

(12) **Ausschließungspatent**(11) **DD 299 318 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) **C 12 N 15/06**  
**C 12 N 15/12**  
**C 12 P 21/00**  
**A 61 K 37/36**

**DEUTSCHES PATENTAMT**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) **DD C 12 N / 336 941 7**  
(31) **07/293,851**  
**07/404,533**  
**07/485,564**

(22) **04.01.90**  
(32) **05.01.89**  
**08.09.89**  
**28.12.89**

(44) **09.04.92**  
(33) **US**

(71) **siehe (73)**  
(72) **Collins, Franklin D.; Lin, Leu-Fen; Mismar, Drzislav; Ko, Christine, US**  
(73) **SYNERGEN, INC., Boulder, Colorado, US**  
(74) **Grünecker, Kinkeldey, Stockmaier + Partner, Patentanwälte, Maximilianstraße 13, W - 8000 München 22, DE**

(54) **Gereinigter ziliärer neurotrophischer Faktor**

(57) Beansprucht wird ein ziliarneurotropher Faktor (CNTF), insbesondere ein Hüftnerve-CNTF (SN-CNTF). Der hier beschriebene SN-CNTF ist eine Einzelproteinspezies und hat eine spezifische Aktivität, die sich auf mehr als das 25000fache des Rohextrakts erhöhte. Aminosäuredaten für diesen SN-CNTF werden ebenfalls geliefert. Darüber hinaus werden auch Verfahren zur Verwendung dieser Daten für die Schaffung von SN-CNTF-Sonden (probes) und zum Screenen von cDNA- und genomischen Banken geliefert. Es werden Rekombinanten-DNA-Methoden für die Produktion von SN-CNTF beschrieben. Es werden Nucleinsäuresequenzen geschaffen, die Kaninchen- und Human-CNTF codieren. Es wurde ein rekombinantes Expressionssystem zur Produktion eines biologisch aktiven CNTF geschaffen.

**Patentansprüche:**

1. Ein wesentlich gereinigter proteinhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF), der eine spezifische Aktivität aufweist, die mehr als 25000mal höher ist als die spezifische Aktivität des natürlichen Hüftnerveextrakts.
2. Ein wesentlich gereinigter proteinhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF), der eine Aktivität von mehr als  $2 \times 10^8$  TU/mg aufweist. (TU = Trophische Einheiten).
3. Ein wesentlich gereinigter proteinkaninchenhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF).
4. Ein wesentlich gereinigter proteinhumanhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF).
5. Ein wesentlich gereinigter proteinhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF), der ein Protein umfaßt, das wie folgt gekennzeichnet ist:
  - (a) relative Molekülmasse von etwa 25000 bei SDS-PAGE;
  - (b) spezifische Aktivität von mehr als  $2 \times 10^8$  Trophischen Einheiten pro mg;
  - (c) Resistenz der biologischen Aktivität gegenüber SDS und Reduktionsmitteln.
6. Ein wesentlich gereinigter proteinhüftnerveurotropher Faktor (SN-CNTF), der eine Einzelprotein-spezies enthält.
7. Ein Verfahren zur Reinigung des hüftnerveurotrophen Faktors (SN-CNTF) vom Hüftnerveextrakt, das folgendes umfaßt:
  - Säurebehandlung und Ammoniumsulfatfraktionierung des Nervenextraktpräparats;
  - Chromatofokussierung des Präparats, das einer Säurebehandlung und Ammoniumsulfatfraktionierung unterworfen wurde;
  - Passieren des Präparats über SDS-PAGE-Gel und Durchführung einer Umkehrphasen-HPLC.
8. Das Verfahren von Anspruch 7, das vor den genannten Schritten des Passierens des Präparats über ein SDS-PAGE-Gel zusätzliche Reinigungsschritte miteinschließt. Diese umfassen: hydrophobe Wechselwirkungschromatographie zwischen Ammoniumsulfatfraktionierung und Chromatofokussierung, und FFLC-hydrophobe Wechselwirkungschromatographie zwischen Chromatofokussierung und präparativer SDS-PAGE.
9. Die Nucleinsäuresequenz, die Kaninchen-SN-CNTF kodiert, wie in Abb. 11 dargestellt.
10. Die Aminosäuresequenz des Kaninchen-SN-CNTF, wie in Abb. 11 dargestellt.
11. Die Nucleinsäuresequenz, die menschlichen CNTF codiert, wie in Abb. 12 dargestellt.
12. Die Aminosäuresequenz, die menschlichen CNTF codiert, wie in Abb. 12 dargestellt.
13. Ein Rekombinanten-Tierzellen-Expressionssystem zur Produktion eines biologisch aktiven CNTF.
14. Ein Bakterienzellen-Expressionssystem zur Produktion eines biologisch aktiven CNTF.
15. Der CNTF von Anspruch 4, worin der genannte CNTF mittels Rekombinanten-DNA-Verfahren erzeugt wird.
16. Ein Rekombinanten-DNA-Verfahren zur Produktion von CNTF, dadurch gekennzeichnet, daß es folgendes umfaßt:
  - (a) Präparierung einer DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine Wirtszelle zur Produktion eines Proteins mit CNTF-Aktivität zu dirigieren.
  - (b) Klonierung der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine Wirtszelle transferiert und dort repliziert werden kann, wobei ein solcher Vektor operationelle Elemente enthält, die zur Expression der DNA-Sequenz benötigt werden.
  - (c) Transferierung des Vektors, der die synthetische DNA-Sequenz und operationelle Elemente enthält, in eine Wirtszelle, die in der Lage ist, die den CNTF-codierende DNA zu exprimieren.
  - (d) Kultivierung der Wirtszellen unter Bedingungen, die für die Verstärkung des Vektors und die CNTF-Expression geeignet sind.
  - (e) CNTF-Ernte.
  - (f) Dem CNTF wird ermöglicht, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, durch die er eine CNTF-Aktivität besitzt.
17. Das Verfahren von Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA die Aminosäuresequenz des menschlichen CNTF kodiert.
18. Das Verfahren von Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA-Sequenz die im CNTF-Syn 1/3 enthaltenen Nucleinsäuren mitumfaßt.
19. Das Verfahren von Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA-Sequenz die in CNTF-Syn 2/3 enthaltenen Nucleinsäuren umfaßt.

20. Das Verfahren von Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte DNA-Sequenz einen physiologisch funktionellen CNTF codiert, der eine DNA-Sequenz umfaßt, die ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz aufweist, die dem CNTF genügend ähnlich ist, um den Besitz von mindestens einer der biologischen Eigenschaften des CNTF zu ermöglichen.
21. Das Verfahren von Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Wirtszelle ein Mikroorganismus ist.
22. Das Verfahren von Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Mikroorganismus E. coli ist.
23. Das Verfahren von Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Wirtszellen Säugetierzellen sind.
24. Das Verfahren von Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Säugetierzellen Ovarienzellen des chinesischen Hamsters sind.
25. Ein wesentlich gereinigter rekombinanter CNTF.

Hierzu 22 Seiten Zeichnungen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neurotrophe Faktoren und den ziliarneurotrophen Faktor (CNTF) im besonderen sowie auf ein Verfahren der Reinigung des CNTF und der Erzeugung rekombinanter CNTF.

Das Absterben von Nerven- oder Gliazellen im Nervensystem führt zu schweren geistigen oder körperlichen Beeinträchtigungen. Das Absterben von Nerven- oder Gliazellen kann verursacht werden durch neurodegenerative Krankheiten, wie Alzheimersche Krankheit, Parkinsonsche Krankheit und multiple Sklerose, durch Ischämie infolge eines Hirnschlags, durch eine traumatische Verletzung oder durch den natürlichen Alterungsprozeß.

Neurotrophe Faktoren sind eine Gruppe von Molekülen, die das Überleben und die Funktionstätigkeit von Nerven- oder Gliazellen fördern. Es gibt Beweise für die Vermutung, daß neurotrophe Faktoren für Behandlungen brauchbar sind, die auf eine Verhütung des Absterbens und von Funktionsstörungen von Nerven- oder Gliazellen aufgrund der obengenannten Bedingungen abzielen (Appel, in Ann. Neurology 10 (1981), S. 499).

Von diesen neurotrophen Faktoren ist der Nervenwachstumsfaktor (NWF) am besten charakterisiert. Es wurde nachgewiesen, daß der NWF ein neurotropher Faktor für die cholinergischen Nervenzellen des Vorderhirns ist, die während der Alzheimerschen Krankheit und mit zunehmendem Alter absterben. Der Verlust dieser Nervenzellen wird allgemein als Ursache für viele der in Verbindung mit der Alzheimerschen Krankheit und mit fortgeschrittenem Alter auftretenden Wahrnehmungsausfällen betrachtet. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, daß der NWF das Absterben von cholinergischen Nervenzellen des Vorderhirns nach traumatischer Verletzung verhindert und mit dem Alterungsprozeß auftretende Wahrnehmungsverluste umkehren kann (Hefti und Weiner, in Ann. Neurology 20 (1986), S. 275; Fischer et al., in Nature 329 (1987), S. 65). Diese Ergebnisse lassen beim Menschen auf die potentielle klinische Nützlichkeit dieses neurotrophen Faktors bei der Behandlung von Wahrnehmungsverlusten aufgrund des Absterbens von cholinergischen Nervenzellen des Vorderhirns durch Krankheit, Verletzung oder Altern schließen.

Eine Komplikation des Einsatzes neurotropher Faktoren ist deren ausschließliche Spezialisierung auf solche Nervenzellen-Subpopulationen, die die richtigen Membranrezeptoren besitzen. Die meisten Nervenzellen im Körper besitzen keine NWF-Rezeptoren und sprechen offenbar auf diesen neurotrophen Faktor nicht an. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, neue neurotrophe Faktoren ausfindig zu machen, die das Überleben anderer Typen von Nerven- oder Gliazellen unterstützen können, als es der NWF vermag.

Es wurde nach neuen neurotrophen Faktoren gesucht, die in der Lage sein würden, das Überleben von Nervenzellen in der Kultur zu unterstützen, die auf NWF nicht ansprechen. Ein häufig angewandter Screening-Test soll Faktoren ausfindig machen, die das Überleben von Ziliarganglion-Motoneuronen fördern, die Skelett- und Eingeweidemuskel innervieren. Diese Ziliarganglionnervenzellen gehören zum parasympathischen Nervensystem und ihr Überleben wird durch NWF nicht unterstützt.

Berichten zufolge enthalten zahlreiche Gewebe und Spezies Faktoren, die das Überleben von Ziliarganglionnervenzellen fördern. Viele von diesen neurotrophen Aktivitäten des Ziliarganglions weisen die folgenden ähnlichen chemischen und biologischen Eigenschaften auf:

(1) Die Aktivität ist in den Hüftnerven in hoher Konzentration vorhanden; (2) die neurotrophe Aktivität überlebt eine Exposition mit dem Ionendetergens Natriumdodecylsulfat (SDS) und mit den Reduktionsmitteln  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) oder Dithiothreitol (DTT) während der Elektrophorese auf SDS-polyacrylamidreduzierenden Gelen; und (3) auf solchen Gelen wandert die Aktivität mit einer scheinbaren relativen Molekülmasse zwischen 24 und 28 Kd (Collins, in Developmental Biology 109 (1985), S. 255-258; Manthorpe et al., in Brain Research 367 (1986), S. 282-286).

Auf der Basis dieser ähnlichen Eigenschaften wurde angenommen, daß die gleichen oder eng verwandten Moleküle, die typischerweise als „ziliarneurotropher Faktor“ oder „CNTF“ bezeichnet werden, für die ziliarganglionischen neurotrophen Aktivitäten verantwortlich sind. Somit ist der Terminus CNTF eine Arbeitsdefinition, die sich auf Agenzien mit den obengenannten Eigenschaften bezieht, die das Überleben von ziliarganglionischen Nervenzellen in Kultur fördern. Ohne daß genügend Daten vorliegen, um festzustellen, daß die für diese Aktivitäten verantwortlichen Proteine identisch sind, werden die CNTF nach ihren Gewebe und ihrer Herkunftsspezies unterschieden werden. Somit ist die Nomenklatur Kaninchen-Hüftnerv-CNTF, wenn die Ursprungsspezies das Kaninchen ist (Kaninchen-SN-CNTF).

Der Hüftnerv-CNTF ist offenbar in höchster Konzentration in peripheren Nerven, wie z. B. im Hüftnerv, zu finden. Er wird nach Verletzung aus Zellen im Nerv freigesetzt. Der NS-CNTF-Faktor unterstützt das Überleben und Wachstum aller getesteten Nervenzellen des peripheren Nervensystems, einschließlich sensorischer, sympathischer und parasympathischer Nervenzellen.

Somit verfügt der SN-CNTF über einen breiteren Bereich reaktiver Nervenzellen als der NWF. Ein Ratten-SN-CNTF reguliert, wie kürzlich nachgewiesen wurde, die Bildung spezifischer Arten von Gliazellen im Zentralnervensystem (Hughes et al., in Nature 335 [1988], S.70).

Die vernünftigste Hypothese auf der Basis des obengenannten Beweises besteht darin, daß der Hüftnerv-CNTF eine Komponente der Reaktion des Nervensystems auf die Verletzung darstellt. Von einem aus Zellen in einem geschädigten Nerv freigesetzten SN-CNTF würde man erwarten, daß er das Überleben und Nachwachsen verletzter Nervenzellen fördert und die für die Regenerierung notwendige funktionale Aktivierung von Gliazellen reguliert. Diese Überlegungen deuten darauf hin, daß der SN-CNTF einen therapeutischen Wert bei der Verringerung des dem Nervensystem durch Krankheit oder Verletzung zugefügten Schadens haben würde.

Trotz des weitverbreiteten wissenschaftlichen Interesses am SN-CNTF hat die Schwierigkeit der Reinigung beträchtlicher Mengen aus natürlichen Quellen und die Unverfügbarkeit eines menschlichen SN-CNTF Versuche behindert, dessen Wert bei der Unterstützung der Lebensfähigkeit von Nervenzellen bei Krankheit oder nach Verletzung nachzuweisen. Frühere Versuche der Reinigung eines Ratten-SN-CNTF führten zu einer 800fachen Zunahme der spezifischen Aktivität über dem Rohnerextrakt (Manthorpe et al., in Brain Research 367 [1986], S.282-286).

Eine 800fache Steigerung der spezifischen Aktivität reichte jedoch zur Erzeugung einer Einzelproteinspezies nicht aus. Das Erzeugnis, das eine durch die von Manthorpe et al. beschriebenen Methode erzielte erhöhte Aktivität aufweist, ist daher unzureichend, da sie eine Mehrfachproteinspezies einschließt. Es wäre wünschenswert, eine SN-CNTF-Reinigung dergestalt zu erzielen, daß eine Einfachproteinspezies mit der geeigneten biologischen Aktivität gewonnen wird. Sobald eine Einzelproteinspezies erzielt worden ist, werden die gewonnenen Sequenzierungsdaten genauer sein. Unter dem Terminus „Einfachproteinspezies“, wie er im folgenden in dieser Patentbeschreibung und in den beigefügten Ansprüchen verwendet wird, wird ein Polypeptid oder eine Serie von Polypeptiden mit der gleichen Aminosäuresequenz überall an ihren aktiven Stellen verstanden. Mit anderen Worten: Wenn der wirksame Teil der Aminosäuresequenz zwischen 2 oder mehreren Polypeptiden der gleiche ist, so sind diese definitionsgemäß eine „Einzelproteinspezies“, selbst wenn geringfügige Heterogenitäten bezüglich Länge oder Ladung bestehen.

#### Summarische Beschreibung der Erfindung

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein verbessertes Verfahren der SN-CNTF-Reinigung zu liefern.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen SN-CNTF zu schaffen, der in einem nie zuvor erreichten Maße gereinigt ist, so daß eine Einzelproteinspezies erzielt wird.

Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, Proben zu liefern, die ein Prüfen (screening) von cDNA- und Genombanken erleichtern, um die tierischen und menschlichen Gene zu klonieren, die SN-CNTF kodieren.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, die Nukleinsäure- und entsprechenden Aminosäuresequenzen für tierische und menschliche CNTF zu liefern.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, rekombinante Expressionssysteme zu schaffen, in denen die Nukleinsäuresequenz für menschliche oder tierische CNTF zur Erzeugung menschlichen oder tierischen CNTF-Proteins verwendet werden kann.

Diese und andere Ziele werden durch die Schaffung eines SN-CNTF-Reinigungsverfahrens erreicht, so daß die spezifische Aktivität vom Rohextrakt zum gereinigten SN-CNTF um mehr als das 25000fache gesteigert wird. Der mehr als 25000fache gereinigte SN-CNTF wird ebenfalls geliefert.

Entsprechend anderen bevorzugten Merkmalen gewisser bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden SN-CNTF-Proben zur Prüfung von cDNA- und Genombanken für SN-CNTF geliefert.

Entsprechend anderen bevorzugten Merkmalen gewisser bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Kaninchen- und Humanaminosäure- und -nukleinsäure-CNTF-sequenzen geschaffen.

Entsprechend anderen bevorzugten Merkmalen gewisser bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein Rekombinantenexpressionssystem zur Erzeugung biologisch aktiver Tier- und Human-CNTF geschaffen.

Entsprechend anderen vorteilhaften Merkmalen gewisser bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein SN-CNTF-Reinigungsprozeß ermöglicht, der die Stufen einer Säurebehandlung, Ammoniumsulfatfraktionierung, Chromatofokussierung, Herstellung auf SDS-PAGE-Gel und Umkehrphasen-HPLC umfaßt.

Entsprechend anderen bevorzugten Merkmalen gewisser bevorzugter Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung werden zusätzliche Reinigungsschritte ermöglicht, in denen unmittelbar vor und nach der Chromatofokussierung eine hydrophobe Wechselwirkungschromatographie angewandt wird.

Es versteht sich von selbst, daß sowohl die vorhergehende allgemeine als auch die folgende detaillierte Beschreibung nur exemplarisch und erläuternd sind und die Erfindung in ihrem Anspruch nicht einschränken. Die beigefügten Zeichnungen, die in die Patentbeschreibung eingegliedert sind und einen Teil derselben bilden, illustrieren verschiedene Ausführungsformen der Erfindung und dienen zusammen mit der Beschreibung der Erläuterung der Grundgedanken der Erfindung.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Abb. 1: veranschaulicht typische chromatographische Ergebnisse an einer Mono-P-Säule.

Abb. 2: veranschaulicht ein Musterdiagramm der Verteilung der neurotrophen Aktivität im Eluat aus jedem der 7 Streifen, die nach der Elektrophorese vom SDS-PAGE-Gel abgeschnitten wurden.

Abb. 3: veranschaulicht typische Ergebnisse der Umkehrphasenchromatographie.

Abb. 4: veranschaulicht typische Ergebnisse eines reduzierenden Silberfärbungs-SDS-PAGE-Gel-Prozesses an Fraktionen, die mit denjenigen äquivalent sind, die der in Abb. 3 dargestellten neurotrophen Aktivität benachbart sind und deren Maximum enthalten.

Abb. 5: veranschaulicht eine Profil eluierter Peptide nach Aufschließung mit Endoprotease-Asp-N und

- Abb. 8: veranschaulicht ein Profil eluierter Peptide nach Aufschließung mit Endoprotease-Lys-C.
- Abb. 7: veranschaulicht typische Ergebnisse der Chromatographie der Ammoniumsulfatfraktion an einer Phenyl-Sopharose-HIC-Säule.
- Abb. 8: veranschaulicht typische Ergebnisse der Chromatographie der chromatofokussierten Mono-P-Fraktion an einer Alkyl-Superose-FPLC-HIC-Säule.
- Abb. 9: veranschaulicht typische Ergebnisse der Chromatographie der präparativen SDS-PAGE-Fraktion an einer C8-Umkehrphasen-HPLC-Säule. Tafel (A) veranschaulicht die Ergebnisse der ersten Reinigungsprozedur. Tafel (B) veranschaulicht die Ergebnisse der gegenwärtigen Reinigungsprozedur nach Zusatz der beiden HIC-Chromatographiestufen.
- Abb. 10: veranschaulicht typische Ergebnisse der SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse des umkehrphasengereinigten SN-CNTF. Bahn 1 in jeder der beiden Tafeln enthält Standardproteins bezüglich der relativen Molekülmasse (SIGMA SDS-7). Bahn 2 enthält einen gereinigten SN-CNTF. Tafel (A) veranschaulicht die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse mit affinitätsgereinigtem Antipeptid-A-Antikörper.
- Abb. 11: veranschaulicht die Nukleinsäuresequenzkodierung für Kaninchen-SN-CNTF. Die Translation dieser Nukleinsäuresequenz liefert die entsprechende Aminosäuresequenz, die darunter in Einzelbuchstabencode abgedruckt ist. Unterstrichene Sequenzen wurden durch die aus dem SN-CNTF-Protein erhaltene Aminosäuresequenz bestätigt.
- Abb. 12: veranschaulicht die Nukleinsäure- und entsprechende Aminosäuresequenz (3-Buchstaben-Code) für die codierende Sequenz für den menschlichen CNTF. Die menschlichen Sequenzen befinden sich zwischen den Linien. Wenn sich die Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen des Kaninchens von denjenigen des Menschen unterscheiden, wird dies über bzw. unter den Linien vermerkt.
- Abb. 13: veranschaulicht die Struktur des pCMVXVPL2-Expressionvektors.
- Abb. 14: veranschaulicht die zur Konstruktion des CNTF-Syn 1/3 für die CNTF-Expression angewandten Methoden. Die Zeichnung ist repräsentativ, aber nicht maßstabgetreu. Bezüglich experimenteller Details siehe Beispiel 7.
- Abb. 15: veranschaulicht die zur Konstruktion des CNTF-Syn 2/3 für die CNTF-Expression angewandten Methoden. Die Zeichnung ist repräsentativ, aber nicht maßstabgetreu. Bezüglich experimenteller Details siehe Beispiel 7.
- Abb. 16: veranschaulicht die synthetischen Oligonucleotide 1 bis 4, die zur Konstruktion von CNTF-Syn 1/3 und CNTF Syn 2/3 verwendet werden.
- Abb. 17: veranschaulicht die synthetischen Oligonucleotide 5 bis 10, die bei der Konstruktion des CNTF-Syn 2/3 verwendet werden.
- Abb. 18: veranschaulicht bestimmte Merkmal des pT5T-Bakterienexpressionsvektors, der ein für die CNTF-Expression geeignetes DNA-Insert enthält. Die Zeichnung ist repräsentativ, aber nicht maßstabgetreu. Bezüglich experimenteller Details siehe Beispiel 7.
- Abb. 19: veranschaulicht bestimmte Merkmale des pT3XI-2-Bakterienexpressionsvektors, der ein für die CNTF-Expression geeignetes DNA-Insert enthält. Die Zeichnung ist repräsentativ, aber nicht maßstabgetreu. Bezüglich experimenteller Details siehe Beispiel 7.
- Abb. 20: veranschaulicht ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel, bei dem Extrakte von mittels verschiedener Expressionskonstrukte transformierten Zellen einer Elektrophorese und Coomassie-Brillantblaufärbung unterworfen wurden.
- Abb. 21: veranschaulicht ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel, bei dem Extrakte von mittels verschiedener Expressionskonstrukte transformierten Zellen einer Elektrophorese und mittels eines affinitätsgereinigten Anti-CNTF-Peptid-A-Antikörpers einem Immun-Blotting unterworfen wurden.
- Abb. 22: veranschaulicht den Bioassay von Reihenverdünnungen von Überständen aus Bakterienzellen, die pT5T:CNTF-Syn 1/3 oder pT3XI-2:CNTF-Syn 2/3 exprimieren. Das Nebenbild veranschaulicht die biologische Wertbestimmung extrahierter Scheiben eines reduzierenden SDS-Polyacrylamidgels des pT5T:CNTF-Syn 1/3-Überstands im Gelbereich unmittelbar über und unter 24 kD.

#### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Es wird nun im einzelnen Bezug genommen auf die gegenwärtig bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die zusammen mit den folgenden Beispielen der Erläuterung der Prinzipien der Erfindung dienen.

Wie oben erwähnt, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf einen SN-CNTF, der mindestens 25000fach aus Rohextrakt gereinigt wurde. Dieser SN-CNTF ist eine Einzelproteinspezies entsprechend der hier gegebenen Definition dieses Terminus. Als Einzelproteinspezies kann die Aminosäuresequenz des SN-CNTF bestimmt und für den Entwurf von DNA-Proben zur Gewinnung genomischer oder cDNA-Klone für den Einsatz bei der Rekombinantenproduktion von SN-CNTF verwendet werden. Die Aminosäuresequenz der Einzelproteinspezies des SN-CNTF wurde partiell bestimmt. Diese Sequenz lautet:

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

Eine zusätzliche Aminosäuresequenz wurde aus gereinigtem Kaninchen-SN-CNTF ermittelt, das in Beispiel 2 angegeben ist. Diese zusätzliche Sequenz ermöglicht es einigen der oben angegebenen Aminosäuresequenzen, sich im Innern eines großen Einzelpeptids zu lokalisieren (Beispiel 2). Diese Einzelpeptidsequenz wurde zur Erzeugung von drei degenerierten Oligonucleotidproben (#'s 1, 13 und 7 in Beispiel 4) verwendet, die zur Vorbereitung der Polymerasekettenreaktion sehr nützlich sind, da ihre Position bezüglich jeder anderen bekannt ist.

Die Nukleinsäure-(mRNA-Äquivalent)-Sequenzen, die Kaninchen- und Human-CNTF kodieren, wurden bestimmt und sind in den Abbildungen 11 und 12 angegeben.

Es wurde ein Rekombinantensystem zur vorübergehenden Expression eines biologisch aktiven CNTF entwickelt; es ist in Beispiel 5 beschrieben.

Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein verbessertes SN-CNTF-Reinigungsverfahren. Obwohl sich die vorliegende Erfindung auf die SN-CNTF jeder Herkunft bezieht, wird sich die folgende Beschreibung dem aus Kaninchen isolierten SN-CNTF widmen.

Zu einer bevorzugten Ausführungsform des gegenwärtigen Verfahrens gehört kurz gesagt die Pulverisierung von Kaninchen-Hüftnervenmaterial. Das Rohextrakt wird dann zentrifugiert. Der Überstand wird azidifiziert und das resultierende Präzipitat durch Zentrifugierung entfernt. Der Überstand wird dann mit NaOH titriert und das resultierende Präzipitat wiederum durch Zentrifugierung entfernt.

Nach den pH-Präzipitationen wird dem Überstand eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und das Präzipitane durch Zentrifugierung entfernt. Weiterer Zusatz von Ammoniumsulfat zum Überstand führt zur Ausfällung der Proteinfraction, die den größten Teil der SN-CNTF-Aktivität umfaßt.

Das obengenannte Präparat wird dann auf eine Mono-P-chromatofokussierende FPLC-Säule geladen. Dann werden die Säulenfraktionen eingesammelt und auf pH-Wert und CNTF-Aktivität analysiert. Die durch einen dicken Strich in Abb. 1 angegebenen Fraktionen mit dem SN-CNTF-Aktivitätspeak werden dann weiter behandelt, wie unten eingehend erörtert wird. Die fokussierten Fraktionen von Mehrfachdurchläufen über die Mono-P-Säule werden auf SDS-Polyacrylamid-Plattengel einer Elektrophorese unterworfen. Ein Bereich des Gels, der den relativen Molekülmassen zwischen 22 und 27 kd entspricht, wird in der Breite des Gels zu Mehrfachstreifen durchgeschnitten. Die einzelnen Streifen werden in kleinere Stücke zerschnitten und Proteine elektrophoretisch eluiert. Die eluierten Proteine werden eingesammelt, und die Fraktion mit der höchsten Aktivität wird mittels Umkehrphasen-HPLC weiter gereinigt. Dieser Prozeß wird in den folgenden Beispielen eingehender beschrieben.

Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Erfindung auf zusätzliche Schritte, die in die oben angegebene Reinigungsprozedur eingefügt werden können, um zu ermöglichen, daß mehr Ausgangsmaterial bequemer verarbeitet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser zusätzlichen Schritte wird zwischen der Ammoniumsulfatfraktionierung und der Chromatofokussierung eine hydrophobe Wechselwirkungschromatographie auf Phenyl-Sepharose eingeschaltet, während zwischen der Chromatofokussierung und der präparativen SDS-PAGE eine hydrophobe Wechselwirkungschromatographie an einer FPLC-Alkyl-Superosensäule inseriert wird (Beispiel 1).

Das durch die vorliegende Erfindung gelieferte Verfahren führte zu einem SN-CNTF in gereinigter Form mit einer mehr als 25000fachen Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber dem Rohextrakt. Ferner ist das erzeugte Endprodukt eine Einzelproteinspezies. Diese stellt eine mehr als 30fache Steigerung gegenüber dem SN-CNTF dar, was eine Mehrfachproteinspezies mit einschließt, die, wie Manthorpe et al. (weiter oben erörtert) berichten, gereinigt ist. Da der SN-CNTF bei Umkehrphasen-HPLC teilweise inaktiviert wird, stellt die Errechnung einer mindestens 25000fachen Reinigung entsprechend der vorliegenden Erfindung eine Mindestreinigung dar; die tatsächliche Reinigung kann sogar ein 100000faches oder mehr betragen. Diese erhöhte Reinigung wird die Bestimmung der Aminosäuresequenz des SN-CNTF erleichtern. Entsprechend der vorliegenden Erfindung wurde bereits genügend Aminosäuresequenz gewonnen, um Oligonucleotidproben zu erzeugen, die ein Screening von cDNA- und Genombanken erleichtern werden, um die tierischen und menschlichen Gene zur Kodierung für den SN-CNTF zu klonieren. Die durch die vorliegende Erfindung gelieferten Verfahren führten zur Bestimmung der kodierenden (mRNA-Äquivalent) Sequenz für Kaninchen- und Human-CNTF.

Wie weiter unten eingehender erörtert wird, werden diese Gene wiederum eine großtechnische Produktion folgender SN-CNTF ermöglichen: (1) eines tierischen SN-CNTF, der geeignet ist für Untersuchungen seiner Fähigkeit, Tiermodelle zu behandeln, die eine Schädigung des Nervensystems aufweisen, und (2) eines menschlichen SN-CNTF, der geeignet ist für die Einbeziehung in pharmazeutische Formulierungen, die zur Behandlung von Schädigungen des menschlichen Nervensystems brauchbar sind. Die durch die vorliegende Erfindung gelieferten Methoden führten zur Erzeugung eines biologisch aktiven Tier-CNTF in einem rekombinanten Expressionssystem.

Mit diesen gereinigten Proteinen kann die Aminosäuresequenz der markanten Peptide bestimmt werden. Die Proteine werden zuerst mit der Endoprotease Asp-N, der Endoprotease Lys-C, der Endoprotease Glu-C oder mit Chymotrypsin behandelt. Nach der Aufschließung kann die Aminosäuresequenz markanter Peptide mittels eines Gasphasenproteinsequenators angewandter Biosysteme bestimmt werden.

Antikörper, die mit gereinigtem SN-CNTF reagieren, können zur Prüfung (screening) von Expressionsbanken verwendet werden, um das Gen zu erhalten, das den SN-CNTF kodiert. Synthetische Peptide können synthetisiert werden; sie entsprechen Bereichen der SN-CNTF-Sequenz unter Benutzung eines automatisierten Proteinsynthesators angewandter Biosysteme. Solche Peptide können zur Produktion der Antikörper verwendet werden. Antikörper zu synthetischen Peptiden sind produziert worden, und durch Western-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, daß sie mit gereinigtem CNTF reagieren (Abb. 10).

Ausgehend von den obigen Untersuchungen besteht ein letztes Ziel darin, das menschliche SN-CNTF-Gen zu klonieren und zu exprimieren, um Material vorzubereiten, das zur Verwendung bei humanpharmazeutischen Präparaten geeignet ist. Sobald die genomische Sequenz bekannt ist, können Gene, die SN-CNTF kodieren, in tierischen oder bakteriellen Zellen exprimiert werden. Die Kaninchen- und Humangensequenzen, die CNTF kodieren, wurden bestimmt. Ein vorübergehendes Expressionssystem zu Produktion biologisch aktiver CNTF wurde entwickelt.

Eine DNA-Rekombinationsmethode zur CNTF-Produktion wurde jetzt offenbart. In einer Ausführungsform der Erfindung funktioniert das aktive Zentrum in einer Weise, die der des aus dem Menschen isolierten nativen CNTF biologisch äquivalent ist. Zur direkten CNTF-Produktion kann eine natürliche oder synthetische DNA-Sequenz verwendet werden.

Dieses Verfahren umfaßt:

- Herstellung einer DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine Wirtszelle zur Produktion eines Proteins mit CNTF-Aktivität zu führen;
- Klonierung der DNA-Sequenz in einem Vektor, der in eine Wirtszelle transferiert und dort repliziert werden kann, wobei ein solcher Vektor Funktionselemente enthält, die zur Expression der DNA-Sequenz benötigt werden;

- (c) Transferierung des Vektors, der die synthetische DNA-Sequenz und Funktionselemente enthält, in eine Wirtszelle, die fähig ist, die CNTF-kodierende DNA zu exprimieren.
- (d) Kultivierung der Wirtszellen unter Bedingungen, die zur Verstärkung des Vektors und zur CNTF-Expression geeignet sind;
- (e) Ernte des CNTF, und
- (f) dem CNTF wird ermöglicht, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er eine CNTF-Aktivität besitzt.

In einer Ausführungsform kann eine partiell- oder vollsynthetische DNA-Sequenz, die zur Produktion des Rekombinanten-CNTF verwendet wird, andere Nukleotide als die native DNA-Sequenz enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die DNA-Sequenz mit anderen Nucleotiden immer noch ein Polypeptid kodieren, das die gleiche Primärstruktur besitzt wie der durch tierische oder menschliche CNTF-Gene kodierte CNTF. In einer bevorzugten Zweitausführungsform wird die DNA-Sequenz mit anderen Nucleotiden ein Polypeptid kodieren, das eine Primärstruktur besitzt, die mit einem natürlichen CNTF in Beziehung steht und mindestens eine der biologischen Aktivitäten des hier beschriebenen CNTF aufweist.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die native DNA-Sequenz, die den CNTF kodiert, modifiziert, um die Expression in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle zu fördern. Solche Modifizierungen können folgendes umfassen:

(a) Wenn die native DNA-Sequenz eine genomische DNA ist, kann die Beseitigung nichtkodierender Intervening-Sequenzen (Introns) vorgenommen werden, wenn eine Expression in Mikroorganismen in Betracht gezogen wird.

(b) Eine Veränderung der Nucleinsäuresequenz, um Sequenzen mit einzubeziehen, die durch verschiedene Restriktasen bezüglich der Mühelosigkeit späterer Verknüpfungs-, Klonierungs- und Mutageneseschritte erkannt wurden.

(c) Eine Veränderung der Nucleinsäuresequenz zur Schaffung von Codons, die von dem zur Produktion des rekombinanten Proteins verwendeten Wirtsorganismus oder -zelle bevorzugt werden.

(d) Verbindung der Nucleinsäuresequenzen mit Funktionselementen, die für die Aufrechterhaltung und Expression der DNA in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle notwendig sind.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die zu exprimierende DNA-Sequenz präpariert, wie oben dargelegt, und in einen Expressionsvektor inseriert, der in der Lage ist, in einem Wirtsorganismus oder -zelle zu verbleiben und die CNTF-Expression zu lenken.

Solche Vektoren besitzen gewisse bevorzugte Merkmale, die für eine Expression in einem besonderen Wirtsorganismus oder -zelle geeignet sind.

#### (a) Mikroorganismen, besonders E. coli

Die für einen Einsatz in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Vektoren umfassen alle Vektoren, in die eine DNA-Sequenz, wie oben dargelegt, inseriert werden kann, und dazu alle bevorzugten oder erforderlichen Funktionselemente; ein solcher Vektor kann dann später in eine Wirtszelle transferiert und dort repliziert werden. Bevorzugte Vektoren sind solche, deren Restriktionsorte gut dokumentiert wurden und die die für die Transkription der DNA-Sequenz bevorzugten oder erforderlichen Funktionselemente enthalten. Es werden jedoch auch bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen, die gegenwärtig unauffindbare Vektoren verwenden, die eine oder mehrere der hier beschriebenen DNA-Sequenzen enthalten würden. Insbesondere wird bevorzugt, daß alle diese Vektoren einige oder alle der folgenden Merkmale aufweisen: (1) eine minimale Anzahl von Wirtsorganismensequenzen besitzen; (2) im gewünschten Wirt stabil gehalten und vermehrt werden; (3) in einer hohen Kopienzahl im gewünschten Wirt anwesend sein können; (4) einen regulierbaren Promotor besitzen, der so positioniert ist, daß er die Transkription des interessierenden Gens fördert; (5) mindestens eine Marker-DNA-Sequenzkodierung haben für ein selektierbares Merkmal, das bei einem Teil des Plasmids vorhanden ist, der getrennt von dem Teil existiert, wo die DNA-Sequenz inseriert werden wird; und (6) eine DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine Transkription zu terminieren.

In verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen enthalten diese Klonierungsvektoren, die die DNA-Sequenzen der vorliegenden Erfindung enthalten und exprimieren können, verschiedene Funktionselemente. Diese „Funktionselemente“, wie sie hier erörtert werden, umfassen mindestens einen Promotor, mindestens eine Shine-Dalgarno-Sequenz, ein Startcodon und mindestens ein Terminationscodon. Diese „Funktionselemente“ können vorzugsweise auch folgendes (eins oder mehrere davon) umfassen: mindestens einen Operator, mindestens eine Leader-Sequenz, um Proteine aus dem Zellularraum auszuführen, mindestens ein Gen für ein Regulatorprotein und alle anderen DNA-Sequenzen, die für eine geeignete Transkription und spätere Translation der Vektor-DNA notwendig oder bevorzugt sind.

Einige von diesen Funktionselementen (operational elements) können in jedem der bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung enthalten sein. Es wird in Betracht gezogen, daß alle zusätzlichen Funktionselemente, die erforderlich sein können, diesen Vektoren hinzugefügt werden können mittels Verfahren, die den auf dem Fachgebiet Erfahrenen, besonders im Lichte der diesbezüglichen Lehren, bekannt sind.

In der Praxis ist es möglich, jeden dieser Vektoren in einer Weise zu konstruieren, die deren mühelose Isolierung, Zusammenbau und Austausch ermöglicht. Dies erleichtert einen Zusammenbau zahlreicher funktioneller Gene aus Kombinationen dieser Elemente und dem codierenden Bereich der DNA-Sequenzen. Außerdem werden viele von diesen Elementen bei mehr als einem Wirt anwendbar sein. Zusätzlich wurde in Betracht gezogen, daß die Vektoren in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen DNA-Sequenzen enthalten, die als Regulatoren („Operatoren“) fungieren können, und weitere DNA-Sequenzen, die in der Lage sind, für Regulatorproteine zu kodieren.

#### (i) Regulatoren

Diese Regulatoren werden in einer Ausführungsform dazu dienen, beim Vorhandensein bestimmter Umweltbedingungen eine Transkription und spätere Expression des durch die DNA-Sequenz codierten Proteins zu ermöglichen. Insbesondere wird vorgezogen, Regulationssegmente in den Vektor so zu inserieren, daß eine Expression der DNA-Sequenz nicht oder in stark reduziertem Maße erfolgen wird, z. B. in Abwesenheit von Isopropylthio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG). In dieser Situation können sich die transformierten Mikroorganismen, die die DNA-Sequenz enthalten, vor der Initiierung der CNTF-Expression zu einer gewünschten Dichte vermehrt haben. In dieser Ausführungsform wird die Expression des gewünschten Proteins durch Zusatz einer Substanz zur mikrobiellen Umgebung induziert, die in der Lage ist, nach Erreichung der gewünschten Dichte eine Expression der DNA-Sequenz zu bewirken.

**(ii) Promotoren**

Die Expressionsvektoren müssen Promotoren enthalten, die vom Wirtsorganismus zur Expression seiner eigenen Proteine verwendet werden können. Während das Laktose-Promotorsystem häufig verwendet wurde, wurden andere mikrobielle Promotoren isoliert und charakterisiert, die es dem Fachmann ermöglichen, sie für eine Expression des rekombinanten CNTF zu nutzen.

**(iii) Transkriptionsterminator**

Die hier in Betracht gezogenen Transkriptionsterminatoren dienen der Stabilisierung des Vektors. Insbesondere werden die durch Rosenberg, M. und Court, D. in *Ann. Rev. Genet.* 13 (1979), S. 319-353 beschriebenen Sequenzen - hier gesonderter Literaturverweis - zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen.

**(iv) Nichttranslatierte Sequenz**

In der bevorzugten Ausführungsform ist vermerkt, daß es auch wünschenswert sein kann, das 3'- oder 5'-Ende des codierenden Bereichs zu rekonstruieren, so daß eine Inkorporierung von nichttranslatierten 3'- und 5'-Sequenzen in das Gentranskript ermöglicht wird. In diese nichttranslatierten Sequenzen sind diejenigen einbezogen, die die mRNA stabilisieren; sie wurden von Schmelssner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. und Court, D. in *J. Mol. Biol.* 176 (1984), S. 39-53 identifiziert - hier gesonderter Literaturverweis.

**(v) Ribosomen-Bindungsstellen**

Die mikrobielle Expression von Fremdproteinen macht gewisse Funktionselemente (operational elements) erforderlich, die Ribosomen-Bindungsstelle mit einschließen, aber nicht auf diese beschränkt sind. Eine Ribosomen-Bindungsstelle ist eine Sequenz, die ein Ribosom erkennt und an die es sich bei der Initiierung der Proteinsynthese bindet, wie Gold, L. et al., *Ann. Rev. Microbio.* 35, S. 557-580, oder Markquas, D. M. et al., *Gene* 42 (1986), S. 175-183, dargelegt haben (hier gesonderter Literaturverweis). Eine bevorzugte Ribosomen-Bindungsstelle ist GAGGCGCAAAAA(ATG).

**(vi) Leader-Sequenz und Translationskoppler**

Zusätzlich wird bevorzugt, daß eine DNA-Kodierung für eine geeignete sekretorische Leader-(Signal)Sequenz am 5'-Ende der DNA-Sequenz vorhanden ist, wie Watson, M. E. in *Nucleic Acid Res.* 12 S. 5145-5163 darlegt - hier gesonderter Literaturverweis -, wenn das Protein aus dem Zytoplasma ausgeschieden werden soll. Die DNA für die Leader-Sequenz muß sich in einer Position befinden, die die Produktion eines Fusionsproteins erlaubt, in welchem die Leader-Sequenz dem CNTF unmittelbar benachbart und mit diesem kovalent verbunden ist, d. h., zwischen den beiden DNA-Kodierungssequenzen darf es keine Transkriptions- oder Translationsterminationssignale geben. Die Anwesenheit der Leader-Sequenz ist aus einem oder mehreren der folgenden Gründe teilweise erwünscht: Erstens kann die Anwesenheit der Leader-Sequenz die Verarbeitung des CNTF durch den Wirt erleichtern. Insbesondere kann die Leader-Sequenz die Spaltung des Initialtranslationsprodukts durch eine Leader-Peptidase dirigieren, um die Leader-Sequenz zu entfernen und eine Polypeptid mit der Aminosäuresequenz zurückzulassen, die eine potentielle Proteinaktivität besitzt. Zweitens kann die Anwesenheit der Leadersequenz die Reifung des CNTF durch Führung des Proteins aus dem Zellzytoplasma erleichtern. Bei einigen Wirtsmikroorganismenspezies wird die Anwesenheit einer geeigneten Leader-Sequenz den Transport des vervollständigten Proteins in den periplasmatischen Raum ermöglichen, wie im Falle einiger *E. coli*. Bei bestimmten *E. coli*, *Saccharomyces* und *Bacillus*- sowie *Pseudomonas*stämmen wird die geeignete Leader-Sequenz den Transport des Proteins durch die Zellmembran und in das extrazelluläre Medium ermöglichen. In dieser Situation kann das Protein von extrazellulären Protein gereinigt werden. Drittens kann die Anwesenheit der Leader-Sequenz im Falle einiger der durch die vorliegende Erfindung präparierten Proteine notwendig sein, um das vervollständigte Protein in einer Umgebung unterzubringen, wo es sich zusammenlegen kann, um seine aktive Struktur anzunehmen, die die geeignete Proteinaktivität besitzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine zusätzliche DNA-Sequenz unmittelbar vor der DNA-Sequenz, die für den CNTF kodiert, untergebracht. Die zusätzliche DNA-Sequenz ist in der Lage, als Translationskoppler zu fungieren, d. h., sie ist eine DNA-Sequenz, die eine RNA kodiert, die der Positionierung von Ribosomen dient, die der Ribosomen-Bindungsstelle der Inhibitor-RNA, mit dem sie sich berührt, benachbart sind. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der Translationskoppler deriviert werden unter Verwendung der DNA-Sequenz

TAACGAGGCGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATCTTGGAGGATGATTAAATG

und mit Hilfe von Methoden, die Fachleuten in bezug auf Translationskoppler gegenwärtig bekannt sind.

**(vii) Translationsterminator**

Die hier in Betracht gezogenen Translationsterminatoren dienen der Unterbindung der mRNA-Translation. Sie können entweder natürlicher Art sein, wie von Kohli, J. in *Mol. Gen. Genet.* 182 S. 430-439, beschrieben, oder synthetisiert sein, wie von Petterson, R. F. in *Gene* 24 (1983), S. 15-27, dargelegt (beides hier gesonderte Literaturangaben).

**(viii) Selektierbarer Marker**

Zusätzlich wird bevorzugt, daß der Klonierungsvektor einen selektierbaren Marker enthält, wie z. B. einen Arzneimittelresistenzmarker oder einen anderen Marker, der die Expression eines selektierbaren Merkmals durch den Wirtsmikroorganismus bewirkt. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Gen für Ampicillinresistenz im Vektor enthalten, während in anderen Plasmiden das Gen für Tetracyclinresistenz oder das Gen für Chloramphenikolresistenz enthalten ist.

Eine solche Arzneimittelresistenz oder ein anderer selektierbarer Marker soll bei der Selektion von Transformanten teilweise Erleichterung schaffen.



Außerdem kann die Anwesenheit eines solchen selektierbaren Markers im Klonierungsvektor nützlich sein, um kontaminierende Mikroorganismen von einer Vermehrung im Kulturmedium abzuhalten. In dieser Ausführungsform würde eine Reinkultur der transformierten Wirtsmikroorganismen durch Kultivierung der Mikroorganismen unter Bedingungen erzielt werden, die den induzierten Phänotyp zum Überleben erfordern.

Die hier erörterten Funktionselemente werden von Fachleuten im Lichte der hier enthaltenen früheren Literatur und Lehren routinemäßig selektiert. Allgemeine Beispiele dieser Funktionselemente sind dargelegt bei B. Lewin, Genes, Wiley & Sons, New York (1983) – gesonderter Literaturverweis –, Verschiedene Beispiele geeigneter Funktionselemente lassen sich bei den eben erörterten Vektoren finden und können anhand der Publikationen, die Grundmerkmale der vorerwähnten Vektoren erörtern, erläutert werden.

Nach Synthese und Isolierung aller notwendigen und erwünschten Komponententeile des oben beschriebenen Vektors wird der Vektor durch Verfahren zusammengesetzt, die den Fachleuten allgemein bekannt sind. Die Zusammensetzung solcher Vektoren liegt, wie man glaubt, im Bereich der von den Fachleuten geleisteten Pflichten und Aufgaben und kann ohne übermäßiges Experimentieren durchgeführt werden. Zum Beispiel wurden ähnliche DNA-Sequenzen zu geeigneten Klonierungsvektoren ligiert, wie von Maniatis et al. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1984) – (gesondert aufgenommene Literaturangabe) – dargelegt wurde.

Bei der Konstruktion der Klonierungsvektoren der vorliegenden Erfindung sollte zusätzlich beachtet werden, daß Mehrfachkopien der DNA-Sequenz und deren begleitende Funktionselemente in jeden Vektor inseriert werden können. In einer solchen Ausführungsform würde der Wirtsorganismus pro Vektor größere Mengen des gewünschten CNTF erzeugen. Die Zahl der Mehrfachkopien der DNA-Sequenz, die in den Vektor inseriert werden kann, wird allein durch die Fähigkeit des resultierenden Vektors, die auf dessen Größe zurückzuführen ist, begrenzt, in eine geeignete Wirtszelle transferiert und dort repliziert und transkribiert zu werden.

#### (b) Andere Mikroorganismen

Für diese Erfindung werden auch Vektoren in Betracht gezogen, die sich für den Einsatz bei Mikroorganismen, die keine E. coli sind, eignen. Solche Vektoren sind in Tabelle 1 beschrieben. Darüber hinaus werden unten bestimmte bevorzugte Vektoren erörtert.

##### (i) Pseudomonas-Vektoren

Verschiedene Vektorplasmide, die sich in einem breiten Bereich gramnegativer Bakterien autonom replizieren, werden für den Einsatz als Klonierungsvektoren bei Wirten der Gattung Pseudomonas bevorzugt. Einige von diesen sind beschrieben worden von Tait, R. C., Close, T. J., Lundquist, R. C., Hagly, M., Rodriguez, R. L. und Kado, C. I. in Biotechnology (1983), Mai, S. 269–275; von Panopoulos, N. J. in Genetic Engineering in the Plant Sciences, Praeger Publishers, New York S. 163–185 (1991) und von Sakaguchi, K. in Current Topics in Microbiology and Immunology 96 (1982), S. 31–45 (jede Literaturangabe hier gesondert aufgenommen). Eine besonders bevorzugte Konstruktion würde das Plasmid RSF1010 und Derivate davon anwenden, wie von Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M., Coleman, S. und Timmis, K. N. in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, Timmis, K. N. und Puhler, A., Hrsg., Elsevier/North Holland, Biomedical Press (1979) beschrieben wurde (im Literaturverzeichnis gesondert aufgenommen). Die Vorteile des RSF1010 bestehen darin, daß es ein relativ kleines Plasmid mit hoher Kopienzahl ist, das sich leicht sowohl in E. coli- als auch in Pseudomonas-Spezies transformieren und dort stabil halten läßt. In diesem System würde man die Verwendung des Tac-Expressionssystems, wie es für Escherichia beschrieben wurde, vorziehen, da es den Anschein hat, daß der E. coli-trp-Promotor von der Pseudomonas-RNA-Polymerase leicht erkannt wird, wie dargelegt wird von Sakaguchi, K. in Current Topics in Microbiology and Immunology 96 (1982), S. 31–45 und Gray, G. L., McKeown, K. A., Jones, A. J. S., Seeburg, P. H. und Heyneker, H. L. in Biotechnology, Feb. 1984, S. 161–165 (beide Titel hier gesondert im Literaturverzeichnis aufgenommen). Die Transkriptionsaktivität kann weiter maximiert werden, indem der Austausch des Promotors z. B. mit einem E. coli- oder P. aeruginosa-trp-Promotor verlangt wird. Darüber hinaus würde auch das LacI-Gen von E. coli in das Plasmid einbezogen werden, um eine Regulation zu bewirken.

Die Translation kann gekoppelt werden mit einem Translationsstart für jedes der Pseudomonas-Proteine sowie mit Startorten für jedes der hochexprimierten Proteine des zur Bewirkung einer intrazellulären Expression des Inhibitors gewählten Typs. In solchen Fällen, wo Minus-Restriktionsstämme einer Wirt-Pseudomonas-Spezies nicht zur Verfügung stehen, ist die Transformationseffizienz mit aus E. coli isolierten Plasmidkonstrukten gering. Daher ist ein Durchgang des Pseudomonas-Klonierungsvektors durch einen r<sup>-</sup> m<sup>+</sup> -Stamm einer anderen Spezies vor der Transformation des gewünschten Wirts, wie in Bagdasarian, M. et al., Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance S. 411–422, Timmis and Puhler eds., Elsevier/Nord-Holland Biomedical Press (1979), dargelegt wird (hier gesonderte Literaturangabe), wünschenswert.

##### (ii) Bacillus-Vektoren

Darüber hinaus bringt ein bevorzugtes Expressionssystem in Wirten der Gattung Bacillus den Einsatz des Plasmids pUB110 als Klonierungshilfsmittel mit sich. Wie bei einem anderen Wirtsvektorsystem, ist es beim Bacillus möglich, den CNTF der vorliegenden Erfindung entweder als intrazelluläre oder als sezerniertes Protein zu exprimieren. Die vorliegenden Ausführungsformen schließen beide Systeme ein. Shuttle-Vektoren, die sowohl im Bacillus als auch in E. coli replizieren, stehen zur Konstruktion und Prüfung verschiedener Gene zur Verfügung, wie dargelegt wurde von Dubnau, D., Gryczan, T., Contente, S. und Shivakumar, A. G. in Genetic Engineering, Vol. 1, Setlow and Hollander eds., Plenum Press, New York, S. 115–131 (1980), (durch Literaturverweis hier gesondert aufgenommen). Zur Expression und Sezernierung des CNTF aus B. subtilis wird die Signalsequenz der Alpha-Amylase möglichst an den codierenden Bereich für das Protein gekoppelt werden. Für eine Synthese des intrazellulären CNTF wird die transportable DNS-Sequenz translationell an die Ribosomen-Bindungsstelle der Alpha-Amylase-Leadersequenz gekoppelt.

Die Transkription jedes dieser Konstrukte wird vorzugsweise durch den Alpha-Amylase-Promotor oder durch ein Derivat desselben gelenkt. Dieses Derivat enthält die RNA-Polymerase-Erkennungssequenz des nativen Alpha-Amylase-Promotors, inkorporiert aber auch den Lac-Operatorbereich. Es wurde nachgewiesen, daß ähnliche Hybridpromotoren, die aus dem

Penicillinasegenpromotor und dem Lac-Operator konstruiert wurden, in regulierbarer Form in *Bacillus*-Wirten fungieren, wie dargelegt wurde von Yansura, D. G. und Henner in *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, Ganesan, A. T. und Hoch, J. A., eds., Academic Press, S. 249-263 (1984) (im Literaturverzeichnis gesondert aufgenommen). Zur Bewirkung der Regulation würde auch das lacI-Gen von *E. coli* in das Plasmid einbezogen werden.

### (iii) Clostridium-Vektoren

Eine bevorzugte Konstruktion zur Expression in *Clostridium* ist in Plasmid pJU12 zu finden, wie dargelegt wurde von Squires, C. H. et al., in *J. Bacteriol.* 159 (1984), S. 455-471 (durch Literaturangabe hier gesondert aufgenommen), mit Transformation in *C. perfringens* mit Hilfe des Verfahrens von Haefner, D. L. et al., wie dargelegt wurde in *J. Bacteriol.* 159 (1984), S. 460-464 (durch Literaturangabe hier gesondert aufgenommen).

Die Transkription wird vom Promotor des Tetracyclin-Resistenzgens gelenkt. Die Translation ist, an die Shine-Dalgarno-Sequenz dieses gleichen *tet<sup>r</sup>*-Gens in einer Weise gekoppelt, die streng analog ist zu den oben umrissenen Verfahren für Vektoren, die zur Verwendung in anderen Wirten geeignet sind.

### (iv) Hefe-Vektoren

Die Erhaltung von Fremd-DNA, die in Hefe eingeführt wurden, kann auf mehrere Arten erfolgen, wie dargelegt wurde von Botstein, D. und Davis, R. W. in *The Molecular Biology of The Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Strathern, Jones and Broach, Hrsg. (1982), S. 607-636 (durch Literaturangabe hier gesondert aufgenommen). Ein bevorzugtes Expressionssystem zur Verwendung bei Wirtsorganismen der Gattung *Saccharomyces* beherbergt das CNTF-Gen am 2-Mikron-Plasmid. Zu den Vorzügen des 2-Mikron-Ringes gehören eine relativ hohe Kopienzahl und Stabilität bei der Einführung in *cir<sup>-</sup>*-Stämme. Diese Vektoren inkorporieren vorzugsweise den Replikationsursprung und mindestens einen antibiotischen Resistenzmarker aus pBR322, um eine Replikation und Selektion in *E. coli* zu ermöglichen. Darüber hinaus wird das Plasmid vorzugsweise die 2-Mikron-Sequenz und das Hefe-LEU2-Gen aufweisen, um bei LEU2-defekten Hefemutanten die gleichen Zwecke zu erfüllen.

Wenn man in Betracht zieht, daß der rekombinante CNTF letztlich in der Hefe exprimiert wird, wird vorgezogen, den Klonierungsvektor zuerst in *Escherichia coli* zu transferieren, wo dem Vektor eine Replikation ermöglicht und von wo er nach Verstärkung gewonnen und gereinigt werden würde. Der Vektor würde dann zur endgültigen CNTF-Expression in die Hefe transferiert werden.

### (c) Säugetierzellen

Die cDNA oder genomische DNA, die den CNTF kodiert, wird als Gen für die Expression des CNTF in Säugetierzellen dienen. Sie sollte eine Sequenz haben, die beim Binden von Ribosomen wirksam ist, wie z. B. die von Kozak in *Nucleic Acids Research* 15 (1987), S. 8125-8132 (gesonderte Literaturangabe) beschriebene. Das DNA-Restriktionsfragment, das die den CNTF kodierende DNA-Sequenz trägt, kann in einem Expressionsvektor inseriert werden, der einen Transkriptionspromotor und einen Transkriptionsverstärker besitzt, wie dargelegt wurde von Guarente, L. in *Cell* 52 (1988), S. 303-305 und Kadonaga, J. T. et al. in *Cell* 51 (1987), S. 1079-1090, (beides gesonderte Literaturangaben). Der Promotor kann regulierbar sein, wie beim Plasmid pMSG (Pharmazie-Kat.-Nr. 27450601), wenn die konstitutive Expression des Inhibitors dem Zellwachstums schädlich ist. Der Vektor sollte ein vollständiges Polyadenylierungssignal haben entsprechend der Beschreibung von Ausübel, F. M. et al. in *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley (1987) (hier gesonderte Literaturaufnahme), so daß die aus diesem Vektor transkribierte mRNA richtig verarbeitet wird. Und schließlich wird der Vektor den Replikationsursprung und mindestens einen antibiotischen Resistenzmarker von pBR322 aufweisen, um eine Replikation und Selektion in *E. coli* zu ermöglichen.

Um eine stabile Zelllinie zu selektieren, die CNTF erzeugt, kann der Expressionsvektor Träger des Gens für einen selektierbaren Marker sein, wie z. B. einen Arzneimittelresistenzmarker, oder Träger eines komplementären Gens für eine Mangelzelllinie sein, wie z. B. ein Dihydrofolatreduktasen-(dhfr)-gen zur Transformierung einer dhfr-Zelllinie, wie von Ausübel et al. oben beschrieben. Andererseits kann ein separates Plasmid, das Träger des selektierbaren Markers ist, zusammen mit dem Expressionsvektor cotransformiert werden.

### Wirtszellen, Transformation

Der so gewonnene Vektor wird in eine geeignete Wirtszelle transferiert. Diese Wirtszellen können Mikroorganismen oder Säugetierzellen sein.

#### (a) Mikroorganismen

Man ist der Ansicht, daß jeder Mikroorganismus, der die Fähigkeit hat, exogene DNA aufzunehmen und diese Gene und begleitende Funktionselemente zu exprimieren, gewählt werden kann. Nach der Wahl eines Wirtsorganismus wird der Vektor in den Wirtsorganismen transferiert, wobei Verfahren angewendet werden, die den Fachleuten im allgemeinen bekannt sind. Beispiele für solche Verfahren kann man finden bei R. W. Davis et al. in *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Press, New York (1980) (im Literaturverzeichnis hier gesondert aufgenommen). In einer Ausführungsform wird es vorgezogen, die Transformation bei niedrigen Temperaturen erfolgen zu lassen, da die Temperaturregulierung als Mittel zur Regulation der Genexpression durch Verwendung von Funktionselementen in Betracht gezogen wird, wie oben dargelegt. In einer weiteren Ausführungsform wurde im Falle einer Insertion osmolarer Regulatoren in den Vektor eine Regulation der Salzkonzentrationen während der Transformation erforderlich sein, um eine geeignete Steuerung der Fremdgene zu gewährleisten. Der Wirtsorganismus soll möglichst ein fakultativer Anaerobier oder ein Aerobier sein. Bestimmte Wirte, die bei diesem Verfahren für den Einsatz vorzuziehen sein können, sind u. a. Hefen und Bakterien. Zu bestimmten Hefen gehören solche der Gattung *Saccharomyces*, speziell *Saccharomyces cerevisiae*. Zu bestimmten Bakterien gehören die der Gattung *Bacillus*, *Escherichia* und *Pseudomonas*, besonders *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. In Tabelle 1 (S. 86) sind weitere Wirtszellen verzeichnet.

### (b) Säugetierzellen

Der Vektor kann durch verschiedene Techniken, wie z.B. Calciumphosphat: DNA-Mitfällung, Elektroporation oder Protoplastenfusion, in Kultur-Säugetierzellen eingeführt werden. Die bevorzugte Methode ist die Mitfällung mit Calciumphosphat entsprechend der Beschreibung von Ausubel et al. (s.o.).

Es gibt viele stabile Zelltypen, die transformierbar und in der Lage sind, ein Processing zu transkribieren, die DNA-Sequenz zu translatieren und CNTF-Protein zu erzeugen. Die Zelltypen können jedoch variabel sein in bezug auf Glycosylierung von Proteinen und bezüglich posttranslationaler Modifizierung von Aminosäureresten, wenn es überhaupt zu einer solchen kommt. Somit sind die idealen Zelltypen diejenigen, die einen rekombinanten CNTF erzeugen, der mit dem natürlichen Molekül identisch ist. Die Wirtszellen werden unter Bedingungen kultiviert, die für die CNTF-Expression geeignet sind. Diese Bedingungen sind generell für die Wirtszelle spezifisch und werden vom Fachmann anhand der veröffentlichten Literatur bezüglich den Wachstumsbedingungen für solche Zellen und die darin enthaltenen Lehren mühelos bestimmt. Zum Beispiel enthält Bergveys Handbuch der determinativen Bakteriologie, 8. Aufl., Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland (hier durch Literaturangabe gesondert aufgenommen), Informationen über Bedingungen für eine Bakterienkultivierung. Ähnliche Informationen über Kultivierung von Hefe- und Säugetierzellen können erhalten werden von Pollack, R., Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1976) (gesonderte Literaturangabe).

Alle für die Regulation der Expression der DNA-Sequenz notwendigen Bedingungen, die von allen in den Vektor inserierten oder dort vorhandenen Funktionselementen abhängig sind, würden im Transformations- und Kulturstadium wirksam sein. In einer Ausführungsform werden die Zellen in Gegenwart geeigneter Regulationsbedingungen, die die Expression der DNA-Sequenz inhibieren, zu hoher Dichte vermehrt. Wenn eine optimale Zelldichte fast erreicht ist, werden die Umgebungsbedingungen in solche abgeändert, die für die Expression der DNA-Sequenz geeignet sind. Es wird daher in Betracht gezogen, daß die CNTF-Produktion in einer Zeitspanne erfolgt, die sich der Vermehrung der Wirtszelle auf die nahezu optimale Dichte anschließt, und das Ergebnis zu einem Zeitpunkt nach der Induzierung der für die Expression notwendigen Regulationsbedingungen geerntet wird. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der rekombinante CNTF nach der Expression in einer Wirtszelle oder einem Wirtsorganismus gereinigt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der rekombinante CNTF nach einer Expression in Mikroorganismen, besonders E. coli, gereinigt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der CNTF in seinem biologisch aktiven Zustand nach Rückgewinnung aus den Bakterienkulturen vorhanden. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform kann man eine Rückfaltung der CNTF ermöglichen, damit dieser seine aktive Struktur auf einer bestimmten Stufe im Reinigungsprozeß annimmt.

Zur Reinigung des rekombinanten Proteins wird eine gewisse Kombination der folgenden Stufen vorzugsweise angewandt: Anionenaustauschchromatographie (Mono-Q, Mono-S und/oder DEAE-Sephacel), Gelpermeationschromatographie (Superose), Chromatofokussierung (Mono-P) und hydrophobe Wechselwirkungschromatographie (Octyl- und/oder Phenyl-Sephacel).

Es versteht sich von selbst, daß die Anwendung der Lehren der vorliegenden Erfindung auf ein spezielles Problem oder Umgebung im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmanns im Lichte der hierin enthaltenen Lehren erfolgen wird.

Die folgenden Beispiele sollen bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung illustrieren, und sie schränken die Erfindung nicht ein, wie beansprucht wird. Alle in diesen Beispielen gelieferten Bezugnahmen sind durch Verweis gesondert aufgenommen.

### Beispiel 1

#### Proteinpräparation

##### A. Materialien

Hüftnerven vom ausgewachsenen Kaninchen wurden bezogen von Pel-Freez Biologicals, Rogers, Arkansas. Ammoniumsulfat (ultrarein) wurde gekauft bei Schwartz/Mann Biotech., Cleveland, Ohio. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Epsilon-Aminocapronsäure, Benzamidin, Pepstatin, Dithiothreitol (DTT), Poly-L-ornithin (P3655) und 3-[4,5-Dimethylthiosol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolbromid (MTT) wurden bezogen von Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. Mono-P-Chromatofokussierungs-FPLC-Säulen wurden bezogen von Pharmacia, Inc., Piscataway, New Jersey. Die C8-Umkehrphasen-HPLC-Säulen stammten von Synchrom, Inc., Lafayette, Indiana. Acetonitril wurde gekauft bei J. T. Baker, Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey. Trifluoressigsäure wurde bezogen von Pierce Chemicals, Rockford, Illinois. Endoprotease Asp-N und Lys-C wurde bezogen von Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana. Kalbsfötusserum wurde gekauft bei Hyclone Laboratories, Logan, Utah. Kulturmedium und Salzlösungen wurden bezogen von Costar, Cambridge, Massachusetts. Pathogenfreie fruchtbare Hühnerembryo-Nutzeier wurden bezogen von Spafas, Roanoke, Illinois.

##### B. SN-CNTF-Analyse

Kulturen primärer Hühnerembryo-Ziliarganglien wurden hergestellt, wie zuvor beschrieben (Collins, 1978, Develop. Biol. 65, S. 50; Manthorpe et al., 1986, Develop. Brain Research 25, S. 191). Um es kurz zu sagen: Die Ziliarganglien wurden von fruchtbaren pathogenfreien Hühnereiern, die 9–10 Tage lang bei 38°C in durchfeuchteter Luft inkubiert worden waren, entfernt. Die Ganglien wurden chemisch dissoziiert, und zwar zunächst durch 10minütige Exposition bei 37°C mit Hanks balancierter Salzlösung ohne zweiwertige Kationen, die 10mM HEPES-Puffer (pH = 7,2) enthielt, dann durch 12minütige Exposition bei 37°C mit einer Lösung aus 0,125%igem Bactotrypsin 1:250 (Difco, Detroit, Michigan) in Hanks balancierter Salzlösung mit Modifizierung, wie oben angegeben. Die Trypsinisierung wurde unterbunden durch Zusatz von fötalem Kalbsserum zu einer Endkonzentration von 10%.

Nach dieser Behandlung wurden die Ganglien in eine Lösung transferiert, die aus modifiziertem Dulbecco-Hochglukose-Eagle-Medium ohne Bikarbonat bestand und 10% fötales Kalbsserum sowie 10mM HEPES, pH = 7,2, enthielt, mechanisch dissoziiert durch etwa 10maliges Zerreiben über eine Pasteur-Glaspipette, deren Öffnung glattgeschmolzen und auf einen Durchmesser so verengt worden war, daß zum Füllen der Pipette 2 Sekunden benötigt wurden.

Die dissoziierten Ganglien wurden dann in einem Kulturmedium (modifiziertes Dulbecco-Eagle-Medium, ergänzt durch 10% Kalbsfötusserum, 4mM Glutamin, 60mg/l Penicillin-G, 25mM HEPES, pH = 7,2) 3 Stunden lang in 100-mm-Ø-Gewebekultur-Petrischalen (40 dissoziierte Ganglien pro Petrischale) ausplattiert. Die Vorplattierung erfolgte, um die nichtneuronalen Zellen,

die der Petrischale anhaften, von den Nervenzellen, die nicht anhaften, zu trennen. Nach 3 Stunden wurden die nichtanhaftenden Nervenzellen, durch Zentrifugierung eingesammelt, erneut im Kulturmedium suspendiert und in 50 µl pro Vertiefung (well) auf Halbfächen-96Bohrungen-Mikrotiter-Gewebekulturplatten mit einer Dichte von 1500 Nervenzellen pro Vertiefung plattiert. Die Mikrotiter-Vertiefungen waren zuvor über Nacht bei 4°C einer 1 mg/ml-Lösung von Poly-L-ornithin in 10 mM Natriumborat, pH 8,4, ausgesetzt worden, in destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet worden.

10 µl einer Reihenverdünnung der auf neurotrophe Aktivität zu analysierenden Probe wurden jeder Vertiefung zugesetzt, und die Schalen wurden 20 h lang bei 37°C in angefeuchteter Luft (7,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt) inkubiert. Nach 18 Stunden wurden pro Vertiefung 15 µl einer 1,5 mg/ml-Lösung des Tetrazolium-Farbstoffs MTT im modifizierten Dulbecco-Hochglukose-Eagle-Medium ohne Bikarbonat und mit 10 mM HEPES, pH = 7,2, zugesetzt und die Kulturen in den Inkubator (37°C) für 4 Stunden zurückgestellt. Dann wurden 75 µl einer Lösung von 8,7 ml 12 M HCl pro Liter Isopropanol zugesetzt und der Inhalt jeder einzelnen Vertiefung 30mal zerrieben, um die Zellen aufzubrechen und die Farbe zu suspendieren. Die Extinktion bei 570 nm wurde in bezug auf eine 690 nm-Referenz für jede Vertiefung mittels eines automatischen Mikrotiterplattenlesegeräts (Dynatech, Chantilly, Virginia) bestimmt. Die Extinktion von Vertiefungen, die kein neurotrophen Agens erhalten hatten (Negativkontrollen), wurden von der Extinktion der probenhaltigen Vertiefungen subtrahiert. Die resultierende Extinktion ist proportional der Zahl der lebenden Zellen in jeder Vertiefung, die definiert sind als diejenigen Nervenzellen, die den Farbstoff verringern können. Die Zahl der trophischen Einheiten der neurotrophischen Aktivität wurde definiert als der Kehrwert der Verdünnung, die ein 50%iges maximales Überleben der Nervenzellen ergab. Die Konzentration der trophischen Aktivität in trophischen Einheiten pro ml erhielt man durch Dividieren der gesamten trophischen Einheiten durch das Analysevolumen (60 µl). Die spezifische Aktivität wurde bestimmt durch Dividieren der Zahl der trophischen Einheiten durch den in der Probe enthaltenen Proteinanteil.

### C. Reinigung des SN-CNTF

Am Ende jedes der folgenden Schritte wurde das Präparat entweder sofort verarbeitet oder bis zur Verwendung bei -70°C bis zu 1 Woche gelagert.

#### Schritt 1: Rohextraktherstellung

100 g (Feuchtgewicht) Kaninchen-Hüftner (etwa 300 Nerven) wurden aufgetaut und 1 Minute lang pulverisiert mittels eines Polytron-Rotationshomogenisators (Kinematica, Schweiz) in 10 Volumen (Gewicht/Volumen) Wasser mit einem Gehalt von 10 mM EDTA, 1 mM Epsilon-Aminokapronsäure, 1 mM Benzamidin und 0,1 mM PMSF und 30 min lang bei 4°C mit 400 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde über Glaswolle gefiltert, um schwimmende Lipide zu entfernen.

#### Schritt 2: Säurebehandlung und Ammoniumsulfatfraktionierung

Die weiter unten genannten Zentrifugierungsschritte wurden 20 min lang mit 17 000 xg durchgeführt, und alle Arbeitsgänge wurden bei 4°C ausgeführt, wenn nicht anders angegeben. Das Rohextrakt wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels 5 N HCl auf pH = 3,6 azidifiziert und der resultierende Niederschlag durch Zentrifugierung entfernt. Der Überstand wurde mit 1 N NaOH auf pH = 6,3 titriert und der resultierende Niederschlag wiederum durch Zentrifugierung entfernt. Dem genannten Überstand wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, um eine 30%ige Sättigung zu erzielen, und der Niederschlag wurde durch Zentrifugierung entfernt. Ein weiterer Zusatz von Ammoniumsulfat zum Überstand zwecks Erzielung einer 60%igen Sättigung führte zum Niederschlag einer Proteinfraction, die den größten Teil der SN-CNTF-Aktivität enthielt. Der Niederschlag wurde aufgelöst in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH = 6,7, der mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,1 µM Pepstatin enthielt, um eine Proteinkonzentration von 8-13 mg/ml zu ergeben.

#### Schritt 3: Chromatofokussierung

Das obengenannte Präparat wurde über Nacht gegen ein 500mal größeres Volumen von 10 mM Natriumphosphat, pH = 6,7, mit einem Pufferwechsel dialysiert und 30 min lang bei 140 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Nylonfilter (0,22 µm Poren-Ø) passiert und mit 3 Injektionen von jeweils 3 ml an einer Mono-P-chromatofokussierenden FPLC-Säule (Bettvolumen 4 ml) mit Ausbalancierung in 25 mM bis-Tris-HCl-Puffer, pH = 5,8, beschickt. Die Säule wurde mit dem gleichen Puffer gespült, bis die Extinktion bei 280 nm des Ausflusses zur Grundlinie zurückkehrte. Die Probe wurde dann mit Polypuffer, pH = 4,0 (1-10 Verdünnung von PB74 von Pharmacia) chromatografiert.

Die Säulenfraktionen wurden eingesammelt und in bezug auf den pH-Wert und die CNTF-Aktivität analysiert. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Chromatographie an der Mono-P-Säule. Das Profil der eluierten Proteine ist als optische Dichte (O.D.) mit 280 nm grafisch dargestellt. Es wird überlagert von Diagrammen des pH-Wertes und der SN-CNTF-Aktivität, die bei jeder Fraktion gemessen wurden. Die durch den Strich mit dem Peak der SN-CNTF-Aktivität (pH = etwa 5) angezeigten Fraktionen wurden gesammelt und mit festem Ammoniumsulfat behandelt, um eine 95%ige Sättigung zu erzielen, und das Pellet wurde mittels Zentrifugierung aufgefangen, erneut suspendiert in gesättigter Ammoniumsulfatlösung und wiederum zentrifugiert, um den Polypuffer zu entfernen. Der Niederschlag wurde in genügend 10 mM-Natriumphosphatpuffer, pH = 6,7, aufgelöst, um eine Proteinkonzentration von 3-5 mg/ml (als „fokussierte Fraktion“ bezeichnet) zu ergeben. Charakteristischerweise wurde 1 Liter Originalrohextrakt in 8 gesonderten Durchgängen an der Mono-P-Säule verarbeitet.

#### Schritt 4: Präparative Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel-Elektrophorese

Die fokussierten Fraktionen aus Mehrfachdurchgängen über die Mono-P-Säule wurden 8 Stunden lang kombiniert und dialysiert gegen ein 100mal größeres Volumen von 10 mM-Natriumphosphatpuffer, pH = 6,7, wobei ein Pufferwechsel erfolgte; dann erfolgte ein Durchgang an einem 15% reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Plattengel nach dem Laemmli-Verfahren (1970). Jedes Auflösungsgel (resolving gel) war 0,3 cm dick, 14 cm hoch und 11,5 cm breit. Jedes Gel wurde mit 5,5 mg Protein beladen. Die Elektrophorese wurde bei 15°C und 40 mA/Gel durchgeführt, bis die 20 kd vorgefärbten Molekulargewichtsstandards den Boden des Auflösungsgels gerade erreichten. Um die Krümmung einzelner Proteinbanden über die Breite des Plattengels sichtbar zu machen, wurde das Gel bedeckt mit einer zuvor mit Wasser befeuchteten Nitrozelluloseschicht (0,45 µm Porengröße in Rollenform, bezogen von Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts), mit 2 Bogen vorgefeuchteten und 2 Bogen

trockenen Chromatografiepapier (3MM Chr., bezogen von Whatman, Hillsboro, Oregon), einer Glasplatte und einer 500-ml-Glasflasche als Gewicht. Nach 30–45 Minuten wurde das Profil des Gels mittels eines wasserunlöslichen Markers auf das Nitrozellulosepapier aufgezeichnet. Das Papier wurde 3mal gewaschen mit 10mm Tris-HCl-Puffer, pH = 8,0, das 0,15M NaCl und 0,3%iges NP-40-Reinigungsmittel enthielt, und dann 15–30 Minuten lang mit einer 1:1 000-Verdünnung von Kohinuor-Rapidograph-Tinte (verfügbar in stationären Versorgungsläden) im obengenannten Puffer gefärbt.

Das Originalgel wurde auf eine Glasplatte gelegt und seine Konturen wurden nach denen des unter der Glasplatte angebrachten gefärbten Nitrozellulosepapiers ausgerichtet. Der Gelbereich, der der relativen Molekülmasse von 22–27 kD entsprach, wurde unter Bezugnahme auf den Durchlauf in engen Bahnen an beiden Enden jedes Gels mit vorgefärbten Standards relativer Molekülmasse lokalisiert. Dieser Bereich wurde in der Breite des Gels in sieben 2,5-mm-Parallelstreifen zerschnitten unter Benutzung der Bandenkrümmung, die durch gefärbtes Nitrozellulosepapier sichtbar gemacht wurde. Jeder einzelne Gelstreifen wurde in kleinere Stücke (2,5 × 2 mm) zerschnitten und die Proteine wurden 6 Stunden lang in einer 1:1-Lösung des Laemmli-Laufpuffers mittels eines elektrophoretischen Konzentrators (ISCO, Lincoln, Nebraska) elektrophoretisch eluiert. Die eluierten Proteine wurden in einem Volumen von 0,2 ml eingesammelt. Abb. 2 stellt die Verteilung der neurotrophen Aktivität im Eluat aus jedem der 7 Streifen (mit der Aufschrift a–g in der Reihenfolge abnehmender relativer Molekülmasse) grafisch dar. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität (Streifen d) wurde mittels Umkehrphasen-HPLC weiter gereinigt.

#### Schritt 5: Umkehrphasen-HPLC

Dem Geleluat wurden Dithiothreitol (DTT) und 10%-Trifluoressigsäure (TFA) zur Erzielung von Endkonzentrationen von 2% bzw. 0,3% zugesetzt. Die Probe wurde mittels 0,22-µm-Nylonfilter gefiltert, an einer C8-Umkehrphasen-HPLC-Säule beladen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1%-TFA:Azetonitril/0,1% TFA-Gradienten eluiert.

Die Fraktion wurde in silikonisierten Röhren gesammelt, die 5 µl eines 0,4%igen Tween-20-Reinigungsmittels enthielten. Aus jeder Fraktion wurden Aliquoten auf neurotrophe Aktivität analysiert. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Umkehrphasenchromatografie. Die Proteinkonzentration wird angegeben durch eine Extinktion bei 215 nm, und sie wird überlagert von der Verteilung der neurotrophen Aktivität. Die Fraktionen mit der Peak-SN-CNTF-Aktivität (Fraktionen 37–40, Abb. 3) wurden zur Sequenzierung eingesammelt, wie in Beispiel 2 beschrieben. In einer separaten Präparation wurden Fraktionen, die der Peak-CNTF-Aktivität benachbart waren, diese einschlossen und mit den Fraktionen 36–44 in Abb. 3 äquivalent waren, auch mittels silbergefärbter reduzierender SDS-PAGE (Abb. 4) analysiert.

Es wurden auch zwei zusätzliche chromatografische Schritte durchgeführt. Diese Schritte bestätigten die Reinheit des oben hergestellten CNTF. Die beiden zusätzlichen chromatografischen Schritte werden beide das Prinzip der hydrophoben Wechselwirkungschromatografie (HIC) an. Der erste HIC-Schritt ist ein konventionelles säulenchromatografisches Verfahren, das nach Schritt 2 angefügt wird: pH-Wert und Ammoniumsulfatfraktionierung. Das aufgelöste Material nach Ammoniumsulfatfällung wurde mit 10 mM-Natriumphosphatpuffer, pH = 6,7 (Puffer B) weiter verdünnt, bis die Ionenstärke (mit einem Leitfähigkeitsmesser gemessen) äquivalent war mit der des Puffers B, der 0,3 M Ammoniumsulfat und 5%-Isopropanol (Puffer A) enthielt. Der verdünnten Probe wurde dann Isopropanol bis auf eine Endkonzentration von 5% zugesetzt und das Gemisch auf eine Phenyl-Sepharose-CL4B-Säule (Pharmacia, Inc., Piscataway, New Jersey) bei Äquilibrierung mit Puffer A angewandt. Pro ml des Säulen-Bettvolumens wurden nicht mehr als 3 mg Probenprotein angewandt. 1 Liter Hüftnerohextrakt ergab typischerweise 50 ml des wiederaufgelösten Ammoniumsulfatpellets, das dann auf 70–100 ml verdünnt, wie oben erwähnt, und auf eine 110-ml-Phenyl-Sepharosesäule angewandt wurde. Die Säule wurde schrittweise eluiert, beginnend mit 3 Bettvolumen von Puffer A, dann folgten 3 Bettvolumen von Puffer B und schließlich 2 Bettvolumen von Puffer B mit 50%-Ethylenglycolgehalt (Puffer C), und dann mit 5 Bettvolumen Wasser gewaschen. 18 ml Fraktionen des eluierten Materials wurden eingesammelt.

Abb. 7 zeigt die Ergebnisse eines solchen Chromatografie-Durchgangs. Das Profil eluierter Proteine wurde kontinuierlich durch O.D. 280 (ausgezogene Linie) überwacht. Die O.D.-Durchzeichnung ist überlagert vom Profil der eluierten SN-CNTF-Bioaktivität in jeder Fraktion (Linie, die x's verbindet), wie gemessen wurde in der in der Originalpatentanmeldung beschriebenen Ziliarganglion-Überlebensanalyse. Die SN-CNTF-Bioaktivität entwickelte sich aus der Säule während der Elution mit Puffer C. Die Säulenfraktionen, die den größten Teil der Bioaktivität enthielten (angegeben durch den Strich in Abb. 7), wurden eingesammelt und durch Druckanalyse mittels Amicon-YM-10-Membran (Amicon Division, W. R. Grace & Co., Danvers, MA) auf etwa 1/10 des ursprünglichen Volumens konzentriert, was typischerweise zu einer Protein-Endkonzentration von 2,5–3,0 mg/ml führte. Das Konzentrat wurde insgesamt 6 Stunden lang gegen 3 Wechsel des 55mal größeren Volumens von B dialysiert. Das dialysierte Material wurde durch einen 0,2 µm-Poren-Ø-Acrodiscfilter (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI) passiert und in Mehrfachinjektionen von jeweils 2 ml an einer Mono-P-chromatofokussierenden Säule aufgeladen, wie in der Originalpatentanmeldung beschrieben.

Ohne diesen HIC-Säulenschritt machte 1 Liter Hüftnerohextrakt aufgrund der begrenzten Proteinaufladungskapazität der Säule 8 separate Durchgänge an der Mono-P-chromatofokussierenden Säule erforderlich, wie in der Anfangspatentanmeldung beschrieben. Mit der Hinzufügung des HIC-Säulenschrittes könnte 1 Liter Rohextrakt in einem einzigen Chromatofokussierungsdurchlauf verarbeitet werden.

Der zweite HIC-Schritt wurde nach dem ursprünglichen Schritt 3 eingefügt: Chromatofokussierung an Mono-P. Jedem ml des chromatofokussierten Materials (bei 3–5 mg/ml Protein) wurden 2 ml 50 mM-Phosphatpuffer, pH = 6,7, zugesetzt, das 1,5 M-Ammoniumsulfat (Puffer D) enthielt. Das Gemisch wurde dann durch einen 0,2 µm-Poren-Ø Acrodisc-Filter passiert und in Mehrfachinjektionen von jeweils 2 ml an einer Alkyl-Superose-HR 10/10-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgeladen, die mit Puffer D ausbalanciert war. Die Säule wurde mit Puffer D gewaschen, bis die Extinktion des Zuflusses bei O.D. 280 zur Basislinie zurückkehrte. Die Säule wurde dann mit einem 60-ml-Lineargradientendurchlauf von Puffer D in Puffer E (50 mM-Phosphatpuffer, pH = 6,7) eluiert und es wurde 1 ml Fraktionen eingesammelt.

Abb. 8 illustriert die Ergebnisse eines solchen FPLC-HIC-Säulendurchlaufs. Die durchgehende Linie repräsentiert das Profil des mittels O.D. 280 gemessenen eluierten Proteins. Es wird überlagert von einem Diagramm der SN-CNTF-Bioaktivität in jeder Gradientenfraktion. Die bioaktivitätshaltigen Fraktionen (angegeben durch den Strich in Abb. 8) wurden eingesammelt und in einem Centricon-10-Konzentrator (Amicon) auf 0,5 ml konzentriert. Die Probe wurde durch Zusatz von 2 ml Puffer B zum oberen Reservoir verdünnt und durch Zentrifugierung auf ein Endvolumen von 0,5 ml aufgesättigt. Verdünnung und Aufsättigung

wurden noch 2mal wiederholt und die endgültig aufgesättigte Probe wurde über ein reduzierendes SDS-15%-Polyacrylamid-Präparativ-Plattengel geleitet, wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, daß eine vorherige Dialyse nicht nötig war. Abb. 9 vergleicht den abschließenden Reinigungsschritt nach Umkehrphasen-HPLC im Anfangsreinigungsverfahren (obere Tafel) und im Reinigungsverfahren nach Hinzufügung der beiden HIC-Schritte (untere Tafel). Jede Tafel zeigt das Profil eluierter Proteine (die durchgehende Linie ist O.D. 280 und die darüberliegende SN-CNTF-Bioaktivität (Linie, die x's verbindet). Aus der Abbildung wird deutlich, daß in der Probe, die im neuen Reinigungsverfahren dem Umkehrphasen-HPLC unterworfen wurde, viel weniger verunreinigendes Protein enthalten ist. Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, daß die spezifische Aktivität des durch das neue Verfahren produzierten CNTF im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch ist mit der spezifischen Aktivität des durch das frühere Verfahren (Tabelle 1) produzierten CNTF, was darauf hindeutet, daß der durch das oben beschriebene ursprüngliche Verfahren hergestellte CNTF bis zur Homogenität gereinigt wurde. Der Vorteil des neuen Reinigungsverfahrens besteht darin, daß 8 Liter Startmaterial heute so bequem verarbeitet werden können wie 1 Liter mit Hilfe des ursprünglichen Verfahrens.

#### Beispiel 2

##### Sequenzierung des gereinigten neurotrophen Faktors

Fractionen mit der Peak-SN-CNTF-Aktivität (#37-40, Abb. 3) wurden gesammelt und mittels Vakuumverdampferzentrifuge auf 50 µl konzentriert. Die konzentrierte Probe enthielt 0,14% Tween 20. Sie wurde verdünnt mit 1 %-Ammoniumbicarbonat zu einem Endvolumen von 350 µl und über Nacht bei 37°C mit Endoprotease-Asp-N oder Endoprotease-Lys-C behandelt. Das Gemisch wurde mit einer Vakuumverdampferzentrifuge auf etwa 50-100 µl konzentriert und mittels einer 1-ml-Probenschleife auf eine Aquapore-RF-300-08-Umkehrphasen-HPLC-Kapillarsäule geladen (Brown Labs.), 2,1 x 220 mm, eluiert mit H<sub>2</sub>O/0,1%-TFA; Acetonitril/0,1%-TFA-Gradient, geladen. Peptidhaltige Fraktionen wurden manuell in Eppendorf-Röhren auf der Basis der Absorption bei 215 nm eingesammelt. Abb. 5 zeigt das Profil eluierter Peptide nach Aufschließung mittels Endoprotease Asp-N, bestimmt durch Extinktion bei 215 nm. Abb. 6 zeigt das Profil eluierter Peptide nach Aufschließung mit Endoprotease Lys-C und anschließender Reduktion und Carboxymethylierung. Die Aminosäuresequenz der hervorstechenden Peptide wurde mit Hilfe eines Gasphasenproteinsequenzators bestimmt. Eine zusätzliche Aminosäuresequenz wurde erzielt mit Hilfe der Spaltungsenzyme Chymotrypsin und der Endoprotease Glu-C (Boehringer, Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Diese zusätzliche Proteinsequenz ermöglichte es, einige der obengenannten Aminosäuresequenzen zu größeren Peptiden aus überlappenden Aminosäurestreckungen zusammenzusetzen. Die neuen Aminosäuresequenzen und diejenigen, die mit früheren Sequenzen zusammengefügt wurden, werden nachstehend angegeben:

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

#### Beispiel 3

##### Präparation von Antikörpern zum neurotrophen Faktor

Antikörper, die mit gereinigtem Kaninchen-SN-CNTF reagieren, werden zur Prüfung von Expressionsbanken brauchbar sein, um das Gen zu erhalten, das den Kaninchen-SN-CNTF kodiert. Darüber hinaus werden Antikörper, die seine biologische Aktivität neutralisieren, bei unversehrten Tieren zur Bestimmung der biologischen Rolle dieses neurotrophen Faktors verwendet werden. Um solche Antikörper zu präparieren, werden unter Verwendung eines automatisierten Applied-Biosystems-Proteinsynthesators synthetische Peptide synthetisiert, die Bereichen der SN-CNTF-Sequenz entsprechen. Solche synthetischen Peptide werden kovalent verbunden sein mit dem Trägerprotein-Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin). Das konjugierte Peptid wird Meerschweinchen in vollständigem Freundschens Adjuvans injiziert, wobei nach 3 und 6 Wochen bei unvollständigem Adjuvans Aktivierungsspritzen gegeben werden. Jedem Meerschweinchen werden Serumproben entnommen und in einem Western-Blot gegen gereinigten SN-CNTF verwendet, um zu bestimmen, ob der Antikörper im Serum mit dem gereinigten Protein reagiert. Positive Seren im Western-Versuch werden weiter getestet bezüglich der Fähigkeit, die neurotrophe Aktivität in dem zur Reinigung verwendeten Tierversuch zu neutralisieren. Positive Seren im Western- oder im Neutralisierungsversuch werden wie folgt weiter gereinigt: (1) Die Seren werden absorbiert mit dem Trägerprotein-Schlüsselloch-Napfschnecken-Hämocyanin, um Antikörper zu entfernen, die gegen dieses Protein gerichtet sind; dann werden die Seren in den genannten Versuchen erneut getestet; (2) die IgG-Antikörperfraktion wird vom Serum mittels Standardverfahren gereinigt und in den genannten Versuchen erneut getestet. Beide Schritte werden einen polyklonalen Antikörper liefern, der rein genug ist, um zur Prüfung von Expressionsbanken zum Zwecke der Klonierung der Messenger-RNA und des Gens für den SN-CNTF verwendet zu werden.

Die Antikörper wurden in Kaninchen zu einem synthetischen Peptid „A“ erzeugt, das einem Teil der Aminosäuresequenz des in Beispiel 2 angegebenen Kaninchen-SN-CNTF entsprach (E-S-Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N). Weiter unten in diesem Beispiel sind Verfahren ausführlich angegeben. Affinitätsgereinigte Antikörper gegen das synthetische Peptid A (Anti-Peptid-A-Antikörper) wurden präpariert, indem immunisiertes Kaninchen-Antiserum über eine Affinitätsäule geleitet wurde, die das kovalent gebundene synthetische Peptid A enthielt, und dann gebundene Antikörper eluiert wurden. Das unfractionierte Immunantiserum ergab einen Titer von ca. 10<sup>5</sup> in einem ELISA-Versuch, in dem beschichtete Peptid-A-Vertiefungen (wells) benutzt wurden. Es wurde in einer 1:50-Endverdünnung für die Western-Blot-Analyse verwendet. Der affinitätsgereinigte Anti-Peptid-A-Antikörper, der präpariert wurde, wie unten beschrieben, wurde in der Western-Blot-Analyse in einer Endkonzentration von 80 µg/ml verwendet.

Durch die Western-Blot-Analyse der reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) des gereinigten SN-CNTF wurde nachgewiesen, daß sowohl das Anti-Peptid-A-Antiserum als auch die affinitätsgereinigten Antikörper in Wechselwirkung mit gereinigtem Kaninchen-SN-CNTF stehen. Präimmunserum vom gleichen Kaninchen stand unter diesen Bedingungen in Wechselwirkung mit dem SN-CNTF. Aliquoten der Peak-Fraktion des CNTF aus dem letzten Umkehrphasen-HPLC-Reinigungsschritt (Fraktion #46, Abb. 9, Tafel B) wurden in zwei separaten Bahnen einer reduzierenden SDS-PAGE

unterworfen. Jeder Bahn des gereinigten CNTF war eine Bahn benachbart, die Markerproteine bezüglich relativer Molekülmasse enthielt. Das Gel wurde in zwei Tafeln zerschnitten, jede davon enthielt eine Bahn des gereinigten CNTF und eine benachbarte Bahn von Markerproteinen. Eines der Teile war silbergefärbt, um Proteine zu lokalisieren (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), das andere wurde durch Western-Blot-Analyse (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76:4350) auf Proteine untersucht, die mit den affinitätsgereinigten Anti-Peptid-A-Antikörpern reagierten.

Die linke Tafel der Bahnen in Abb. 10 zeigt, daß die Peak-Fraktion des umkehrphasengereinigten CNTF zwei eng benachbarte Proteinbande enthält, die mit etwa 25000 Dalton laufen und voneinander durch etwa 500 Dalton nach reduzierender SDS-PAGE getrennt sind. Wenn silbergefärbte Gele mit gereinigtem CNTF überladen sind, ist es oft nicht möglich, die beiden Banden aufzulösen, wie in Abb. 4.

Die rechte Bahntafel in Abb. 4 zeigt, daß beide Banden durch affinitätsgereinigte Anti-Peptid-A-Antikörper erkannt und gefärbt wurden. Diese Erkennung ist spezifisch, da die beziehungslosen Markerproteine in der am weitesten links befindlichen Bahn des rechten Paares nicht von den Anti-Peptid-A-Antikörpern erkannt werden, obwohl sie in hoher Konzentration anwesend sind, wie in den linken silbergefärbten Bahnen gezeigt wurde (Abb. 10). Das Präimmunsersum aus diesem gleichen Kaninchen erkennt die beiden Banden des gereinigten CNTF ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es mindestens 2 verschiedene CNTF-Formen gibt, die sich durch ca. 500 Dalton in der relativen Molekülmasse bei reduzierender SDS-PAGE unterscheiden. Zur Präparation von Anti-Peptid-A-Antikörpern wurde synthetisches Peptid A zu Schlüsseloch-Napfschnecken-Hämoxyanin (SNH) konjugiert, um dessen Antigenität zu erhöhen. Für die Konjugation wurden 1 mg Peptid A und 1 mg SNH (Calbiochem., La Jolla, CA) in 50% Glycerol in 0,5 ml PBS (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH = 7,4, das 0,15 M NaCl enthielt) aufgelöst. Es wurde 10% Glutaraldehyd tropfenweise unter Vermischen und zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt; die Reaktion wurde unter Vermischen bei Zimmertemperatur über Nacht stehengelassen und dann mit PBS auf 5 ml verdünnt. Die Konjugationsmischung wurde mit vollständigem Freundschens Adjuvans 1:2 emulgiert und 2 Neuseeland-Kaninchen an mehreren dorsalen Stellen subkutan mit ca. 100 µg Peptid A pro Kaninchen injiziert. Drei Wochen später bekam jedes Kaninchen eine Boosterdosis von 50 µg konjugierten Peptids A in unvollständigem Freundschens Adjuvans verabreicht.

Danach wurden in 14-tägigen Abständen ähnliche Boosterinjektionen verabreicht, bis das Antiserum einen Titer von mindestens 100000 in einem ELISA-Versuch (Tainer et al., 1984, Nature 312, S. 127) mittels peptid-A-beschichteter Vertiefungen ergab. Die Seren wurden präpariert aus Blut, das der Ohrvene 5 Wochen nach der Anfangsinjektion und 14-tägig danach entnommen wurde. Die Seren wurden bei -70°C gelagert.

Um eine Peptidaffinitätsäule zu präparieren, wurde Peptid-A kovalent an eine Chromatographiesäulenmatrix wie folgt angelagert: Zu 8 mg Peptid A, das aufgelöst wurde in 0,4 ml PBS, das 4 M Guanidinhydrochlorid enthielt, wurden 4,5 ml von 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH = 8,0, und von 0,5 M NaCl zugesetzt. 1 g gefriergetrocknete aktivierte CH-Sepharose 4 B (Pharmacia) wurde gewaschen, in 200 ml 1 mM-HCl aufgequollen und sofort in die Peptid-A-Lösung überführt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C geschüttelt. Das Gel wurde dann in einer klinischen Zentrifuge sedimentiert und der Überstand zur Bestimmung der Peptid-A-Menge, die mit der Matrix gekoppelt wurde, aufbewahrt. 15 ml 0,1 M-TRIS-Puffer, pH = 8,0, wurden dem Gelpellet zugesetzt und bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang inkubiert, um unreaktierte Kopplungsgruppen auf der Gel-Matrix zu blockieren. Das Gel wurde dann in eine Säule (3 ml Bett) gepackt und 3 mal mit folgender Puffersequenz gewaschen: (1) 10 Bettvolumen von 0,1 M-Azetatpuffer, pH = 4,0, die 0,5 M NaCl enthielten; (2) 0,1 M TRIS-Puffer, pH = 8,0, der 0,5 M NaCl enthielt. Schließlich wurde die Säule ausbalanciert mit PBS, das 0,02% Natriumazid enthielt. Die Differenz in der Konzentration freier Aminogruppen wurde in der Originalpeptid-A-Lösung und im Überstand nach Konjugation mittels Fluorescamin (Chen et al., 1978, Arch. Biochem. Biophys. 189:241; Nowicki, 1979, Anal. Letters 12, S. 1019) bestimmt. Diese Analyse zeigte, daß 92-93% des Peptids aus der Lösung verdrängungen und mit der Sepharose-Gelmatrize konjugiert worden waren.

Vor der Affinitätsreinigung des Anti-Peptid-A-Antikörpers wurden 8 ml immunisiertes Kaninchensersum über Nacht gegen 2 Liter PBS dialysiert. Die Peptid-A-Sepharose-Säule wurde sequentiell mit jeweils 10 Bettvolumen folgender Substanzen gewaschen: 0,1 M Glycin-HCl, pH = 2,5; PBS; 0,1 M Triethylamin, pH = 11,5; dann PBS. Das dialysierte Serum wurde 3 mal durch die Säule geleitet, um eine vollständige Bindung der Anti-Peptid-A-Antikörper zu gewährleisten. Die Säule wurde mit 20 Bettvolumen PBS gewaschen, dann sequentiell mit jeweils 4 Bettvolumen folgender Substanzen eluiert: 0,1 M Glycin-HCl, pH = 2,5; PBS; 0,1 M Triethylamin, pH = 11,5; dann PBS. 1 ml Fraktionen wurden eingesammelt. Die Eluate der Glycin- und Triethylaminwaschungen wurden sofort mit 1 M TRIS, pH = 9 bzw. 7, neutralisiert und Aliquoten in bezug auf Anti-Peptid-A-Antikörper in einem ELISA-Versuch mittels peptid-A-beschichteter Vertiefungen analysiert. Die höchsten Titerfraktionen (typischerweise innerhalb von 3 Bettvolumen des Beginns der Glycin- und Triethylaminelution) wurden eingesammelt und gegen PBS dialysiert. Nach Entfernung der Schwebstoffteilchen durch kurze Zentrifugierung wurde der affinitätsgereinigte Anti-Peptid-A-Antikörperüberstand bei -70°C gelagert.

#### Beispiel 4

##### Klonierung des Gens für SN-CNTF

Das letzte Ziel der zu beschreibenden Untersuchung ist die Klonierung und Expression des humanen SN-CNTF-Gens, um Material zu präparieren, das zur Verwendung bei pharmazeutischen Präparaten für Menschen geeignet ist. Da die gewonnenen Peptidsequenzen den Kaninchen-SN-CNTF betreffen und Kaninchen- und Humansequenzen nicht identisch sein können, ist es vernünftig, die Klone des Kaninchengens über eine Hybridisierung mit synthetischen Oligonucleotiden auf der Basis der Proteinsequenz zu erzielen und die Kaninchen-Klone als Hybridisierungssonden in Screenings für das menschliche Gen anzuwenden.

Gewonnen werden sowohl die genomische als auch die Messenger-RNA (mRNA)-Sequenz, die Kaninchen- und Human-SN-CNTF kodieren. Die mRNA-Sequenz wird für die Expression des Proteins von Nutzen sein, während die genomische Sequenz wichtig ist zum Verständnis der Struktur und Regulation des Gens für den SN-CNTF. Um diese Sequenzen zu gewinnen, werden sowohl die genomischen Banken von Kaninchen und Mensch als auch die cDNA-Banken von Kaninchen und Mensch, die aus von Hüftnerven isolierten mRNA hergestellt wurden, einem Screening unterworfen. Im Prozeß der Gewinnung des Gens, das der Sequenz des Kaninchen- oder Human-SN-CNTF entspricht, ist es auch möglich, in bezug auf strukturell eng verwandte Gene zu screenen, die zusätzliche Glieder dieser Familie neurotropher Faktoren darstellen können.



### A. SN-CNTF-Gen

Um die Kaninchen-Genomsequenzen, die SN-CNTF kodieren, zu isolieren, werden eine Kaninchen-Genombank (Clontech) auf dem E. coli nm 538-Bakterienstamm ausplattiert und etwa 1 000 000 rekombinanter Klone einem Screening unterworfen. Bereiche der Proteinsequenz des Kaninchen-SN-CNTF, die durch die wenigsten Codons repräsentiert werden können, werden umkehrtranslatiert, und entsprechende degenerierte Oligonucleotidsonden werden synthetisiert. Die Kaninchen-Oligonucleotide werden markiert durch Kinasierung entsprechend dem Standardprotokoll von Maniatis et al. (1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). Die DNA-Kinase wurde bezogen von der US Biochemical Corporation und das  $\gamma$ -markierte ATP von ICN.

Die Oligonucleotide werden markiert zu einer spezifischen Aktivität von mindestens 1 000 000 cpm pro Pikomol. Nach Plattierung der genomischen Bank werden etwa 1 Million Plaques auf Doppel-Nitrozellulosefilter überführt. Die Filter werden dann entsprechend den Verfahren von Maniatis et al. (1982, *ibid*) verarbeitet und über Nacht mit einer radioaktiv markierten Oligonucleotidsonde hybridisiert. Die Hybridisierungsmischung umfaßt 6x SSCP, 2x Denhardt's, 0,05% Natriumpyrophosphat, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 100  $\mu$ g Hefe-tRNA (Sigma), pH = 8,0. Die Hybridisierungstemperatur liegt mehrere Grade unter der errechneten Temperatur des Oligonucleotids. Klone, die mit mehreren Sonden auf der Basis unterschiedlicher Bereiche der Proteinsequenz hybridisieren, werden plaque-gereinigt und die Hybridisierungsbereiche werden sequenziert durch das Didesoxyterminationsverfahren (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, S. 5463) mittels Sequenase (US Biochemicals Corp.), um diejenigen Klone zu identifizieren, die die SN-CNTF-Proteinsequenz kodieren.

### B. mRNA-Sequenzen des SN-CNTF

Die gesamte zelluläre RNA wird aus Hüftnerve des Kaninchens und des Menschen gewonnen. Das Gewebe wird in einer Guanidinthiocyanat/ $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung homogenisiert, und die RNA wird durch Sedimentierung über Cäsiumchloridgradienten gereinigt (Glison et al., 1974, Biochemistry 13: 2633). Die polyadenylierte RNA wird chromatografisch auf Oligo(dt)zellulose selektiert (Avid und Leder, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. 69, S. 408). Die quantitative RNA-Blot-Hybridisierungsanalyse wird mit „antisense“-Oligonucleotidsonden durchgeführt, um das Vorherrschen von SN-CNTF-Sequenzen in jedem RNA-Präparat einzuschätzen und dadurch die Zahl der unabhängigen Klone zu ermitteln, die man zum Screenen benötigen würde, um mindestens eine 99%ige Wahrscheinlichkeit der Gewinnung von CNTF-Klonen zu haben. Genügend doppelsträngige komplementäre DNA werden synthetisiert, wie von Gubler und Hoffman, 1983, Gene 25, S. 263, beschrieben, und in den Lambda-gem 2-Vektor (Promega Biotech) entsprechend Palazzolo und Meyerowitz, 1987, Gene 52, S. 197, inseriert.

Klone, die Kaninchen-SN-CNTF kodieren, werden durch Hybridisierung rekombinanter Phagen-Plaques, wie oben beschrieben, identifiziert. Die Identität der Klone wird verifiziert durch Bestimmung der Nucleotidsequenzen, um die Übereinstimmung mit der gesamten bekannten Proteinsequenz zu ermitteln. Es werden Screenings der cDNA-Bank des menschlichen Hüftnervs mit zufallsvorbereiteten (randomly primed) Kaninchen-SN-CNTF-cDNA-Sonden (Feinberg und Vogstein, 1983, Anal. Biochem. 132, S. 6) durchgeführt, was ein zuverlässigeres Verfahren zum Nachweis von Quer-Spezies-Hybridisierung darstellt als die Verwendung kleinerer Oligonucleotide, die zum Screenen der Kaninchen-cDNA-Banken benutzt werden. Die Polymerase-Kettenreaktion (PKR) (Saiki et al., 1988, Science 239, S. 487) wurde verwendet zur Verstärkung von DNA-Fragmenten, die Kaninchen-CNTF-Aminosäuresequenzen entsprechen. Solche DNA-Fragmente wurden verstärkt aus genomischen DNA von Mensch und Kaninchen und aus cDNA des Kaninchen-Hüftnervs und des Sympathicusganglions. Die verstärkten DNA-Fragmente wurden subkloniert und mittels Standardverfahren (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York,) sequenziert.

Die durch PKR gewonnenen DNA-Fragmente wurden auch als Sonden benutzt, um eine Kaninchen-Hüftnerv-cDNA-Bank und eine genomische DNA-Bank des Menschen zu screenen. Ein positiver Kaninchen-cDNA-Klon und positive menschliche genomische Klone wurden gereinigt und partiell sequenziert. Die Sequenz des offenen Leserasters, die der kodierenden (mRNA-äquivalenten) Sequenz für den Kaninchen- oder Human-CNTF entsprach, bestätigte die Sequenz der DNA-Fragmente der mittels PKR gewonnenen kodierenden Region. Die resultierenden kodierenden Sequenzen für Kaninchen- und Menschen-CNTF sind in den Abb. 11 bzw. 12 angegeben.

Teile der aus dem Kaninchen-SN-CNTF erhaltenen Aminosäuresequenz wurden umkehrtranslatiert in die degenerierten Oligonucleotide #1, 13, 7 und 12 und deren Komplemente #3, 14, 8 und 17. Die Aminosäuresequenz (oben) und die Lokalisierung und Nummerierung der entsprechenden sinn- und gegensinndegenerierten Oligonucleotide (darunter) werden wie folgt angegeben:

```

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
(5') ****12***** (3')
(3') ****17***** (5')

```

Die Nucleotidsequenz der Sinn-version jedes der degenerierten Oligonucleotide wird wie folgt angegeben (hierbei entspricht N jedem Nucleotid):

```

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

```



Separate Polymerase-Kettenreaktionen wurden unter Verwendung von genomischen DNA von Menschen oder Kaninchen als Matrize und Oligonucleotide #s 1 und 8 oder #s 1 und 17 als Primer durchgeführt, um die entsprechenden Bereiche der Menschen- und Kaninchen-CNTF-Gene zu verstärken. Southern-Blots der Reaktionsprodukte (sondiert mit radioaktiv markiertem Oligonucleotid #13) ließen die Existenz markierter Banden in einer Größe von ca. 66 Basenpaaren (#s 1 und 8) und ca. 366 Basenpaaren (#s 1 und 17) erkennen.

Die gleichen PCR-Reaktionen, die oben beschrieben wurden, wurden mittels cDNA durchgeführt, die entweder aus Kaninchen-Hüftnerv-mRNA oder Kaninchen-Sympathicus-Ganglion-mRNA präpariert worden waren. Die RNA wurde aus Kaninchen-Hüftnerven oder -Sympathicusganglien präpariert und über eine Oligo-dT-Säule geleitet, um für Messenger-RNA (mRNA) zu selektieren, wie oben beschrieben. Eine komplementäre DNA (cDNA) wurde mit Umkehrtranskriptase präpariert, wobei die mRNA als Matrize und die Oligo-dT als Primer benutzt wurden. Wenn die PCR durchgeführt wurde unter Verwendung jeder cDNA als Matrize und jedes Oligonucleotids #s 1 und 8 oder #s 1 und 17 als Primer, wurden Fragmente verstärkt, die die gleiche Sequenz hatten wie die, die aus der Kaninchen-Genom-DNA verstärkt worden waren (Abb. 11). Dies deutet darauf hin, daß es im proteinkodierenden Bereich des CNTF-Gens zwischen den Oligonucleotiden #s 1 und 17 keine Intervening-Sequenzen (Introns) gibt.

Um mehr von der kodierenden (mit der Messenger-RNA äquivalenten) Sequenz für Kaninchen-CNTF zu erhalten, wurde eine zusätzliche Strategie angewandt:

Mittels Kaninchen-Hüftnerv-mRNA als Matrize und eines Oligo-dt/Not-I-Linkeradapters als Primer wurden doppelsträngige cDNA präpariert. Anschließend wurde durch Ligation stumpfer Enden dem 5'-Ende der doppelsträngigen cDNA ein EcoRI/XmnI-Linkeradapter (5'-AATTCGAACCCCTTCG-3') hinzugefügt (Maniatis et al., *ibid.*). Mittels dieser cDNA als Matrize und Oligonucleotiden #8- sowie EcoRI/XmnI-Linkeradapter als Primer wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Ein Southern-Blot der Reaktionsprodukte (mit radioaktiv markiertem Oligonucleotid #13 sondiert) ließ die Existenz einer markierten Bande mit einer Größe von etwa 200 Basenpaaren erkennen.

Um cDNA-Klone für den Kaninchen-CNTF zu erhalten, wurde eine cDNA-Bank aus Kaninchen-Hüftnerv-Poly(A)+mRNA präpariert, wobei die oben beschriebenen Verfahren angewandt wurden mit der Ausnahme, daß anstelle des Lambda-gem2 ein Lambda-gt10-Vektor (Stratigene) verwendet wurde.  $4 \times 10^6$  Plaques dieser Bank wurden einem Screening unterworfen, wobei eine Sonde verwendet wurde, die präpariert worden war durch Zufallsmarkierung eines M13-Subklons eines PCR-Fragments, das aus Kaninchen-Sympathicusganglion-cDNA als Matrize sowie Oligos #8- und EcoRI/XmnI-Linkeradapter als Primer (s. o.) gewonnen wurde. Das Einzelprimärpositiv wurde durch einen Tertiärscreen plaque-gereinigt. Nach Aufschließung mit EcoRI ergab die DNA aus diesem Klon 3 Fragmente zusätzlich zu den Lambda-Abzweigungen: ca. 2,0, 1,5 und 0,6 kb in der Länge. Durch Southern-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, daß sich das 1,5-kb-Fragment hybridisiert mit anderen CNTF-spezifischen Oligonucleotiden und PCR-Fragmenten, auf die oben verwiesen wurde. Die DNA-Sequenz dieses 1,5-kb-cDNA-Fragments legte fest, daß sie die gesamte kodierende Sequenz für Kaninchen-CNTF enthielt (Abb. 11).

Um genomische DNA-Klone für menschlichen CNTF zu erhalten, wurden etwa  $3 \times 10^6$  Plaques einer menschlichen genomischen DNA-Bank im Vektor Lambda LMBL3 einem Screening unterworfen; dazu wurde eine Sonde verwendet, die präpariert worden war durch Zufallsmarkierung eines M13-Subklons eines PCR-Fragments, das aus einer menschlichen genomischen DNA als Matrize und aus Oligos #1 und #17 als Primer (s. o.) gewonnen wurde. Sechs der Primärpositive wurden durch anschließendes Screenen plaque-gereinigt, und es wurde festgestellt, daß sie zu zusätzlichen CNTF-spezifischen Oligonucleotiden und PCR-Fragmenten hybridisieren. Ein 0,6-kb-Bam-HI-Restriktionsfragment aus einem der Klone, die zu Oligo #13 hybridisieren, wurde subkloniert in Bam-HI-Schnitt-M13mp19 und sequenziert.

Die DNA-Sequenzen der durch PCR aus Kaninchenmaterial vom Kaninchen-cDNA-Klon gewonnenen Fragmente wurden kombiniert auf der Basis von Bereichen einer überlappenden Sequenz, um die in Abb. 11 dargestellte klonierende (mRNA-äquivalente) Sequenz für Kaninchen-SN-CNTF zu ergeben. Die DNA-Sequenzen der durch PCR aus menschlichen genomischen DNA und aus menschlichen genomischen Klonen gewonnenen Fragmente wurden kombiniert auf der Basis von Bereichen einer überlappenden Sequenz, um die in Abb. 12 dargestellte kodierende Sequenz für menschliche SN-CNTF zu ergeben. Die Kaninchen- und Menschen-Nucleinsäuresequenzen für CNTF sind zu ca. 89% identisch (Abb. 12), was darauf hindeutet, daß die Kaninchen- und Menschen-Sequenzen von homologen Genen herrühren, die CNTF kodieren. Wie in Abb. 11 gezeigt, werden Teile der Nucleinsäuresequenz für Kaninchen-CNTF durch die aus gereinigten SN-CNTF gewonnenen und in früheren Beispielen genannten Aminosäuresequenzen bestätigt.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mittels der oben beschriebenen Matrizen und Primer durchgeführt. Das Programm für die Reaktionen bestand in folgendem:

**Denaturierungszyklus**, 1 min bei 95°C; **Glühzyklus**, 1,5 min bei 40°C, und **Dehnungszyklus**, 4 min bei 72°C. Die Reaktion wurde für 30 Zyklen durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden über 2%ige Agarosegelelektrophoretisch behandelt und auf Zeta-Bind-Membranen (BioRad, Richmond, CA) zum Southern-Blotting transferiert. Um die verstärkten Teile der CNTF-kodierenden Sequenz zu identifizieren, wurden die Southern-Blots mit einem radioaktiv markierten Oligonucleotid #13 sondiert, das, wie aus der CNTF-Proteinsequenz bekannt ist, zwischen den Oligonucleotiden liegt, die zur Vorbereitung der Reaktion verwendet werden. Die nach dem Southern-Blotting gewonnenen Bande wurden von den Originalgelen abgeschnitten und zur Klonierung durch Reparatur der Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) in Gegenwart aller 4 dNTPs und durch Kinasierung der DNA mit T4-Polynucleotid-Kinase (US Biochemical Corp., Cleveland, OH) und ATP präpariert. Die geeigneten DNA-Stücke wurden dann in den M13mp10-Smal-Schnitt-Vektor subkloniert (dephosphoryliert, im Handel erhältlich bei Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Die rekombinanten Phagen, die das interessierende Fragment enthalten, wurden durch das Screening-Verfahren nach Benton & Davis (Science, 196 [1977], S. 180) unter Verwendung des radioaktiv markierten Oligonucleotids 13 als Sonde identifiziert. Diese rekombinanten Klone wurden solange vermehrt, bis man genügende Mengen einzelsträngiger DNA zur Sequenzierung erhielt, und dann mittels Dideoxy-Kettenterminationsverfahren (Sanger et al., *ibid.*) sequenziert. Die Hybridisierungsbedingungen beim Einsatz langer, zufallsmarkierter DNA-Sonden waren  $5 \times$  SSCP,  $2 \times$  Denhardt's, 2 mM EDTA, 0,05%-Natriumpyrophosphat, 0,1%-Natriumdodecylsulfat (SDS), 250 µg/ml Heringssperma-DNA (unspezifischer Konkurrent), pH 8,0. Die Hybridisierung wurde bei 65°C durchgeführt, und Fließpapiere oder Filter wurden bei 65°C in  $0,1 \times$  SSCP und 0,1%-SDS gewaschen. Die Hybridisierungsbedingungen für kürzere

Oligonucleotidsonden waren 6× SSCP, 2× Denhardt's, 2 mM EDTA, 0,05%-Natriumpyrophosphat, 0,1%-SDS, 100 µg/ml HefetRNA (unspezifischer Konkurrent), pH = 8,0. Die Hybridisierungstemperatur und die Bedingungen für das Waschen von Fließpapier und Filtern wurden einzeln auf den GC-Gehalt jedes Oligonucleotids eingestellt (Maniatis et al., *ibid.*).

#### Beispiel 5

##### Expression von Genen, die SN-CNTF in tierischen Zellen codieren:

Die SN-CNTF-Expression in tierischen Zellen macht folgende Schritte erforderlich:

- Konstruktion eines Expressionsvektors;
- Wahl einer Wirtszelllinie;
- Einführung des Expressionsvektors in Wirtszellen und
- Manipulierung rekombinanter Wirtszellen zur Erhöhung der SN-CNTF-Expressionsniveaus.

(a) Die zur Verwendung in tierischen Zellen vorgesehenen SN-CNTF-Expressionsvektoren können verschiedene Typen umfassen, darunter stark konstitutive Expressionskonstrukte, induzierbare Genkonstrukte sowie diejenigen Typen, die für die Expression in besonderen Zelltypen vorgesehen sind. In allen Fällen sind Promotoren und andere Genregulationsbereiche, wie z. B. Verstärker (induzierbar oder nicht) und Polyadenylierungssignale an die geeignete Stelle hinsichtlich der cDNA-Sequenzen in Vektoren auf Plasmidbasis gebracht. Es folgen 2 Beispiele solcher Konstrukte: (1) Ein Konstrukt unter Verwendung einer stark konstitutiven Promotorregion sollte hergestellt werden unter Benutzung der Affenvirus-40(SV40)-Genkontrollsignale in einer Anordnung, wie sie z. B. in dem von Gorman et al. in *Mol. Cel. Biol.* 2 (1982), S. 1044–1051, (hier gesonderte Literaturangabe) beschriebenen Plasmid pSV2CAT festgestellt wurde. Dieses Plasmid sollte in der Weise manipuliert werden, daß es die SN-CNTF-cDNA durch die chloramphenicolacetyltransferase(CAT)codierenden Sequenzen unter Benutzung biologischer Standardmolekulartechniken ersetzt (Maniatis et al., *s. o.*). (2) Unter Nutzung des Plasmids PMK, das die Maus-Metalllothionein(MT-1)-Promotorregion enthält (Brinster et al., *Cell* 27 (1981), S. 228–231), sollte ein induzierbares Genkonstrukt hergestellt werden. Dieses Plasmid kann als Startermaterial verwendet und sollte manipuliert werden, um ein metallinduzierbares Genkonstrukt zu liefern.

(b) Eine Reihe von Tierzelllinien sollte zur SN-CNTF-Expression unter Benutzung der oben beschriebenen Vektoren zur Erzeugung aktiven Proteins verwendet werden. Zwei potentielle Zelllinien, die bezüglich ihrer Fähigkeit, eine Fremdgenexpression zu fördern, ausreichend charakterisiert wurden, sind Maus-Ltk<sup>-</sup>- und CHO-dhfr<sup>-</sup>-Zellen, obwohl sich die Expression des SN-CNTF nicht auf diese Zellen beschränkt.

Zu den tierischen Zelllinien, die zusätzlich zu den oben erwähnten zur Expression verwendet werden können, gehören die Affennierenzelle COS-7, die für eine vorübergehende Expression von Nutzen ist, und die Menschenembryo-Nierenzelle 293.

(c) In diese Zelllinien sollten unter Anwendung einer Reihe von Gentransfertechniken Vektor-DNA eingeführt werden. Die hier angewandte Methode involviert die von S. L. Graham und A. S. van der Eb (*Virology* 52 (1973), S. 456–467) beschriebene Calciumphosphat-DNA-Fällungstechnik, bei der der Expressionsvektor für SN-CNTF mitgefällt wird mit einem zweiten Expressionsvektor, der einen selektierbaren Marker kodiert. Im Falle der Ltk<sup>-</sup>-Zelltransfektion ist der selektierbare Marker ein Thymidinkinasegen, und die Selektion erfolgt so, wie von Wigler et al. in *Cell* 16 (1979), S. 777–785, beschrieben; im Falle von CHO-dhfr<sup>-</sup>-Zellen ist der selektierbare Marker die Dihydrofolatreduktase (DHFR), deren Selektion nach der Beschreibung von Ringold et al. (*J. Mol. App. Genet.* 1 (1981), S. 165–175) erfolgt.

(d) Zellen, die die SN-CNTF-Genkonstrukte exprimieren, sollten dann unter Bedingungen vermehrt werden, die die Höhe der SN-CNTF-Produktion steigern. Zellen, die Träger der Metallothioneinpromotorkonstrukte sind, können nun vermehrt werden in Gegenwart von Schwermetallen, wie Kadmium, was zu einer 5fach erhöhten Nutzung des MT-1-Promotors (Mayo et al., *Cell* 29, S. 99–108) führt; dies wiederum führt zu einer vergleichbaren Erhöhung des SN-CNTF-Proteingehalts. Zellen, die SN-CNTF-Expressionsvektoren (entweder auf SV40- oder MT-1-Basis) und dazu einen DHFR-Expressionsvektor enthalten, können aufgrund des von Ringold et al. (*J. Mol. App. Genet.* 1 (1981), S. 165; 175) beschriebenen Genverstärkungsprotokolls unter Verwendung von Methotrexat, einem kompetitiven Antagonisten der DHFR, verwendet werden. Dies führt zu mehr Kopien der in den Zellen vorhandenen DHFR-Gene und gleichzeitig zu mehr Kopien der SN-CNTF-Gene, dies wiederum kann zu mehr SN-CNTF-Protein führen, das von den Zellen produziert wird.

Ein zusätzlicher Expressionsvektor, pCMVXVPL2, wurde zur vorübergehenden Expression der codierenden Sequenz für Kaninchen-CNTF in COS-7-Zellen verwendet. Dieser Plasmid-Vektor enthält den unmittelbaren frühen Promotor und Verstärker des Zytomegalovirus (CMV), wie von Boshard und al. (*Cell*, 41 (1985), S. 521–530) beschrieben. Dieses Plasmid kann konstruiert werden, wie in Abb. 13 dargestellt. Das Polyadenylierungssignal wird durch die Affenvirus-40(SV40)-Sequenzen (Kartenkoordinaten 2589–2452; s. Reddy et al., *Science* 200 (1978), S. 494–502) geliefert. Die SV40-Herkunft der Replikation ist in diesem Plasmid mitenthalten, um dessen Verwendung in COS-Zellen für Tests vorübergehender Expression zu erleichtern. Der Kaninchen-SN-CNTF wurde in COS-7-Zellen wie folgt vorübergehend exprimiert. Das 1,5-kb-Eco-R1-Restriktionsfragment eines Kaninchen-Hüftner-cDNA-Klons, das den gesamten codierenden Bereich für Kaninchen-SN-CNTF enthält (Beispiel 4), wurde in den Eco-R1-Schnitt-Expressionsvektor pCMVXVPL2 subkloniert. Es wurde ein Einzelklon selektiert, der nach Aufschließung mit SacI und Bam HI Restriktionsfragmente von der Größenordnung ergab, die vorausgesagt wurde für die Insertion des 1,5-kb-Fragments in den Vektor in der korrekten Orientierung für eine CNTF-Expression. Die Plasmid-DNA aus diesem Konstrukt wurde mit Hilfe des alkalischen Lyseverfahrens mit anschließender CsCl-Dichtezentrifugierung präpariert (Maniatis et al., *ibid.*). Diese DNA wurde mit Hilfe der Methode von Sompayrac und Danna (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), S. 7575–7578) in COS-7-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden äquivalente COS-Zellkulturen mit Plasmidvektor-DNA ohne Insert transfiziert.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die darüberliegenden Medium- und Zellpellets geerntet. Die Zellpellets wurden durch kurze Beschallung auf Eis in 20 mM Natriumphosphat, pH = 6,7, mit einem Gehalt von 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,1 µM Pepstatin extrahiert. Reihenverdünnungen des Zellextrakts und des darüberliegenden Mediums aus jeder Kultur wurden im Ziliarganglion-Überlebenstest auf Aktivität analysiert.

Die Zellextrakte aus Kulturen, die mit einem Vektor transfektiert wurden, der das CNTF-cDNA-Fragment enthält, hatten einen Titer von ca. 15000 TU/ml im Tierversuch und etwa 50 ng/ml CNTF, wie durch Western-Blot-Analyse bestimmt wurde. Weder die Zellextrakte aus vektortransfektierten Kulturen allein noch das darüberliegende Medium aus beliebigen Kulturen wiesen eine nachweisbare Bioaktivität oder CNTF-Protein aufgrund einer Western-Blot-Analyse auf. Dieses Ergebnis beweist eindeutig, daß die von uns klonierte CNTF-cDNA ein Protein mit der erwarteten Bioaktivität des echten SN-CNTF codiert.

#### Beispiel 6

##### Reinigung des SN-CNTF von rekombinanten tierischen Zellen

Da angenommen wird, daß der SN-CNTF durch Zellen wie natürliches Material synthetisiert wird, wird erwartet, daß die obenbeschriebenen Methoden zur Reinigung des natürlichen Proteins eine ähnliche Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Proteins erlauben.

Es wird den Fachleuten klar werden, daß in den Verfahren und Produkten der vorliegenden Erfindung verschiedene Modifizierungen und Änderungen vorgenommen werden können. So ist vorgesehen, daß die vorliegende Erfindung die Modifizierungen und Änderungen dieser Erfindung umfaßt, vorausgesetzt, sie fallen in den Bereich der beigefügten Ansprüche und deren Äquivalente. Auch der Terminus SN-CNTF soll alle Spezies-Ursprünge umfassen, sofern dem Terminus kein spezifischer Spezies-Ursprung unmittelbar vorausgeht.

#### Beispiel 7

##### Produktion rekombinanter menschlicher CNTF

Als eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde ein System zur Produktion rekombinanter menschlicher CNTF beim Bakterium *Escherichia coli* aufgestellt. Es wurden zwei alternative Methoden zur Konstruktion der zu exprimierenden DNA und zwei unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet. Alle diese verschiedenen Expressionssysteme produzieren lösliches CNTF-Protein mit hoher Ausbeute, das in Bakterienzellextrakt biologisch aktiv ist. Die Methoden zur Aufstellung dieser Produktionssysteme werden weiter unten beschrieben. Achten Sie bitte im folgenden darauf, daß sich die Position eines in Klammern angegebenen Merkmals (z. B. [233]) auf die Zahl der Basen bezieht, wo das Merkmal stromabwärts vom A [1] im Ausgangs-ATG-Codon in der menschlichen codierenden Sequenz für den CNTF beginnt (Abb. 12).

#### 1. Präparierung von DNA zur CNTF-Expression

##### Strategie 1 für die Konstruktion des 5'-Endes (Abb. 14)

Der menschliche genomische DNA-Klon für den CNTF im Phagen-Lambda-EMBL 3 aus dem Beispiel 4 wurde mit den Restriktionsenzymen Sall und HindIII aufgeschlossen. Das 4,3-kb-Fragment wurde gelgereinigt; es enthält die CNTF-codierende Sequenz stromaufwärts der Hind-III-Stelle [233]. Dieses 4,3-kb-Fragment enthält auch ein einzelnes, ca. 1,3-kb-Intron [114-115] in der codierenden Sequenz. Um eine Expression in Bakterienzellen zu ermöglichen, wurde das Intron durch ortsspezifische Mutagenese in vitro unter Verwendung eines synthetischen Oligonucleotids entfernt, wie von J. A. McClary, F. Whitney, J. Geisselsoder (1989), *Biotechniques*, 7, S. 282-289, beschrieben.

##### A. Intron-Deletion durch ortsspezifische Mutagenese mittels Phagemid-Vektor und genetischer Selektion

Die ortsspezifische Mutagenese wurde durchgeführt, um das ca. 1,3-kb-Intron in dem in einem Phagemid-Vektor (Bluescript SK M 13(-) Stratagene) subklonierten 4,3-kb-Sal-I/Hind-III-DNA-Fragment zu deletieren. Dieser Vektor wurde gewählt, weil er die große Größe (ca. 4,3 kb) des Sall/Hind-III-Inserts akzeptieren kann. Phagemid-Vektoren sind Plasmid-Vektoren, die die intergenische Region des Bakteriophagen f1 enthalten, die die Rettung als einzelsträngige DNA ermöglicht. Darüber hinaus haben Phagemidvektoren eine Reihe von Vorzügen gegenüber einzelsträngigen M 13-Bakteriophagenvektoren. Da die Phagemide weniger als halb so groß sind wie die M 13-Vektoren und Inserts mit Größen unter ca. 2,3 kb bevorzugen, können größere Inserts leichter in Phagemide subkloniert werden und sind die Chancen spontaner Deletionen verringert. Ein weiterer Vorzug der Phagemide besteht darin, daß die Inserts direkt aus doppelsträngigen, supergeknäulten DNA sequenziert werden können und damit die Charakterisierung vereinfachen. Die Mutagenese wurde durchgeführt mittels Muta-Gene-In-Vitro-Mutagenese-Ausrüstung von BioRad. Die Wirtszelle zur Matrizenpräparation für die Mutagenese ist der E.-coli-Stamm CJ 236 (Genotyp: dut, ung, thi, rel A1, pCJ 105 [cap']). CJ 236 führt einen F'-Faktor mit sich, der durch Chloramphenicol selektierbar ist und somit eine Rettung der einzelsträngigen Phagemid-DNA mittels eines geeigneten Helfer-Phagen R408 ermöglicht, der in der vorliegenden Untersuchung verwendet wird. Die gerettete einzelsträngige Phagemid-DNA ist teilweise durch Uracil substituiert aufgrund der dut-(dUTPase)- und ung (Uracil-N-Glykosylase)-Mutationen in CJ 236. Die Matrizen-DNA, die durch Uracil substituiert und zur Mutagenese verwendet wurde, wird selektiv vernichtet, wenn sie in Wirtszellen transformiert wird, die Wildtyp-ung-Loci enthalten, wie z. B. DH5a in diesem Falle, und somit eine bevorzugte Replikation der neu synthetisierten mutierten DNA ermöglichen.

Um die Mutagenese durchzuführen, wurde das gelgereinigte 4,3-kb-Sall/HindIII-Fragment zu Sall/HindIII-aufgeschlossenem und gelgereinigtem Bluescript SK M 13(-) ligiert. Die ligierte DNA wurde eingeführt in CJ 236, das kompetent gemacht wurde durch die Methode von Kanahan (beschrieben in *J. Mol. Biol.* 166 [1983], S. 557). Auf Platten, die 50 µg/ml Ampicillin (zur Selektion für das Phagemid) und 30 µg/ml Chloramphenicol (zur Selektion für die Retention des F'-Faktors) enthielten, wurden Transformanten selektiert. Die Transformanten wurden durch Restriktionsenzymanalyse der Transformanten-DNAs auf das Vorhandensein des korrekten Inserts kontrolliert. Ein Transformant, der das korrekte Insert (pSHM-D19), aufwies, wurde im anschließenden Mutageneseversuch verwendet.

Eine einzelsträngige Matrize aus pSHM-D19 wurde mittels Phage-R408 als Helferphage gerettet. pSHM-D19-haltiges CJ 236 wurde in Luria-Brühe vermehrt, die Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) zu einem A<sub>600</sub> von ca. 0,3 enthielt. Die Zellen wurden infiziert mit R408-Helferphage mit einer Infektionsvielfältigkeit von 20 und dann bei 37°C 8-14 h geschüttelt. Aus den geretteten Phagemiden wurde eine einzelsträngige Matrize extrahiert.

Mittels 71-Basen-Oligonucleotid (Oligonucleotid 1 in Abb. 16) wurde eine ortsspezifische Introndeletion-Mutagenese durchgeführt. Das Oligonucleotid 1 weist die Basen 1-30 auf, die dem codierenden Strang unmittelbar stromabwärts (3') des aus der genomischen CNTF-DNA zu deletierenden Introns komplementär sind, und es enthält die Basen 31-71, die dem codierenden

Strang unmittelbar stromaufwärts (5') das aus der genomischen CNTF-DNA zu deletierenden Introns komplementär sind. Für den Einsatz bei Mutagenesereaktionen wurde das Oligonucleotid mittels T4-Polynucleotidkinase phosphoryliert. Mutagenesereaktionen mittels BioRad-Muta-Gene-Ausrüstung wurden nach den Angaben des Herstellers ausgeführt mit der Ausnahme, daß die DNA aus Mutagenesereaktionen zur Transformation von E.-coli-Stamm-DH5a verwendet wurde. Die Deletionsmutanten wurden charakterisiert durch Restriktionsenzymkartierung der DNAs und DNA-Sequenzierung von doppelsträngigen DNAs aus Mutanten mit den geeigneten Restriktionskarten. Die pM<sup>+</sup>N-2a war eine korrekt deletierte intronlose Mutante im Bluescript-Phagemid.

#### B. Rekonstruktion des 5'-Endes des CNTF-Gens für die Expression

Das 5'-Ende der CNTF-codierenden Sequenz wurde rekonstruiert, um bestimmte Änderungen vorzunehmen, die die Aminosäuresequenz, für die codiert wird, nicht verändern, die aber die Expressionsleistung bei Bakterien wahrscheinlich erhöhen. Die partiell überlagernden komplementären Oligonucleotide 2 und 3 (Abb. 16) wurden synthetisiert, gelgereinigt und annealed. Das Oligonucleotid 2 kodiert für die im menschlichen CNTF stromaufwärts der Nhe-I-Stelle [66] vorhandene Aminosäure. Die codierende Sequenz des Oligonucleotids 2 enthält verschiedene Basen, die sich von den im menschlichen Gen vorhandenen unterscheiden (vgl. Abb. 12 und 16). Diese Änderungen wurden entweder vorgenommen, um die Nutzung des menschlichen Codons in die vorzugsweise durch E. coli erfolgte Nutzung zu verändern (nach deBoer und Kastelein in From Gene to Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene Expression (Vom Gen zum Protein: Schritte, die das höchste Niveau der Genexpression diktiert) (1986); Davis und Resnikoff, Hrsg., S. 225-283, Butterworths, NY), oder um eine Bgl-II-Stelle zu erzeugen (Abb. 16), die in die Sequenz zur Erleichterung späterer genetischer Manipulationen eingesetzt wird. Das Oligonucleotid 2 codiert auch für einen Translationskoppler in Richtung auf das 5'-Ende (Abb. 16) zur Förderung einer effektiven Translation. Die annealten Oligonucleotide 2 und 3 weisen einen Bam-HI-Überhang am 5'-Ende und einen Nhe-I-Überhang am 3'-Ende zur Erleichterung einer späteren Ligation und Clonierung auf (Abb. 14 und 16). Eine Untersuchung des Restriktionsenzym der DNA-Sequenz des menschlichen CNTF-Gens ließ eine einzige Nhe-I-Erkennungssequenz [66] erkennen (Abb. 12). Daher wurden die Oligonucleotide 2 und 3 mit einem Nhe-I-Überhang entworfen, um diesem eine Verbindung mit dem restlichen 3'-Fragment des Gens nach Aufschließung mit NheI zu ermöglichen.

#### C. Verbindung der Oligonucleotide 2 und 3 mit den introndeletierten codierenden Sequenzen

Die Oligonucleotide 2 und 3, die das umgebaute Aminoterminal des CNTF-Gens enthalten, wurden zusammentempert und zum Nhe-I-Schnitt-pMCN-2a ligiert. Die ligierte DNA wurde dann mit Bam HI und Hind III aufgeschlossen, um das als CNTF-Syn1 bezeichnete DNA-Fragment freizusetzen, das die DNA-Sequenzen enthält, die für eine Expression in E. coli und eine Codierung des menschlichen CNTF stromaufwärts der Hind-III-Stelle 233 geeignet sind.

#### Strategie 2 zur Konstruktion des 5'-Endes (Abb. 15)

Es wurde eine alternative Strategie durchgeführt, in welcher das Intron nicht durch eine ortsspezifische Mutagenese entfernt wurde, sondern es wurde vielmehr eine völlig synthetische DNA-Sequenz präpariert, die für den CNTF stromaufwärts der Hind-III-Stelle [233] codiert, aber ohne das Intron. Um dieses synthetische DNA-Konstrukt zu bilden, wurden die Oligonucleotide 5 bis 10 in Abb. 17 synthetisiert. Die folgenden Oligonucleotide waren dazu bestimmt, teilweise überlappende doppelsträngige Paare zu bilden: 5 & 6, 7 & 8, 9 & 10. Jedes doppelsträngige Paar enthält einzelsträngige Überhänge, die dazu vorgesehen sind, eine Zusammenbindung in der Anordnung 5 & 6 - 7 & 8 - 9 & 10 zu ermöglichen. Die Oligonucleotide wurden gelgereinigt, getempert und zusammenligiert in ein einzelnes 261-Basenpaar-Doppelstrang-DNA-Oligonucleotid mit der Bezeichnung CNTF-Syn2. Diese synthetische DNA enthielt auch: (1) veränderte Codons zur Anpassung an E. coli-Codonnutzungsbevorzugungen (vgl. Abb. 12 und 18); (2) den oben verwendeten 5'-Translationskoppler (Abb. 16 und 17); (3) einen 5'-Bam-HI-Überhang und einen 3'-Hind-III-Überhang zur Erleichterung der Ligation und Clonierung (Abb. 17).

#### Präparation des 3'-Endes des Expressionskonstrukts (Abb. 14 und 15)

Der menschliche genomische DNA-CNTF-Klon im Phage-Lambda-EMB aus Beispiel 4 wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III zerschnitten und ein 2,1-kb-Fragment wurde gelgereinigt, es enthielt die CNTF-codierenden Sequenzen stromabwärts der Hind-III-Stelle 233. Dieses 2,1-kb-Fragment wurde in Hind-III-Schnitt-Plasmid pEMBL 8 kloniert (Dente et al., Nucleic Acids Res. 11 [1983], S. 1645). Eine Spe-I-Stelle 613 wurde inseriert in die 2,1 kb-Insert-DNA durch oligonucleotidgelonkte Mutagenese 13 Basenpaare stromabwärts des Stoppcodons, das die CNTF-Sequenz mittels des synthetischen Oligonucleotids 4 abschließt (Abb. 16). Das mutierte Plasmid wurde mittels Hind III und Spe I zerschnitten, um das stromabwärts codierende Fragment freizusetzen, das gelgereinigt wurde und CNTF-Syn3 genannt wird (es enthält die codierenden Sequenzen für den menschlichen CNTF stromabwärts der Hind-III-Stelle [233]).

#### Präparation des vollständigen Expressionskonstrukts

CNTF-Syn1 wurde an CNTF-Syn3 ligiert, um CNTF-Syn1/3 zu erzeugen (Abb. 14), und CNTF-Syn2 wurde an CNTF-Syn3 ligiert, zwecks Produktion von CNTF-Syn2/3 (Abb. 15), um zwei alternative DNA-Fragmente zu konstruieren, von denen jedes für menschliches CNTF codiert und geeignete Modifizierungen der DNA-Sequenz aufweist, um eine effiziente Expression in E. coli zu fördern. Diese DNA-Fragmente wurden dann in E. coli exprimiert, nachdem sie subkloniert worden waren in: (A) einen Bakterienexpressionsvektor pT5T auf der Basis des T7-Phage-Promotors oder (B) einen Bakterienexpressionsvektor pT3XI-2 auf der Basis eines Hybridlaktose- und Tryptophan-Operon-Promotors ('lac').

**2. Expression von CNTF mittels eines Expressionsvektors auf der Basis des „T7-Promotor“-Systems** (Beziehen Sie sich bitte auf Abb. 17, was die Merkmale des Vektors betrifft):

**A. Beschreibung des pT5T**

Der auf dem T7-Promotor basierende Expressionsvektor pT5T ist im wesentlichen der gleiche wie der von Squires et al. (J. Biol. Chem. 263 [1988], 16297–16302) beschriebene pJU1003 mit der Ausnahme, daß zwischen der einzigen Bgl-II-Stelle 5' bis zum T7-Promotor und der Cla-I-Stelle, im Tetracyclin-Resistenzgen eine kurze DNA-Strecke vorhanden ist. Die Sequenz dieser DNA ist:

```
ATCGATGATA AGCTGTCAAA CATGAGAATT GAGCTCCCG GAGATCCTTA GCGAAACCTA
Cla I
AGGATTTTTT TTAGATCT
                Bgl II
```

**B. Konstruktion des vollständigen Expressionsvektors**

Der gelgereinigte Vektor wurde mit BamHI- und SpeI-Restriktionsenzymen linearisiert. CNTF-Syn 1/3 wurde mit dem linearisierten Vektor vermischt und ligiert, um das Expressionskonstrukt pT5T:CNTF-Syn1/3 zu bilden (Zum allgemeinen Entwurf der Vektor-Konstruktionen, Abb. 14).

**C. Expression des rekombinanten menschlichen CNTF in E. coli**

pT5T:CNTF-Syn1/3 wurde in den E.-coli-Stamm BL21(DE3) zur Expression transformiert. Dieser Stamm, der in Studier und Moffat, J. Mol. Biol. 189 (1986), S. 113–130, beschrieben wurde, enthält das T7-RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren lac-Promotors an einem nichtexziserbaren lysogenen Lambda-Bakteriophagen. Von 10 gescreenten Transformanten exprimierten zwei Klone, wie festgestellt wurde, eine IPTG-induzierbare Proteinwanderung bei einer relativen Molekülmasse im CNTF-geeigneten Bereich (ca. 24 kD). Diese beiden Klone wurden als pT5T:CNTF-Syn1/3-5a und 5c bezeichnet. Die DNA-Sequenzierung von pT5T:CNTF-Syn1/3-5a und 5c bestätigte, daß die Sequenzen der Rekombinanten korrekt waren. Ein hoher Expressionsgrad des rekombinanten CNTF wurde erreicht durch Vermehrung der Zellen in Luria-Brühe mit 15 µg/ml Tetracyclin bis zu einer Zelldichte, die einem  $A_{600}$  von 0,5–0,8 entsprach. Die Zellen wurden 1,5–4 Stunden lang entweder ohne IPTG („uninduziert“) kultiviert, oder es wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1,0 mM („induziert“) zugesetzt. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) ist ein Induktor des Lac-Operon, dessen Anwesenheit zu einer indirekten Aktivierung der T7-Polymerase des Expressionsvektors und zu erhöhten CNTF-Expressionswerten führen sollte.

**D. Analyse des exprimierten Proteins mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie-Auffärbung oder Immun-Blotting**

Mittels Kurzzentrifugierung wurden Zellen geerntet und direkt in SDS-Polyacrylamidgel-Probenpuffer (0,025% Bromphenolblau, 10% Glycerol, 1% β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH = 6,8) gelöst und 2 min gekocht (Abb. 20 und 21). In den mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformierten und mit IPTG 2 Stunden lang induzierten Zellen (Bahn 5, Abb. 20) ist eine mit Coomassie-Farbe dunkelgefärbte Bande vorhanden, die an der von CNTF erwarteten Stelle verläuft (ca. 24 kD). Wenn die Zellen ohne IPTG vermehrt wurden (Bahn 4, Abb. 20), ist viel weniger von dieser Bande vorhanden, wie für ein Protein erwartet wird, dessen Expression vom Lac-Operon gesteuert wird. Zellen, die mittels pT5T-Vektor ohne ein CNTF-Insert transformiert wurden, weisen diese entweder induzierte (Bahn 3, Abb. 20) oder nichtinduzierte (Bahn 2, Abb. 20) Bande nicht auf. Bahn 1 enthält Standards der relativen Molekülmasse.

Ein identisches SDS-Polyacrylamidgel wurde zu Nitrozellulose transferiert und einem Immun-Blotting mit affinitätsgereinigten Antikörpern zum CNTF-Peptid A (E–S–Y–V–K–H–Q–G–L–N–K–N) unterworfen. In den Zellen, die mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformiert und mit IPTG 2 h lang induziert wurden (Bahn 5, Abb. 21), gibt es eine dichte Bande, die von den affinitätsgereinigten Antikörpern zum CNTF-Peptid A erkannt wird und an der Stelle verläuft, die vom CNTF erwartet wird (ca. 24 kD). Wenn die Zellen ohne IPTG vermehrt wurden (Bahn 4, Abb. 21), ist viel weniger von dieser Bande vorhanden. Zellen, die mit dem pT5T-Vektor ohne ein CNTF-Insert transformiert wurden, weisen diese entweder induzierte (Bahn 3, Abb. 20) oder nichtinduzierte (Bahn 2, Abb. 20) Bande nicht auf. Bahn 1 enthält Standards relativer Molekülmasse.

Darüber hinaus wurden Zellen, die mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformiert und mit IPTG 2 Stunden lang induziert wurden, durch 3maliges Passieren durch eine French-press aufgebrochen. Eine Aliquote des Rohzellenlysats wurde in Überstand- und Pelletfraktionen durch Zentrifugierung mit 20000 rpm im JA-20-Rotor (Beckman) 15 min lang separiert. Aliquoten des Rohlysats, Überstands und der Pellet-Fraktionen, die den gleichen Starterzellen-Suspensionsanteil darstellten, wurden ebenfalls über das gleiche SDS-Polyacrylamidgel geleitet, zu Nitrozellulose transferiert und mit affinitätsgereinigten Anti-peptid-A-Antikörpern immun-blottiert. Der Lysat-Überstand (Bahn 8, Abb. 21) enthält viel mehr immunreaktiven CNTF als das Lysatpellet (Bahn 9, Abb. 21). Der Überstands-CNTF-Wert war vergleichbar mit dem im umfraktionierten Lysat (Bahn 7, Abb. 21).

**E. Bioaktivität von exprimiertem CNTF**

Die durch Kurzzentrifugierung geernteten Zellen wurden in 20 mM Tris-HCl, pH = 8,2, bei 1/35 des ursprünglichen Zellsuspensionsvolumens resuspendiert und durch 3maliges Passieren einer French-press aufgebrochen; das Rohzellenlysats wurde in Überstand- und Pelletfraktionen durch Zentrifugierung mit 20000 rpm im JA-20-Rotor (Beckman) 15 min lang separiert, Reihenverdünnungen der Zellenüberstandfraktion wurden in bezug auf ihre Fähigkeit, das Überleben von Ziliarganglion-Nervenzellen zu fördern (wie in Beispiel 1 beschrieben) analysiert. Der Überstand wies eine beträchtliche Bioaktivität bis zu einer Verdünnung von 1:1000000 auf (Abb. 22). Die spezifische Aktivität des rekombinanten menschlichen CNTF wurde eingeschätzt auf etwa 275 TU/ng auf der Basis der Bioaktivität und des aus Immun-Blots eingeschätzten CNTF-Proteinanteils. Diese spezifische Aktivität ist etwa doppelt so hoch wie die spezifische Aktivität des gereinigten Kaninchen-CNTF-Proteins, was darauf hindeutet, daß der rekombinante CNTF im Bakterienzellextrakt biologisch aktiv ist. Lysate von Zellen, die mit pT5T ohne CNTF-Insert transformiert wurden, wiesen keine feststellbare Bioaktivität auf.

Der Überstand wurde auch auf einem 15%-polyacrylamidreduzierenden SDS-Gel einer Elektrophorese unterworfen und in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, die über Nacht im Zellkulturmedium bei 4°C unter Schütteln extrahiert und einem Bioassay unterworfen wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Einfügung in Abb. 22 verdeutlicht, daß es einen Bioaktivitätspeak in Fraktionen gibt, die 24 kD entsprechen, wie für CNTF erwartet wird.

#### F. Aminosäuresequenz des exprimierten CNTF

Der Bereich um 24 kD wurde aus einem SDS-Polyacrylamidgel herausgeschnitten, das dem in Abb. 20 ähnlich war, aber keine Coomassie-Anfärbung aufwies. Dieses Material wurde mittels Edman-Abbau in einem Applied-Biosystems-Proteinsequenzierer (wie in Beispiel 2 beschrieben) sequenziert. Es wurde folgende Aminosäuresequenz erzielt: AFTEHSPLTPHRRDL / ? / S.... Das Fragezeichen entspricht einem C in der menschlichen Sequenz (Abb. 12), das mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden kann. Diese Sequenz entspricht derjenigen, die vom menschlichen CNTF erwartet wird (Abb. 12) und liefert einen zusätzlichen Beweis dafür, daß der CNTF richtig exprimiert wird. Sie deutet auch darauf hin, daß das Amino-Terminus Methionin während der Expression entfernt wird und das Alanin als Aminoterminal-Aminosäure im exprimierten Protein zurückläßt. Die obigen Ergebnisse beweisen, daß ein immunologisch kreuzreaktiver CNTF in hohem Maße in biologisch aktiver Form exprimiert wurde, wovon der größte Teil nach Auflösung der Bakterienzelle löslich ist.

### 3. CNTF-Expression mittels eines Expressionsvektors auf der Basis eines Hybridlaktose- und Tryptophan-Operon-Promotor(-, Tac)-Systems

(Zu den Merkmalen des Vektors siehe Abb. 19):

#### A. Beschreibung des pT3XI-2 (Modifizierung des pKK223-3)

Das Starterplasmid für diese Konstruktion war das bei Pharmacia erworbene Plasmid pKK223-3. Das Plasmid pKK223-3 führt ein partielles Gen für die Tetracyclin-Resistenz mit sich. Dieses nichtfunktionelle Gen wurde durch ein vollständiges Tetracyclinresistenzgen ersetzt, das im Plasmid pBR322 enthalten war. Das Plasmid pKK223-3 wurde mittels Sph I vollständig und mittels Bam HI partiell aufgeschlossen. Ein 4,4-Kilobasenpaarfragment wurde gelgereinigt und mit einem synthetischen Adapter kombiniert, der folgende Sequenz hatte:

```
5' GATCTAGAATTGTCATGTTTGACAGCTTATCAT 3'
3' ATCTTAACAGTACAAACTGCGAATAGTACC 5'
```

und ein 539-Basenpaarfragment der DNA aus einem C1a I-, Sph I-Aufschluß des Tetracyclinresistenzgens von pBR322 (PL Biochemicals, 27-4891-01). Das daraus resultierende Plasmid wurde pCJ1 genannt. Als nächstes wurde ein bei New England Biolabs erworbener Xho-I-Linker in die Plasmid-pCJ1's PvuII-Stelle inseriert, um das Plasmid pCJX-1 zu bilden. Diese Insertion reißt das rop-Gen auseinander, das die Plasmid-Kopienzahl kontrolliert. Ein Eco-RI-Fragment, das das Lac-1-Gen enthielt, wurde vom Plasmid pMC9 gereinigt (Calos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA [1983], 80, S. 3015-3019) und dann in die Mho-I-Stelle inseriert, wobei die Xho-I-bis Eco-RI-Adapter folgende Sequenz aufwies:

```
5' TCGAGTCTAGA 3'
3' CAGATCTTAA 5'
```

Die Polylinker-Sequenz zwischen der Eco-RI- und der Pst-I-Stelle im Plasmid pKK223-3 wurde als nächstes durch eine Polylinkersequenz folgender Gestalt ersetzt:

```
5' AATCCCGGG TACCAGATCT GAGCTCACTA GTCTGCA 3'
3' GGGCCC ATGGTCTAGA CTCGAGTGAT CAG 5'
```

Der so gewonnene Plasmidvektor wird pCJXI-1 genannt.

Schließlich wurde das Tetracyclinresistenzgen durch ein ähnliches Gen ersetzt, das die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme Hind III, Bam HI und Sal I aufweist, die durch Bisulfitmutagenese zerstört wurden. Das folgende Verfahren wurde angewandt, um das Tetracyclinresistenzgen von pBR322 zu mutieren. Das Plasmid pBR322 wurde mit Hind III zerschnitten, und dann mit Natriumbisulfit (Shortle und Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [1978], 5, S. 2170-2174) mutagenisiert. Die mutagenisierte DNA wurde ligiert, um eine ringförmige DNA zu bilden, und dann mit Hind III zerschnitten, um jedes Plasmid zu linearisieren, das der Mutagenese entkam. E. coli JM109 (Yanisch-Perron, et al., Gene [1985] 33, S. 103-119), wurde mit dem Plasmid transformiert und dann auf selektiven Medien plattiert. Die Plasmide wurden aus Tetracyclinresistenzkolonien isoliert und in bezug auf Verlust der Hind-III-Stelle im Tetracyclinresistenzgen überprüft. Das erfolgreich mutierte Plasmid wurde pT1 genannt. Ein ähnliches Verfahren wurde angewandt, um die Bam-HI-Stelle im pT1 zu mutagenisieren, was zum Plasmid pT2 führte. Das Plasmid pT2 wiederum wurde mutagenisiert, um die Sal-I-Stelle zu beseitigen; damit wurde Plasmid pT3 gebildet. Ein C1a-I/Bam-I-Fragment von pT3, das das mutierte Tetracyclinresistenzgen enthielt, wurde isoliert und zur Ersetzung des homologen Fragments von pCJXI-1 verwendet, um pT3XI-2 zu bilden. Das mutierte Tetracyclinresistenzgen codiert noch immer ein funktionelles Protein.

#### B. Bildung von pT3XI-010TC3FGFsyn (das den Tac-Promotorvektor für CNTF präpariert)

Zuerst wurde ein „Gen“ für den grundlegenden Fibroblast-Wachstumsfaktor (bFGF) synthetisiert. Dieses „Gen“ codiert für die gleiche Sequenz wie die, von der Sommer et al. (1987 Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, S. 67) bei FGF berichten, benutzt aber die Codons, die vorzugsweise in hochexprimierten Genen bei E. coli angetroffen werden. Die Struktur dieses Gens ist so beschaffen, daß dem codierenden Teil ... vorausgehen (s. Squires et al., 1988, ibid.), um eine effiziente Initiierung der Translation zu gewährleisten.

Das synthetische FGF-Gen wurde zuerst in M13mp18 zwischen der Eco-RI- und Hind-III-Stelle inseriert und sequenziert. Die Struktur dieses Gens ist:

|                       |                          |                          |                          |                          |                          |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| AATTCAGGA<br>GTCCT    | TCCGATCGTG<br>AGGCTAGCAC | GAGGATGATT<br>CTCCTACTAA | AAATGGGTAC<br>TTTACCCATG | CATGGCTGCT<br>GTACCGACGA | GGCTCCATCA<br>CCGAGGTAGT |
| EcoRI                 | BAMHI                    | RBS                      | FGFstart                 |                          |                          |
| Translationskoppler 3 |                          |                          |                          |                          |                          |
| CTACCCGTGCC           | GGCACTGCCG               | GAAGACGGTG               | GCTCCGGTGC               | TTTCCCGCCG               | GGGCACTTCA               |
| GATGGGACGG            | CCGTGACGGC               | CTTCTGCCAC               | CGAGGCCACG               | AAAGGGCGGC               | CCGGTGAACT               |
| AAGACCCGAA            | ACGTCTGTAC               | TGTA AAAACG              | GTGGCTTCTT               | CCTGCGTATC               | CACCCGGATG               |
| TTCTGGGCTT            | TCCAGACATG               | ACATTTTTCG               | CACCGAAGAA               | GGACGCATAG               | CTGGGCCTAC               |
| GTCGTGTCGA            | CGGCGTACGT               | GAAAAAAGCG               | ACCCGCACA                | TCAAACGTCA               | GCTGCAGGCTG              |
| CAGCACAGCT            | TGCCGCATGC               | ACTTTTTC                 | TGGGCGTGT                | AGTTTGACGT               | CGACGTCCGAC              |
| AAGAACGTG             | GTGTTGTATC               | TATCAAAGGC               | GTTTGCGCAA               | ACCGTTACCT               | GCCTATGAAAG              |
| TTCTTGACAC            | CACAACATAG               | ATAGTTTCCG               | CAAACGCGTT               | TGGCAATGGA               | CCGATACTTTC              |
| AAGACGGTC             | GTCTGCTGGC               | TAGCAAATGT               | GTAACGTACG               | AATGTTTCTT               | CTTCGAACGTC              |
| TTCTGCCAG             | CAGACGACCG               | ATCGTTTACA               | CATTGACTGC               | TTACAAAGAA               | GAACCTTGACG              |
| TGGAAAGCA             | ACAAC TACA               | CACCTACCGT               | TCTCGTAAAT               | ACACTTGTTG               | GTACGTTGCTC              |
| ACCTTTCGT             | TGTTGATGTT               | GTGGATGGGA               | AGAGCATTTA               | TGTGAAGAAC               | CATGCAACGAG              |
| TGAAACGTA             | CCGGCCAGTA               | CAAAC TGGGT              | TCCAAAC TCG              | GCCCGGGTCA               | GAAAGCAATCC              |
| ACITTTGCAT            | GGCCGGTCAT               | GTTTGACCCA               | AGGTTTTCGAC              | CGGGCCAGT                | CTTTCGTTAGG              |
| TGTTCTCTGC            | CGATGAGCGC               | TAAATCTTAA               | ACTAGTA                  |                          |                          |
| ACAAGGACG             | GCTACTCGCG               | ATTTAGAGAATT             | TGATCATTCTGA             |                          |                          |
|                       |                          | FGFstop                  | HindIII                  |                          |                          |

Relevante Merkmale des Gens werden hervorgehoben.

Es wurde dann durch Aufschließung mit BamHI und HindIII isoliert und in Bam-HI-/Hind-III-Schnitt-pJU1003 inseriert (Squires et al., 1988, ibid.). Dies ergab pJU1003-synFGF. Dieses Plasmid wurde mittels XbaI und Hind III zerschnitten, und das XbaI/HindIII-Fragment, das das FGF-Gen mit sich führte, wurde isoliert. Dieses Fragment wurde in pT3XI-2 ligiert, das mit EcoRI und Hind III unter Benutzung eines EcoRI-XbaI-Linkers zerschnitten wurde:

5' pAATTCACAACG GTT TCC CT 3'  
3' GG TGT TGC CAA AGG GAG ATCp 5'

Das neue Plasmid wird pT3XI-2-010TC3FGFsyn genannt.

### C. Insertion von CNTF-Expressionskonstrukten in den Tac-Promotor-Vektor

pT3XI-2-010TC3FGFsyn wurde mittels BamHI und SpeI zerschnitten, was zur Linearisierung des 7,4-kb-Expressionsvektors und zur Freisetzung des ca. 0,5-kb-FGF-DNA-Fragments führte. In getrennten Reaktionen wurden CNTF-Syn1/3 und CNTF-Syn2/3 in das gelereinigte Bam HI/Spe I-Schnitt-Vektor-DNA-Fragment ligiert, woraus sich die Plasmide pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 und pT3XI-2:CNTF-Syn2/3 ergaben.

### D. Expression in E. coli

pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 wurde transformiert in einen phagenresistenten E.coli K-Stamm JM107. Vierzehn Transformanten wurden kultiviert und in bezug auf CNTF-Expression durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Anfärbung mit Coomassie-Brilliantblau analysiert. Vier Transformanten wiesen eine dunkelgefärbte Bande an der approximativen Stelle des CNTF auf. Eine hochgradige Expression des rekombinanten CNTF wurde erzielt durch Vermehrung der Zellen in Luria-Brühe mit 15 µg/ml Tetracyclin bis zu einer Zelldichte, die einem A<sub>600</sub> von 0,8 entsprach. IPTG wurde zu einer Endkonzentration von 1,0 mM zugesetzt und die Zellen ließ man 2 Stunden sich vermehren. Diese 4 Transformanten wiesen alle etwa die gleiche CNTF-Dichte sowohl an coomassie-angefärbten als auch immuno-geblotteten Gelen auf. Der scheinbare CNTF-Expressionsgrad in diesen Transformanten auf der Basis dieser Gele betrug etwa ein Viertel des Expressionsgrades, den das nach den vorausgehenden Angaben kultivierte pT5T:CNTF-Syn1/3-5a aufwies. Die Restriktionskartierung der DNAs dieser 4 Transformanten bestätigte, daß sie alle das menschliche CNTF-Gen mit sich führten. pT3XI-2:CNTF-Syn2/3 wurde zur Expression in das E.coli-Färbungs-TG1 transformiert. Die Transformanten wurden durch Plattierung auf Lb-Agar, der 15 µg/ml Tetracyclin enthielt, selektiert. Vier Transformanten, pT3XI-2:CNTF-Syn2/3-A, -B, -C und -D, wurden selektiert, kultiviert und durch Restriktionsenzymkartierung bestätigt. Ein Transformant, pT3XI-2:CNTF-Syn2/3-A, wurde zur weiteren Untersuchung selektiert. Dieser Transformant wurde über Nacht in 500 ml 2XYT-Brühe plus 10 µg/ml Tetracyclin und 1 mM IPTG kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugierung, wie oben angegeben, geerntet und in 10 mM Phosphatpuffer, pH = 6,7, der 1 mM EDTA enthielt, 0,1 M PMSF und 0,1 mM Pepstatin durch eine 15-sec-Beschallung auf Eis mittels eines Mikrotips mit einer Leistungseinstellung von #3 extrahiert. Nach 15minütiger Zentrifugierung in einer Mikrozentrifuge wurde der Überstand eingesammelt und auf Bioaktivität im Ziliarganglion-Überlebensversuch analysiert (Beispiel 1). Im Überstand (Abb. 22), der 1,5 mg/ml Protein enthielt, war eine beträchtliche Bioaktivität zu verzeichnen. Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, daß 2 verschiedene DNA-Konstrukte in zwei unterschiedlichen Expressionsvektoren die Expression eines biologisch aktiven CNTF erlaubten, der auch in geeigneter Weise auf reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen wanderte, durch affinitätsgereinigte Antikörper zum CNTF erkannt wurde und eine geeignete Aminoterminal-Aminosäuresequenz aufwies.



#### 4. Reinigung des rekombinanten CNTF

Ein kleines Inokulum von pT5T:CNTF-Syn1/3-5a wird über Nacht bei 37°C unter Schütteln in Luria-Brühe, die 10 µg/ml Tetracyclin enthält, kultiviert. Sieben ml dieser Zellsuspension werden pro 50 ml Luria-Brühe in großen Kolben zugesetzt und bei 37°C unter Schütteln kultiviert, bis der A<sub>600</sub>-Wert annähernd 0,5 erreicht. Dann werden 0,5 mM End-IPG zugesetzt, um eine CNTF-Expression zu induzieren, und die Kultivierung fortgesetzt, bis der A<sub>600</sub>-Wert annähernd 1,2 erreicht, wozu typischerweise 4–6 h nötig sind. Die Zellen werden durch 5minütige Zentrifugierung bei 4°C mittels JA-20-Rotor bei 7000 rpm geerntet und noch einmal durch Zentrifugierung in 50 mM Phosphatpuffer, pH = 8,0, (Puffer A) bei 4°C gewaschen. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet bei –20°C als Paste eingefroren.

Die Zellpaste wird in Puffer B (Puffer A enthält 1 mM EGTA (Ethylenglycol-bis-(aminoethylether) N,N,N',N'-Tetraessigsäure) und 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)) mit 0,5 mg Paste pro ml Puffer bei 4°C suspendiert und 3mal durch eine French-press passiert, um die Bakterien aufzubrechen. Zu einer Endkonzentration von 0,25% wird Polyethylenimin (PEI) zugesetzt und 30 min bei 4°C geschüttelt. Der Niederschlag wird durch 15minütige Zentrifugierung bei Höchstgeschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge entfernt. Dieser Schritt verringert typischerweise den Nucleinsäuregehalt, wie anhand des Verhältnisses A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> gemessen wurde, von etwa 25% auf weniger als 5%.

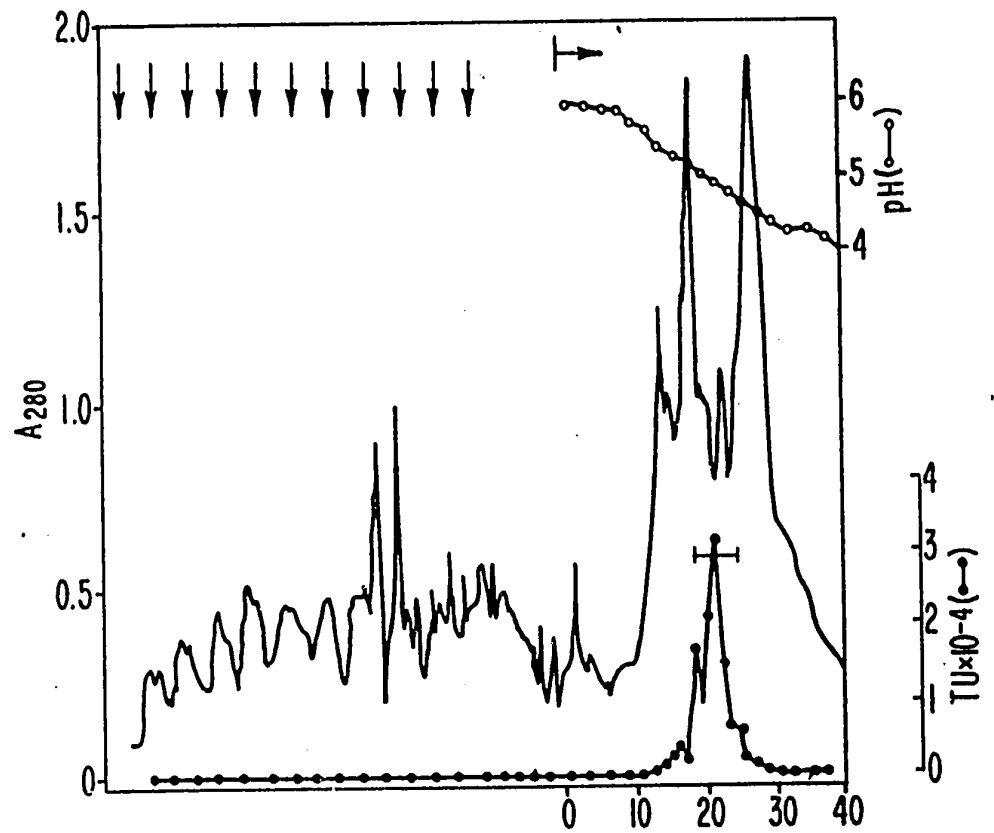
Die Probe wird dann auf eine mit Puffer B äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (Pharmacia) angewandt. CNTF ist eine so große Komponente des French-press-Lysats, daß sie während der Chromatografie durch Coomassie-Brillantblau gefärbte SDS-Polyacrylamidgelen der Säulenfraktionen verfolgt werden kann. CNTF ist eine größere coomassiegefärbte Bande mit etwa 24 kD. Unter Anwendung dieser Analyse durchwäscht der CNTF die Q-Sepharosesäule im Puffer B. Die Durchwaschungsfraktionen, die den größten Teil des CNTF-Proteins enthalten, werden eingesammelt, gegen Puffer C (5 mM Phosphatpuffer, pH = 8,0, enthält 1 mM EGTA und 1 mM EDTA) dialysiert und auf eine mit Puffer C äquilibrierte Q-Sepharosesäule angewandt. Die Säule wird in Puffer C gewaschen, bis der A<sub>260</sub>-Wert zur Grundlinie zurückkehrt, was darauf hindeutet, daß nicht anhaftende Proteine die Säule durchgewaschen haben. Im Puffer C bindet sich CNTF an die Q-Sepharosesäule und wird dann mit einem 0–0,1 M NaCl-Gradienten in Puffer C eluiert. Der CNTF tritt aus der Säule bei etwa 40 mM NaCl aus und besitzt eine mehr als 90%ige Reinheit aufgrund der Beurteilung von coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgelen der CNTF-Peakfraktionen.

Tabelle 1

| Wirt             | Regulierte Promotoren                                                                                        | Induktor                                                                             | Transkriptionsterminator                  | Meta-stabilisierung                                                  | Transkriptionale Startstelle- und Leader-Peptide                                                                            | Marker                                                                                    | RS-Bindungsstelle                                                     |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| E.coli           | Lac <sup>1</sup> , Tac <sup>2</sup><br>Lambda pl.<br>Trp <sup>3</sup>                                        | IPTG<br>erhöhte Temperatur<br>IAA-Zusatz oder<br>Tryptophanerschöpfung               | rrnB <sup>6</sup><br>rrnC <sup>7</sup>    | ompA <sup>8</sup><br>lambda<br>int <sup>9</sup><br>trp <sup>10</sup> | bla <sup>11</sup><br>ompA <sup>12</sup><br>phoS                                                                             | Ampicillin <sup>14</sup><br>Tetracyclin <sup>14,15</sup><br>Chloramphenicol <sup>16</sup> |                                                                       |
| Bacillus         | * Alphaamylase <sup>17</sup><br>* Subtilisin <sup>18</sup><br>* p-43 <sup>19</sup><br>spae – 1 <sup>20</sup> | IPTG                                                                                 | E. coli rrn<br>rrn BT.1 <sup>20</sup>     |                                                                      | B. amy neutrale<br>Protease <sup>21</sup><br>B. amy-Alpha-<br>amylase <sup>22</sup><br>B. subt.<br>Subtilisin <sup>23</sup> | Kan <sup>24</sup><br>Cam <sup>25</sup>                                                    | B. amy-neutrale<br>Protease<br>B. amy-Alpha-<br>Amylase <sup>22</sup> |
| Pseudo-<br>monas | Trp <sup>27</sup> (E.coli)<br>Lac (E.coli)<br>Tac (E.coli)                                                   | IAA-Zusatz oder<br>Tryptophan<br>erschöpfung<br>IPTG                                 |                                           |                                                                      | Phospholipase C <sup>28</sup><br>Exotoxin A <sup>29</sup>                                                                   | Sulfonamid <sup>30</sup><br>Streptomycin <sup>30</sup>                                    | Trp (E.coli)                                                          |
| Hefe             | Gal <sup>31</sup><br>10 <sup>32</sup><br>Adb <sup>34</sup><br>11 <sup>34</sup><br>Pho 5                      | Glucose-Erschöpfung und<br>Galactose-Glucose-<br>Erschöpfung<br>Phosphat-Erschöpfung | Cyc 1<br>Una<br><br>Alpha-Faktor<br>Sac 2 |                                                                      | Invertase <sup>36</sup><br>Saure Phosphatase <sup>36</sup><br><br>Alpha-Faktor                                              | Ura e <sup>37</sup><br>Leu 2 <sup>38</sup><br><br>His 3<br>Tap 1                          |                                                                       |

\* nicht reguliert \*\* im Original teilweise schlecht lesbar – A. d. Üb.

FIG. 1



↓  
 T  
 —  
 ○ pH  
 ● CNTF  
 I I

**FIG. 2**

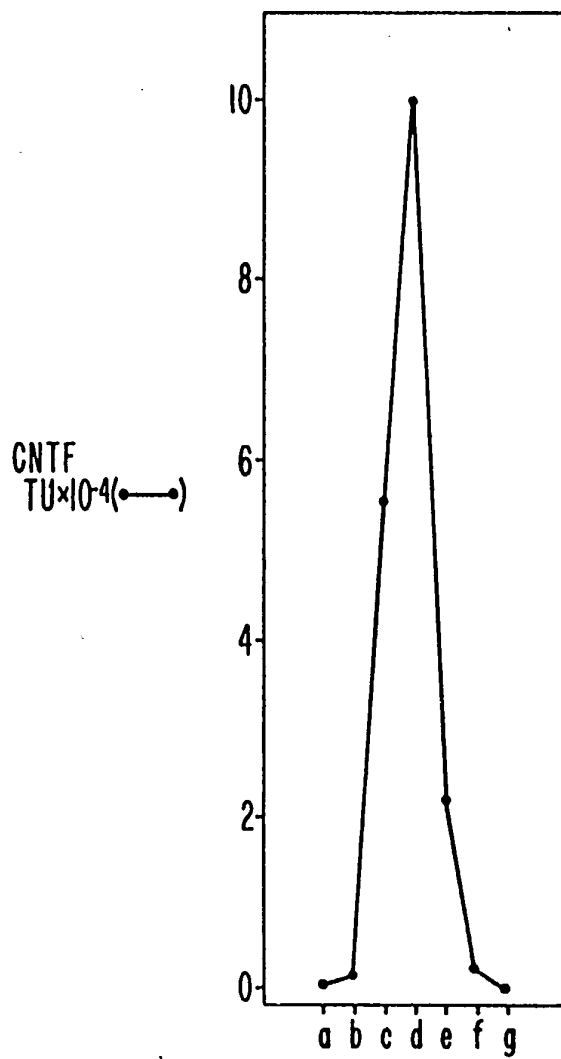
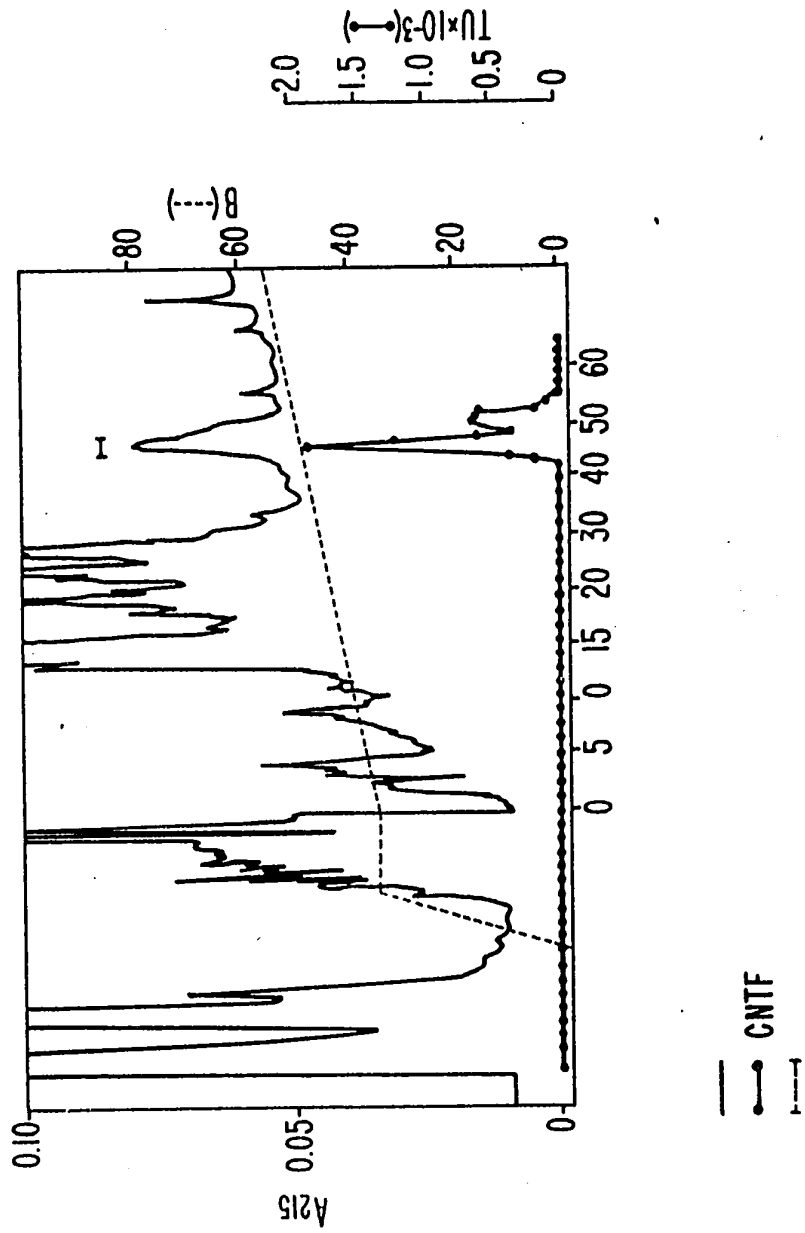


FIG. 3



CONFIDENTIAL

2993-18

- 27 -

**FIG. 4**

2 0 2 4 6 8  
- - - - -



— 29K

— 20K

— 14K

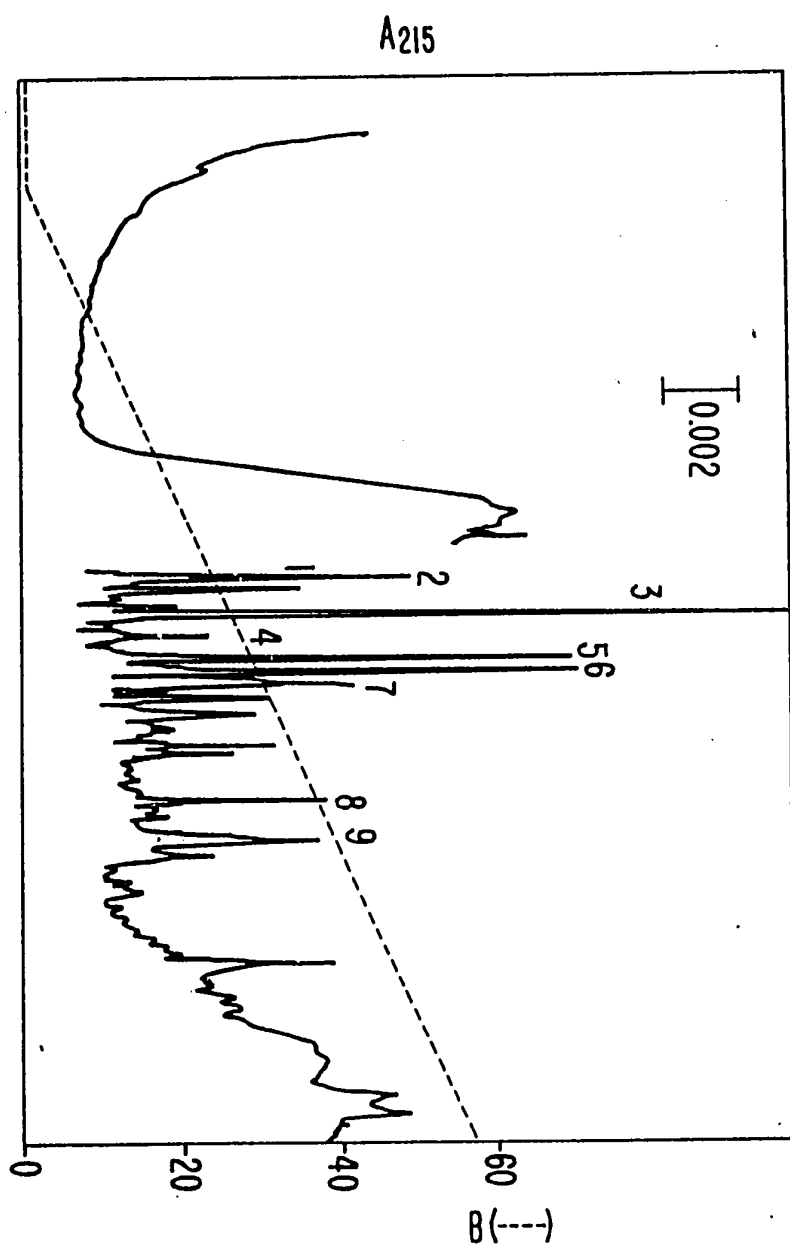


FIG. 5

FIG. 6

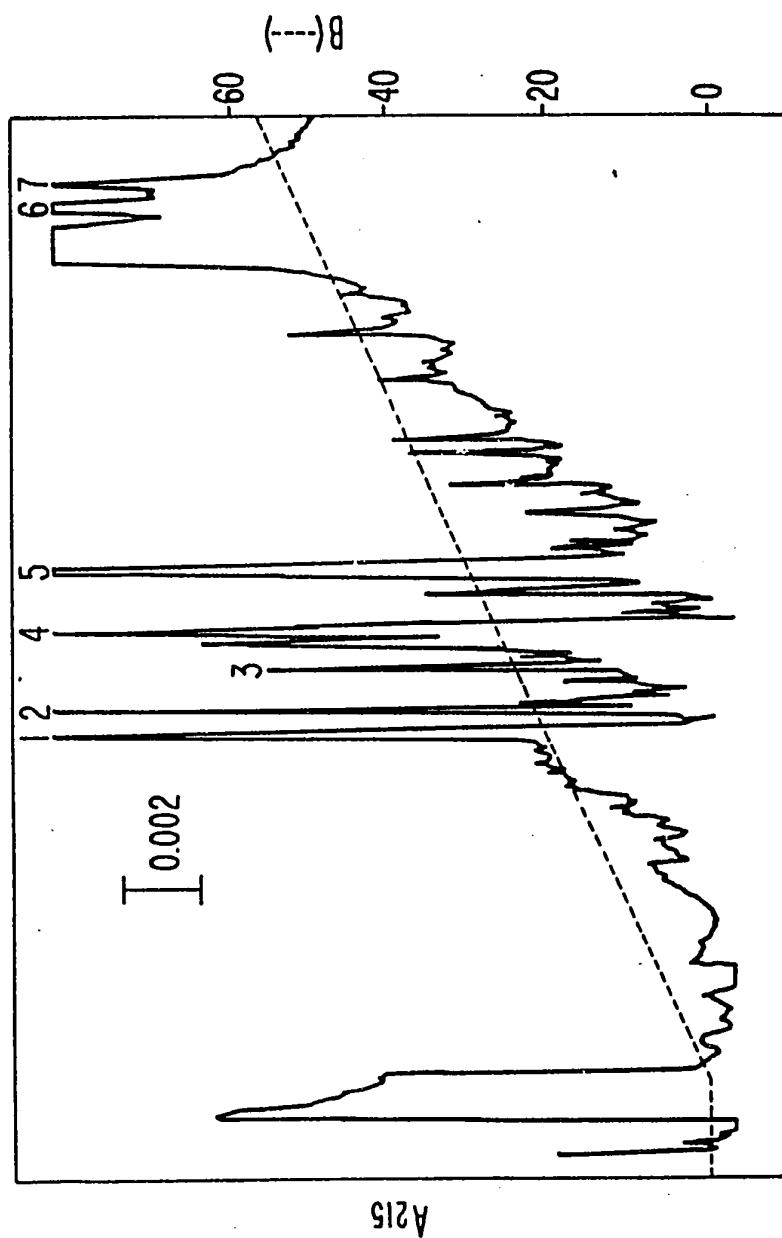
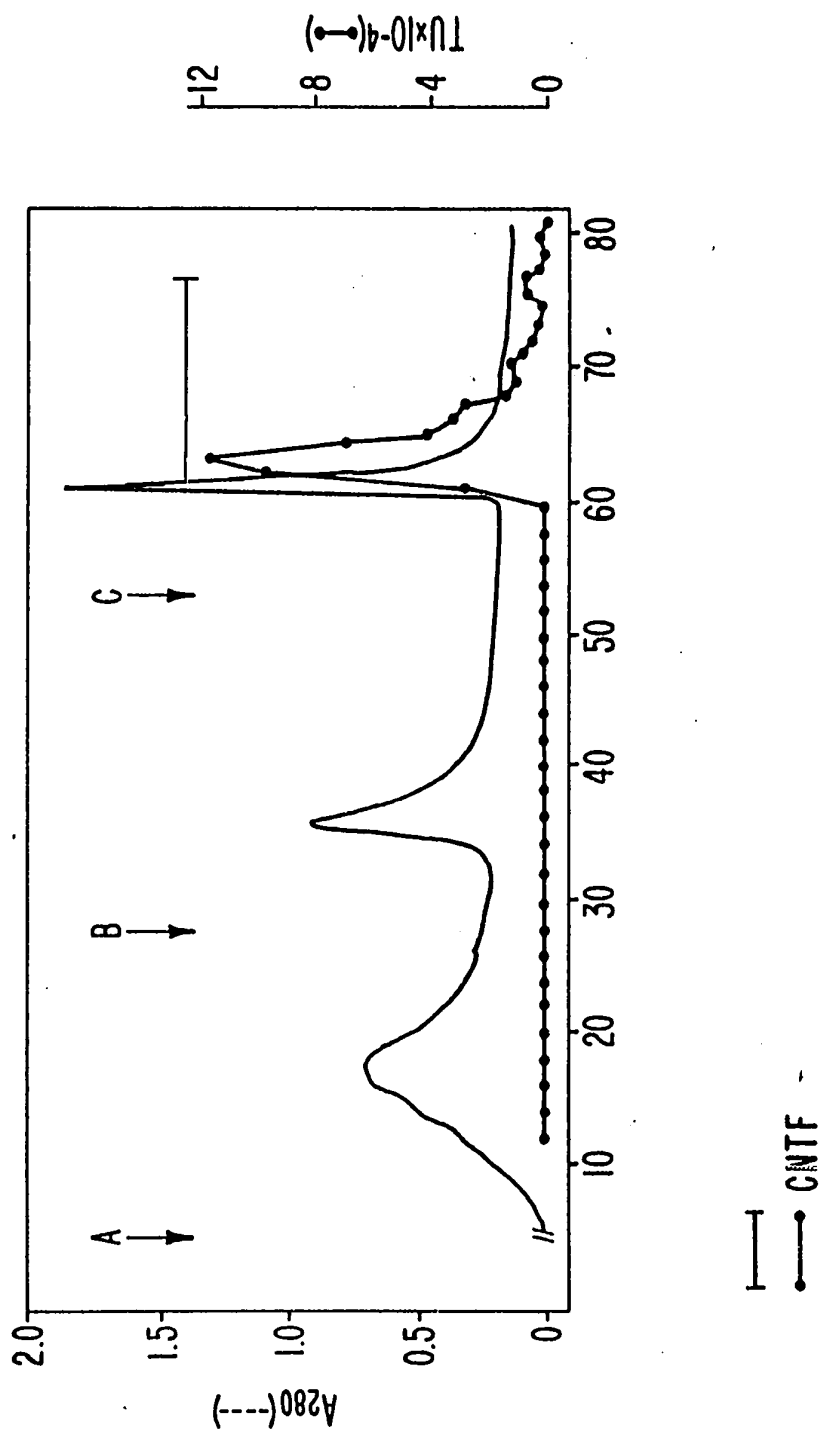
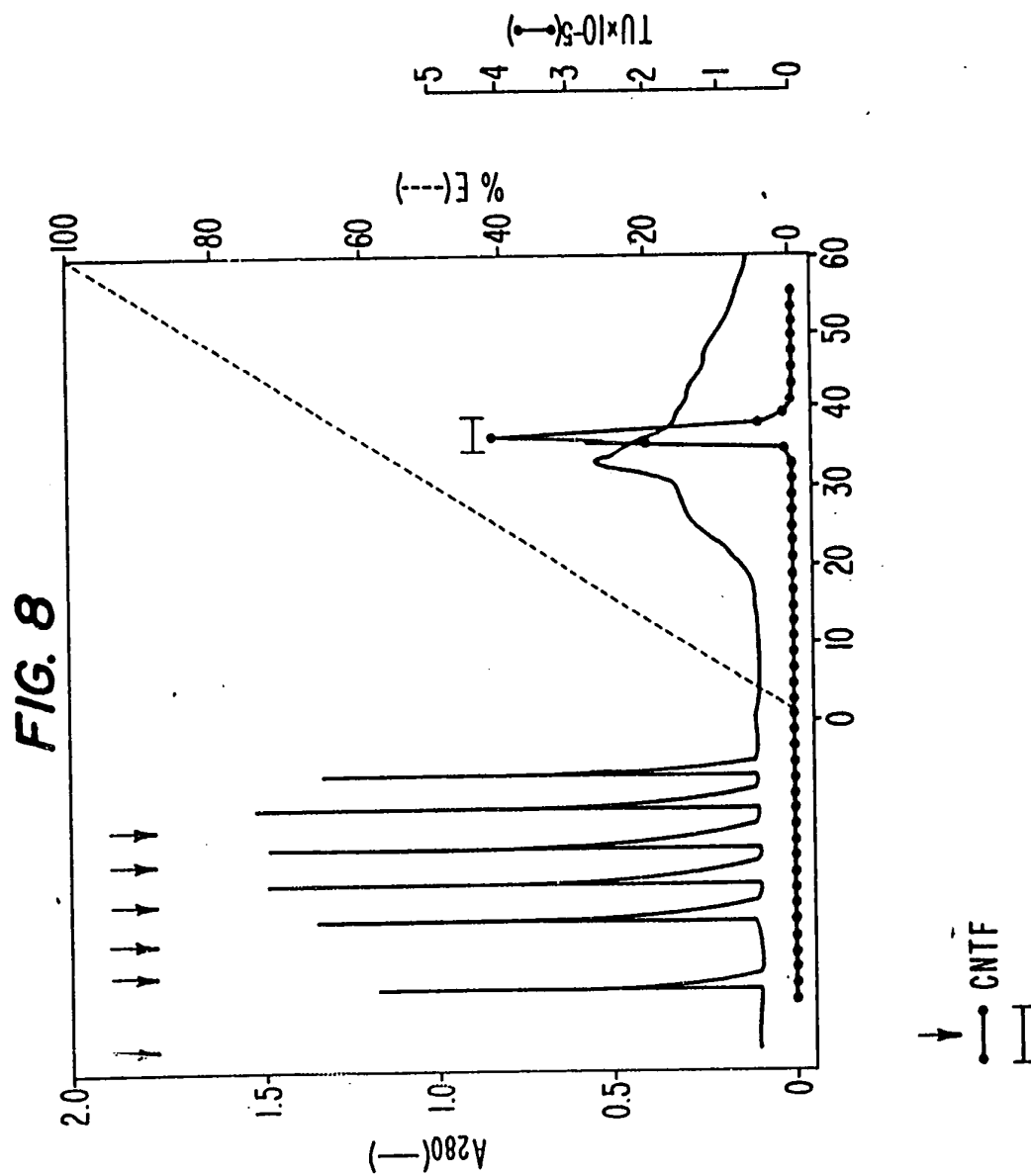
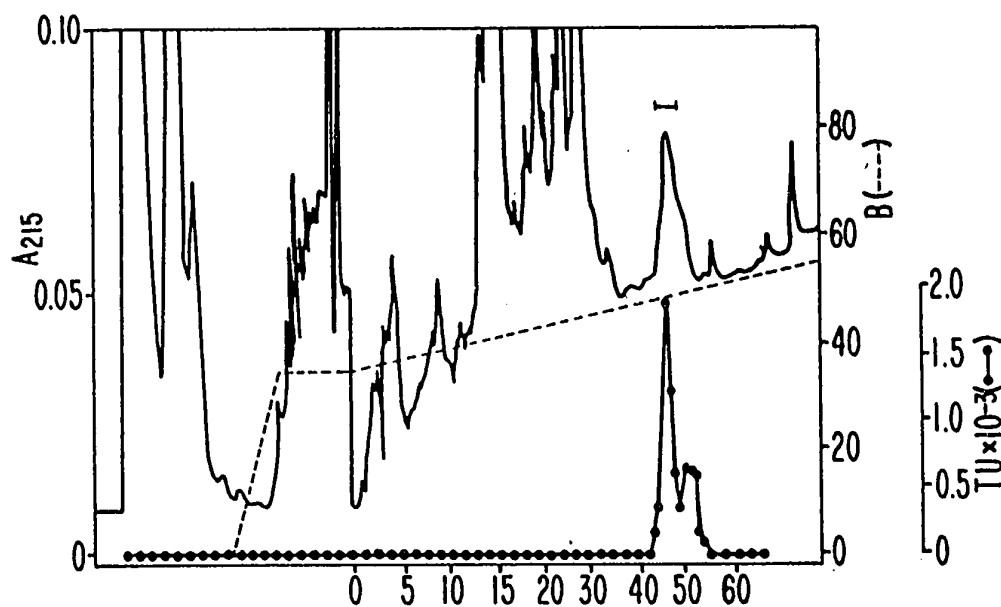
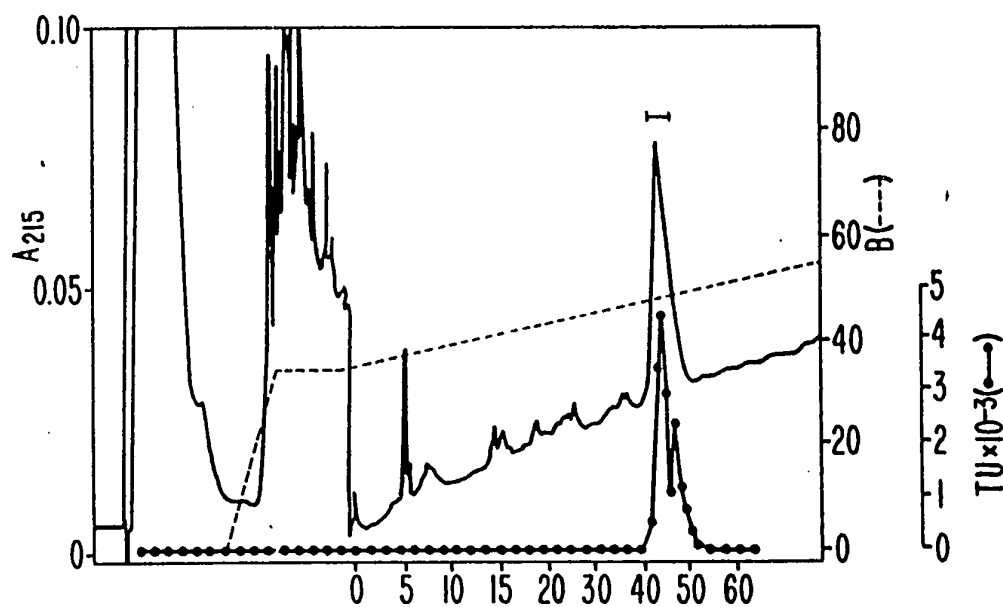




FIG. 7





**FIG. 9A****FIG. 9B**

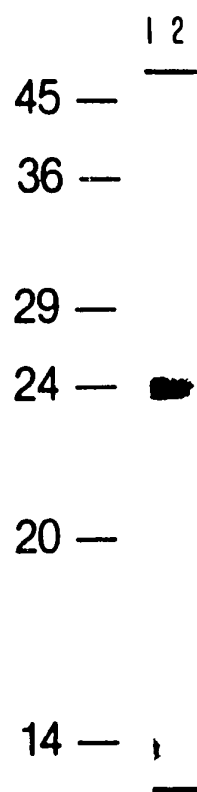
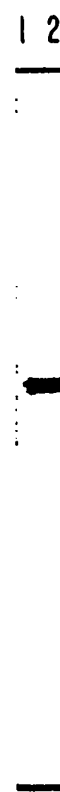
**FIG. 10A****FIG. 10B**

FIG. II

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

| G   |     |     | TG  |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TAA | GGG | ATG | GCT | TTC | ACA | GAG |
|     | met | ala | phe | thr | glu |     |
|     |     |     |     |     | met |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| G A |     |     | C   |     |     | G   |     |     | T A C |     |     |     |     |     |     |     |
| CAT | TCA | CCG | CTG | ACC | CCT | CAC | CGT | CGG | GAC   | CTC | TGT | AGC | CGC | TCT | ATC | TGG |
| his | ser | pro | leu | thr | pro | his | arg | arg | asp   | leu | cys | ser | arg | ser | ile | trp |
| ala |     |     |     |     |     | glu |     |     | thr   |     |     |     |     |     |     |     |
| G   |     |     |     |     |     | C   |     |     | T C   |     |     |     |     |     |     |     |
| CTA | GCA | AGG | AAG | ATT | CGT | TCA | GAC | CTG | ACT   | GCT | CTT | ACG | GAA | TCC | TAT | GTG |
| leu | ala | aro | lys | ile | arg | ser | asp | leu | thr   | ala | leu | thr | glu | ser | tyr | val |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | T   | A G A |     |     |     |
| AAG | CAT | CAG | GGC | CTG | AAC | AAG | AAC | ATC | AAC | CTG | GAC | TCT | GCG   | GAT | GGG | ATG |
| lys | his | gin | gly | leu | asn | lyn | asn | ila | asn | leu | asp | ser | ala   | asp | gly | met |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | val | val   |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | T   |     |     |     |     |     |     |
| CCA | GTG | GCA | AGC | ACT | GAT | CAG | TGG | AGT | GAG | CTG | ACC | GAG | GCA | GAG | CBA | CTC |
| pro | val | ala | ser | thr | asp | gln | trp | ser | glu | leu | thr | glu | ala | glu | arg | leu |
| met |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

CAA GAG AAC CTT CAA GCT TAT CGT ACC TTC CAT GTT TTG TTG GCC AGG CTC  
gln glu asn leu gln ala tyr arg thr phe his val leu leu ala arg leu  
ile met

TTA GAA GAC CAG CAG GTG CAT TTT ACC CCA ACC GAA GGT GAC TTC CAT CAA  
leu glu asp gln gln val his phe thr pro thr glu gly asp phe his gln  
a l a

T A
T
C
T

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GCT | ATA | CAT | ACC | CTT | CTT | CTC | CAA | GTC | GCT | GCC | TTT | GCA | TAC | CAG | ATA | GAG |
| ala | ile | his | thr | leu | leu | leu | gln | val | ala | ala | phe | ala | tyr | gln | ile | glu |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     | G G | G T |     |     |     | G T | T   |     |     | T   | C C | A   | T   |     |     |     |  |
| GAG | TTA | ATG | ATA | CTC | CTG | GAA | TAC | AAG | ATC | CCC | CGC | AAT | GAG | GCT | GAT | GGG |  |
| glu | leu | met | ile | leu | leu | glu | tyr | lys | ile | pro | arg | asn | glu | ala | asp | gly |  |
|     |     |     | val |     |     |     |     | cys | asn |     |     | pro | lys | asp |     |     |  |

CA G C ... GT A  
ATG CCT ATT AAT GTT GGA GAT GGT GGT CTC TTT GAG AAG AAG CTG TGG GGC  
met pro ile asn val gly asp gly gly leu phe glu lys lys leu trp gly  
val ... ile gly asp

G A A G C G A T  
 CTA AAG GTG CTG CAG GAG CTT TCA CAG TGG ACA GTA AGG TCC ATC CAT GAC  
 leu lys val leu gln glu leu ser gln trp thr val arg ser ile his asp  
 his

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| G   |     |     | G   |     |     | A   |     |     | A   |     |     | A   |     |     |     |     |
| CTT | CGT | TTC | ATT | TCT | TCT | CAT | CAG | ACT | GGG | ATC | CCA | GCA | CGT | GGG | ABC | CAT |
| leu | arg | phe | ile | ser | ser | his | gln | thr | gly | ile | pro | ala | arg | gly | ser | his |
| val |     |     | cys |     |     |     |     |     |     |     |     | his |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     |     | G   | G   |     |     |     |  |
| TAT | ATT | GCT | AAC | AAC | AAG | AAA | ATG | TAG |  |
| tyr | ile | ala | asn | asn | lys | lys | met |     |  |
|     |     |     |     | asp |     | glu |     |     |  |

FIG. 13

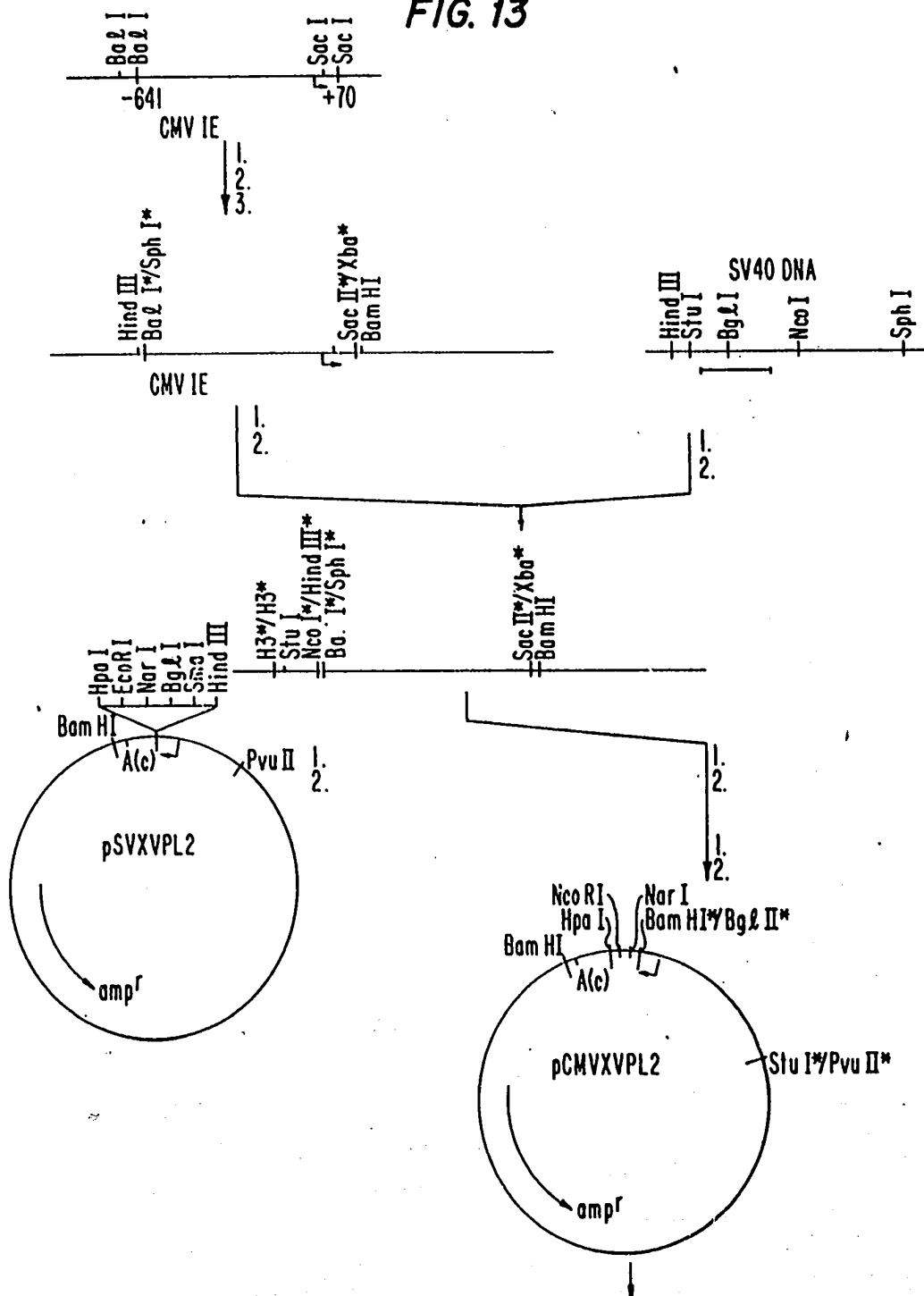
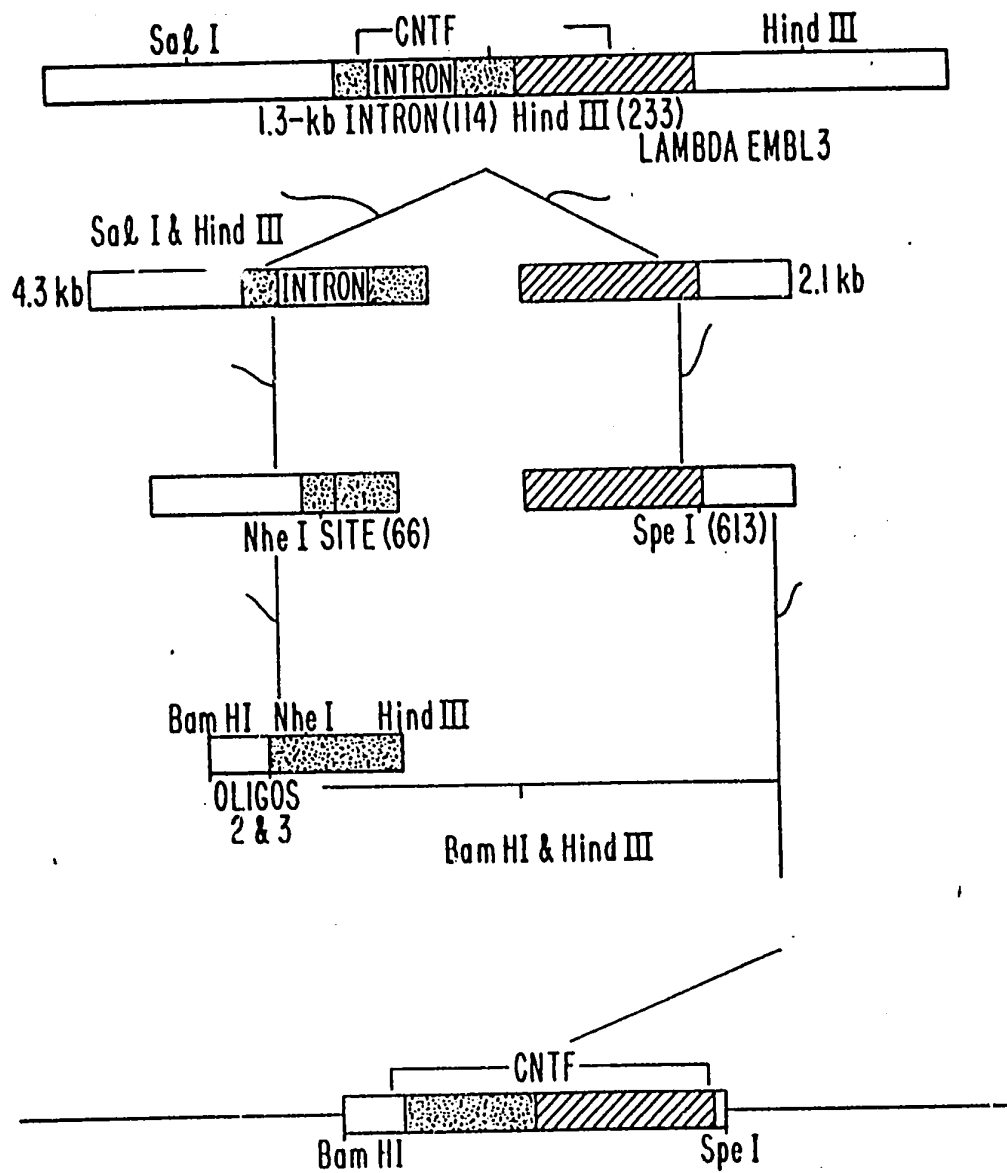
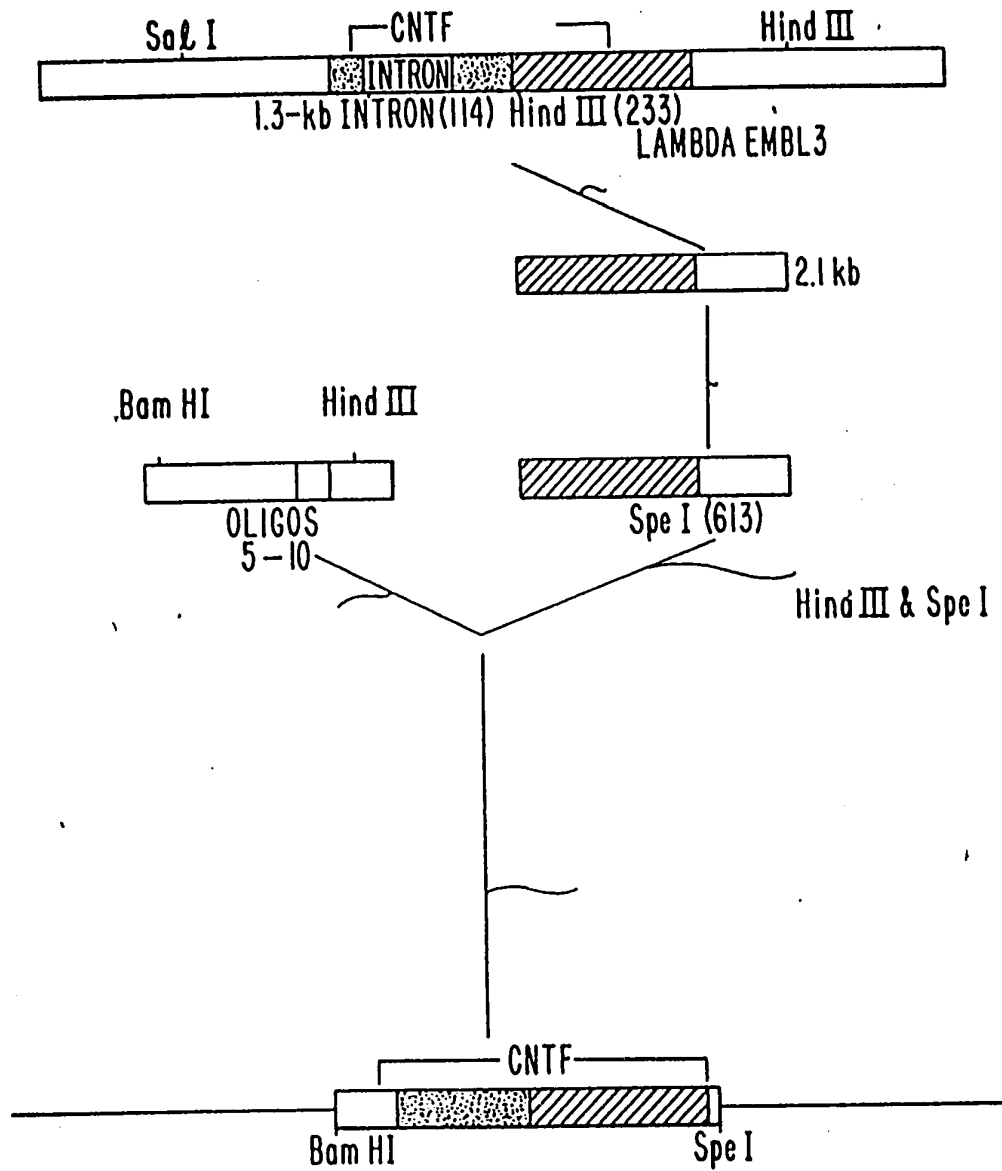


FIG. 14





**FIG. 15**



299318

299318

-39-

## FIG. 16

### Oligonucleotide 1

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'

### Oligonucleotides 2 & 3

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 GGT CTA GAC  
thr glu his ser pro leu thr pro his arg arg asp leu

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

### Oligonucleotide 4

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

FIG. 17

Bam HI  
 01160-5 5'-GATC CGA TCT TGG AGG ATG ATT AAA TGG CTT TCA CCG AAC ACT CCC CGC TGA  
 01160-6 3'-GCT AGA ACC TCC TAC TAA TTT ACC GAA AGT GGC TTG TGA GGC GCG ACT

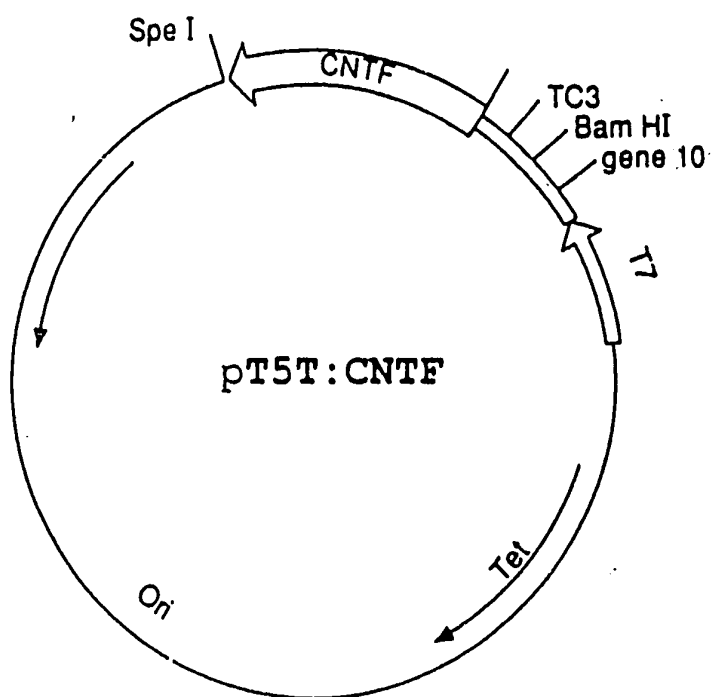
CCC CGC ACC GTC GTG ACC TGT GCT CCC GTT CCA TCT GGC TGG CT-3'01160-5  
 GGG GCG TGG CAG CAC TGG ACA CGA GGG CAA -5'01160-6

01160-7 5'-C GTA AAA TCC GTT CCG ACC TGA CCG CTC TGA CCG AAT  
 01160-8 3'-GGT AGA CCG ACC GAG CAT TTT AGG CAA GGC TGG ACT GGC GAG ACT GGC TTA

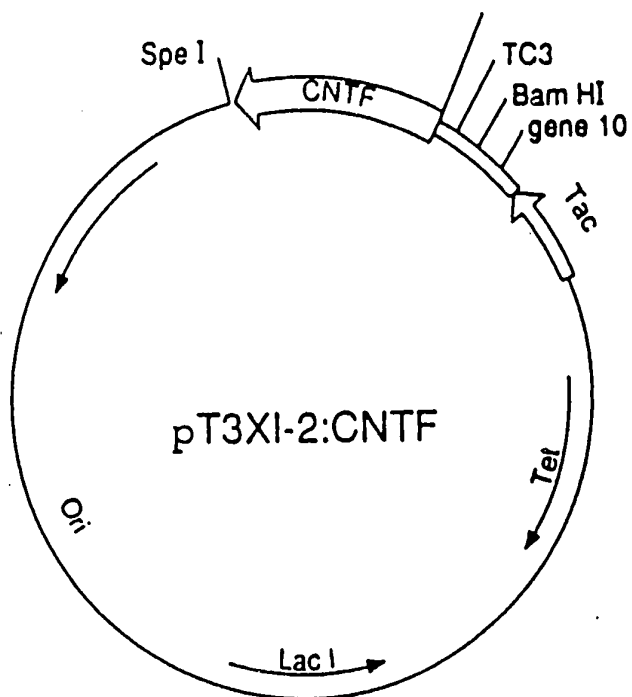
CCT ACG TTA AAC ACC AGG GTC TGA ACA AAA ACA TCA ACC TGG ACT CC-3'01160-7  
 GGA TGC AAT TTG TGG TCC CAG ACT TGT TTT TGT AGT T -5'01160-8

01160-9 5'-G CTG ACG GTA TGC CGG TTG CTT CCA CCG ACC AGT GGT CCG  
 01160-10 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 -3'01160-9  
 TTG ACT GGC TTC GAC TFG CAG ACG TCC TTT TGG ACG TTCGA -5'01160-10  
Hind III

**FIG. 18**

**FIG. 19**

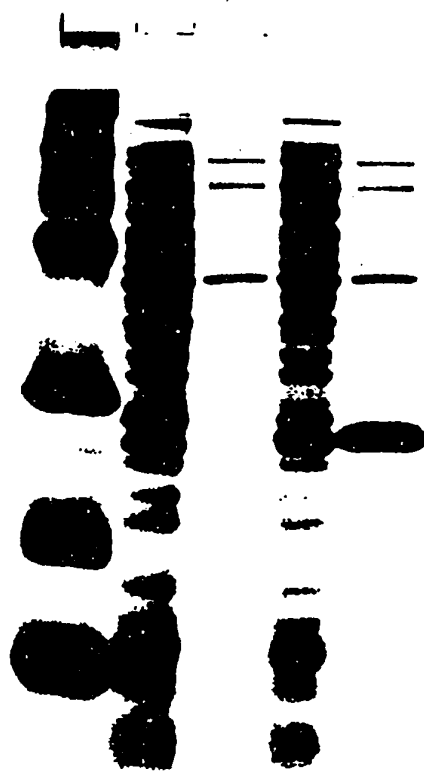


200000

299318

-43-

**FIG. 20**



299318

299318

- 44 -

**FIG. 21**

