op de absorptie bij 215 nm. Fig. 5 toont het profiel van geëluëerde peptiden na digestie met endoprotease Lys-C, gevolgd door reductie en carboxymethylering. De aminozuurreeks van de voornaamste peptiden werd bepaald met
25 gebruik van een Applied Biosystems gasfase proteïne reeks bepaler.

Aanvullende aminozuurreeks is verkregen met de splitsingsenzymen chymotrypsine en endoprotease Glu-C (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Deze
30 aanvullende proteïne reeks heeft het mogelijk gemaakt enkele van de bovenvermelde aminozuurreksen aan elkaar te zetten tot grotere peptiden uit overlappende stukken aminozuren. De nieuwe aminozuurreksen en die, verenigd met eerdere reksen, worden hieronder vermeld:

35 H-S-A-L-T-P-H-R-R-E

L-A-R-K-I-R-S-D-L-T A L T E S Y V K-H-Q-G-L-N-K-N-I-N-L-D-S-V-D-G-V-P-M-A

D-Q-Q-V-H-F-T-P-A-E-G

D-G-L-F-E-K-K-L-W-G-L-K-V-L-Q-E-L-S-H-W-T-V

D-L-R-V-I

Voorbeeld 3

Bereiding van antilichamen voor de neurotrofe factor

5 Antilichamen, die reageren met gezuiverd konijne SN-CNTF is bruikbaar voor het doorlopen van expressie verzamelingen teneinde het gen te verkrijgen dat konijne SN-CNTF kodeert. Bovendien worden antilichamen, die zijn biologische werking neutraliseren, gebruikt in intacte
10 dieren, teneinde de biologische rol te bepalen van deze neurotrofe factor.

Om dergelijke antilichamen te bereiden worden synthetische peptiden gesynthetiseerd, die overeenkomen met gebieden van de reeks van SN-CNTF met gebruik van een
15 Applied Biosystems geautomatiseerde proteïne syntheseinrichting. Dergelijke synthetische peptiden zijn covalent gebonden aan het sleutelgat napklink hemocyanine van het dragerproteïne. Het geconjugeerde peptide wordt geïnjecteerd in cavia's in volledig Freund's toevoegsel,
20 met hulpinjecties na 3 en 6 weken in onvolledig toevoegsel. Serum monsters worden van elke cavia genomen en gebruikt in Western vlek tegen gezuiverd SN-CNTF om te bepalen of antilichaam in het serum reageert met het gezuiverde proteïne. Sera, die positief zijn in de Western
25 test worden verder getest op vermogen om de neurotrofe factor te neutraliseren in de voor zuivering gebruikte biotest. Sera, die positief zijn in ofwel de Western of neutralisatie test worden verder als volgt gezuiverd: (1) de sera worden geabsorbeerd met het sleutelgat napklink
30 hemocyanine van het dragerproteïne teneinde tegen dat proteïne gerichte antilichamen te verwijderen, waarna de sera opnieuw worden getest in de bovenvermelde tests; (2) de IgG antilichaam fractie wordt gezuiverd uit het serum met standaard procedures en opnieuw getest in de
35 bovenstaande tests. Deze beide stappen verschaffen een polyklonaal antilichaam, dat zuiver genoeg is om te worden gebruikt om expressieverzamelingen af te tasten teneinde het boodschapper RNA en gen voor SN-CNTF te klonen.

Er werden antilichamen opgewekt in konijnen voor een synthetisch peptide "A", dat overeenkomt met een gedeelte van de aminozuurreeks van konijne SN-CNTF als gegeven in Voorbeeld 2 (E-S-Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N). In dit
5 Voorbeeld worden hieronder werkwijzen nader beschreven. Op affiniteit gezuiverde antilichamen tegen synthetisch peptide A (anti-peptide-A antilichamen) werden bereid door geïmmuniseerd konijne antiserum te leiden over een affiniteitskolom, die covalent gebonden synthetisch peptide
10 A bevat, en dan worden gebonden antilichamen geëluëerd. Het ongefractioneerde immuun antiserum gaf een titer van ong. 10^5 in een ELIZA test met gebruik van met peptide A beklede putjes; het werd gebruikt in een 1:50 eindverdunding voor Western vlek analyse. Het op affiniteit gezuiverde anti-
15 peptide-A antilichaam, bereid zoals hieronder beschreven, werd gebruikt in Western vlek analyse in een eindconcentratie van 80 $\mu\text{g/ml}$.

Er werd aangetoond , dat zowel anti-peptide-A antiserum als op affiniteit gezuiverde antilichamen een
20 wisselwerking vertonen met gezuiverd konijne SN-CNTF met de Western vlek analyse van reducerende SDS-polyacrylamide-gel elektroforese (SDS-PAGE) van gezuiverd CNTF. Pre-immuun serum van hetzelfde konijn vertoonde geen wisselwerking met SN-CNTF onder deze omstandigheden. Monsters van
25 de piek fractie van CNTF uit de laatste HPLC zuiveringsstap (fractie nr. 46, Fig. 9, plaat B) werden in twee gescheiden banen geleid op reducerend SDS-PAGE. Grenzend aan elke baan gezuiverd CNTF was een baan, die mol.gew. markeerproteïnen bevatte. Een van de stukken was zilverkleurig om proteïnen
30 te localiseren (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) en het andere werd onderzocht met Western vlek analyse (Towbin c.s., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 76: 4350) voor proteïnen, die reageerden met de op affiniteit gezuiverde anti-peptide-A antilichamen.

35 De linker afbeelding van banen in Fig.10 laat zien, dat de piek fractie van met omgekeerde fase gezuiverd CNTF bevat twee dicht bij elkaar gelegen proteïne banden, die lopen bij ongeveer 25.000 dalton en van elkaar worden gescheiden door ongeveer 500 dalton op reducerend SDS-

9020024.

PAGE. Als zilvergekleurde gels overbelast worden met gezuiverd CNTF is het dikwijls niet mogelijk de twee banden uit elkaar te halen, zoals in Fig. 4.

De rechter afbeelding van banen in Fig. 10 laat
5 zien, dat deze beide banen worden herkend en gekleurd door op affiniteit gezuiverd anti-peptide-A antilichamen. Deze herkenning is specifiek, daar de niet-verwante markeerproteïnen in de linkse baan van het rechter paar niet worden herkend door de anti-peptide-A antilichamen,
10 ofschoon ze aanwezig zijn in hoge concentratie, zoals aangetoond in de linker zilverkleurige banen (Fig. 10). Het pre-immuun serum van dit zelfde konijn herkent de twee banden van gezuiverd CNTF ook niet. Deze resultaten geven aan, dat er tenminste twee verschillende vormen van CNTF
15 zijn, die met ong. 500 dalton verschillen in mol.gew. op reducerend SDS-PAGE.

Om anti-peptide-A antilichamen te bereiden, werd synthetisch peptide A geconjugeerd aan sleutelgat napklink hemocyanine (KLH) om zijn antigene werking te bevorderen.
20 Voor conjugatie werden 1 mg peptide A en 1 mg KLH (Calbiochem, La Jolla, CA) in 50% glycerol opgelost in 0,5 ml PBS (20 mmol natriumfosfaat buffer, pH 7,4, die 0,15 mol NaCl bevat). 10% glutaaraldehyde werd druppelsgewijs onder mengen toegevoegd tot een eindconcentratie van 1% en met
25 liet het reactiemengsel aan nacht lang onder mengen bij kamertemperatuur staan, verdunde dan tot 5 ml met PBS. Het conjugatie mengsel werd 1:2 geëmulgeerd met volledig Freund's toevoegsel en subcutaan geïnjecteerd in een aantal dorsale plaatsen in twee Nieuw Zeeland witte konijnen met
30 ong. 100 µg peptide A per konijn. Drie weken later kreeg elk konijn een hulpdosis van 50 µg van 50 µg geconjugeerd peptide A in onvolledig Freund's toevoegsel. Daarna werden dergelijke hulpinjecties met tussenpozen van 2 weken toegediend tot het antiserum een titer gaf van tenminste
35 100.000 in een ELIZA test (Tainer c.s., 1984 Nature 312: 127) met gebruik van met peptide A beklede putjes. Sera werden bereid uit bloed, dat werd verzameld uit de oorader 5 weken na de eerste injectie en om de twee weken daarna.

Sera werden bewaard bij -70°C .

Om een peptide affiniteitskolom te bereiden werd peptide A als volgt covalent gebonden aan een chromatografiekolom matrix: aan 8 mg peptide A, opgelost in 0,4 ml PBS, dat 4 mol guanidinehydrochloride bevat, werden 4,5 ml 0,1 mol NaHCO_3 , pH 8,0, en 0,5 mol NaCl toegevoegd. Een gram gevriesdroogd, geactiveerd CH Sepharose 4B (Pharmacia) werd gewassen en opgezwollen in 200 ml 1 mmol HCl en onmiddellijk overgebracht naar de peptide A oplossing. Het mengsel werd een nacht lang bij 4°C geschud. Het gel werd dan gesedimenteerd in een klinische centrifuge en de bovenstaande vloeistof gewonnen voor het bepalen van de hoeveelheid peptide A, die was gekoppeld aan de matrix. Vijftien ml 0,1 mol Tris buffer, pH 8,0, werden toegevoegd aan de gel prop en gedurende 2 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd om ongereageerde koppelingsgroepen op de gelmatrix te blokkeren. Het gel werd dan in een kolom (3 ml bed) gepakt en drie maal gewassen met de volgende buffer serie: (1) 10 bedvolumina 0,1 mol acetaatbuffer, pH 4,0, die 0,5 mol NaCl bevat; (2) 0,1 mol Tris buffer, pH 8,0, die 0,5 mol NaCl bevat. Tenslotte werd de kolom in evenwicht gebracht met PBVS, dat 0,02% natriumazide bevat. Het verschil in de concentratie van vrije aminogroepen werd bepaald in de oorspronkelijke peptide A oplossing en in de bovenstaande vloeistof na conjugatie, met gebruik van fluorescamine (Chen c.s., Anal. Letters 12: 1019). Deze analyse liet zien, dat 92-95% van het peptide uit de oplossing verloren was gegaan en was geconjugeerd aan de Sepharose gelmatrix.

Voorafgaande aan affiniteitszuivering van het anti-peptide-A antilichaam werden 8 ml geïmmuniseerd konijneserum een nacht lang gedialyseerd tegen 2 liter PBS. De peptide A-Sepharose kolom werd achtereenvolgens gewassen met 10 bedvolumina van elk van de volgende: 0,1 mol glycine-HCl, pH 2,5; PBS; 0,1 mol triethylamine, pH 11,5; dan PBS. Het gedialyseerde serum werd drie maal door de kolom gevoerd om volledige binding van anti-peptide-A antilichamen te verzekeren. De kolom werd gewassen met 20

bedvolumina PBS, dan achtereenvolgens geëlueerd met 4
bedvolumina van elk van de volgende: 0,1 mol glycine-HCl,
pH 2,5; PBS; 0,1 mol triethylamine, pH 11,5; dan PBS.
Fracties van 1 ml werden verzameld. De eluaten van de
5 glycine en triethylamine wassingen werden onmiddellijk
geneutraliseerd met 1 mol Tris, respectievelijk pH 9 en 7,
en monsters werden getest op anti-peptide-A antilichaam met
een ELIZA test met gebruik van met peptide A beklede
putjes. De hoogste titer fracties (karakteristiek binnen 3
10 bedvolumina na het begin van glycine en triethylamine
elutie) werden verenigd en gedialyseerd tegen PBS. Na
verwijdering van deeltjesvormig materiaal door kort
centrifugeren, werd de bovenstaande vloeistof van het op
affiniteit gezuiverde anti-peptide-a antilichaam bij -70°C
15 bewaard.

Voorbeeld 4

Klonen van het gen voor SN-CNTF

Het einddoel van het te beschrijven werk is het
humane SN-CNTF gen te klonen en uit te drukken teneinde
20 materiaal te bereiden, dat geschikt is voor gebruik in
humane farmaceutische preparaten. Daar de verkregen peptide
reeksen voor konijne SN-CNTF zijn en humane reeksen
mogelijk niet identiek zijn, is het verstandig eerst
klonen van het konijne gen te verkrijgen via hybridisering
25 met synthetische oligonucleotiden, die gebaseerd zijn op
de proteïne reeks en de konijne klonen te gebruiken als
hybridisatie sonden bij onderzoeken van het humane gen.

Zowel de genoom als boodschapper RNA (mRNA)
reeksen, die konijne en humaan SN-CNTF koderen worden
30 verkregen. Het mRNA reeks is bruikbaar voor uitdrukken van
het proteïne, terwijl de genoom reeks essentieel is om de
structuur en regulering te begrijpen van het gen voor SN-
CNTF. Om deze reeksen te verkrijgen worden zowel konijne
als humane genoom verzamelingen en konijne en humane cDNA
35 verzamelingen, gemaakt uit mRNA, geïsoleerd uit
heupzenuwen, onderzocht. Tijdens het proces van het
verkrijgen van het gen, dat overeenkomt met de reeks van
konijne of humaan SN-CNTF is het ook mogelijk te zoeken

naar structureel nauw verwante genen, die aanvullende leden van deze familie van neurotrofe factoren zijn.

A. SN-CNTF gen

Om de konijne genoom reeksen te isoleren, die
5 SN-CNTF koderen, wordt een konijne genoom verzameling (Clontech) geplateerd op de E. coli nm538 bacteriestam en ongeveer 1.000.000 recombinant klonen worden onderzocht. Gebieden van de proteïne-reeks van konijne SN-CNTF, die kunnen worden weergegeven door het geringste aantal codonen
10 worden teruggetranslateerd en overeenkomstige gedegenereerde oligonucleotide monsters worden gesynthetiseerd. De konijne oligonucleotiden worden gemerkt door kinasering volgens het standaard protocol van Maniatis c.s. (1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold
15 Spring Harbor Laboratory). Het DNA kinase wordt verkregen van US Biochemical Corp. en het gamma gemerkte ATP wordt verkregen van ICN. Oligonucleotiden worden gemerkt op een specifieke werking van tenminste 1.000.000 cmp per picomol.

Bij plateren van de genoom verzameling worden
20 ongeveer 1 miljoen plaques overgebracht op nitrocellulose filters. De filters worden dan bewerkt volgens de werkwijzen van Maniatis c.s. (1982, ibid) en een nacht lang gehybridiseerd met radioactief gemerkte oligonucleotide sonde. De hybridiseringscocktail bevat 6X SSCP, 2X
25 Denhardt's, 0,05% natriumpyrofosfaat, 1 mmol EDTA, 0,1% SDS, 100 µg gist tRNA (Sigma), pH 8,0. De hybridiserings-temperatuur is enige graden beneden de berekende T_m van het oligonucleotide. Klonen, die hybridiseren met verscheidene sonden, gebaseerd op verschillende gebieden van de
30 proteïne-reeks worden van de plaque gezuiverd en de hybridiseringsgebieden worden gerangschikt door didesoxy beëindiging werkwijze (Sanger c.s., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci 74: 5463) met gebruik van Sequenase (US Biochemicals Corp.) teneinde die klonen te identificeren, die de SN-
35 CNTF proteïne-reeks koderen.

B. SN-CNTF mRNA reeksen

Totaal cellulair RNA wordt uit konijne en humane heupzenuwen verkregen. Het weefsel wordt gehomogeniseerd in

een guanidiniumthiocyanaat/ β -mercaptoethanol oplossing en het RNA wordt gezuiverd door sedimentatie door cesiumchloride gradienten (Glison c.s., 1974, Biochemistry 13: 2633). Gepolyadenyleerd RNA wordt geselecteerd door
5 chromatografie op oligo(dT)cellulose (Avid en Leder, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 408). Kwantitatieve RNA vlek hybridisatie analyse wordt uitgevoerd met "antirichting" oligonucleotide monsters om het algemeen voorkomen van SN-CNTF reeksen in elk RNA preparaat te schatten en om
10 daardoor het aantal onafhankelijke klonen te schatten, die men moet onderzoeken om tenminste een 99% waarschijnlijkheid te hebben CNTF klonen te verkrijgen. Voldoende dubbelstrengs complementair DNA wordt gesynthetiseerd, zoals beschreven door Gubler en Hoffman, 1983, Gene 25: 263
15 en ingevoerd in de lambda gem2 vector (Promega Biotech) volgens Palazzolo en Meyerowitz, 1987, Gene 52: 197.

Konijne SN-CNTF dat klonen kodeert, wordt geïdentificeerd door hybridisatie van recombinant faag plaques, zoals boven beschreven. De identiteit van de
20 klonen wordt geverifieerd door bepaling van nucleotide reeksen teneinde overeenkomst te bepalen met de gehele bekende proteïnereeks. Onderzoekingen van de humane heupzenuw cDNA sonden (Feinberg en Vogelstein, 1983, Anal. Biochem. 132: 6), die een betrouwbaarder procedure is voor
25 het opsporen van kruising-species hybridisatie, dan het gebruik van de kleinere oligonucleotiden, die gebruikt worden voor het onderzoek van konijne cDNA verzamelingen.

De polymerase ketting reactie (PCR) (Saiki c.s., 1988, Science 239: 487) werd gebruikt om DNA fragmenten,
30 die overeenkomen met konijne CNTF aminozuurreeksen, te versterken. Dergelijke DNA fragmenten werden versterkt uit humaan en konijne genoom DNA en konijne heupzenuw en sympatisch ganglion cDNA. De versterkte DNA fragmenten werd gesubkloond en gerangschikt met gebruik van standaard
35 technieken (Maniatis c.s., 1982, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York).

De door PCR verkregen DNA fragmenten werden ook gebruikt als sonden om een konijne heupzenuw cDNA

verzameling en een humane genoom verzameling te onderzoeken. De rangschikking van het open leesraam, dat overeenkomt met de koderings (mRNA equivalent) reeks voor konijne of humaan CNTF, bevestigde de reeks van de DNA
5 fragmenten van het met gebruik van PCR verkregen koderingsgebied. De verkregen koderingsreeksen voor konijne en humaan CNTF worden weergegeven in respectievelijk Fig. 11 en Fig. 12.

Delen van de aminozuurreeks, verkregen uit
10 konijne SN-CNTF werden teruggetranslateerd in de gedegenereerde oligonucleotiden nrs. 1, 13, 7 en 12 en hun complementen nrs. 3, 14, 8 en 17. De aminozuurreeks (bovenaan) en de plaats en nummering van de overeenkomstige richting en anti-richting gedegenereerde oligonucleotiden
15 (onder) wordt hieronder gegeven:

Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N-I-N-L-D-S-V-D-G-V-P-M-A
(5') ****1***** ****13***** *****7***** (3')
(3') ****3***** ****14***** *****8***** (5')
K-L-W-G-L-K-V-L-Q-E-L-S
20 (5') ****12***** (3')
(3') ****17***** (5')

De nucleotidereeks van de richtingversie van elk gedegenereerd oligonucleotide wordt hieronder gegeven (waarin N staat voor elk nucleotide):

25 nr.1 5'-TA(T/C) GTN AA (A/G) CA(T/C) CA(A/G) GG -3'
nr.13 5'-AA(T/C) AA(A/G) AA(T/C) AT(A/T/C) AA (T/C)
(C/T)T-3'
nr.7 5'-GA(T/C) GGN GTN CCN ATG GC-3'
nr.12A AA(A/G) TT(A/G) TGG GGN TT(A/G) AA-3'
30 nr.12B AA(A/G) TT(A/G) TGG GGN CTN AA-3'
nr.12C AA(A/G) CTN TGG GGN TT(A/G) AA-3'
nr.12B AA(A/G) CTN TGG GGN CTN AA-3'

Afzonderlijke polymerase kettingreacties werden uitgevoerd met gebruik van ofwel humaan of konijne genoom
35 DNA als mal en oligonucleotiden nrs.1 en 8 of nrs. 1 en 17 als starters, teneinde de overeenkomstige gebieden van de humane en konijne CNTF genen te versterken. Southern vlekken van de reactieprodukten (gesondeerd met

radiogemerkt oligonucleotide nr.13) toonden het bestaan aan van gemerkte banden ong. 66 basisparen (nrs. 1 en 8) en ong. 366 basisparen (nrs. 1 en 17) in grootte.

Dezelfde PCR reacties als boven beschreven werden
5 uitgevoerd met gebruik van cDNA, dat is bereid ofwel uit konijne heupzenuw of konijne sympatisch ganglion mRNA. RNA werd bereid uit konijne heupzenuwen of sympatische ganglia en gevoerd over een oligo-dT kolom of boodschapper RNA (mRNA) te selecteren, zoals boven beschreven. Complementair
10 DNA (cDNA) werd bereid met terugtranscriptase met gebruik van het mRNA als mal en oligo-dT als starter. Als PCR werd uitgevoerd met gebruik van een van de cDNA's als mal en ofwel oligonucleotiden nrs. 1 en 8 of nrs. 1 en 17 als starters, werden fragmenten versterkt, die dezelfde
15 rangschikking hadden als die, versterkt uit het konijne genoom DNA (Fig. 11). Dit geeft aan, dat er geen tussen-gelegen reeksen (intronen) zijn in het proteïne koderingsgebied van het CNTF gen tussen oligonucleotiden nrs. 1 en 17.

20 Een aanvullende strategie werd gebruikt om meer van de koderings (boodschapper RNA equivalent) reeks te verkrijgen voor konijne CNTF: dubbelstrengs cDNA werd bereid met gebruik van konijne heupzenuw mRNA als mal en een oligo-dT/Not I verbindingsadaptor als starter.
25 Vervolgens werd een EcoRI/XmnI-verbindingsadaptor (5'-AATTCGAACCCCTTCG-3') toegevoegd aan het 5'-einde van het dubbelstrengs cDNA door stomp einde ligatie (Maniatis c.s., ibid). De polymerase kettingreactie werd uitgevoerd met gebruik van dit cDNA als een mal en oligonucleotiden
30 nrs.8 en EcoRI/XmnI-verbindingsadaptor als starters. Een Southern vlek van de reactieprodukten (gesondeerd met radiogemerkt oligonucleotide nr. 13) liet het bestaan zien van een gemerkte band van ongeveer 200 basisparen in grootte.

35 Om cDNA klonen te verkrijgen voor konijne CNTF werd een cDNA verzameling bereid uit konijne heupzenuw poly(A)+mRNA met de bovenbeschreven werkwijzen, behoudens het gebruik van een lambda gt10 vector (Stratigene) in

plaats van lambda gem2. Ongeveer 4×10^6 plaques van deze verzameling werden onderzocht met gebruik van een sonde, die was bereid door willekeurig merken van een M13 subkloon van een PCR fragment, dat is verkregen uit konijne
5 sympatisch ganglion cDNA als mal en oligos nr. 8 en EcoRI/XmnI verbindingsadaptor als starters (zie boven).

De afzonderlijke primaire positief werd van plaque gezuiverd door een tertiaire zeef. Bij digestie met Eci RI leverde het DNA van deze kloon drie fragmenten in
10 aanvulling op de lambda armen: ong. 2,0; 1,5 en 0,6 kb in lengte. Met Southern vlek analyse werd aangetoond, dat het 1,5 kb fragment hybridiseert met andere CNTF-specifieke oligonucleotiden en PCR fragmenten als boven vermeld. De DNA reeks van dit 1,5 kb fragment bevestigde, dat deze de
15 gehele koderingsreeks voor konijne CNTF (Fig. 11) bevat.

Om genoom DNA klonen voor humaan CNTF te verkrijgen werden ongeveer 3×10^6 plaques humane genoom DNA verzameling in vector lambda EMBL3 onderzocht met behulp van een sonde, bereid door willekeurig merken van een M13
20 subkloon van een PCR fragment, verkregen uit humaan genoom DNA als mal en oligos nr. 1 en nr. 17 als starters (zie boven). Zes van deze primaire positieven werden van plaque gezuiverd en bleken te hybridiseren tot aanvullende CNTF-specifieke oligonucleotiden en PCR fragmenten. Een 0,6 kb
25 Bam HI restrictiefragment van een van de klonen, die hybridiseren tot oligo nr. 13 werd gesubkloond in met Bam HI-doorgeknipt M13mp19 en gerangschikt.

De DNA reeksen van de door PCR van konijne materiaal uit de konijne cDNA kloon verkregen fragmenten
30 werden gecombineerd vastgezet op gebieden van overlappende rangschikking om de klonende (mRNA equivalent) reeks voor konijne SN-CNTF, weergegeven in Fig. 11, te geven. De DNA reeksen van de door PCR van humaan genoom DNA en uit humane genoom klonen verkregen fragmenten werden gecombineerd
35 vastgezet op gebieden van overlappende rangschikking, waardoor de koderings reeks voor humaan SN-CNTF, weergegeven in Gif. 12, werd verkregen. De konijne en humane nucleïnezuur reeksen voor CNTF zijn ong. 89%

(Fig. 12) identiek, hetgeen er op wijst, dat de konijne en humane reeksen van homologe genen zijn die CNTF koderen. Zoals weergegeven in Fig. 11, worden delen van de nucleïnezuur reeks voor konijne CNTF bevestigd door de
5 aminozuurreeksen, die worden verkregen uit gezuiverd SN-CNTF en vermeld in eerdere voorbeelden.

De polymerase kettingreactie werd uitgevoerd met gebruik van de boven beschreven mallen en starters. Het programma voor de reacties was als volgt:
10 denatureringscyclus, 1 min bij 95°C; temperingscyclus, 1,5 min bij 40°C; en verlengings cyclus, 4 min bij 72°C.
De reactie werd gedurende 30 cycli uitgevoerd. De reactieprodukten werden aan elektroforese onderworpen door 2% agarose gels en overgebracht op Zeta-Bind membranen
15 (Biorad, Richmond, CA) voor Southern vlekken. Om de versterkte gedeelten van de CNTF koderingsreeks te identificeren werden de Southern vlekken gesondeerd met een radiogemerkt oligonucleotide nr. 13, waarvan bekend is uit de CNTF proteïnereeks, dat het ligt tussen de oligo-
20 nucleotiden, die worden gebruikt voor het klonen door herstellen van de uiteinden met Klenow fragment van het DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) in aanwezigheid van alle vier dNTP's en kinaseren van het DNA met T4 polynucleotide kinase (US Biochemical Corp.,
25 Cleveland, OH) en ATP. De geschikte DNA species werden daarna gesubkloond in M13mp10 SmaI-doorgeknijpte vector (gedefosforyleerd; in de handel verkrijgbaar bij Amersham Corp., Arlington Heights, IL). De recombinant fagen, die het van belang zijnde fragment bevatten, werden
30 geïdentificeerd met de Benton & Davis (1977, Science 196: 180) onderzoekswerkwijze met gebruik van radiogemerkt oligonucleotide nr. 13 als een sonde. Deze recombinant klonen werden opgekweekt om voldoende hoeveelheden enkelstrengs DNA te verkrijgen voor reeksvorming en werden
35 daarna gerangschikt met de didesoxy ketenbeëindigingswerkwijze (Sanger c.s., *ibid*).

De hybridiseringsomstandigheden als lange, willekeurig gemerkte DNA sonden werden gebruikt, waren

5X SSCP, 2X Denhardt's, 2 mmol EDTA, 0,05% natrium-pyrofosfaat, 0,1% natriumdodecylsulfaat (SDS), 250 µg/ml haringsperma DNA (niet-specifieke mededinger), pH 8,0. Hybridisering werd uitgevoerd bij 65°C en vlekken of
5 filters werden bij 65°C gewassen in 0,1X SSCP en 0,1% SDS. De hybridiseringsomstandigheden voor kortere oligonucleotide sonden waren 6X SSCP, 2X Denhardt's, 2 mmol EDTA, 0,05% natriumpyrofosfaat, 0,1% SDS, 100 µg/ml gist tRNA (niet-specifieke mededinger), pH 8,0. De temperatuur
10 voor de hybridisering en de omstandigheden voor het wassen van vlekken en filters werden afzonderlijk ingesteld voor het GC gehalte van elk oligonucleotide (Maniatis c.s., ibid).

Voorbeeld 5

15 Expressie van genen, die SN-CNTF in diercellen koderen

Diercel expressie van SN-CNTF heeft de volgende stappen nodig:

- a. Opbouw van een expressievector;
- b. Keuze van een gastheer cellijn;
- 20 c. Invoering van de expressievector in gastheer-cellen; en
- d. Manipuleren van recombinant gastheercellen om expressiegehaltes van SN-CNTF te verhogen.

(a) SN-CNTF expressievectoren, die zijn ontworpen
25 om te worden gebruikt in diercellen, kunnen van verschillende soort zijn, waaronder sterk regelende expressie opbouw, induceerbare gen opbouw, alsmede die, ontworpen voor expressie in bepaalde celsoorten. In alle gevallen worden promotors en andere gen regulerende
30 gebieden, zoals bevorderaars (al dan niet induceerbaar) en polyadenyleringssignalen op de geschikte plaats ten opzichte van de cDNA reeksen in vectoren op plasmidebasis geplaatst. Twee voorbeelden van dergelijk opbouwen volgen:
(1) een opbouw met gebruik van een sterk regelend
35 promotorgebied wordt gemaakt met gebruik van de apevirus 40 (SV40) gen regelsignalen in een zodanige opstelling als gevonden in het plasmide pSV2CAT, zoals beschreven door Gorman c.s. in Mol. Cel. Biol. 2: 1044-1051, 1982, dat

hierin uitdrukkelijk door verwijzing wordt opgenomen.

Dit plasmide dient op zodanige wijze zo worden gemanipuleerd, dat het het SN-CNTF cDNA vervangt voor de chlooramfenicol acetyltransferase (CAT) koderingsreeksen met gebruik van standaard moleculair biologische technieken (Maniatis c.s., zie boven).

(2) Een induceerbare genopbouw dient te worden gemaakt met gebruik van het plasmide PMK, dat het muize metallothionine (MT-1) promotor gebied bevat (Brinster c.s., Cell 27: 228-231, 1981). Dit plasmide kan worden gebruikt als een uitgangsmateriaal en dient te worden gemanipuleerd om een metaal-induceerbare gen opbouw te verschaffen.

(b) Een aantal diercellijnen dient te worden gebruikt om SN-CNTF uit te drukken met gebruik van de boven beschreven vectoren om werkzaam proteïne te vormen. Twee mogelijke cellijnen, die goed gekenmerkt zijn op hun vermogen om vreemd gen expressie te bevorderen zijn muize Ltk⁻ en Chinese hamster ei (CHO) dhfr⁻ cellen, ofschoon expressie van SN-CNTF niet beperkt is tot deze cellijnen.

Diercellijnen, die gebruikt kunnen worden voor expressie in aanvulling op de boven genoemde omvatten de apeniercel COS-7, die bruikbaar is voor tijdelijke expressie, en de humane embryo niercel 293.

(c) Vector DNA dient in deze cellijnen te worden ingevoerd met gebruik van een aantal genoverdracht technieken. De hier gebruikte werkwijze omvat de calciumfosfaat-DNA neerslagtechniek, beschreven door S.L. Graham en A.S. van der Eb (Virology 52: 456-467, 1973) waarin de expressie vector voor SN-CNTF wordt gecoprecipiteerd met een tweede expressievector, die een markeerder naar keuze kodeert. In het geval van Ltk⁻ celoverdracht is de markeerder naar keuze een thymidine kinase gen en de keuze geschiedt, zoals beschreven door Wigler c.s. in Cell 16: 1777-785, 1979 en in het geval van CHO dhfr⁻ cellen is de markeerder naar keuze dihydrofoliaat reductase (DHFR), waarvan de selectie geschiedt zoals beschreven door Ringold c.s. in J. Mol. Appl. Genet. 1: 165-175, 1981.

(d) Cellen, die de SN-CNTF genopbouw uitdrukten, dienen dan te worden gekweekt onder omstandigheden, die het produktiepeil van SN-CNTF verhoogt. Cellen, die de metallothionine promotor opbouw dragen, kunnen nu worden
5 gekweekt in aanwezigheid van zware metalen, zoals cadmium, hetgeen leidt tot een 5-voudig verhoogde benutting van de MT-1 promotor (Mayo c.s., Cell 29: 99-108) hetgeen vervolgens leidt tot een overeenkomstige toename in SN-CNTF proteïnegehalten. Cellen, die SN-CNTF expressie-
10 vectoren bevatten (hetzij op SV40- of Mt-1 basis), samen met een DHFR expressievector, kunnen door het gen vermenigvuldigingsprotocol worden gehaald, dat wordt beschreven door Ringold c.s. in J. Mol. Appl. Gent. 1: 165-175, 1981, met gebruik van methotrexaat, een mededingende
15 antagonist van DHFR. Dit leidt tot meer kopieën van de in de cellen aanwezige DHFR genen en begeleidend, meer kopieën van de SN-CNTF gene, hetgeen op zijn beurt ertoe kan leiden dat meer SN-CNTF proteïne door de cellen wordt gevormd.

Een aanvullende expressievector pCMVXVPL2 werd
20 gebruikt om de koderingsreeks voor konijne CNTF voorbijgaand uit te drukken in COS-7 cellen. Deze plasmidevector bevat de cytomegalovirus (CMV) onmiddellijke vroege promotor en bevorderaar zoals beschreven door Boshart c.s. (Cell 41: 521-530, 1985) Dit plasmide kan
25 opgebouwd zijn zoals weergegeven in Fig. 13. Het polyadenyleringssignaal wordt verschaft door apegvirus 40 (SV40) reeksen (kaartcoördinaten 2589-2452; zie Reddy c.s., Science 200: 494-502, 1978). De SV40 kopieeroorsprong is in dit plasmide opgenomen om zijn gebruik in COS cellen te
30 vergemakkelijken voor voorbijgaande expressieproeven.

Konijne SN-CNTF werd als volgt voorbijgaand uitgedrukt in COS-7 cellen: het 1,5 kb Eco RI restrictiefragment van een konijne heupzenuw cDNA kloon, die het gehele koderingsgebied voor konijne SN-CNTF
35 (Voorbeeld 4) bevat, werd gesubkloond in de met Eco RI doorgeknipte expressievector pCMVXVPL2. Een enkele kloon werd uitgekozen, die restrictiefragmenten gaf, na digestie met Sac I en Bam HI, die van de voorspelde grootte waren

voor het invoeren van het 1,5 kb fragment in de vector in de juiste orientatie voor CNTF expressie. Plasmide DNA uit deze opbouw werd bereid met de werkwijze van alkalische lysis, gevolgd door CsCl dichtheids centrifugeren (Maniatis
5 c.s., ibid). Dit DNA werd overgebracht in COS-7 cellen met de werkwijze van Sompayrac en Danna (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 78: 7575-7578, 1981). Als een controle werden equivalente COS celkweken overgeënt met plasmide vector DNA zonder inlas.

10 Acht en veertig uur na overenten werden het bovenstaande medium en celproppen geoogst. Celproppen werden geëxtraheerd door korte geluidsbehandeling op ijs in 20 mmol natriumfosfaat, pH 6,7. dat 1 mmol EDTA, 0,1 mmol PMSF en 0,1 μ mol pepstatine bevat. Serie verdunningen
15 van zowel het celextract als het overliggende medium van elke kweek werden getest op werking in de ciliaire ganglion overlevingstest.

De celextracten uit kweken die waren overgeënt met vector, die het CNTF cDNA fragment bevat, hadden een titer
20 van ong. 15.000 TU/ml in de biotest en ongeveer 50 ng/ml CNTF, zoals bepaald met Western vlek analyse. Noch de celextracten uit met vector alleen geënte kweken, noch het overliggende medium van enige kweek vertoonde enige waarneembare biowerking of CNTF proteïne met Western vlek
25 analyse. Dit resultaat laat duidelijk zien, dat het CNTF cDNA, dat we gekloond hebben, een proteïne kodeert met de verwachte biowerking van authentiek SN-CNTF.

Voorbeeld 6

Zuivering van SN-CNTF uit recombinante diercellen

30 Daar verwacht wordt, dat SN-CNTF wordt gesynthetiseerd door cellen, zoals natuurlijk materiaal, wordt verondersteld, dat de boven beschreven werkwijzen voor het zuiveren van het natuurlijke proteïne een dergelijke zuivering en kenmerking van het recombinante proteïne
35 toelaat.

Het zal de vakman duidelijk zijn, dat verschillende modificaties en varianten gemaakt kunnen worden in de werkwijzen en produkten van de onderhavige

uitvinding. Het is derhalve de bedoeling, dat de onderhavige uitvinding de modificaties en varianten van deze uitvinding omvat, vooropgesteld, dat ze binnen het kader van de bijgaande conclusies en hun equivalenten 5 vallen. Het is ook de bedoeling, dat de uitdrukking SN-CNTF alle oorsprongen van species omvat, tenzij de uitdrukking onmiddellijk wordt voorafgegaan door een bepaalde oorsprong van species.

Voorbeeld 7

10 Bereiding van recombinant humaan CNTF

Als een uitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding werd een systeem voor het vormen van recombinant humaan CNTF gevestigd in de bacterie Escherichia coli. Twee alternatieve werkwijzen voor het opbouwen van het DNA, dat 15 moet worden uitgedrukt, en twee verschillende expressievectoren werden gebruikt. Al deze verschillende expressiesystemen vormen oplosbaar CNTF proteïne in hoge opbrengst, dat biologisch werkzaam is in het bacteriecel extract. De werkwijzen voor het tot stand brengen van deze 20 produktiesystemen worden hieronder beschreven. Denk in hetgeen volgt er aan, dat de positie van een kenmerk dat tussen haken wordt vermeld (b.v. [233]) betrekking heeft op het aantal van basen waarna het kenmerk begint stroomafwaarts van de A[1] in het ATG begincodon in de humane 25 koderingsreeks voor CNTF (Fig. 12).

1. Bereiding van DNA voor de expressie van CNTF

Strategie 1 voor het opbouwen van het 5'-einde (Fig. 14): het humane genoom DNA kloon voor CNTF in faag lambda EMBL3 uit Voorbeeld 4 werd verwerkt met de restrictieënzymen Sal 30 I en Hind III en een 4,3 kb fragment werd gezuiverd met gel, dat de CNTF koderingsreeksen bovenstrooms van de Hind III plaats [233] bevatte. Dit 4,3 kb fragment bevat ook een enkel, ongeveer 1,3 kb intron [114-115] in de koderingsreeks. Om expressie in bacteriecellen mogelijk te 35 maken werd het intron verwijderd door plaatsgerichte mutagenese in vitro met gebruik van een synthetisch oligonucleotide. zoals beschreven door J.A. McClary, F. Whitney, J. Geisselsoder (1989) Biotechniques 7: 282-289.

A. Intron verwijdering door plaatsgerichte mutagenese met gebruik van faagmide vector en genetische selectie

Plaatsgerichte mutagenese werd uitgevoerd om het
5 ong. 1,3-kb intron te verwijderen in het 4,3-kb Sal I/Hind
III DNA fragment, dat gesubkloond is in een faagmide
vector, Bluescript SK M13(-) (Strategene). Deze vector werd
gekozen daar hij de grote afmeting (ong. 4,3 kb) van de
SII/HindIII inlas kan opnemen. Faagmide vectoren zijn
10 plasmide vectoren, die het bacteriofaag f1 intergene gebied
bevatten, dat winning als enkelstrengs DNA mogelijk maakt.
Bovendien hebben faagmide vectoren een aantal voordelen
boven de enkelstrengs M13 bacteriofaag vectoren. Daar
faagmiden minder dan de helft zo groot zijn dan M13
15 vectoren, die de voorkeur geven aan inlassen met een
grootte van minder dan ong. 2,3 kb, kunnen grotere inlassen
gemakkelijker in faagmiden worden gesubkloond en kansen op
spontane verwijderingen worden verminderd. Een ander
voordeel is, dat de inlassen kunnen worden gerangschikt
20 rechtstreeks van dubbelstrengs superhelix DNA, waardoor hun
kenmerking wordt vereenvoudigd.

Mutagenese werd uitgevoerd met gebruik van het
Muta-Gene in Vitro Mutagenesis set van Biorad. De
gastheercel voor voorbereiding van de mal voor mutagenese
25 is de E. coli stam CJ236 (Genotype: dut, ung, thi, rel A1,
pCJ105 [cap^r]). CJ236 draagt een F'-factor, die uit
chlooramfenicol kan worden gehaald, waardoor het winnen van
enkelstrengs faagmide DNA mogelijk wordt met gebruik van
een geschikte hulpfaag, R408, die in het onderhavige werk
30 wordt gebruikt. Het gewonnen enkelstengs faagmide DNA is
partieel gesubstitueerd met uracil, tengevolge van de dut
(dUTPase) en ung (uracil N-glycolase) mutaties in CJ236.
Mal DNA, gesubstitueerd met uracil, en gebruikt voor
mutagenese, wordt selectief afgebroken bij transformatie in
35 gastheercellen, die wilde soort ung plaatsen, zoals DH5 α in
dit geval, bevatten, waardoor voorkeurskopieëring van het
nieuw gesynthetiseerde gemuteerde DNA mogelijk wordt.

Om mutagenese uit te voeren, werd het met gel

gezuiverd 4,3-kb SalI/HindIII fragment geligeerd in met SalI/HindIII verwerkt en met gel gezuiverd Bluescript SK M13(-). Het geligeerde DNA werd ingevoerd in CJ236, dat geschikt was gemaakt met Hanahan's werkwijze, zoals
5 beschreven in J. Mol. Biol. 166: 557 (1983). Transformanten werden geselecteerd op platen, die 50 µg/ml ampicilline bevatten (om op het faagmide te selecteren) en 30 µg/ml chlooramfenicol (om te selecteren op retentie van de F'-factor. Transformanten werden gecontroleerd op de
10 aanwezigheid van de juiste inlas door analyse met restrictie enzym van transformant DNA's. Een transformant, die de juiste inlas (pSHM-D19) bevat, werd gebruikt in volgende mutagenese proef.

Enkelstrengse mal van pSHM-D19 werd gewonnen met
15 gebruik van faag R408 als helperfaag. CJ236, dat pSHN-D19 bevatte, werd gekweekt in Luria bouillon, die ampicilline (50 µg/ml) en chlooramfenicol (30 µg/ml) bevatte, tot een A₆₀₀ van ong. 0,3. Cellen werden geïnfecteerd met R408 helperfaag in een infectievelvoud van 20, daarna geschud
20 bij 37°C gedurende 8-14 uur. Enkelstrengse mal werd geëxtraheerd uit gewonnen faagmiden.

Plaatsgerichte intron verwijdering mutagenese werd uitgevoerd met gebruik van een 71-base Oligonucleotide (Oligonucleotide 1 in Fig. 16). Oligonucleotide 1 heeft
25 basen 1-30 aanvullend op de koderingsstreng onmiddellijk benedenstrooms (3') en basen 31-37 aanvullende op de koderingsstreng onmiddellijk bovenstrooms (5') van het uit het CNTF genoom DNA te verwijderen intron. Voor gebruik in mutagenese reacties werd het oligonucleotide gefosforyleerd
30 met gebruik van T4 polynucleotide kinase. Mutagenese reacties met gebruik van de BioRad MutaGene set werden uitgevoerd volgens de richtlijnen van de fabrikant, behoudens dat DNA uit mutagenese reacties werd gebruikt om E.coli stam DH5α te transformeren. Verwijderingsmutanten
35 werden gekenmerkt door restrictieënzym in kaart brengen van de DNA's en DNA reeksen van dubbelstrengs DNA's uit mutanten met de geschikte restrictiekaarten. pMCN-21 was een mutant, die op juiste wijze minus het verwijderde

intron was, in het Bluescript faagmide.

B. Reconstructie van het 5' einde van het CNTF gen voor expressie

Het 5' einde van de CNTF koderingsreeks werd
5 gereconstrueerd teneinde bepaalde veranderingen aan te
brengen, die de gekodeerde aminozuurreeks niet wijzigen,
maar waarvan verwacht wordt dat ze de doelmatigheid van
expressie in bacteriën verhogen. De gedeeltelijke over-
lapping, complementaire oligonucleotiden 2 en 3 (Fig. 16)
10 werden gesynthetiseerd, op gel gezuiverd, en aan elkaar
gekoppeld. Oligonucleotide 2 kodeert voor de aminozuren,
die aanwezig zijn in humaan CNTF bovenstrooms van de Nhe I
plaats [66]. De koderingsreeks van oligonucleotide 2 bevat
verscheidene basen, die verschillen van degene, die
15 aanwezig zijn in het humane gen (vergelijk Fig. 12 en Fig.
16). Deze veranderingen werden gemaakt ofwel om het humane
koderingsgebruik te wijzigen in dat, bij voorkeur gebruikt
door E. coli (volgens de Boer en Kastelein in From Gene to
Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene
20 Expression (1986) Davis en Reznikoff, red., bl. 225-283,
Butterworths, NY) of om een Bgl II plaats te vormen (Fig.
16), die in de reeks is geplaatst voor gemakkelijke nadere
genetische manipulaties. Oligonucleotide 2 kodeert ook voor
een translatiekoppelaar naar het 5' einde (Fig. 16) om
25 doeltreffende translatie te bevorderen. Gekoppelde
oligonucleotiden 2 en 3 hebben een Bam HI overhang aan het
5' einde en een Nhe I overhang aan het 3' einde voor
gemakkelijke navolgende ligatie en klonen (Figs. 14 & 16).
Een restrictieënzym onderzoek van de DNA reeks van het
30 humane gen toonde een uitzonderlijke NheI herkenningsreeks
[66] (Fig. 12). Daarom werden oligonucleotiden 2 & 3
gemaakt met een Nhe I overhang om ze in staat te stellen te
worden gebonden aan het resterende 3' fragment van het gen
na digestie met Nhe I.

35 C. Binden van oligonucleotiden 2 & 3 aan de van
intron ontdane koderingsreeksen

Oligonucleotiden 2 & 3, die het herbouwde amino-
einde van het CNTF gen bevatten, werden aan elkaar

gekoppeld en geligeerd aan met Nhe I doorgeknipt pMCN-2a. Geligeerd DNA werd dan behandeld met Bam HI en Hind III om het DNA fragment vrij te maken, dat wordt aangeduid als CNTF-Syn1, dat DNA reeksen bevat, die geschikt zijn voor
5 expressie in E.coli en humaan CNTF bovemstrooms van de Hind III plaats [233] koderen.

Strategie 2 voor opbouw van het 5' einde (Fig.15):

Een andere strategie werd uitgevoerd, waarin het intron niet werd verwijderd door plaatsgerichte mutagenese,
10 maar in plaats daarvan een volledig synthetische DNA reeks werd bereid, die kodeert voor CNTF bovenstrooms de Hind III plaats [233], maar zonder het intron. Om deze synthetische DNA opbouw te vormen, werden oligonucleotiden 5 tot en met
15 werden gemaakt om gedeeltelijk overlappende, dubbelstrengs paren te vormen: 5&6, 7&8, 9&10. Elk dubbelstrengs paar bevat enkelstrengs overhangen, bestemd om ligatie met elkaar mogelijk te maken in de volgorde 5&6-7&8-9&10. De oligonucleotiden werden op gel gezuiverd, gekoppeld en met
20 elkaar geligeerd tot een enkel 261 basis paar dubbelstrengs DNA oligonucleotide, aangeduid als CNTF-Syn2. Dit synthetische DNA bevatte ook: (1) gewijzigde codonen die zijn aangepast aan E. coli codongebruik voorkeuren (vergelijk Figs. 12 en 17); (2) de hierboven gebruikte 5'
25 translatiekoppelaar (Fig. 16 en 17); en (3) een 5' Bam HI overhang en een 3' Hind III overhang om ligatie en klonen te vergemakkelijken (Fig. 17).

Bereiding van het 3' einde van de expressie

Opbouw (Fig. 14 of 15): Het humane genoom DNA
30 CNTF kloon in faag lambda EMBL3 uit Voorbeeld 4 werd geknipt met het restrictieënzym Hind III en een 2,1-kb fragment werd op gel gezuiverd, dat de CNTF koderingsreeksen benedenstrooms van de Hind III plaats [233] bevatte. Dit 2,1-kb fragment werd gekloond in met
35 Hind III geknipt plasmide pEMBL8 (Dente c.s., 1983, Nucleic Acids res. 11: 1645). Een Spe I plaats [613] werd ingevoegd in het 1,2-kb inzet DNA met door oligonucleotide geleide mutagenese 13 basisparen benedenstrooms van het stopcodon,

dat de CNTF reeks beëindigt, met gebruik van het synthetische Oligonucleotide 4 (Fig. 16). Het gemuteerde plasmide werd geknipt met Hind III en Spe I om het benedenstroomse koderingsfragment vrij te maken, dat op gel 5 werd gezuiverd en wordt aangeduid als CNTF-Syn3 (bevat de koderingsreeksen voor humaan CNTF benedenstrooms van de Hind III plaats [233]).

Bereiding van de volledige expressie opbouw

CNTF-Syn1 werd geligeerd aan CNTF-Syn3 om CNTF-Syn1/3 (Fig. 14) te vormen en CNTF-Syn2 werd geligeerd aan CNTF-Syn3 om CNTF-Syn2/3 (Fig. 15) te vormen teneinde twee alternatieve DNA fragmenten te bouwen, die elk koderen voor humaan CNTF en geschikte modificaties van de DNA reeks hebben om doeltreffende expressie in E.coli te bevorderen. 15 Deze DNA fragmenten werden dan uitgedrukt in E.coli na te zijn gesubkloond in: (A) een bacteriële expressievector, pT5T, gebaseerd op de T7 faagpromotor); of (B) een bacteriële expressie vector, pT3XI-2, gebaseerd op een hybride lactose en tryptofaan operon promotor ('Tac').

20 2. Expressie van CNTF met gebruik van een expressievector, gebaseerd op het "T7 promotor" systeem (Zie Fig. 17 voor kenmerken van de vector):

A. Beschrijving van pT5T

25 De op T7 promotor gebaseerde expressievector pT5T is in hoofdzaak dezelfde als pJU1003, beschreven door Squires c.s., J. Biol. Chem. (1988) 263: 16297-16302, behoudens dat er een kort stuk DNA is tussen de unieke Bgl II plaats 5' naar de T7 promotor en de Cla I plaats in het 30 gen voor bestendigheid tegen tetracycline. De reeks van dit DNA is:

ATCGATGATA AGCTGCAAA CATGAGAATT GAGCTCCCCG GAGATCCTTA
GCGAAGCTA

Cla I

35 AGGATTTTTT TTAGATCT

Bgl II

B. Opbouw van de volledige expressievector

De op gel gezuiverde vector werd lineair gemaakt

met Bam HI en Spe I restrictieënzymen. CNTF-Syn1/3 werd gemengd met de lineair gemaakte vector en geligeerd om de expressieopbouw pT5T:CNTF-Syn1/3 te vormen. (zie Fig. 14 voor de algemene opzet van vectoropbouw).

- 5 C. Expressie van recombinant humaan CNTF in E.coli
pT5T:CNTF-Syn1/3 werd getransformeerd in de E.coli stam BL21 (DE3) voor expressie. Deze stam, beschreven in Studier en Moffat, J. Mol. Biol. (1986), 189: 113-130, bevat het T7 RNA polymerase gen onder controle van de door
10 IPTG induceerbare lac promotor op een niet-uitsnijdbare lysogene lambda bacteriofaag. Van 10 onderzochte transformanten werd gevonden, dat twee klonen een IPTG-induceerbaar proteïne uitdrukken, waarvan het mol.gew. beweegt in het traject, dat geschikt is voor CNTF (ong.
15 24kD). Deze twee klonen zijn aangeduid als pT5T:CNTF-Syn1/3-5a en 5c. DNA rangschikking van pT5T:CNTF-Syn1/3-5a en 5c bevestigde dat de reeksen van de recombinanten juist waren.

Hoge graad expressie van recombinant CNTF werd
20 bereikt door de cellen in Luria bouillon te kweken met 15 µg/ml tetracycline tot een cel dichtheid, die overeenkomt met een A_{600} van 0,5-0,8. Cellen werden gekweekt gedurende 1,5-4 uur, hetzij zonder IPTG ("niet-geïnduceerd") of met IPTG toegevoegd tot een eindconcentratie van 1,0 mmol
25 ("geïnduceerd"). IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) is een opwekker van het lac operon, welks aanwezigheid er toe dient te leiden tot directe activering van het T7 polymerase van de expressievector en verhoogde gehalten van CNTF.

- 30 D. Analyse van uitgedrukt proteïne door SDS polyacrylamide gel elektroforese, gevolgd door kleuren met Coomassie kleurstof of immunovlekken

Cellen werden geoogst door kort centrifugeren en
35 direct opgelost in SDS-polyacrylamide gel monster buffer (0,025% broomfenol blauw, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 0,0625 mol Tris-HCl, pH 6,8) en gedurende 2 min gekookt (Fig. 20 en Fig. 21). In cellen,

die waren getransformeerd met pT5T:CNTF-Syn1,3-5a en geïnduceerd met IPTG gedurende 2 uur (baan 5, Fig. 20), is een band, die donker gekleurd is met Coomassie kleurstof, die loopt op de plaats, die wordt verwacht voor CNTF (ong. 24kD). Als de cellen worden gekweekt zonder IPTG (baan 4, Fig. 20), is er veel minder van deze band, zoals te verwachten voor een proteïne, waarvan de expressie wordt beheerst door het lac operon. Cellen, getransformeerd met pT5T vector zonder een CNTF inzet, vertonen deze band niet, zij het geïnduceerd (baan 3, Fig. 20) of niet-geïnduceerd (baan 2, Fig. 20). Baan 1 bevat mol.gew. standaarden.

Als identiek SDS-polyacrylamidegel werd overgebracht op nitrocellulose en immunogevlekt werd met door affiniteit gezuiverde antilichamen voor CNTF peptide A (E-S-Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N). In cellen, die zijn getransformeerd met pT5T:CNTF-Syn1,3-5a en zijn geïnduceerd met IPTG gedurende 2 uur (baan 5, Fig. 21) wordt een dichte band herkend door de door affiniteit gezuiverde antilichamen voor CNTF peptide A en lopen op de plaats, die wordt verwacht voor CNTF (ong. 24kD). Als de cellen worden gekweekt zonder IPTG (baan 4, Fig. 21), is er veel minder van deze band. Cellen, die getransformeerd zijn met pT5T vector zonder een CNTF inzet vertonen deze band niet, zij het geïnduceerd (baan 3, Fig. 20) of niet-geïnduceerd (baan 2, Fig. 20). Baan 1 bevat mol.gew. standaarden.

Verder werden cellen, die getransformeerd waren met pT5T:CNTF-Syn1,3-5a en geïnduceerd met IPTG gedurende 2 uur, opengebroken door drie maal doorleiden door een French drukcel. Een monster van het ruwe cel lysaat werd gescheiden in bovenstaande vloeistof en prop fracties door centrifugeren met 20.000 rpm in een JA-20 rotor (Beckman) gedurende 15 min. Monsters van het ruwe lysaat, bovenstaande vloeistof en prop fracties, die dezelfde hoeveelheid uitgangs celsuspensie vormen, werden ook gevoerd op hetzelfde SDS polyacrylamide gel, overgebracht op nitrocellulose en immunogevlekt met door affiniteit gezuiverde anti-peptide-A antilichamen. De bovenstaande vloeistof van het lysaat (baan 8, Fig. 21) bevatte veel

meer immunoreactief CNTF, dan de lysaatprop (baan 9, Fig. 21). Het CNTF gehalte van de bovenstaande vloeistof was vergelijkbaar met dat van het ongefractioneerde lysaat (baan 7, Fig. 21).

5 E. Biowerking van uitgedrukt CNTF

Cellen, die waren geoogst door kort centrifugeren, werden opnieuw gesuspenseerd in 20 mmol Tris-HCl, pH 8,2 op 1/35 van het oorspronkelijke volume celsuspensie, opengebroken door drie maal doorgang door een French drukcel, en het ruwe cellysaat werd gescheiden in bovenstaande vloeistof en prop fracties door centrifugeren met 20.000 rpm in een JA-20 rotor (Beckman) gedurende 15 min. Serie verdunningen van de bovenstaande vloeistof fractie van de cel werden getest op hun vermogen het overleven te bevorderen van ciliaire ganglion zenuwcellen (zoals beschreven in Voorbeeld 1). De bovenstaande vloeistof vertoonde aanmerkelijke biowerking tot aan een verdunning van 1:1.000.000 (Fig. 22). De specifieke werking van recombinant humaan CNTF werd geschat ongeveer 275/TU/ng te zijn, gebaseerd op biowerking en op de hoeveelheid CNTF proteïne, geschat uit immunovlekken. Deze specifieke werking is ongeveer twee maal de specifieke werking van het gezuiverde konijne CNFT proteïne. hetgeen er op wijst, dat het recombinant CNTF biologisch werkzaam is in het bacteriecel extract. Cellysaten, die zijn getransformeerd met pT5T zonder een CNTF inzet, vertoonden geen waarneembare biowerking.

De bovenstaande vloeistof werd ook onderworpen aan elektroforese op een 15% polyacrylamide reducerend SDS gel en in 1 mm dikke plakken gesneden, die een nacht lang werden geëxtraheerd in celweekmedium bij 4°C onder schudden en biologisch werden getest, zoals beschreven in Voorbeeld 1. De inzet bij Fig.22 laat zien, dat er een piek van de biowerking is bij fracties, die overeenkomen met 24kD, zoals verwacht voor CNTF.

F. Aminozuurreeks van uitgedrukt CNTF

Het gebied rond 24kD werd uit een SDS polyacrylamide gel gesneden, net zo als voor dat,

uitgevoerd voor Fig. 20, maar zonder kleuring met Coomassie. Dit materiaal werd gerangschikt door Edman afbraak in een Applied Biosystems Protein Sequencer (zoals beschreven in Voorbeeld 2). De volgende aminozuurreeks werd

5 verkregen:

AFTEHSPLTPHRRDL[?]S... . Het vraagteken staat voor een C in de humane reeks (Fig. 12), die met deze werkwijze niet kan worden vastgesteld. Deze reeks stemt overeen met die, verwacht voor humaan CNTF (Fig. 12) en verschaft aanvullend
10 bewijs, dat CNTF juist wordt uitgedrukt. Het geeft ook aan, dat het amino-eindstandige methionine tijdens expressie wordt verwijderd, met achterlating van het alanine als het amino-eindstandige aminozuur in het uitgedrukte proteïne.

De bovenstaande resultaten laten zien, dat
15 immunologisch kruis-reactief CNTF in hoge gehalten is uitgedrukt in een biologisch werkzame vorm, waarvan het meeste oplosbaar is na lysis van de bacteriecellen.

3. Expressie van CNTF met gebruik van een
expressievector, gebaseerd op een hybride
20 lactose en tryptofaan operon promotor ('Tac')
systeem (zie Fig. 19 voor kenmerken van de vector).

A. Beschrijving van pT3XI-2 (wijziging van
pKK223-3)

25 Het uitgangsplasmide voor deze opbouw was plasmide pKK223-3, gekocht bij Pharmacia. Plasmide pKK223-3 draagt een partieel gen voor bestendigheid tegen tetracycline. Dit niet-functionele gen werd vervangen door een volledig gen voor bestendigheid tegen tetracycline, gedragen op plasmide
30 pBR322. Plasmide pKK223-3 werd volledig verwerkt met Sph I en gedeeltelijk met Bam HI. Een 4,4 kb paar fragment werd op gel gezuiverd en gecombineerd met een synthetische adaptor met de reeks:

5' GATCTAGAATTGTCATGTTTGACAGCTTATCAT 3'
35 3' ATCTTAACAGTACAACTGTCGAATAGTAGC 5'

en een 539 basepaar fragment van DNA uit een Cla I, Sph I verwerking van het tegen tetracycline bestendige gen van pBR322 (PL Biochemicals, 27-4891-01). Het verkregen plasmide werd aangeduid met pCJ1.

9020024.

plasmide werd aangeduid met pCJ1.

Vervolgens werd een Xho I verbinder, gekocht bij New England Biolabs, in plasmide pCJ1 op de Pvu II plaats ingevoerd om plasmide pCJX-1 te vormen. Deze invoeging 5 verbreekt het rop gen, dat het kopiegetal van het plasmide regelt. Een Eco RI fragment, dat het lac 1 gen bevat, werd gezuiverd uit plasmide pMC9 [Calos c.s., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80: 3015-3019], daarna ingevoegd in de Xho I plaats met Xho I in Eco RI adaptors met de reeks:

10 5' TCGAGTCTAGA 3'
 3' CAGATCTTTAA 5'

De reeks van de meervoudige verbinder tussen de Eco RI en Pst I plaatsen in plasmide pKK-223-3 werd vervolgens vervangen door een hier weergegeven reeks van 15 een meervoudige verbinder:

 5' AATTCCTGGG TACCAGATCT GAGCTCACTA GTCTGCA 3'
 3' GGGCCC ATGGTCTAGA CTCGAGTGAT CAG 5'

De zo verkregen plasmidevector wordt aangeduid als pCJXI-1

Tenslotte werd het tegen tetracycline bestendige 20 gen vervangen door een dergelijk gen, waarvan de herkenningsplaatsen voor restrictieënzymen Hind III, Bam HI en Sal I waren vernietigd door bisulfiet mutagenese. De volgende procedure werd gebruikt om het tegen tetracycline bestendige gen van pBR322 te muteren. Plasmide pBR322 werd 25 geknipt met Hind III, dan gemutageneerd met natriumbisulfiet [Shortle en Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 5: 2170-2174]. Het gemutageniseerde DNA werd geligeerd om cirkelvormig DNA te vormen, dan geknipt met Hind III om elk plasmide lineair te maken, dat aan 30 mutagenese was ontkomen. E.coli JM109 (Yanisch-Perron c.s., Gene (1985) 33: 103-119] werd getransformeerd met het plasmide, dan geplateerd op selectieve media. Plasmiden werden geïsoleerd uit tegen tetracycline bestendige kolonies en gecontroleerd op verlies van de Hind III plaats 35 in het tegen tetracycline bestendige gen. Het met goed gevolg gemuteerde plasmide werd aangeduid als pT1. Een dergelijke procedure werd gevolgd om de Bam HI plaats in pT1 te mutagenen, waardoor plasmide pT2 werd verkregen.

Plasmide pT2 werd op zijn beurt gemutageneerd om de Sal I plaats te verwijderen, waardoor plasmide pT3 werd gevormd. Een Cla I/Bsm I fragment van pT3, dat het gemuteerde, tegen tetracycline bestendige gen draagt, werd geïsoleerd en
5 gebruikt om het overeenkomstige fragment van pCJXI-1 te vervangen om pT3XI-2 te vormen. Het gemuteerde tegen tetracycline bestendige gen kodeert nog een functioneel proteïne.

10 C. Vorming van pT3XI-2- Φ 10TC3FGFsyn (bereiding van de tac promotor voor CNTF)

Aan het begin werd een "gen" voor essentiële fibroblast groeifactor (bFGF) gesynthetiseerd. Dit "gen" kodeert voor dezelfde reeks als dat, beschreven voor FGF door Sommer c.s. (1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 141:
15 67), maar gebruikte de codonen, die bij preferentieel worden gevonden in sterk uitgedrukte genen in E.coli. De structuur van dit gen is zodanig, dat het koderende gedeelte wordt voorafgegaan (zie Squires c.s., 1988, *ibid*) om doeltreffende start of translatie te verzekeren.

20 Het FGF synthetische gen werd eerst ingevoegd in M13mp18 tussen de Eco RI en Hind III plaatsen en gerangschikt. De structuur van het gen is:

AATTCAGGA TCCGATCGTG GAGGATGATT AAATGGGTAC CATGGCTGCT
GGCTCCATCA

25 GTCCT AGGCTAGCAC CTCCTACTAA TTTACCCATG GTACCGACGA
CCGAGGTAGT

EcoRI BamHI RBS FCFstart

Translatiekoppelaar 3

30 CTACCCTGCC GGCAC TGCCG GAAGACGGTG GCTCCGGTGC TTTCCCGCCG
GGCCACTTCA

GATGGGACGG CCGTGACGGC CTTCTGCCAC CGAGGCCACG AAAGGGCGGC
CCGGTGAAGT

35 AAGACCCGAA ACGTCTGTAC TGTA AAAACG GTGGCTTCTT CCTGCGTATC
CACCCGGATG

TTCTGGGCTT TGCAGACATG ACATTTTTC CACCGAAGAA GGACGCATAG
GTGGGCCTAC

GTCGTGTCGA CGGCGTACGT GAAAAAGCG ACCCGCACA TCAAAC TGCA
GCTGCAGGCTG

CAGCACAGCT TGCCGCATGC ACTTTTTTCC TGGGCGTGT AGTTTGACGT
CGACGTCCGAC

5

AAGAACGTG GTGTTGTATC TATCAAAGGC GTTTGCGCAA ACCGTTACCT
GGCTATGAAAG

TTCTTGACAC CACAACATAG ARAGTTTCCG CAAACGCGTT TGGCAATGGA
CCGATACTTTC

10

AAGACGGTC GTCTGCTGGC TAGCAAATGT GTAAC TGACG AATGTTTCTT
CTTCGAACGTC

TTCTGCCAG CAGACGACCG ATCGTTTACA CATTGACTGC TTACAAAGAA
GAAGCTTGACG

15

TGGAAAGCA ACAACTACAA CACCTACCGT TCTCGTAAAT ACACTTCTTG
GTACGTTGCTC

ACCTTTCGT TGTTGATGTT GTGGATGGCA AGAGCATTTA TGTGAAGAAC
CATGCAACGAG

20

TGAAACGTA CCGGCCAGTA CAAACTGGGT TCCAAACTG GCCCGGGTCA
GAAAGCAATCC

ACTTTGCAT GGCCGGTCAT GTTTGACCCA AGGTTTGTAC CGGGCCCAGT
CTTTCGTTAGG

25

TGTTCTGCG CGATGAGCGC TAAATCTTAA ACTAGTA

ACAAGGACG GCTACTCGCG ATTTAGAATT TGATCATTCGA

FGFstop HindIII

Relevante kenmerken van het gen zijn onderstreept.

30

Het werd dan geïsoleerd door verwerking met Bam HI
en Hind III en ingevoegd in met Bam HI/Hind III geknipt
pJU1003 (Squires c.s., 1988, ibid), hetgeen pJU1001003-
synFGF levert. Dit plasmide werd geknipt met Xba I en Hind
III en het Xba/Hind III fragment, dat het FGF gen draagt,
35 werd geïsoleerd. Dit fragment werd geligeerd in pT3XI-2,
geknipt met Eco RI en Hind III, met gebruik van een Eco RI-
Xba 1 verbinder:

5' pATT TCC ACA ACG GTT TCC CT 3'
3' GG TGT TGC CAA AGG GAG ATCp 5'

Het nieuwe plasmide wordt als pT3XI-2- Φ 10TC3FGFSyn aangegeven.

5 D. Invoeging van CNTF expressie opbouwen in de Tac promotor vector

pT3XI-2- Φ 10TC3FGFSyn werd geknipt met Bam HI en Spe I, hetgeen leidde tot de linearisatie van de 7,4 kb expressievector en de vrijmaking van het ong. 0,5-kb FGF DNA fragment. In afzonderlijke reacties werden CNTF-Syn1/3 en CNTF-Syn2/3 geligeerd in het op gel gezuiverde, met Bam HI/Hind III geknipte vector DNA fragment, hetgeen leidt tot het plasmide pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 en pT3XI-2:CNTF-Syn2/3.

15 E. Expressie in E.coli

pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 werd getransformeerd in een tegen faag bestendige E.coli K-stam, JM107. Veertien transformanten werden gekweekt en geanalyseerd op CNTF expressie door SDS polyacrylamide gel elektroforese en 20 kleuren met Coomassie Brilliant Blue. Vier transformanten vertoonden een donkergekleurde band op ongeveer de plaats van CNTF. Hoge graad expressie van recombinant CNTF werd bereikt door de cellen te kweken in Luria bouillon met 15 μ g/ml tetracycline tot een celdichtheid, die overeenkomt 25 met een A_{600} van 0,8. IPTG werd toegevoegd tot een eindconcentratie van 1,0 mmol en de cellen liet men twee uur groeien. Deze vier transformanten vertoonden allen ongeveer dezelfde dichtheid van CNTF op zowel met Coomassie gekleurde en immunovlek gels. Het schijnbare graad van CNTF 30 expressie in deze transformanten, gebaseerd op deze gels, was ongeveer een vierde van die, vertoond door pT5T:CNTF-Syn1/3-5a, gekweekt als eerder met tetracycline. Zeven ml van deze celsuspensie worden toegevoegd per 50 ml Luria bouillon in grote kolven en bij 37°C gekweekt onder 35 schudden tot de A_{600} ongeveer 0,5 bereikt. Dan wordt 0,5 mmol eindwaarde IPTG toegevoegd om expressie van CNTF op te wekken, en groei werd voortgezet tot de A_{600} ongeveer 1,2 bereikt, hetgeen karakteristiek 4-6 uur vergt. De cellen

worden geoogst door centrifugeren met een JA-20 rotor bij 7000 rpm gedurende 5 min bij 4°C en nog een keer gewassen door centrifugeren in 50 mmol fosfaatbuffer, pH 8,0 (Buffer A) bij 4°C. De bovenstaande vloeistof wordt verwijderd en de celplaat wordt bij -20°C bevroren als een pasta.

De celpasta wordt gesuspenderd in Buffer B [Buffer A, die 1 mmol EGTA (ethyleenglycol-bis(β-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraazijnzuur) en 1 mmol EDTA (ethyleendiaminetetraazijnzuur)] met 0,5 g pasta per ml buffer bij 4°C en drie maal door een French drukcel gevoerd op de bacteriën op te breken. Polyethyleenimine (PEI) wordt toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,25% en gedurende 30 min bij 4°C geschud. Het neerslag wordt verwijderd door centrifugeren gedurende 15 min bij topsnelheid in een Microfuge. Deze stap vermindert karakteristiek het gehalte aan nucleïnezuur, zoals gemeten door de verhouding van A_{260}/A_{280} , van ongeveer 25% tot minder dan 5%.

Het monster werd dan aangebracht op een kolom van Q-Sepharose (Pharmacia), in evenwicht gebracht met Buffer B. CNTF is een zo dominerend bestanddeel in het French geperste cel lysaat, dat het kan worden gevolgd tijdens chromatografie door met Coomassie Brilliant Blue gekleurde SDS-polyacrylamide gels van kolomfracties. CNTF is een met Coomassie gekeurde hoofdband bij ongeveer 24kD. Met gebruik van deze test wordt CNTF uit de Q-Sepharose kolom in Buffer B gewassen.

De uitgewassen fracties, die de massa aan CNTF proteïne bevatten, worden verenigd, gedialyseerd tegen Buffer C (5 mmol fosfaatbuffer, pH 8,0, dat 1 mmol EGTA en 1 mmol EDTA bevat) en aangebracht op een Q-Sepharose kolom, in evenwicht gebracht met Buffer C. De kolom wordt gewassen in Buffer C tot de A_{280} terugkeert naar de basislijn, hetgeen er op wijst, dat niet-hechtende proteïne uit de kolom zijn gewassen. In Buffer C bindt CNTF aan de Q-Sepharose kolom en wordt dan verdund met een 0-0,1 mol NaCl gradient in Buffer C. CNTF komt uit de kolom bij ongeveer 40 mmol NaCl en is meer dan 90% zuiver, zoals beoordeeld aan met Coomassie gekleurde SDS-polyacrylamide gels van de

piek CNTF fracties.

5

10

15

20

25

30

35

9020024.'

C o n c l u s i e s :

- 5 1. Een vrijwel zuivere proteïne heupzenuw ciliaire
neurotrofe factor (SN-CNTF), m e t h e t k e n -
m e r k , dat deze een specifieke werking heeft van meer
dan 25.000 maal groter dan de specifieke werking van het
natuurlijke heupzenuw extract.
- 10 2. Een vrijwel zuivere proteïne heupzenuw ciliaire
neurotrofe factor (SN-CNTF), m e t h e t k e n -
m e r k , dat deze een specifieke werking heeft van meer
dan 2×10^8 TU/mg.
- 15 3. Een vrijwel zuivere proteïne konijneheupzenuw
ciliaire neurotrofe factor (SN-CNTF).
4. Een vrijwel zuivere proteïne humane heupzenuw
20 ciliaire neurotrofe factor (SN-CNTF).
5. Een vrijwel zuivere proteïne heupzenuw ciliaire
neurotrofe factor (SN-CNTF), die een proteïne bevat, m e t
h e t k e n m e r k , dat dat:
- 25 (a) een mol.gew. heeft van ongeveer 25.000 op SDS-
PAGE;
(b) een specifieke werking van meer dan 2×10^8
trofische eenheden per mg;
(c) bestendigheid van de biologische werking tegen
30 SDS en reducerende middelen.
6. Een vrijwel zuivere proteïne heupzenuw ciliaire
neurotrofe factor (SN-CNTF), m e t h e t k e n m e r k ,
dat deze een enkele proteïnespecies bevat.
- 35 7. Werkwijze voor het zuiveren van heupzenuw ciliaire
neurotrofe factor (SN-CNTF), uit heupzenuw extract, m e t
h e t k e n m e r k , dat men het zenuwextract preparaat

onderwerpt aan een zuurbehandeling en een ammoniumsulfaat-fractionering;

het aan zuurbehandeling en ammoniumsulfaat-fractionering onderworpen preparaat chromatoconcentreert;

5 het preparaat op SDS-PAGE gel laat lopen; en
omgekeerde fase HPLC uitvoert.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het
kenmerk, dat men, voorafgaande aan genoemde stappen
10 van het preparaat op een SDS-PAGE gel laten lopen,
aanvullende zuiveringsstappen uitvoert, waaronder:

hydrofobe wisselwerking chromatografie tussen
ammoniumsulfaat fractionering en chromatoconcentratie; en

FPLC hydrofobe wisselwerking chromatografie tussen
15 chromatoconcentreren en preparatieve SDS-PAGE.

9. De nucleïnezuurreeks, die konijne SN-CNTF kodeert,
als weergegeven in Fig. 11.

20 10. De aminozuurreeks van konijne SN-CNTF, als
weergegeven in Fig. 11.

11. De nucleïnezuurreeks, die humaan SN-CNTF kodeert,
als weergegeven in Fig. 12.

25

12. De aminozuurreeks van humaan SN-CNTF, als
weergegeven in Fig. 12.

13. Een recombinant diercel expressiesysteem voor het
30 vormen van biologisch werkzaam CNTF.

14. Een bacteriecel expressiesysteem voor het vormen
van biologisch werkzaam CNTF.

35 15. CNTF van conclusie 4, met het kenmerk,
dat genoemd CNTF os bereid met recombinant DNA
werkwijzen.

16. Recombinant DNA werkwijze voor het bereiden van CNTF, met het kenmerk, dat men
- (a) een DNA reeks bereidt, die in staat is een gastheercel op te dragen een proteïne met CNTF werking te vormen;
 - (b) de DNA reeks kloont in een vector, die in staat is te worden overgebracht in en te worden vermenigvuldigd in een gastheercel, welke vector werkzame elementen bevat, die nodig zijn om de DNA reeks uit te drukken;
 - (c) de vector, die de synthetische DNA reeks en werkzame elementen bevat, overbrengt in een gastheercel, die in staat is het voor CNTF koderende DNA uit te drukken;
 - (d) de gastheercellen kweekt onder omstandigheden, die geschikt zijn voor de vermenigvuldiging van de vector en expressie van CNTF; en
 - (e) CNTF oogst; en
 - (f) CNTF een werkzame tertiaire structuur laat aannemen, waardoor het CNTF werking bezit.
17. Werkwijze volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat genoemd DNA kodeert voor de aminozuurreeks van humaan CNTF.
18. Werkwijze volgens conclusie 17, met het kenmerk, dat genoemde DNA reeks de nucleïnezuren bevat, die aanwezig zijn in CNTF-Syn1/3.
19. Werkwijze volgens conclusie 17, met het kenmerk, dat genoemde DNA reeks de nucleïnezuren bevat, die aanwezig zijn in CNTF-Syn2/3.
20. Werkwijze volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat genoemd DNA kodeert voor een fysiologisch functioneel CNTF, dat een DNA reeks bevat, die kodeert voor een polypeptide met een aminozuurreeks, die voldoende overeenkomt met CNTF om tenminste een van de biologische eigenschappen van CNTF te hebben.

21. Werkwijze volgens conclusie 16, met het
kenmerk, dat genoemde gastheercel een microorganisme
is.

5 22. Werkwijze volgens conclusie 21, met het
kenmerk, dat genoemd microorganisme E.coli is.

23. Werkwijze volgens conclusie 16, met het
kenmerk, dat genoemde gastheercellen zoogdiercellen
10 zijn.

24. Werkwijze volgens conclusie 23, met het
kenmerk, dat genoemde zoogdiercellen cavia eicellen
zijn.

15

25. Vrijwel zuiver recombinant CNTF.

20

25

30

35

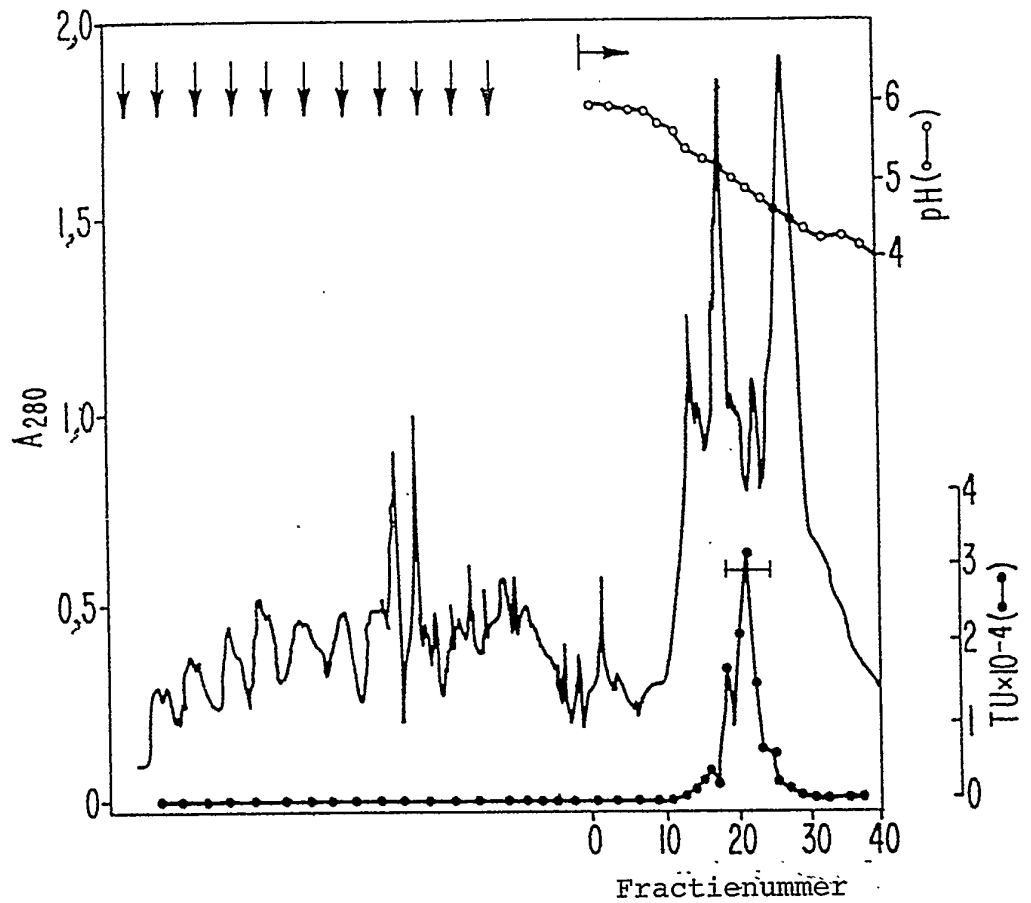
9020024.

U I T T R E K S E L

Geclaimed wordt een ciliaire neutrofore factor (CNTF), in
het bijzonder heupzenuw CNTF (SN-CNTF). De Hierin beschreven
SN-CNTF is een enkele proteïnespecies en bezit een
5 specifieke werking die toeneemt tot meer dan het 25.000-
voudige van het ruwe extract. Aminozyur gegevens voor deze
SN-CNTF worden eveneens verstrekt. Aanvullend worden
eveneens werkwijzen voor het gebruik van deze gegevens
verstrekt voor het verschaffen van SN-CNTF sonden en voor
10 het aftasten van cDNA en genoom verzamelingen. Recombinant-
DNA werkwijze voor het vervaardigen van SN-CNTF worden
beschreven. Nucleïnezyur-reeksen voor het koderen van
konijn- en humaan-CNTF worden verschaft.

9020024.

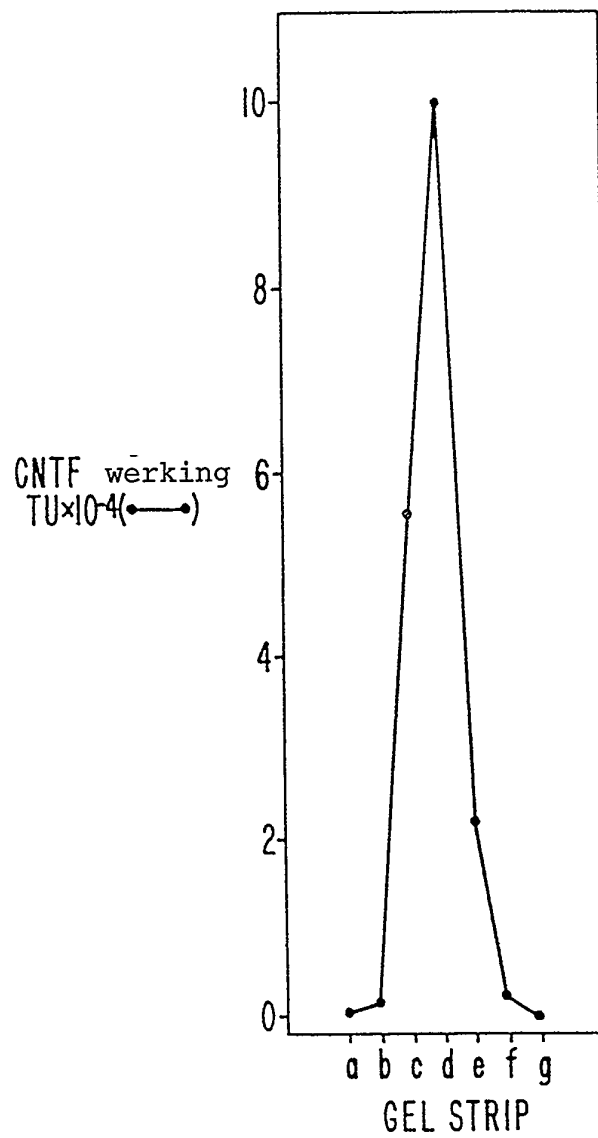
FIG. 1



- ↓ monsterinjectie
- begin elutie met polybuffer
- absorptie bij 280 nm
- pH
- CNTF werking in TU
- ┌─┐ fracties, verenigd voor verdere analyse

2/22

FIG. 2



9020024.

FIG. 3

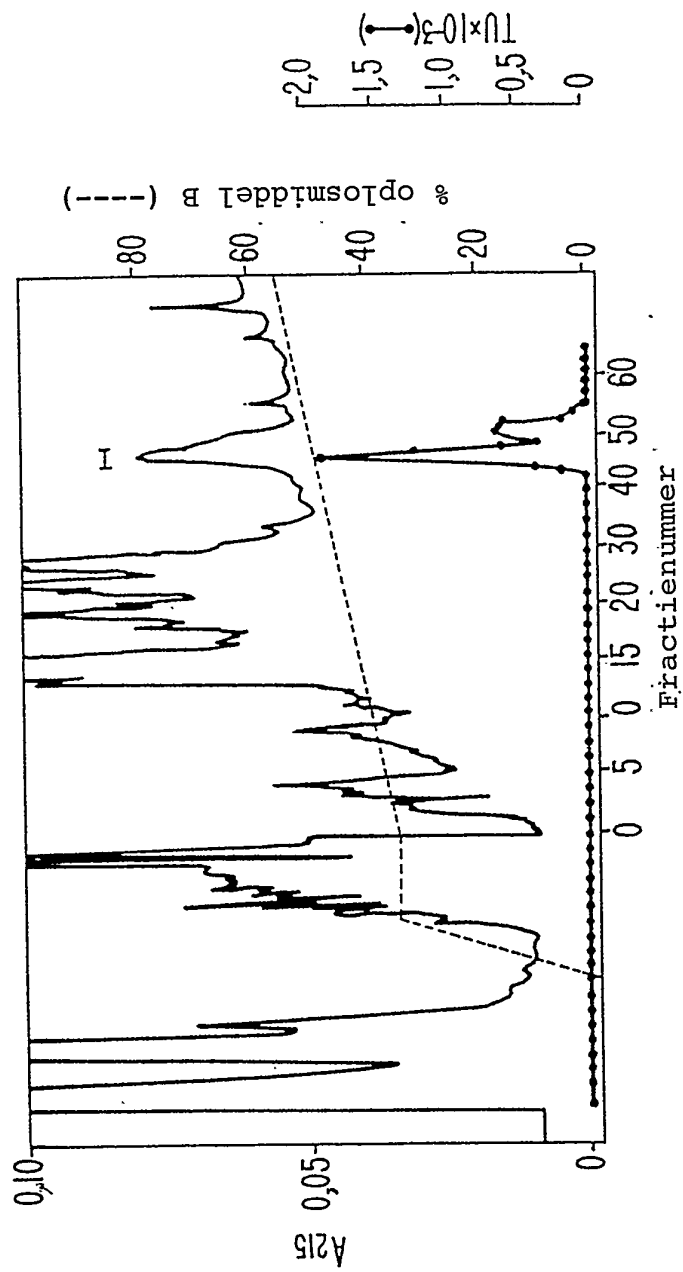


FIG. 4

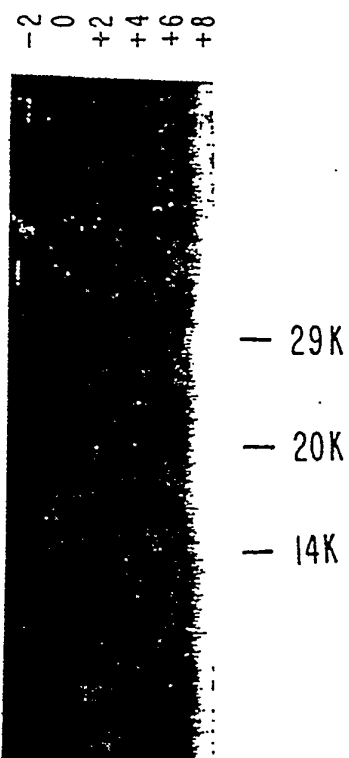


FIG. 5

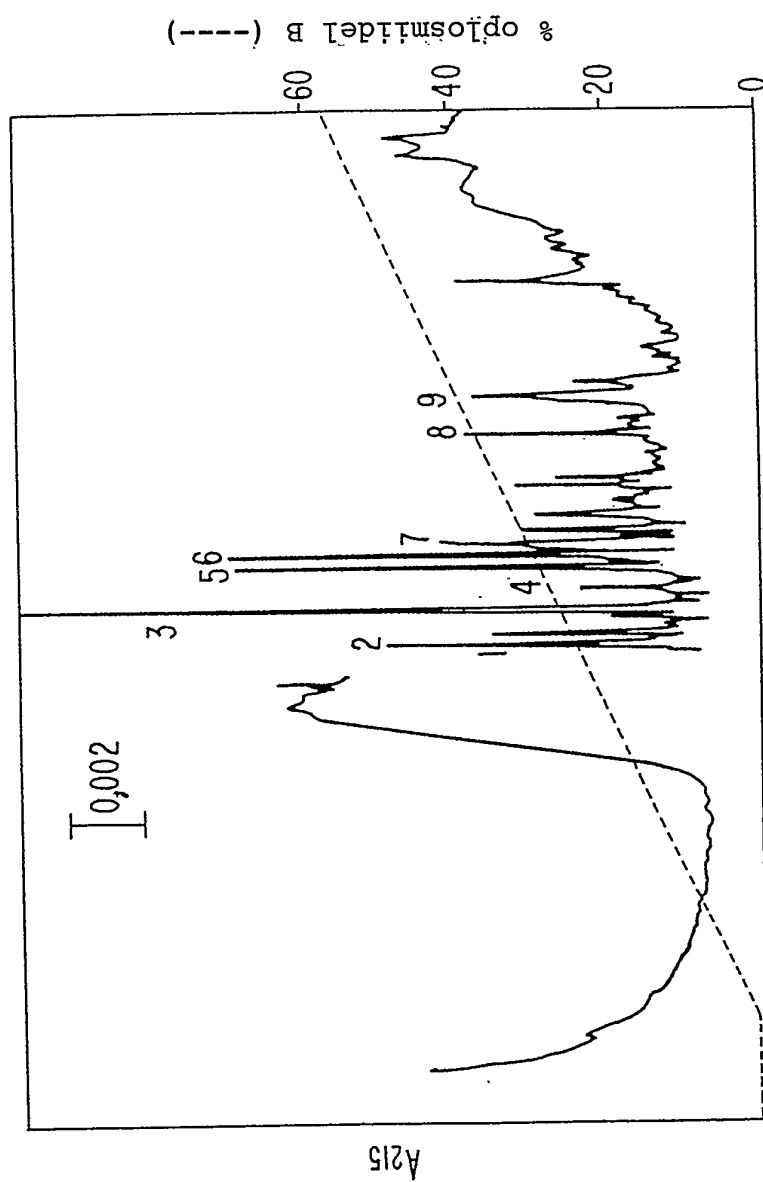


FIG. 6

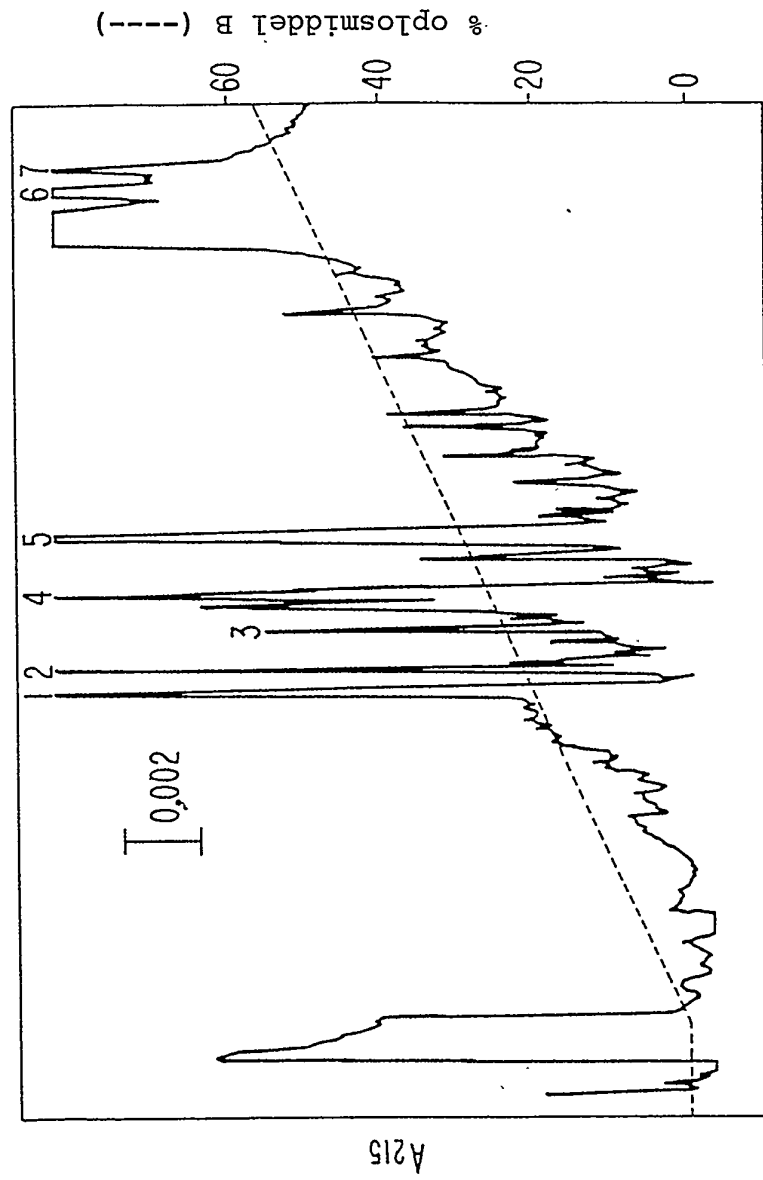
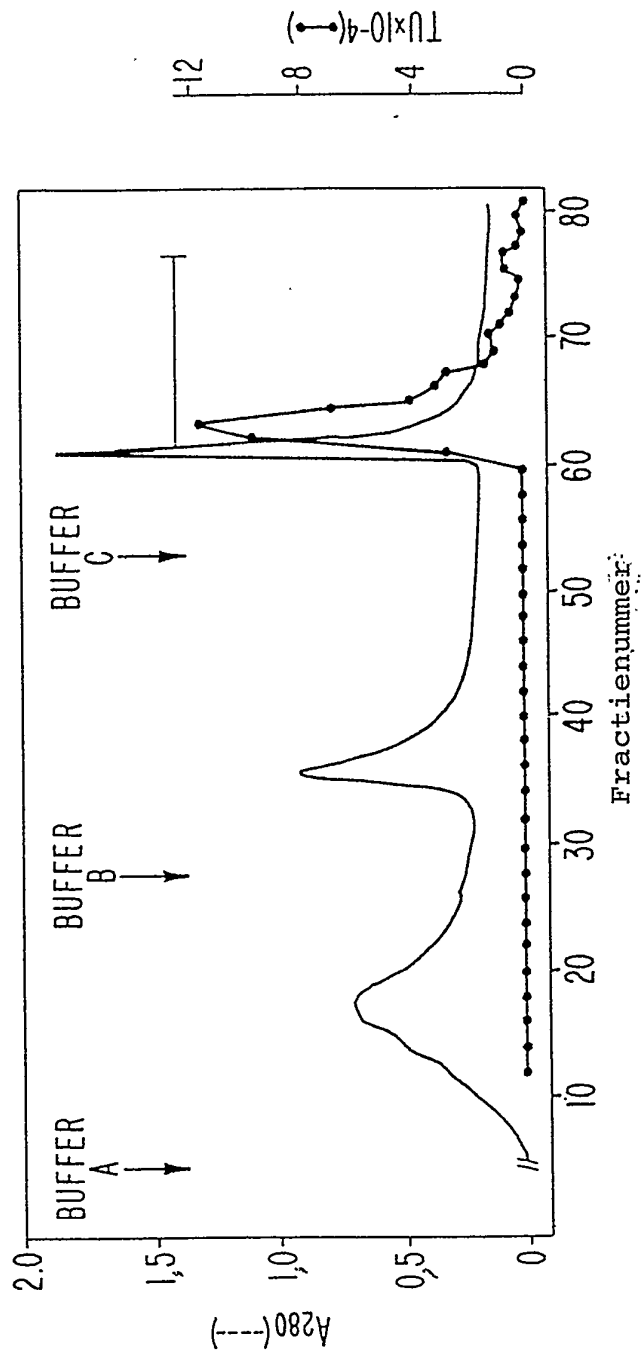


FIG. 7



— fracties, verenigd voor verdere analyse
 - - - CNTF werking in TU

FIG. 8

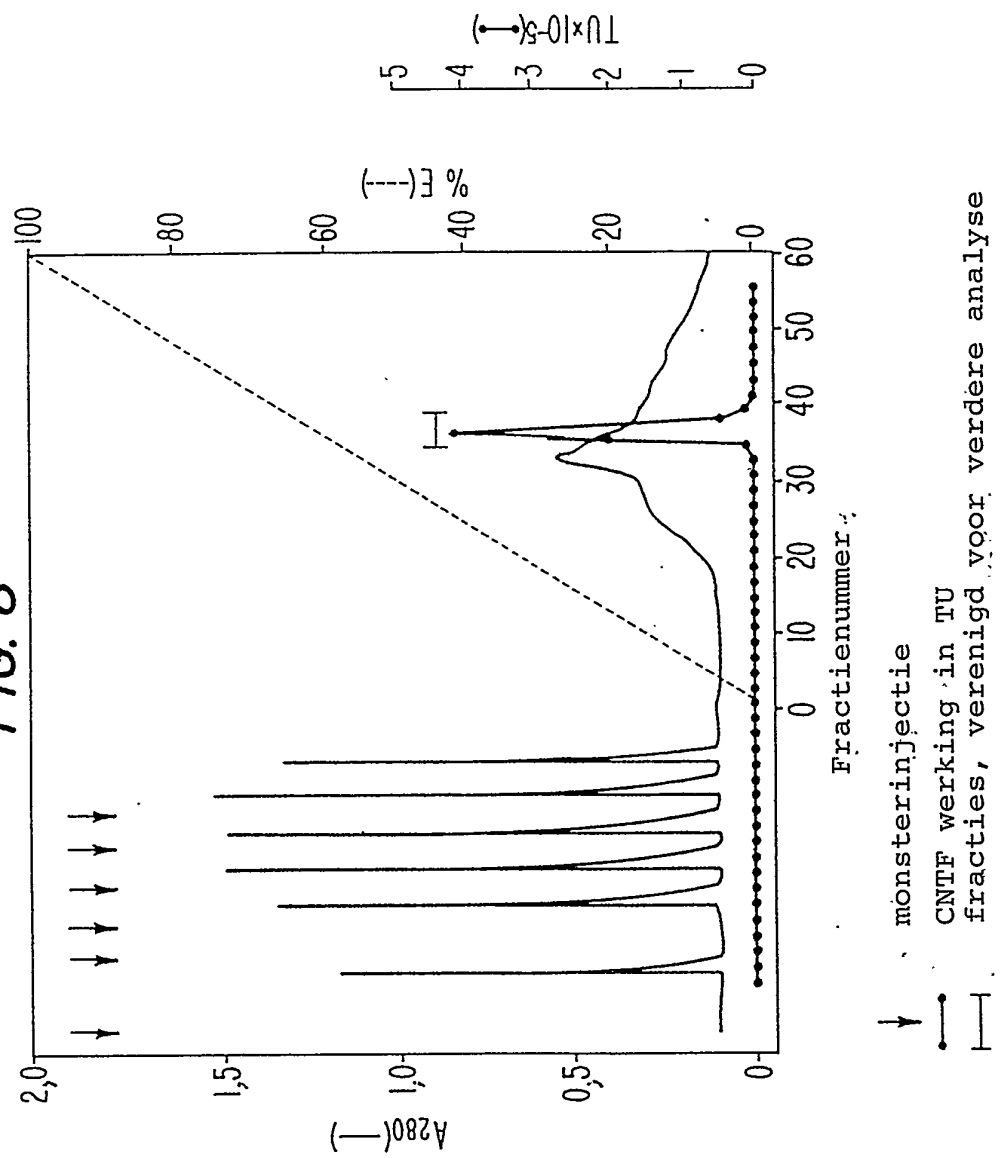


FIG. 9A

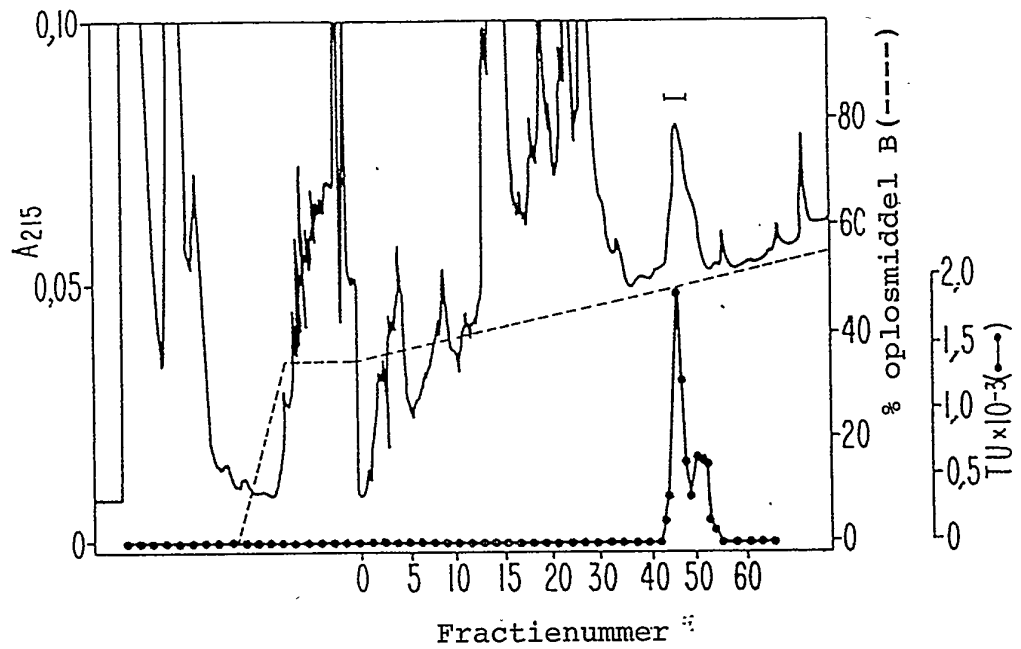


FIG. 9B

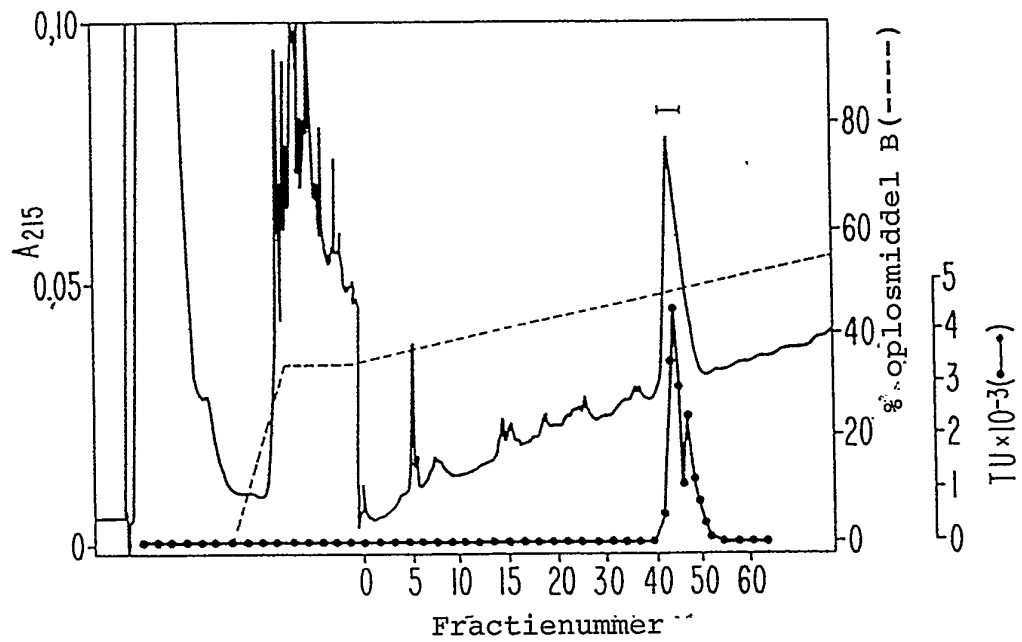


FIG. 10A

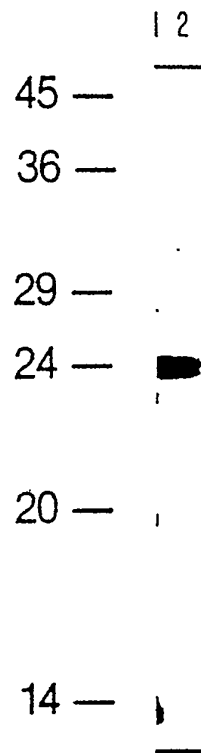


FIG. 10B

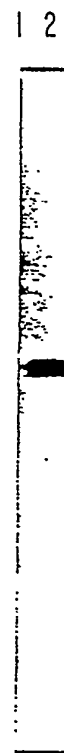


FIG. 11

G CAA ACT CAG CTG ACT TGT TTC CTG GGA CAG TTG AGT TAG GGG ATG GCT
M A

TTC ATG GAG CAT TCA GCA CTG ACC CCT CAC CGC CGG GAG CTC TGT AGC
F M E H S A L T P H R R E L C S

CGT ACC ATC TGG CTA GCG AGG AAG ATT CGT TCA GAC CTG ACC GCT CTT
R T I W L A R K I R S D L T A L

ACG GAA TCT TAC GTG AAG CAT CAG GGC CTG AAC AAG AAC ATC AAC CTG
T E S Y V K H Q S L N K N I N L

GAC TCT GTG GAT GGA GTA CCA ATG GCA AGC ACT GAT CAG TGG AGT GAG
D S V D G V P M A S T D Q W S E

CTG ACT GAG GCA GAG CGA CTC CAA GAG AAC CTC CAA GCT TAT CGG ACC
L T E A E R L Q E N L Q A Y R T

TTC CAT ATT ATG TTG GCC AGG CTT TTA GAA GAC CAG CAG GTG CAT TTT
F H I M L A R L L E D Q Q V H F

ACC CCA GCT GAA GGT GAC TTC CAT CAA GCT ATA CAT ACC CTT TTA CTC
T P A E G D F H Q A I H T L L L

CAA GTT GCT GCC TTC GCT TAC CAG ATA GAG GAG TTA ATG GTG CTG TTG
Q V A A F A Y Q I E E L M V L L

GAA TGT AAT ATC CCT CCC AAA GAT GCT GAT GGG ACA CCT GTC ATT GGA
E C N I P P K D A D S T P V I S

GGT GAT GGT CTC TTT GAG AAG AAG CTG TGG GGC CTG AAG GTG CTA CAA
B D S L F E K K L W S L K V L Q

GAG CTT TCA CAC TGG ACA GTG AGA TCC ATT CAT GAC CTT CGT GTC ATT
E L S H W T V R S I H D L R V I

TCT TGT CAT CAA ACT GGA ATC CCA GCA CAT GGG AGC CAT TAT ATT GCT
S C H Q T G I P A H G S H Y I A

AAC GAC AAG GAA ATG TAG
N D K E M

FIG. 12

FIG. 12

G

FIG. 13

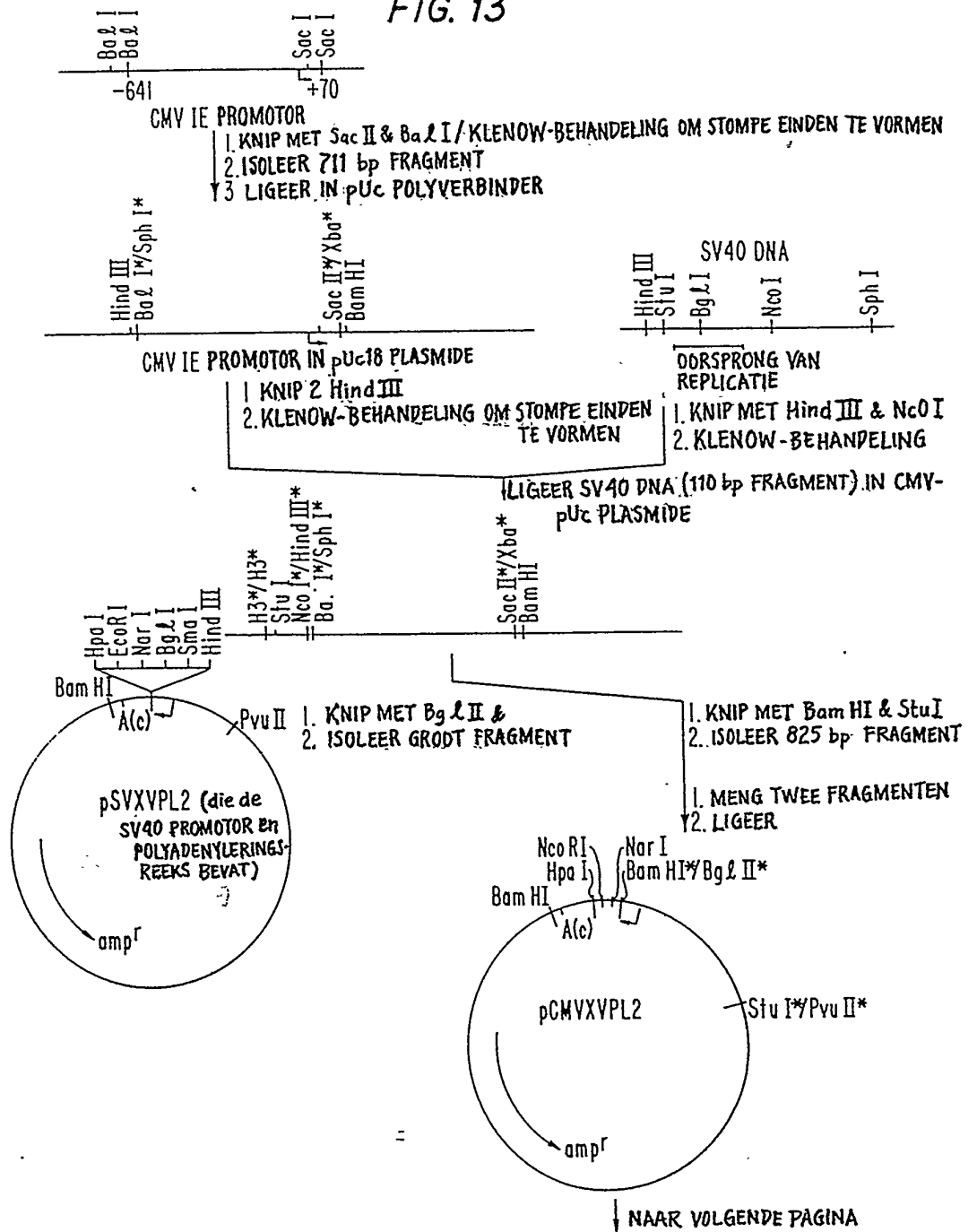


FIG. 14

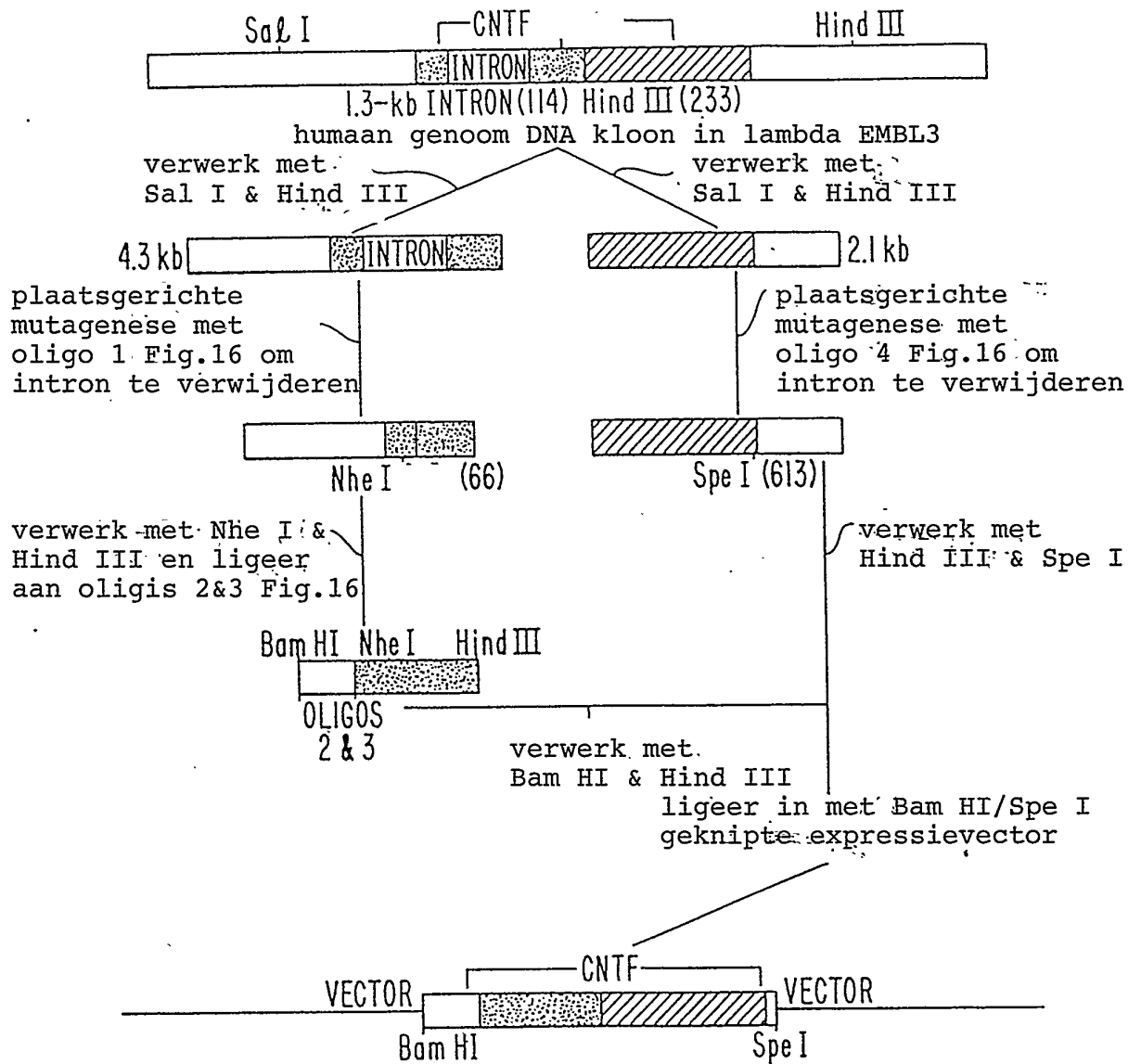


FIG. 15

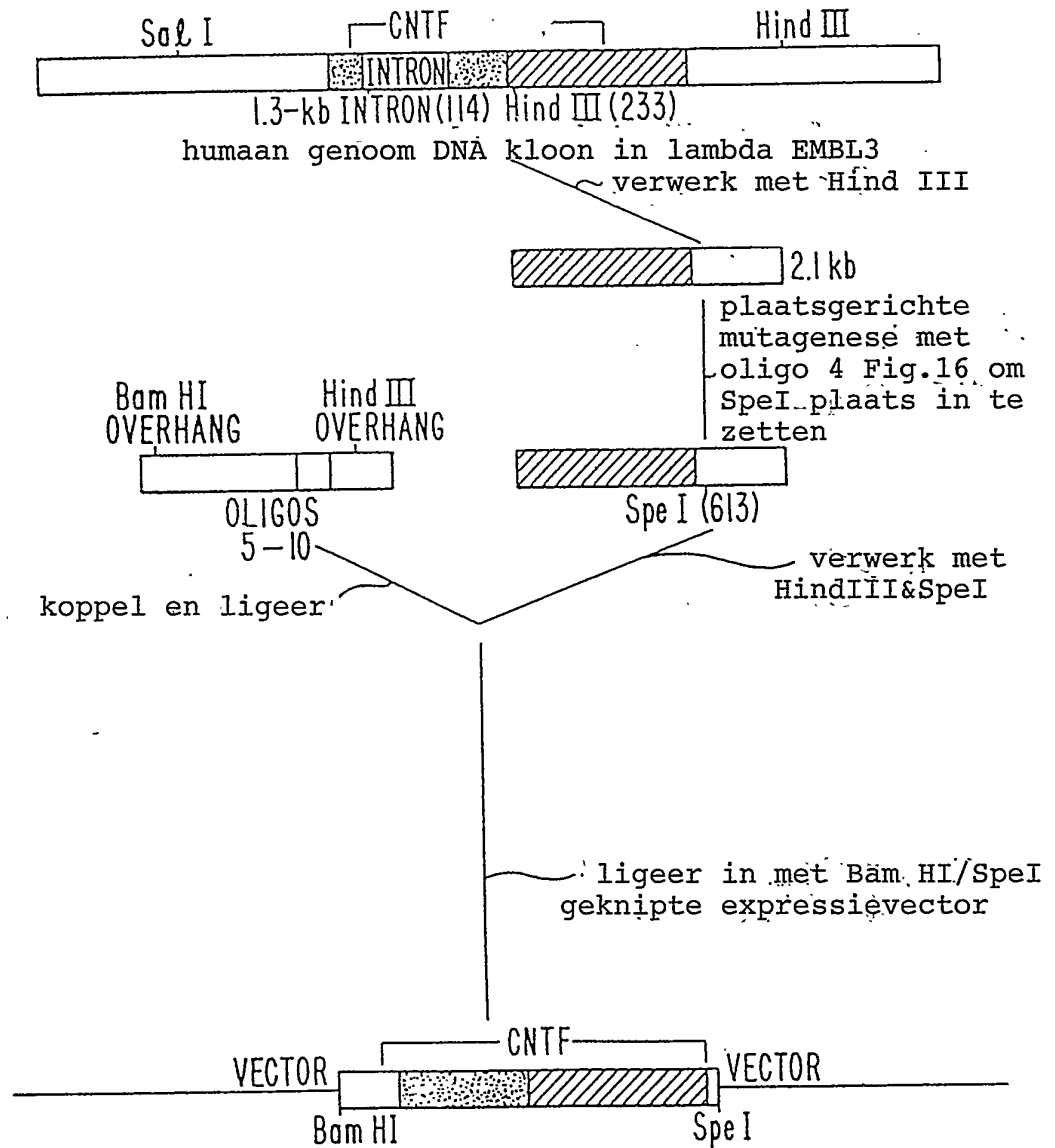


FIG. 16

Oligonucleotide 1
(voor verwijderen intron)

OLIGO-1 5'-GAT GTT CTT GTT CAG GCC CTG ATG CTT CAC
ATA GGA TTC CGT AAG AGC AGT CAG GTC TGA ACG AAT CTT CC-3'

(bovenlijn complementair met 3' kant van intron)
(onderlijn complementair met 5' kant van intron)

Oligonucleotiden 2 & 3
(voor reconstructie 5' eind van uitgedrukt
DNA

OLIGO-2 5'-BamHI
GATC CGATCTTGGAGGATGATTAA ATG GCT TTC
OLIGO-3 3'-GCTAGAACCTCCTACTAATT TAC CGA AAG
met ala phe

ACT GAA CAC TCT CCG CTG ACC CCG CAC CGT CGA Bgl II GAT CTG
TGA CTT GTG AGA GGC GAC TGG GGC GTG GCA GCT CTA GAC
thr glu his ser pro leu thr pro his arg arg asp leu

TGC AGC CGC TCT ATC TGG Nhe I -3' OLIGO-2
ACG TCG GCG AGA TAG ACC GATC -5' OLIGO-3
cys ser arg ser ile trp leu

Oligonucleotide 4
(voor inzetten Spe I plaats)

OLIGO-4 5'-ATG TAG CAG TTA GTC CCT TCT
ACT AGT CTC TTC CTT GCT-3'
met STOP Spe I

FIG. 17

0L160-5 5'-GATC Bom HI CGA TCT TGG AGG ATG ATT AAA TGG CTT TCA CCG AAC ACT CCC CGC TGA
 0L160-6 3'-GCT AGA ACC TCC TAC TAA TTT ACC GAA AGT GGC TTG TGA GGG GCG ACT

CCC CGC ACC GTC GTG ACC TGT GCT CCC GTT CCA TCT GGC TGG CT -3'0L160-5
 GGG GCG TGG CAG CAC TGG ACA CGA GGG CAA -5'0L160-6

0L160-7 5'- C GTA AAA TCC GTT CCG ACC TGA CCG CTC TGA CCG AAT
 0L160-8 3'-GGT AGA CCG ACC GAG CAT TTT AGG CAA GGC TGG ACT GGC GAG ACT GGC TTA

CCT ACG TTA AAC ACC AGG GTC TGA ACA AAA ACA TCA ACC TGG ACT CC -3'0L160-7
 GGA TGC AAT TTG TGG TCC CAG ACT TGT TTT TGT AGT T -5'0L160-8

0L160-9 5'-G CTG ACG GTA TGC CGG TTG CTT CCA CCG ACC AGT GGT CCG
 0L160-10 3'-GG ACC TGA GGC GAC TGC CAT ACG GCC AAC GAA GGT GGC TGG TCA CCA GGC

AAC TGA CCG AAG CTG AAC GTC TGC AGG AAA ACC TGC A -3'0L160-9
 TTG ACT GGC TTC GAC TTG CAG ACG TCC TTT TGG ACG TTCTGA -5'0L160-10
Hind III

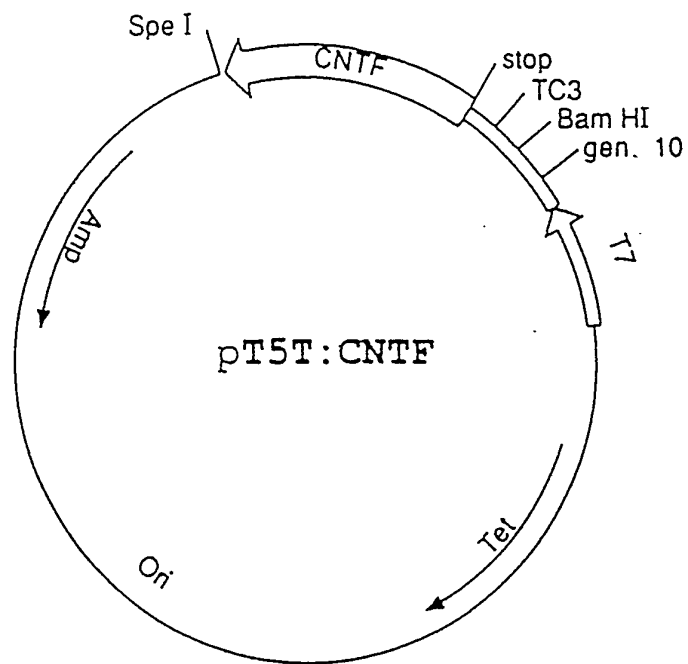
FIG. 18

FIG. 19

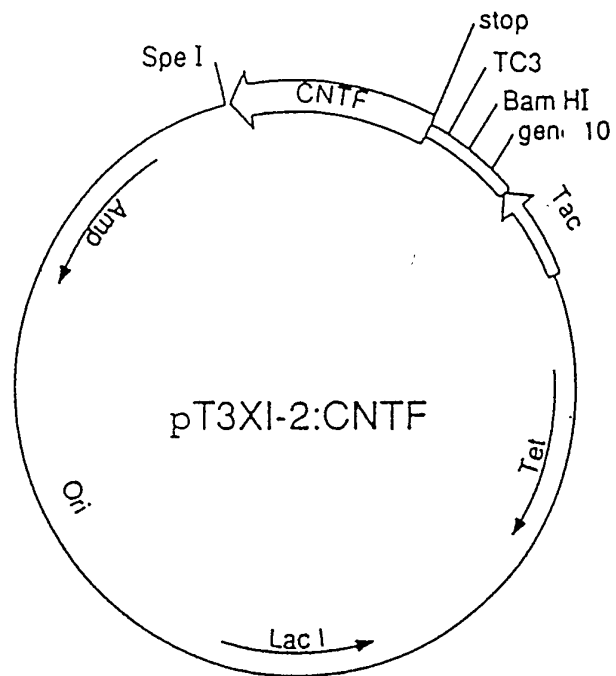
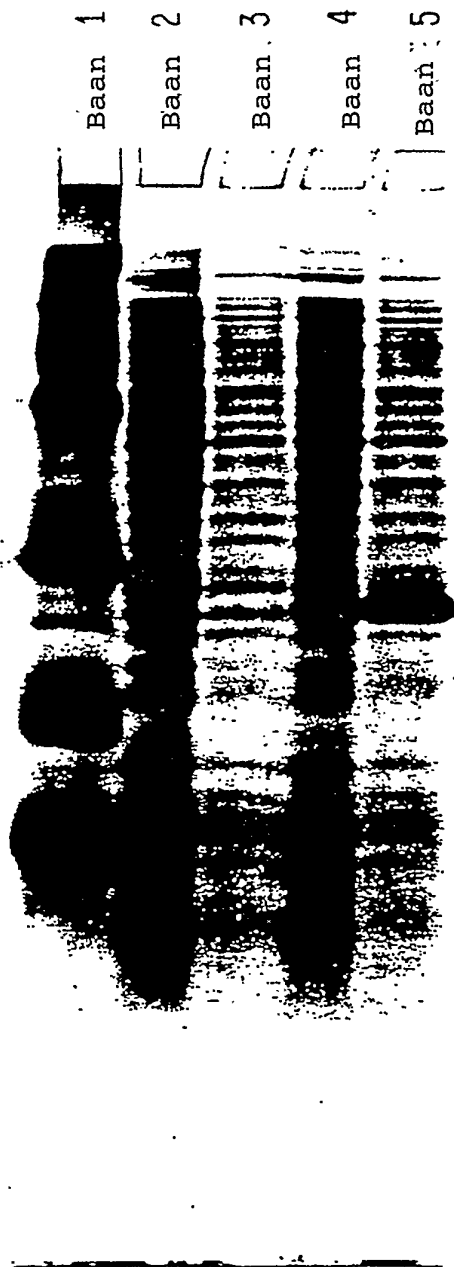


FIG. 20





regenboog mol.gew. standaarden

niet-geïnduceerde pT5T vector zonder inzet

geïnduceerde pT5T vector zonder inzet

niet geïnduceerd pT5T:CNTE-Syn1/3-5a

geïnduceerd pT5T:CNTE-Syn1/3-5a

leeg

French uitgeperste hele cellysaat

French uitgeperste cel vloeistof

French uitgeperste cel prop

