(19) DANMARK (11) **DK 173269 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 07 K 14/50 C 12 N 15/18**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1988 00926**

(22) Indleveringsdag: **1988-02-23**

(24) Løbedag: **1988-02-23**

(41) Alm. tilgængelig: **1988-08-25**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2000-05-29**

(30) Prioritet: **1987-02-24 JP 42218/87 1987-02-25 JP 43444/87 1987-04-02 JP 81977/87 1987-06-12 JP 147511/87 1987-08-11 JP 201510/87 1987-11-17 JP 290283/87 1988-01-26 JP 16260/88**

(73) Patenthaver: **Takeda Chemical Industries Ltd., 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka 541, Japan**

(72) Opfinder: **Masaharu Senoo, 1B-212, 744 Nishi-Izumigaoka 2-chome, Toyonaka, Osaka 560, Japan**
Tsutomu Kurokawa, 1-50, Suimeidai 1-chome, Kawanishi, Hyogo 666-01, Japan
Koichi Igarashi, 66-3, Shimogamo-miyazakicho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan
Reiko Sasada, C1-405, 2 Takenodai, Nagaokakyo, Kyoto 560, Japan

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Mutein af basisk fibroblastvækstfaktor, rekombinant DNA kodende for dette og transformant indeholdende nævnte DNA samt fremgangsmåde til fremstilling af nævnte mutein**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Polypeptid, DNA og anvendelse deraf

Et mutein af basisk fibroblast-vækstfaktor har fibroblast-vækstfremmende virkning, vækststimulerende virkning på kapillære endothel-celler og angiogenvirkning, har høj stabilitet og har lav toxicitet. Dette mutein kan derfor med fordel bruges som middel til fremskyndelse af heling af brandsår og andre sår, som lægemiddel mod thrombose og til at fremme celledyrkning.

Den foreliggende opfindelse angår muteiner af basiske fibroblast-vækstfaktorer (i det følgende også kort benævnt bFGF), et rekombinant-DNA med en basesekvens som koder for et mutein af bFGF samt anvendelse deraf.

Et basisk polypeptidhormon med en molekylvægt på ca. 17000 og secerneret hovedsageligt af hypofysen, bFGF, blev først separeret som en faktor der udviste stærk vækstfremmende virkning på fibroblaster såsom BALB/c3T3 (D. Gospodarowicz, Nature 249, 123 (1974)). Derefter blev det imidlertid bevist at det udviser vækstfremmende virkning på næsten alle celler stammende fra mesoblasten (D. Gospodarowicz et al., National Cancer Institute Monograph 48, 109 (1978)). Specielt tyder den angiogeniske virkning af bFGF, sammen med dens cellevækstfremmende virkning, på et potentiale for anvendelse deraf som lægemiddel mod traumer og som forebyggende middel og lægemiddel mod bl.a. thromboser og arteriosclerose.

Okse-bFGF blev først beskrevet i Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, bind 82, 6507 (1985). I Science, 233, 545 (1986) beskrev man de aminosyrer som indgår i okse-bFGF, udledet af den klon som var frembragt ved kloning af cDNA fra humant bFGF.

Hvad angår human bFGF skal det bemærkes at det er oplyst i Biochemical and Biophysical Research Communications, bind 135, side 541 (1986), at humant bFGF var blevet ekstraheret fra menneskehjernen.

I European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal, bind 5, side 2523 (1986) og PCT international patentpublikation nr. WO/01728 er det vist at de aminosyrer som udgør human bFGF var deduktivt specificeret på basis af den klon som var produceret ved kloning af cDNA fra human bFGF under anvendelse af okse-bFGF som probe (sonde).

Desuden er der i FEBS Letters 213, 189 (1987) beskrevet fremstilling af human bFGF ved dyrkning af en transformant vundet ved kloning af cDNA fra humant bFGF.

Ved sammenligning af humant bFGF med bovint bFGF viser det sig at det humane har Thr i stilling 112, mens okse-bFGF har Ser på dette sted; det humane har Ser i stilling 128 mens det bovine har Pro (i dette tilfælde er det N-terminale Pro bestemt som den første aminosyre).

Nærværende opfindere antog at man ved at modificere aminosyresekvensen kunne forbedre bFGF med hensyn til stabilitet, produktivitet i en celle og celleformeringsaktivitet pr. molekyle, og desuden at dets uidentificerede bioaktiviteter ville blive potentieret.

Det gælder desuden at biologisk aktive proteiner som er fremstillet mikrobiologisk ved DNA-rekombinationsteknik indeholder cysteinrester, der ikke er essentielle for deres aktivitet,men som kan danne uønskede intermolekylære eller intramolekylære bindinger.

Under forløbet af en produktion af bFGF ved rekombinant-DNA teknik fandtes der heterogene konformationer i en ekstrakt fra Escherichia coli indeholdende en høj koncentration af bFGF. Disse konformationer formodes at være blevet frembragt på grund af tilfældige intra- eller intermolekylære disulfidbroer og er årsag til vanskeligheder ved rensning af bFGF og nedsættelse af udbyttet ved udvindingen.

I betragtning af den kendsgerning var det nærværende opfinderes hensigt at modificere mikrobiologisk fremstillede bioaktive proteiner såsom rekombinant-bFGF på en sådan måde at man, uden at påvirke deres aktivitet i ugunstig retning, opnåede at deres evne til at danne sådanne intermolekylære broer og intramolekylære bindinger som resulterer i dannelse af uønskede tertiære strukturer (fx konformationer der nedsætter proteinaktiviteten) nedsættes eller elimineres.

Nærværende opfindere konstruerede modificerede bFGF-muteiner ved DNA-rekombination og steddirigeret mutagenese og foretog undersøgelser med henblik på at forbedre deres stabilitet, sætte deres intracellulære produk-

tiviteter og aktiviteter i vejret og beskrive ændringer i deres bioaktiviteter; som følge af disse undersøgelser fandt fandt nærværende opfindere frem til et mutein som tjener disse formål. Efter yderligere undersøgelser på basis af dette resultat blev den foreliggende opfindelse fuldført.

Opfindelsen angår:

(1) et mutein af en basisk fibroblast-vækstfaktor (bFGF), som er et udskiftningstypemutein eller en kombination af et udskiftningstype- og et udeladelsestypemutein, hvor

et udskiftingstypemutein er et mutein, hvor mindst én af de fire cysteinrester i den indgående aminosyresekvens af den naturlige type bFGF udskiftes med én aminosyre anden end cystein, og

et udeladelsestypemutein er et mutein, hvor 1-41 aminosyrer mangler fra aminoterminalen af den indgående aminosyresekvens af bFGF og/eller 1-61 aminosyrer mangler fra carboxyterminalen af den indgående aminosyresekvens af bFGF.

(2) et rekombinant DNA med en basesekvens som koder for ovennævnte mutein (1),

(3) en transformant hvori der findes en vektor indeholdende et rekombinant DNA med den basesekvens som koder for ovennævnte mutein (1), og

(4) en fremgangsmåde til fremstilling af ovennævnte mutein (1), bestående i at man dyrker en transformant hvori der findes en vektor som indeholder et rekombinant DNA med den basesekvens som koder for nævnte mutein i et dyrkningsmedium til fremstilling og akkumulering deraf i dyrkningsvæsken.

Muteinet ifølge opfindelsen er forbedret i forhold til bFGF med hensyn til stabilitet eller produktivitet i en celle, uden at dets bFGF-aktivitet eller antigene egenskaber i det væsentlige er påvirket i en ugunstig retning.

Som bFGF kan anføres et hvilket som helst bFGF blot det stammer var et varmblodet pattedyr.

Som typiske eksempler herpå skal nævnes humant, okse- og muse-bFGF.

Særlig foretrækkes polypeptider som indeholder følgende aminosyresekvens:

Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro I

I endnu højere grad foretrækkes et polypeptid med formlen:

Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr-Cys-Lys-Asn-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro-His-Ile-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Ser-Ile-Lys-Gly-Val-Cys-Ala-Asn-Arg-Tyr-Leu-Ala-Met-Lys-Glu-Asp-Gly-Arg-Leu-Leu-Ala-Ser-Lys-Cys-Val-Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-X-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Y-Lys-Thr-Gly-Pro-Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-Lys-Ser, II

hvor X betegner Thr eller Ser; når X er Thr betegner Y Ser og når X er Ser betegner Y Pro.

Ganske særlig foretrækkes et polypeptid indeholdende aminosyresekvensen:

Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr-Cys-Lys-Asn-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro-His-Val-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Ser-Ile-Lys-Gly-Val-Cys-Ala-Asn-Arg-Tyr-Leu-Ala-Met-Lys-Glu-Asp-Gly-Arg-Leu-Leu-Ala-Ser-Lys-Cys-Val-Thr-Glu-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Ser-Lys-Thr-Gly-Pro-Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-Lys-Ser

Muteinet ifølge opfindelsen har i det væsentlige aminosyresekvensen i det oprindelige peptid eller protein; som variationer kan nævnes tilføjelse af en eller flere aminosyrer, udeladelse af en eller flere af de indgående aminosyrer og substituering af en eller flere af de indgående aminosyrer med en eller flere andre aminosyrer.

En sådan tilføjelse af en aminosyre omfatter tilføjelse af mindst én aminosyre.

En sådan udeladelse af en indgående aminosyre består i udeladelse af mindst én aminosyre som indgår i bFGF.

En substituering af en indgående aminosyre med andre aminosyrer består i udskiftning af mindst én i bFGF indgående aminosyre med en anden aminosyre.

Den i det mindste ene aminosyre i det mutein til hvilket der er tilføjet mindst én aminosyre til bFGF kan ikke være methionin stammende fra et initieringskodon som bruges til peptidekspression og signalpeptid.

Antallet af tilføjede aminosyrer er mindst én, men det kan være et hvilket som helst andet, blot bFGF-egenskaberne ikke går tabt. Foretrukne aminosyrer bør indbefatte nogle af eller alle de aminosyresekvenser af proteiner, som har homologi med bFGF og som udviser lignende aktiviteter som bFGF.

Som sådanne tilføjede aminosyrer kan nævnes en del af eller alle aminosyresekvenserne i sådanne proteiner som sure fibroblast-vækstfaktorer (aFGF), interleukin 1-α (IL1-α), interleukin 1-β (IL1-β) og et protein som er kodet med int-1 i oncogener.

Sådanne aFGF er bl.a. dem der stammer fra mennesker og dem der stammer fra okser. De pågældende IL1-α og IL1-β indbefatter dem der stammer fra mennesker.

Aminosyresekvenser i sådanne aFGF er bl.a.:

NH_2-Phe-Asn-Leu-Pro-Leu-Gly-Asn-Tyr-Lys-Lys-Pro-Lys-Leu-Leu-Tyr-Cys-Ser-Asn-Gly-Gly-Tyr-Phe-Leu-Arg-Ile-Leu-Pro-Asp-Gly-Thr-Val-Asp-Gly-Thr-Lys-Asp-Arg-Ser-Asp-Gln-His-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Cys-Ala-Glu-Ser-Ile-Gly-Glu-Val-Tyr-Ile-Lys-Ser-Thr-Glu-Thr-Gly-Gln-Phe-Leu-Ala-Met-Asp-Thr-Asp-Gly-Leu-Leu-Tyr-Gly-Ser-Gln-Thr-Pro-Asn-Glu-Glu-Cys-Leu-Phe-Leu-Glu-Arg-Leu-Glu-Glu-Asn-His-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ile-Ser-Lys-Lys-His-Ala-Glu-Lys-His-Trp-Phe-Val-Gly-Leu-Lys-Lys-Asn-Gly-Arg-Ser-Lys-Leu-Gly-Pro-Arg-Thr-His-Phe-Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Leu-Pro-Val-Ser-Ser-Asp-COOH

Aminosyresekvenser fra human IL1-α er bl.a.:

NH_2-Met-Ala-Lys-Val-Pro-Asp-Met-Phe-Glu-Asp-Leu-Lys-Asn-Cys-Tyr-Ser-Glu-Asn-Glu-Glu-Asp-Ser-Ser-Ser-Ile-Asp-His-Leu-Ser-Leu-Asn-Gln-Lys-Ser-Phe-Tyr-His-Val-Ser-Tyr-Gly-Pro-Leu-His-Glu-Gly-Cys-Met-Asp-Gln-Ser-Val-Ser-Leu-Ser-Ile-Ser-Glu-Thr-Ser-Lys-Thr-Ser-Lys-Leu-Thr-Phe-Lys-Glu-Ser-Met-Val-Val-Val-Ala-Thr-Asn-Gly-Lys-Val-Leu-Lys-Lys-Arg-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Ile-Thr-Asp-Asp-Asp-Leu-Glu-Ala-Ile-Ala-Asn-Asp-Ser-Glu-Glu-Glu-Ile-Ile-[Lys/Asn]-Pro-Arg-Ser-Ala-Pro-Phe-Ser-Phe-Leu-Ser-Asn-Val-Lys-Tyr-Asn-Phe-Met-Arg-Ile-Ile-Lys-Tyr-Glu-Phe-Ile-Leu-Asn-Asp-Ala-Leu-Asn-Gln-Ser-Ile-Ile-Arg-Ala-Asn-Asp-Gln-Tyr-Leu-Thr-Ala-Ala-Ala-Leu-His-Asn-Leu-Asp-Glu-Ala-Val-Lys-Phe-Asp-Met-Gly-Ala-Tyr-Lys-Ser-Ser-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Ile-Thr-Val-Ile-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Thr-Gln-Leu-Tyr-Val-Thr-Ala-Gln-Asp-Glu-Asp-Gln-Pro-Val-Leu-Leu-Lys-Glu-Met-Pro-Glu-Ile-Pro-Lys-Thr-Ile-Thr-Gly-Ser-Glu-Thr-Asn-Leu-Leu-Phe-Phe-Trp-Glu-Thr-His-Gly-Thr-Lys-Asn-Tyr-Phe-Thr-Ser-Val-Ala-His-Pro-Asn-Leu-Phe-Ile-Ala-Thr-Lys-Gln-Asp-Tyr-Trp-Val-Cys-Leu-Ala-Gly-Gly-Pro-Pro-Ser-Ile-Thr-Asp-Phe-Gln-Ile-Leu-Glu-Asn-Gln-Ala-COOH

Aminosyresekvenser fra human IL1-β er bl.a.:

NH_2-Met-Ala-Glu-Val-Pro-Glu-Leu-Ala-Ser-Glu-Met-Met-Ala-Tyr-Tyr-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Asp-Leu-Phe-Phe-Glu-Ala-Asp-Gly-Pro-Lys-Gln-Met-Lys-Cys-Ser-Phe-Gln-Asp-Leu-Asp-Leu-Cys-Pro-Leu-Asp-Gly-Gly-Ile-Gln-Leu-Arg-Ile-Ser-Asp-His-His-Tyr-Ser-Lys-Gly-Phe-Arg-Gln-Ala-Ala-Ser-Val-Val-Val-Ala-Met-Asp-Lys-Leu-Arg-Lys-Met-Leu-Val-Pro-Cys-Pro-Gln-Thr-Phe-Gln-Glu-Asn-Asp-Leu-Ser-Thr-Phe-Phe-Pro-Phe-Ile-Phe-Glu-Glu-Glu-Pro-Ile-Phe-Phe-Asp-Thr-Trp-Asp-Asn-Glu-Ala-Tyr-Val-His-Asp-Ala-Pro-Val-Arg-Ser-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Arg-Asp-Ser-Gln-Gln-Lys-Ser-Leu-Val-Met-Ser-Gly-Pro-Tyr-Glu-Leu-Lys-Ala-Leu-His-Leu-Gln-Gly-Gln-Asp-Met-Glu-Gln-Gln-Val-Val-Phe-Ser-Met-Ser-Phe-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-Ile-Pro-Val-Ala-Leu-Gly-Leu-Lys-Glu-Lys-Asn-Leu-Tyr-Leu-Ser-Cys-Val-Leu-Lys-Asp-Asp-Lys-Pro-Thr-Leu-Gln-Leu-Glu-Ser-Val-Asp-Pro-Lys-Asn-Tyr-Pro-Lys-Lys-Lys-Met-Glu-Lys-Arg-Phe-Val-Phe-Asn-Lys-Ile-Glu-Ile-Asn-Asn-Lys-Leu-Glu-Phe-Glu-Ser-Ala-Gln-Phe-Pro-Asn-Trp-Tyr-Ile-Ser-Thr-Ser-Gln-Ala-Glu-Asn-Met-Pro-Val-Phe-Leu-Gly-Gly-Thr-Lys-Gly-Gly-Gln-Asp-Ile-Thr-Asp-Phe-Thr-Met-Gln-Phe-Val-Ser-Ser-COOH

Aminosyresekvenser der er kodet for int-2- er bl.a.:

NH_2-Met-Gly-Leu-Ile-Trp-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Glu-Pro-Ser-Trp-Pro-Thr-Thr-Gly-Pro-Gly-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Asp-Ala-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Val-Tyr-Glu-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Pro-Arg-Arg-Arg-Lys-Leu-Tyr-Cys-Ala-Thr-Lys-Tyr-His-Leu-Gln-Leu-His-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Asn-Gly-Ser-Leu-Glu-Asn-Ser-Ala-Tyr-Ser-Ile-Leu-Glu-Ile-Thr-Ala-Val-Glu-Val-Gly-Val-Val-Ala-Ile-Lys-Gly-Leu-Phe-Ser-Gly-Arg-Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys-Arg-Gly-Arg-Leu-Tyr-Ala-Ser-Asp-His-Tyr-Asn-Ala-Glu-Cys-Glu-Phe-Val-Glu-Arg-Ile-His-Glu-Leu-Gly-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ala-Ser-Arg-Leu-Tyr-Arg-Thr-Gly-Ser-Ser-Gly-Pro-Gly-Ala-Gln-Arg-Gln-Pro-Gly-Ala-Gln-Arg-Pro-Trp-Tyr-Val-Ser-Val-Asn-Gly-Lys-Gly-Arg-Pro-Arg-Arg-Gly-Phe-Lys-Thr-Arg-Arg-Thr-Gln-Lys-Ser-Ser-Leu-Phe-Leu-Pro-Arg-Val-Leu-Gly-His-Lys-Asp-His-Glu-Met-Val-Arg-Leu-Leu-Gln-Ser-Ser-Gln-Pro-Arg-Ala-Pro-Gly-Glu-Gly-Ser-Gln-Pro-Arg-Gln-Arg-Arg-Gln-Lys-Lys-Gln-Ser-Pro-Gly-Asp-His-Gly-Lys-Met-Glu-Thr-Leu-Ser-Thr-Arg-Ala-Thr-Pro-Ser-Thr-Gln-Leu-His-Thr-Gly-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-COOH

Hvad angår antallet af i bFGF indgående aminosyrer, som er fjernet i det foreliggende mutein og som mangler mindst én i bFGF indgående aminosyre, kan det være en hvilken som helst blot bFGF-egenskaberne ikke er gået tabt.

Som eksempler på sådanne udeladte aminosyrer kan nævnes:

fjernelse af aminosyrer fra den aminoterminale eller karboxylterminale ende;

de 10 rester i aminoterminalen af humant bFGF:
Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser;

de 14 rester i den aminoterminale ende af humant bFGF:
Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro;

de 41 rester i aminoterminalen af humant bFGF:

1 2 3 4 41

Met-Pro-Ala-Leu- .... -Val;

eller de 61 rester i karboxylterminalen af humant bFGF:

87 88 146 147
Lys-Cys- ..... -Lys-Ser.

Hvad angår antallet af i bFGF indgående aminosyrer som kan være udskiftet i et mutein hvori mindst en aminosyre som indgår i bFGF er udskiftet med andre aminosyrer, kan en sådan udskiftet aminosyre være en hvilken som helst blot ikke nogen egenskab af bFGF derved er gået tabt.

Som eksempler på indgående aminosyrer før udskiftning kan nævnes cystein og andre aminosyrer end cystein. Cystein foretrækkes. Som anden indgående aminosyre end cystein før udskiftningen kan der bl.a. nævnes asparaginsyre, arginin, glycin, serin og valin.

Når den aminosyre som er til stede før udskiftningen er cystein foretrækkes der som erstatnings-aminosyrer fx neutrale aminosyrer. Som særlige eksempler på sådanne neutrale aminosyrer kan nævnes glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin og methionin. Især foretrækkes serin og threonin.

Som foretrukken udførelsesform for udskiftningen i muteinet er indsættelse af serin for cystein (dvs. at cystein udskiftes med serin).

Ved en sådan udskiftning kan der eventuelt ske ikke under to substitueringer og to eller tre substitueringer eller udskiftninger foretrækkes.

Muteinet ifølge opfindelsen kan være en kombination af to eller tre af de ovennævnte ændringer, altså tilføjelser, udeladelser og udskiftninger.

Foruden konventionel DNA-rekombinationsteknik bruges der steddirigeret mutagenese til frembringelse af muteinet ifølge opfindelsen. Denne teknik er velkendt og beskrevet i Genetic Engineering, af R.F. Lather og J.P. Lecoq, Academic Presse side 31-50 (1983). Mutagenese rettet mod

et oligonukleotid er beskrevet i Genetic Engineering: Principles and Methods, af M. Smith og S. Gillam Plenum Press, bind 3, side 1-32 (1981).

Fremstilling af det strukturelle gen der koder for muteinet ifølge opfindelsen kan fx udføres ved:

(a) hybridisering af et enkeltstrenget DNA indeholdende én streng af det strukturelle gen af bFGF med en mutagen oligonukleotid-primer,

(b) forlængelse af primeren ved hjælp af en DNA-polymerase til dannelse af en mutationel heteroduplex, og

(c) opformering (kopiering) af denne mutationelle heteroduplex.

Størrelsen af oligonukleotid-primeren afhænger af betingelser der er essentielle for stabil hybridisering af primeren med den genregion i hvilken mutation skal indføres, og af begrænsninger i de for tiden til rådighed stående metoder til oligonukleotidsyntese. De faktorer som skal tages i betragtning ved udformning af det oligonukleotid som er tænkt anvendt til mutagenese dirigeret af oligonukleotidet (fx den samlede størrelse af nukleotid og størrelsen af den del på mutationsstedet, der ikke passer sammen) er beskrevet af M. Smith og S. Gillam i ovennævnte litteratur. I almindelighed reguleres oligonukleotidets samlede længde til en sådan længde at man optimerer stabil og enestående hybridisering på mutationsstedet, og forlængelser mellem mutationsstedet og 5'- og 3'-terminalerne udstyres med tilstrækkelig størrelse til at forhindre mutationspåvirkning på grund af exonukleaseaktivitet af DNA-polymerase.

De oligonukleotider der bruges til mutagenese i overensstemmelse med den foreliggende opfindelse indeholder normalt 12-24 baser, fortrinsvis 14-20 baser og navnlig 14-18 baser. Disse indeholder normalt mindst ca. 3 base 3'-terminal af de kodoner som skal ændres.

Med henblik på at vinde fx et mutein med en tilføjet aminosyre fremstilles et mutagen bFGF-gen ved syntese af det gen som koder for den aminosyresekvens der skal tilføjes, hvorpå man direkte eller efter fragmentering ved fordøjelse med et restriktionsenzym indsætter eller tilføjer det på det ønskede sted i bFGF-genet under anvendelse af DNA-ligase. Når der ikke er noget egnet restriktionsenzym-genkendelsessted til stede i bFGF-genet kan der

dannes restriktionsenzym-genkendelsessteder ved den ovenfor nævnte steddirigerede eller pladsdirigerede mutagenese.

Med henblik på fx at frembringe et mutein som mangler bFGF-bestanddelsaminosyrer produceres der et mutagent bFGF på tre forskellige måder. I en af de tre tilfælde udelades aminoterminalen af bFGF; i et andet tilfælde udelades et centralt område af bFGF og i det sidste tilfælde udelades karboxylterminalen.

I tilfælde af udeladelse af aminoterminalen ændres et kodon af det gen, der koder for karboxylterminalen af den aminosyresekvens der skal udelades, til det Met-kodende kodon ATG ved pladsdirigeret mutagenese, og kodonet har et passende restriktionsenzym-genkendelsessted frembragt i den 5'-terminale side deraf for at lette ligatering eller binding deraf til promoteren.

I tilfælde af fjernelse af et centralt område af aminosyresekvensen fremstilles der et unikt restriktionsenzym-genkendelsessted ved steddirigeret mutagenese, i både den 5'-terminale og 3'-terminale side af det gen der koder for den sekvens der skal udelades, og det relevante gen fraspaltes fra genet ved enzymatisk fordøjelse efterfulgt af genligatering af de tilbageværende to genfragmenter for at konstruere det ønskede gen som koder for bFGF som mangler de specificerede aminosyrer. Det er naturligvis nødvendigt ikke at skifte aflæsningsrammen på grund af fordøjelsen med restriktionsenzymerne.

I tilfælde af udeladelse af en aminosyresekvens i karboxylterminalsiden må man ændre et kodon af det gen som koder for de aminoterminale aminosyrer i en sekvens som skal udelades for at stoppe kodonet ved pladsdirigeret mutagenese.

Med henblik på at frembringe et mutein i hvilket en indgående aminosyre i form af cystein er blevet udskiftet, fremstiller man et mutagent bFGF-gen ved at man fx eliminerer Cys-ekspressionskodonet eller frembringer steddirigeret (pladsdirigeret) mutagenese i Cys-ekspressions-

kodonet TGC eller TGT under anvendelse af en syntetisk nukleotidprimer som ændrer kodonet på en sådan måde at det koder for en anden aminosyre. En primer hybridiseres med en affølekæde (sense chain) fra FGF-genet, fx for at ændre cystein (i stilling 26) i human bFGF til serin. Som passende nukleotidprimer kan fx nævnes 5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3',hvor den understregede triplet repræsenterer det ændrede kodon.

Som en egnet primer til ændring af cystein (i stilling 70) til serin kan nævnes 5'-AACGATTAGCGCTCACTC-3', hvor den understregede triplet repræsenterer det omdannede kodon.

Som egnet primer til udskiftning af cystein (i stilling 88) med serin kan nævnes 5'-GTAACAGACTTAGAAGCTAGT-3', hvor den understregede triplet repræsenterer det ændrede kodon.

Som passende primer til udskiftning af cystein (i stilling 93) med serin kan nævnes 5'-TCGAAGAAGAAAGACTCATCC-3', hvor den understregede triplet repræsenterer det ændrede kodon.

I tilfælde af Cys (stilling 26) udskiftes cystein med serin via T→A transposition af den første base; i tilfælde af Cys (stilling 70) udskiftes cystein med serin via T→A transposition af den første base og T→C transposition af den anden base; og i tilfælde af Cys (stilling 88, stilling 93) udskiftes cystein med serin via G→C transposition af den anden base.

Det skal bemærkes at der kan ske induktion af to eller flere variationer i DNA-sekvensen ved fremstilling af bFGF mutein-protein ved steddirigeret mutagenese, dvs. at DNA-kodonerne svarende til aminosyrerne er degenereret.

Med henblik på at frembringe et protein i hvilket en anden indgående bestanddel end cystein er blevet udskiftet med en anden aminosyre, fremstiller man et mutagent bFGF-gen ved at ændre et kodon under anvendelse af en oligonukleotid-primer på samme måde som med cystein.

Udformningen af oligonukleotid-primeren varierer selvsagt med hvilken aminosyre der skal ændres.

Primeren hybridiseres til en enkeltstrenget fag stammende fra kloning af en enkelt streng af bFGF-genet såsom M13 (C. Vieira Yanish-Perror og J. Messing, Gene 33, 103-119 (1985); J. Messing, Methods in Enzymology 101, 20-78 (1983)), fd (R. Herrman et al., Molecular and General Genetics, 177, 231 (1980)) eller Φ X 174 (M. Smith og S. Gillam, Genetic Engineering, Plenum Press, bind 3, side 1-32 (1981)). Det bemærkes at fagen er i stand til at bære enten genets affølekæde eller dets anti-affølekæde. Når fagen bærer en anti-affølekæde (antisense chain) kan primeren, foruden afvigelser fra det relevante kodon som bestemmer en triplet som har kodet for en anden aminosyre, kan primeren også have afvigelser på grund af kodondegenerering fra det affølekæde-område som indeholder det kodon i hvilket der skal induceres mutation. Når fagen tilsvarende bærer en affølekæde, kan primeren eventuelt ikke være komplementær til det affølekæde-område som indeholder det kodon i hvilket der skal induceres mutation, såvel som behørige afvigelser fra den triplet som parrer sig til det kodon der skal udelades. De betingelser der bruges ved hybridiseringen er beskrevet af M. Smith og S. Gillam i ovennævnte litteratur. Temperaturen er normalt mellem omkring $0^{\circ}C$ og $70^{\circ}C$, specielt mellem $10^{\circ}C$ og $50^{\circ}C$. Efter hybridiseringen forlænges primeren på vedkommende fag-DNA ved reaktion med Escherichia coli DNA-polymerase I, T4 DNA-polymerase, revers-transkriptase eller anden passende DNA-polymerase. Det resulterende dsDNA omdannes til et lukket cirkulært dsDNA ved behandling med DNA-ligase såsom T4 DNA-ligase. DNA-molekyler indeholdende enkeltstrengsområder kan nedbrydes ved behandling med S1 endonuklease.

Den resulterende mutationelle heteroduplex bruges til at omdanne en inficerbar værtsorganisme eller celle. Ved opformeringen af heteroduplexen ved hjælp af værten frembringes der afkom fra begge kæder. Efter formeringen isoleres mutantgenet fra en "efterkommer" af mutantens kæde og indsættes i en passende vektor, der derefter bru-

ges til at transformere en pasende værtsorganisme eller celle.

Det fag-DNA som bærer mutantgenet (mutational gene) isoleres derefter og inkorporeres i et plasmid.

Som eksempler på plasmider hvori DNA inkorporeres kan nævnes plasmider stammende fra Escherichia coli såsom pBR322 (Gene, 2, 95 (1977)), pBR325 (Gene 4, 121 (1978)), pUC12 (Gene 19, 259 (1982)) og pUC13 (Gene 19, 259 (1982)); og plasmider stammende fra Bacillus subtilis såsom pUB110 (Biochemical and Biophysical Research Communication 112, 678 (1983)); men man kan bruge et hvilket som helst andet plasmid blot det opformeres og fastholdes i værten.

Som fremgangsmåder til inkorporering i plasmider kan bl.a. nævnes den fremgangsmåde der er beskrevet i Molecular Cloning af T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, side 239 (1982).

Det klonede gen ligateres nedenfor (to the downstream of) en promoter i en passende bærer (vektor) til ekspression for at vinde en ekspressionsvektor.

Som eksempler på vektorer kan nævnes de ovennævnte plasmider stammende fra Escherichia coli (fx pBR322, pBR325, pUC12 og pUC13), plasmider stammende fra Bacillus subtilis (fx pUB110, pTP5 og pC194), plasmider stammende fra gær (fx pSH19 og pSH15), bakterier såsom λ fag og dyrevira såsom retrovirus og vaccinia- virus.

Nævnte gen kan indeholde ATG som translation-igangsætterkodon ved sin 5'-terminal og kan også indeholde TAA, TGA eller TAG som translations-afslutningskodon ved sin 3'-terminal. Med henblik på ekspression af det nævnte gen ligateres en promoter ovenfor det (to the upstream thereof). Man kan bruge en hvilken som helst promoter i forbindelse med den foreliggende opfindelse blot den i passende grad svarer til den vært der skal bruges til genekspressionen.

Når værten for transformationen er en bakterie tilhørende slægten Escherichia er trp-promoter, lac-promoter,

rec A-promoter, λPL-promoter, lpp-promoter og lignende egnede; når værten er en bakterie hørende til slægten Bacillus egner sig bl.a. SP01-promoter, SP02-promoter, penP-promoter; når værten er en gær egner fx PH05-promoter, PGK-promoter, GAP-promoter og ADH-promoter sig. Det foretrækkes i særlig grad som vært, at bruge en bakterie hørende til slægten Escherichia og som promoter at bruge trp-promoter eller λPL-promoter.

Når værten er en dyrecelle er egnede promotere bl.a. promotere stammende fra SV40 og retrovirus-promotere; især foretrækkes promotere stammende fra SV40.

Ved hjælp af den således konstruerede vektor, som indeholder et rekombinant-DNA indeholdende en for mutein kodende basesekvens, fremstilles der en transformant.

Som værter kan fx nævnes bakterier af slægten Escherichia, bakterier af slægten Bacillus, gærsvampe og dyreceller.

Som eksempler på bakterier hørende til slægten Escherichia kan nævnes Escherichia coli K12DH1 (Proc.Natl. Acad.Sci. USA 60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic Acids Research 9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology 120, 517 (1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology,41, 459 (1969)), C600 (Genetics 39, 440 (1954)) og MM294 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174 (1976)).

Som eksempler på bakterier af slægten Bacillus kan nævnes Bacillus subtilis MI114 (Gene 24, 255 (1983)) og 207-21 (Journal of Biochemistry 95, 87 (1984)).

Som eksempler på egnede gærarter kan nævnes Saccharomyces cerevisiae AH22R$^-$, NA87-11A og DKD-5D.

Som eksempler på dyreceller kan nævnes abeceller COS-7, Vero, æggestokceller CHO fra kinesisk hamster, muse L-celler og humane FL-celler.

Transformationen af de ovennævnte bakterier hørende til slægten Escherichia udføres i overensstemmelse med fx de metoder der er beskrevet i Proc.Natl.Acad.Sci USA 69, 2110 (1972) og Gene 17, 107 (1982).

Transformationen af bakterier hørende til slægten Bacillus udføres i overensstemmelse med fx de metoder der er beskrevet i Molecular and General Genetics 168, 111 (1979).

Transformationen af gærceller udføres i overensstemmelse med fx den metode der er beskrevet i Proc.Natl.Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978).

Transformationen af dyreceller udføres i overensstemmelse med fx den metode der er beskrevet i Virology 52, 456 (1973).

På denne måde vindes der en transformant som rummer en vektor der indeholder et rekombinant-DNA med en muteinkodende basesekvens.

Denne transformant dyrkes i et medium som gør det muligt for den at producere proteinet.

Ved dyrkning af en transformant hvis vært er en bakterie af en slægterne Escherichia og Bacillus er et flydende medium egnet til dyrkningen, et medium hvori der er kulstofkilder, nitrogenkilder, mineraler og andre stoffer som er essentielle for transformantvækst til stede. Som eksempler på kulstofkilder kan nævnes glukose, dextrin, opløselige stivelse og sakkarose; som eksempler på nitrogenkilder kan nævnes uorganiske og organiske stoffer såsom ammoniumsalte, nitrater, majsstøbevand, pepton, casein, kødekstrakt, sojakage og kartoffelekstrakt; som eksempler på mineraler kan nævnes kalciumklorid, natriumdihydrogenfosfat og magnesiumklorid. Der kan desuden tilsættes fx gærekstrakter, vitaminer og/eller vækstfremmende midler.

Det er ønskeligt at mediets pH-værdi er omkring 6-8.

Som eksempel på et egnet medium til dyrkning af bakterier af slægten Escherichia kan nævnes M9-medium indeholdende glukose og casaminosyre (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)). Der kan sættes sådanne kemikalier som 3β-indolylakrylsyre dertil når det er nødven-

digt at forøge effektiviteten af promoteren.

Når værten er en bakterie af slægten Escherichia udføres dyrkningen normalt ved 15-43°C i 3-24 timer, idet der om nødvendigt sker luftning og/eller omrøring.

Når værten er en bakterie af slægten Bacillus udføres dyrkningen normalt ved 30-40°C i omkring 6-24 timer, og om nødvendigt foretages der luftning og/eller omrøring.

Som medium til dyrkning af transformanter hvis vært er en gærart kan fx nævnes Burkholders minimale medium (K.L. Bostian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4505 (1980)). Det foretrækkes at mediets pH-værdi reguleres til omkring 5-8. Dyrkningen udføres normalt ved omkring 20-35°C i 24-72 timer, og om nødvendigt foretages der luftning og/eller omrøring.

Som eksempler på medier til dyrkning af transformanter hvis vært er en dyrecelle kan nævnes MEM-medier indeholdende fx 5-20% oksefosterserum (Science 122, 501 (1952)), DMEM-medium (Virology 8, 396 (1959)), RPMI1640-medium (Journal of the American Medical Association 199, 519 (1967)) og 199-medium (Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73, 1 (1950)). Det foretrækkes at pH er omkring 6-8. Dyrkningen udføres normalt ved omkring 30-40°C i omkring 15-60 timer, og om nødvendigt kan den ske under luftning og/eller omrøring.

Fraskillelse og rensning af muteinet fra de foran beskrevne dyrkningsmedier kan fx udføres ved de følgende metoder.

Ved ekstraktion af mutein fra dyrkede bakterie-, svampe- eller dyreceller kan der alt efter behov fx bruges den metode ved hvilken bakterie-, svampe- eller dyreceller efter dyrkningen opsamles på kendt måde og suspenderes i en pufferopløsning indeholdende et denatureringsmiddel for proteiner, fx guanidin-hydroklorid, for at eluere det ønskede protein fra cellerne eller den metode ved hvilken bakterie-, svampe- eller dyreceller efter desintegrering med en fransk presse, ultralydbehandling, behand-

ling med lysozym og/eller frysning og optøning underkastes centrifugering til frembringelse af muteinet. Specielt foretrækkes at bruge lysozymbehandling i kombination med ultralydbehandling.

Rensning af muteinet fra den på denne måde frembragte ovenstående væske kan udføres ved velkendte separationsmetoder og rensningsmetoder i passende kombination. Som eksempler på sådanne separations- og rensningsmetoder kan nævnes dem der er baseret på opløselighed såsom udsaltning og fældning med et opløsningsmiddel; metoder baseret i hovedsagen på forskelle i molekylvægt såsom dialyse, ultrafiltrering, gelfiltrering og SDS-polyakrylamidgelelektroforese; metoder baseret på forskelle i elektrisk ladning såsom ionbytterkromatografering; metoder baseret på specifikke affiniteter såsom affinitetskromatografering; metoder baseret på forskelle i hydrofobitet såsom reversfase-højtydende væskekromatografering; og metoder baseret på forskelle i isoelektrisk punkt såsom isoelektrisk elektroforese.

Nærmere betegnet kan man ved at underkaste ovennævnte ovenstående væske ionbytterkromatografering ved hjælp af DEAE-cellulose og lignende stoffer som bærematerialer fjerne urenheder såsom nukleinsyrer og sure proteiner. Det er fx effektivt at føre den ovenstående væske gennem en DEAE-cellulosekolonne ækvilibreret med en næsten neutral pufferopløsning såsom Tris og opsamle den fraktion som ikke adsorberes til kolonnen. Ved yderligere at underkaste den opsamlede fraktion ionbytterkromatografering hvor man som bærer bruger CMC (karboxymetylcellulose) eller lignende stoffer kan man adsorbere mutein til bæreren og eluere muteinet med en saltopløsning. Disse eluater kan frysetørres efter dialyse.

Affinitetskromatografering ved hjælp af heparin-"Sepharose" ® kan hensigtsmæssigt bruges til rensning af bFGF-mutein i ekstrakter. Således kan man fx rense bFGF-muteinet ved at overføre ovennævnte eluat til en heparin-

"Sepharose" ® kolonne ækvilibreret med en næsten neutral puffer (fx Tris eller fosfatpuffer), vaske kolonnen grundigt og gennemføre eluering med en lineær gradient opbygget med NaCl eller et lignende stof.

Heparinkolonner (fx "Shodex" AF-pak HR-894, der leveres af Showa Denko, Japan) udviklet til højtydende væskekromatografering er særlig effektive.

I dette tilfælde kan bFGF-mutein udvindes som et homogent produkt på samme måde som tilfældet er med de ovennævnte heparin-"Sepharose" ® kolonner, nemlig ved at man overfører prøven til en heparinkolonne med en ca. neutral puffer, vasker kolonnen grundigt og gennemfører eluering med en lineær gradient fremstillet med fx NaCl.

Det på denne måde vundne produkt kan overføres i tør pulverform ved dialyse og frysetørring. Det er ønskeligt at bevare produktet med et tilsat bærestof (fx serumalbumin) fordi adsorptionen af produktet til beholdervæggene herved kan forhindres.

Det foretrækkes desuden at tilsætte en lille mængde af et reduktionsmiddel i løbet af rensningen eller bevaringsbehandlingen for at modvirke oxidation af produktet.

Som eksempler på reduktionsmiddel kan nævnes β-merkaptoætanol, dithiothreitol og glutathion.

På denne måde kan man vinde i det væsentlige rent bFGF-muteinprotein. Det i det væsentlige rene bFGF-muteinprotein ifølge opfindelsen indbefatter produkter hvis indhold af proteinet bFGF-mutein ikke er under 95 vægt%, navnlig produkter hvis indhold af bFGF-mutein ikke er under 98 vægt%.

Det således vundne mutein har fremmende virkning på fibroblastvækst, vækststimulerende virkning på kapillære endotelieceller og angiogenisk virkning, har høj stabilitet og lav toxicitet; det kan derfor bruges som accelerator for heling af fx brandsår, sår og postoperative væv, eller som lægemiddel, baseret på den angiogeniske virkning, mod fx thromboser og arteriosclerose. Det kan også bruges som reagens til accelerering af celledyrkning.

I særlig grad foretrækkes et mutein i hvilket mindst en af de oprindeligt indgående cysteinrester er udskiftet med serin eftersom et sådant mutein er bemærkelsesværdigt stabilt.

Muteinet ifølge opfindelsen kan ved anvendelse som farmaceutikum indgives sikkert parenteralt eller oralt i varmblodede dyr (fx mennesker, mus, rotter, hamstere, kaniner, hunde og katte), direkte i pulverform eller efter oparbejdning som farmaceutisk præparat som fx injektionspræparater, tabletter, kapsler, opløsninger eller salver, sammen med andre farmaceutisk acceptable bærestoffer, excipienter og/eller fortyndingsmidler.

Fremstilling af injektionspræparater udføres i overensstemmelse med rutinemetoder idet der fx bruges en fysiologisk saltopløsning eller en vandig opløsning indeholdende glukose og andre hjælpestoffer. Farmaceutiske præparater såsom kapsler og tabletter kan også fremstilles i overensstemmelse med rutinemetoder.

Muteinet ifølge opfindelsen indgives ved anvendelse i form af et af de ovennævnte farmaceutiske præparater til fx de ovennævnte varmblodede dyr i en passende mængde inden for området fx 1 ng/kg til 100 µg/kg om dagen, idet der tages hensyn til indgiftvejen, symptomer og andre relevante forhold.

Muteinet ifølge opfindelsen sættes, når det bruges som reagens til fremskyndelse af celledyrkning, fortrinsvis til mediet så at det er til stede i en mængde på omkring 0,01-10 µg/l medium, fortrinsvis omkring 0,1-10 µg/l medium.

Forkortelser for baser, aminosyrer etc. der bruges i nærværende beskrivelse og tilhørende tegninger er baseret på de forkortelser der er angivet af IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature eller dem der bruges almindeligt på de pågældende områder, og eksempler derpå er anført i listen nedenfor. Når der er mulighed for tilstedeværelse af en optisk isomer i aminosyren er isomeren et L-stof med mindre andet er angivet.

DNA :	Desoxyribonukleinsyre
dDNA:	Komplementær desoxyribonukleinsyre
A :	Adenin
T :	Thymin
G :	Guanin
C :	Cytosin
RNA :	Ribunukleinsyre
dATP:	Desoxyadenosintrifosfat
dTTP:	Desoxythymidintrifosfat
dGTP:	Desoxyguanosintrifosfat
dCTP:	Desoxycytidintrifosfat
ATP :	Adenosintrifosfat
Tdr :	Thymidin
EDTA:	Ætylendiamintetraeddikesyre
SDS :	Natriumdodecylsulfat
Gly :	Glycin
Ala :	Alanin
Val :	Valin
Leu :	Leucin
Ile :	Isoleucin
Ser :	Serin
Thr :	Threonin
Cys :	Cystein
Met :	Methionin
Glu :	Glutaminsyre
Asp :	Asparaginsyre
Lys :	Lysin
Arg :	Arginin
His :	Histidin
Phe :	Fenylalanin
Tyr :	Tyrosin
Trp :	Tryptofan
Pro :	Prolin
Asn :	Asparagin
Gln :	Glutamin

I nærværende beskrivelse med tilhørende tegninger er ved nummereringen af de aminosyrer som det humane bFGF er opbygget af, den Met-rest som stammer fra translationsinitieringskodonet fastlagt som den første aminosyre med mindre andet er angivet.

De følgende transformanter, der blev frembragt i de nedenfor anførte referenceeksempler eller eksempler, blev deponeret hos Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Japan og hos Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (FRI), Japan under de i efterfølgende tabel 1 viste accessionsnumre på de angivne deponeringsdatoer (deponeringsdatoerne er vist i parenteser). Hvad angår deponeringsnumrene hos FRI, er FERM BP-numrene deponeringsnumrene under Budapest-traktaten; og i tilfælde hvor både FERM P-nummeret og FERM BP-nummeret er anført, betyder det at deponeringen under FERM P-nummeret er blevet omdannet til deponering under Budapest-traktaten og transformanterne befinder sig hos FRI under FERM BP-nummeret.

Tabel 1

Transformanter	IFO	FRI	
E. coli K12 DHI/pTB 627 (Referenceeksempel 1)	IFO 14494 (13. marts 1986)	FERM P-8726 (2. april 1986)	FERM BP-1280
E. coli K12 MM294/pTB 669 (Referenceeksempel 2)	IFO 14532 (11. august 1986)	FERM P-8918 (21. august 1986)	FERM BP-1281
E. coli DH1/pTB 739 (Eksempel 2)	IFO 14575 (18. februar 1987)	FERM P-9216 (25. februar 1987)	FERM BP-1641
E. coli DH1/pTB 742 (Eksempel 3)	IFO 14584 (24. marts 1987)	FERM P-9307 (30. marts 1987)	FERM BP-1642
E. coli DH1/pTB 743 (Eksempel 4)	IFO 14585 (24. marts 1987)	FERM P-9308 (30. marts 1987)	FERM BP-1643
E. coli DH1/pTB 744 (Eksempel 5)	IFO 14586 (24. marts 1987)	FERM P-9309 (30. marts 1987)	FERM BP-1644
E. coli MM294/pTB 762 (Eksempel 7)	IFO 14613 (27. maj 1987)	FERM P-9409 (11. juni 1987)	FERM BP-1645
E. coli MM294/pTB 764 (Eksempel 9)	IFO 14614 (27. maj 1987)	FERM P-9410 (11. juni 1987)	FERM BP-1646
E. coli MM294/pTB 765 (Eksempel 11)	IFO 14615 (27. maj 1987)	FERM P-9411 (11. juni 1987)	FERM BP-1647
E. coli MM294/pTB 795 (Eksempel 34)	IFO 14700 (14. januar 1988)		FERM BP-1660 (20. januar 1988)
E. coli MM294/pTB 796 (Eksempel 35)	IFO 14701 (14. januar 1988)		FERM BP-1661 (20. januar 1988)
E. coli MM294/pTB 797 (Eksempel 36)	IFO 14702 14. januar 1988)		FERM BP-1662 (20. januar 1988)

DK 173269 B1

Følgende hybridomer, der blev produceret i eksempel 35(3)(d) senere i beskrivelsen har været deponeret hos IFO siden den 17. august 1987 under følgende accessionsnumre:

Muse HbF 52 celle: IFO 50143;
Muse HbF 78 celle: IFO 50144.

Tegningsforklaring

Fig. 1 viser den basesekvens som indkoder humant bFGF og den aminosyresekvens der kan udledes deraf.

Fig. 2 viser de syntetiske oligomerer der bruges som primere til at mutere Cys-indkodende kodoner til Ser-indkodende kodoner.

Fig. 3 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS1, der bæres af det ifølge eksempel 2 vundne plasmid pTB739, og aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS1 som indkodes derved. De muterede baser er understreget og det område som indeholder den omdannede aminosyre er omgivet af en firkant.

Fig. 4 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS2 og som bæres af det i eksempel 3 vundne plasmid pTB742, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS2, indkodet deraf. De muterende baser er understreget og det område som indeholder den omdannede aminosyre er omgivet af en firkant.

Fig. 5 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS3 som bæres af det i eksempel 4 vundne plasmid pTB743, samt aminosyresekvensen af det humane bFGF-mutein CS3, indkodet deraf. De muterede baser er understreget og det område som indeholder den omdannede aminosyre er omgivet af en firkant.

Fig. 6 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS4 som bæres af det i eksempel 5 vundne plasmid pTB744, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS4 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og det område som indeholder den omdannede aminosyre er omgivet af en firkant.

Fig. 7 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB739 i eksempel 2(1).

Fig. 8 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB742 i eksempel 3(1).

Fig. 9 viser konstruktionsskemaet for plasmid pTB743 i eksempel 4(1).

Fig. 10 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB744 i eksempel 5(1).

Fig. 11 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS23 som bæres af det i eksempel 7 vundne plasmid pTB762, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS23 som indkodes deraf. De muterede baser er understregede og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 12 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB762 i eksempel 7(1).

Fig. 13 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS123 som bæres af det i eksempel 9 vundne plasmid pTB764, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS123 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de regioner som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 14 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB764 i eksempel 9(1).

Fig. 15 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS1234 som bæres af det i eksempel 11 vundne plasmid PTB765, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS1234 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 16 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB765 i eksempel 11(1).

Fig. 17 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS12 som bæres af det i eksempel 15 vundne plasmid pTB776, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS12 som indkodes deraf.

Fig. 18 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB776 i eksempel 15(1).

Fig. 19 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS24 som bæres af det i eksempel 16 vundne plasmid pTB778, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS24 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 20 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB778 i eksempel 16(1).

Fig. 21 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS13 som bæres af det i eksempel 17 vundne plasmid pTB779, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS13 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 22 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB779 i eksempel 17(1).

Fig. 23 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS14 som bæres af det i eksempel 18 vundne plasmid pTB763, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS14 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 24 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB763 i eksempel 18(1).

Fig. 25 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS34 som bæres af det i eksempel 19 vundne plasmid pTB777, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS34 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 26 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB777 i eksempel 19(1).

Fig. 27 viser den basesekvens om indkoder det humane bFGF-mutein CS234 som bæres af det i eksempel 20 vundne plasmid pTB782, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein

CS234 som indkodes deraf. De muterende baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er omgivet af firkanter.

Fig. 28 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB782 i eksempel 16(1).

Fig. 29 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein CS124 som bæres af det i eksempel 21 vundne plasmid pTB780, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS124 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er indrammet med firkanter.

Fig. 30 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB780 i eksempel 21(1).

Fig. 31 viser den basesekvens som indkoder den humane bFGFmutein CS134 som bæres af det i eksempel 22 vundne plasmid pTB781, samt aminosyresekvensen i det humane bFGF-mutein CS134 som indkodes deraf. De muterede baser er understreget og de områder som indeholder hver sin af de omdannede aminosyrer er indrammet med firkanter.

Fig. 32 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB781 i eksempel 22(1).

Fig. 33-35 viser elueringsmønstre ved HPLC (højtydende væskekromatografering) af de i eksempel 24 vundne muteiner.

Fig. 36 viser HPLC-elueringsmønstre for de muteinoxider der er vundet i eksempel 25.

Fig. 37 viser HPLC-elueringsmønstre for de muteinreduktionsprodukter der er vundet i eksempel 26.

Fig. 38 viser de syntetiske oligomerer som er brugt som primere til fremstilling af mutein-indkodende DNAer.

Fig. 39 viser basesekvensen i den i eksempel 27 vundne fag M13-PN10 samt aminosyresekvensen i mutein TM910 som indkodes deraf, idet muteinet TM910 er vundet ifølge eksempel 32.

Fig. 40 viser basesekvensen i den i eksempel 27 vundne fag M13-PN14 samt aminosyresekvensen i muteinet

N14 som indkodes deraf, hvorved muteinet N14 er vundet ifølge eksempel 34.

Fig. 41 viser basesekvensen i den i eksempel 27 vundne fag M13-PC86 samt aminosyresekvensen i muteinet C86 som indkodes deraf, hvorved muteinet C86 er vundet ifølge eksempel 35.

Fig. 42 viser stabiliteten af de ifølge eksempel 29 fremstillede humane bFGF-muteiner CS2, CS3 og CS23.

Fig. 43 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB854 i eksemmpel 32.

Fig. 44 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB852 ifølge eksempel 33.

Fig. 45 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein N10 som bæres af det ifølge eksempel 33 vundne plasmid pTB852, samt aminosyresekvensen i muteinet N10 som indkodes deraf og hvis frembringelse er beskrevet i eksempel 33. De muterede baser er understreget.

Fig. 46 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB795 i eksempel 34.

Fig. 47 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB796 i eksempel 35.

Fig. 48 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB855 ifølge eksempel 36.

Fig. 49 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein N41 som bære a det ifølge eksempel 36 vundne plasmid pTB855, samt aminosyresekvensen af muteinet N41 som indkodes deraf og hvis frembringelse er beskrevet i eksempel 36. De muterede baser er understreget.

Fig. 50 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB856 i eksempel 37.

Fig. 51 viser den basesekvens som indkoder det humane bFGF-mutein C129 som bæres af det i eksempel 37 vundne plasmid pTB856, samt aminosyresekvensen i

muteinet C129 som indkodes deraf og hvis frembringelse er beskrevet i eksempel 37. De muterede baser er understreget.

Fig. 52 viser konstruktionsskemaet for plasmidet pTB831 i eksempel 38.

Referenceeksempel 1

Konstruktion af et plasmid indeholdende det gen som indkoder humant bFGF

1) Isolering af cDNA-indeholdende plasmid

Et cDNA hvis vært er Escherichia coli x1776 og som var fremstillet ved inkorporering af et primært kulturcelle-mRNA stammende fra menneskeforhud i pCD-vektoren (se Okayama et al., Molecular Cell Biology 3, 280 (1983)) blev leveret af Dr. Okayama fra National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, USA. Fra dette DNA

blev der ekstraheret et plasmid DNA ved alkalimetoden (H.C. Birnboim og J. Doly, Nucleic Acids Research 1, 1513 (1979)), og dette DNA blev inficeret med Escherichia coli DH1 til frembringelse af ca. 2 x 10^6 kloner af et cDNA-bibliotek hvis vært er Escherichia coli DH1.

Dette cDNA-bibliotek med anvendelse af Escherichia coli DH1 blev spredt ud over 10 nitrocellulosefiltre (Millipore Inc., USA, HATF-filtre) i en mængde på ca. 5 x 10^4 kloner pr. filter, hvorefter der blev fremstillet i alt 20 dupliklat-filtre i par under anvendelse af de ovennævnte 10 filtre som originalfiltre. Celler af Escherichia coli på duplikatfiltrene blev lyseret med en 0,5N NaOH-opløsning og det eksponerede denaturerede plasmid-DNA blev immobiliseret på filtrene (M. Grundstein og D.S. Hogness, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 72, 3961 (1975)).

Særskilt syntetiserede man kemisk, på basis af aminosyrerne nr. 13-20 (Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro) og aminosyrerne nr. 89-96 (Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu) i aminosyresekvenserne i den bovine basiske fibroblast-vækstfaktor som rapporteret af F. Esch et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 6507 (1985)), den basesekvens som svarer til disse aminosyresekvenser (for nogle kodoners vedkommende blev det 3. bogstav fastlagt arbitrært; henholdsvis 5'GG A/G TC T/C TT A/G AA A/G TGGCCAGGAGG og 5'TC A/G AA A/G AA A/G AA A/G CA T/C TCGTCGGT; de understregede bogstaver repræsenterer de fastlagte baser). For hvert af disse oligonukleotider udførtes reaktionen ved 37°C i 1 time i 50 µl af en reaktionsvæske med anvendelse af T4 polynukleotidkinase (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd., Japan) [oligonukleotid 0,1 µg, 50 mM tris-HCl pH 8,0, 0,10 mM $MgCl_2$, 10mM merkaptoætanol, 50 µCi λ-^{32}P ATP (>5000 Ci/mmol), 3 enheder T4 polynukleotid-kinase] for at mærke 5'-terminalen i oligonukleotider med ^{32}P.

Idet de to oligonukleotider der var mærket på den ovenfor beskrevne måde blev anvendt som prober, blev de uafhængigt af hinanden bundet til et duplikat-filter til

hvilket DNAet var blev immobiliseret. Der udførtes en associeringsreaktion ved 35°C i 16 timer i en opløsning af 5 x SSPE (180 mM NaCl, 10mM NaH_2PO_4, 1mM EDTA (pH 7,4)), 5 x Denhardts opløsning, 0,1% SDS og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA, indeholdende 10 µCi af proben. Efter reaktionen blev filteret vasket med en 0,1%s SDS-opløsning af 5 x SSC (0,15M NaCl, 0,015M natriumcitrat) 3 gange ved stuetemperatur i 30 minutter, og derefter 2 gange ved 45°C i 30 minutter (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory side 309 (1982)).

Der blev taget radioautogrammer af de vaskede filtre og der søgtes efter stammer som reagerede på begge prober ved overlapning af de to radioautogrammer fra hvert par duplikat-filtre. Ved denne metode opnåedes der én stamme som reagerede på begge grupper [Escherichia coli K12 DH1/pTB627 (IFO 14494, FERM BP-1280)] ud fra 5 x 10^5 kloner.

2) Fra den under 1) ovenfor opnåede stamme [Escherichia coli K12 DH1/pTB627 (IFO 14494, FERM BP-1280)] ekstraheredes og rensedes et plasmid-DNA (pTB627) ved alkalimetoden (Nucleic Acids Research 1, 1513 (1979)).

Referenceeksempel 2

Ekspression i Escherichia coli af genet som indkoder humant bFGF

1) Konstruktion af plasmidet pTB669 for human bFGF ekspression

Plasmidet pTB627, indeholdende et human bFGF-cDNA vundet i henhold til referenceeksempel 1(2), spaltedes ved hjælp af restriktionsenzymerne Ava I og Bal I til frembringelse af et 0,44 kb DNA-fragment indeholdende det område som indkoder det humane bFGF. Til Bal I-spaltningsstedet (den butte ende) af dette DNA-fragment ligaterede man Bgl II-kobleren pCAGATCTG ved hjælp af T4 DNA-ligase og der fraskiltes et 0,44 kb Ava I-Bgl II DNA-fragment. Til dette 0,44 kb Ava I-Bgl II DNA-fragment blev T4 DNA-

ligase bragt til at reagere for at sammenligatere Bgl II-spaltningsstederne, og dette fulgtes af en DNA-polymerasereaktion (Klenows fragment) i nærværelse af dXTP for at afstumpe Ava I-spaltningsstedet. Til dette DNA-fragment blev der ligateret de syntetiske oligonukleotider 5'AATTCTATGCCAGCATTGC3' og 5'GCAATGCTGGCATAG3' efter fosforylering ved hjælp af T4 DNA-ligase, og dette trin efterfulgtes af spaltning ved hjælp af EcoR I-Bgl II til fremstilling af et DNA-fragment på ca. 0,46 kb. Særskilt blev DNA fra plasmidet ptrp781 (T. Kurokawa et al., Nucleic Acids Research 11, 3077-3085 (1983)), som indeholder en trp-promoter, spaltet ved hjælp af Pst I og blev afstumpet ved reaktion med T4 DNA-polymerase. Efter ligatering af Bgl II-kobleren pCAGATCTG til den butte ende ved en T4 DNA-ligasereaktion, udførtes der spaltning ved hjælp af EcoR I-Bgl II for at fraskille et DNA-fragment på ca. 3,2 kb og indeholdende trp-promoter, det tetracyklinresistente gen og et startsted for plasmidduplikering. Det ovennævnte EcoR I-Bgl II DNA-fragment på 0,46 kb, indeholdende det genområde som indkoder human bFGF, og nævnte DNA-fragment på 3,2 kb blev ligateret sammen ved en T4 DNA-ligasereaktion til konstruktion af plasmidet pTB669 for human bFGF-ekspression.

Ved hjælp af dette plasmid pTB669 blev Escherichia coli DH1 transformeret, og herved opnåedes Escherichia coli DH1/pTB669 som indeholder plasmidet pTB669.

Desuden blev ved hjælp af pTB669 Escherichia coli K12 MM294 eller C600 transformeret på samme måde som beskrevet ovenfor, hvorved der opnåedes henholdsvis Escherichia coli K12 MM294/pTB669 (IFO 14532, FERM BP-1281) og Escherichia coli C600/pTB669.

2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakter

Hver af de ovennævnte transformanter blev dyrket i et M9-medium indeholdende 1% glukose, 0,4% casaminosyre og 8µg/ml tetracyklin, og da Klett-værdien blev ca. 200 blev der tilsat 3β-indolylakrylsyre til en koncentration

af 25 µg/ml hvilket efterfulgtes af endnu 4 timers dyrkning. Efter dyrkningen opsamledes bakteriecellerne og de suspenderedes i en 10%s sakkaroseopløsning indeholdende 1/20 mængde 20 mM tris-HCl (pH 7,6). Til denne suspension sattes der fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) til 1 mM, EDTA til 10 mM, NaCl til 0,1M, spermidin-hydroklorid til 10 mM og lysozym til 100 µg/ml (alle tallene angiver slutkoncentrationen), og blandingen henstod ved 0°C i 45 minutter hvorefter den underkastedes ultralydbehandling i 30 sekunder. Denne opløsning centrifugeredes ved 18000 opm ("Sorval" centrifuge, SS34 rotor) i 30 minutter til frembringelse af en ovenstående væske der brugtes som bakteriecelleekstrakt.

3) Aktivitet af human-bFGF i bakteriecelleekstrakter

Human-bFGF-aktiviteten angives ved vægten af en standardprøve af renset oksehjerne-FGF (fremstillet af Takara Shuzo Co., Ltd.) i mængder som i henseende til vækstfremmende virkning på BALB/c3T3 celler er ækvivalente med mængderne af bakteriecelleekstrakter.

BALB/c3T3 celler fra mus i en mængde på 2 x 10^3 celler pr. rum (well) blev podet i et DMEM-medium indeholdende 5% kalveserum på en "Nunc"® 96-rums mikrotiterplade (flad basis) hvor hvert rum indeholdt 0,2 ml af mediet, og der gennemførtes dyrkning. Næste dag blev mediet udskiftet med et DMEM-medium indeholdende 0,5% kalveserum. Efter 3 dages dyrkning sattes der 10 µl af en bakteriecelleekstrakt, i forvejen seriefortyndet i 5-doblings trin med et DME-medium indeholdende 0,5% BSA, til hvert rum og der dyrkedes. 20 timer senere sattes der 2 µl ^{3}H-Tdr (5 Ci/mmol, 0,5 mCi/ml RCC Amersham, UK) til hvert rum. 6 timer senere blev cellerne strippet ved behandling med fosfatpufret opløsning (PBS) indeholdende 0,2% trypsin-0,02% EDTA, og cellerne høstedes over på et glasfilter ved hjælp af en "Titertek"® cellehøster, hvorefter den mængde ^{3}H-Tdr der var gået ind i cellerne blev bestemt ved hjælp af en scintillationstæller. Under anvendelse af samme frem-

gangsmåde blev der foretaget bestemmelser af aktiviteterne af prøver af oksehjerne-FGF (fremstillet af Takara Shuzo) med kendt vægt. Fra den herved fremstillede arbejdskurve blev der foretaget beregninger af mængderne af humant bFGF i prøverne af bakteriecelleekstrakt. Resultaterne fremgår af tabel 2.

Til kontrol bestemtes produktiviteten for humant bFGF hos transformanten escherichia coli DH1/ptrp781, vundet ved transformation af Escherichia coli DH1 under anvendelse af plasmidet ptrp781.

Tabel 2

Produktivitet for humant bFGF

Transformant	Human-bFGF produktivitet pr. liter dyrkningsmedium
E. coli DH1/pTB669	2,95 mg
E. coli MM294/pTB669	23,15
E. coli C600/pTB669	8,15
E. coli DH1/ptrp781	<0,0005

Eksempel 1

Fremstilling af rekombinant-DNAer indeholdende en muteinindkodende basesekvens

(1) Kloning af M13 vektor fra humant bFGF-gen

Det ifølge referenceeksempel 2 vundne plasmid pTB669 blev digereret med restriktionsenzymerne EcoR I og BamH I. Den formeringsdygtige eller replikative form (RF) af fagvektor M13mp8-DNA (J. Messing, Methods in Enzymology 101, 20-78 (1983)) blev digereret med restriktionsenzymerne EcoR I og BamH I og blandedes med det humane bFGF-DNA-fragment stammende fra det digererede pTB669. Blandingen blev derefter underkastet ligatering ved hjælp af T4 DNA-ligase; det ligaterede DNA transformeredes ind i en

inficerbar celle af stammen Escherichia coli JM105; den resulterende transformant podedes på en plade under anvendelse af Xga1 som indikator (J. Messing et al., Nucleic Acids Research 9, 309-321 (1981)); den plak som indeholdt rekombinant-fagen (hvid plak) opsamledes; basesekvensen i det rekombinerede område bestemtes ved den dideoxynukleotid-syntetiske kædeafslutningsmetode (J. Messing et al., Nucleic Acids Research 9, 309 (1981)), hvorved det bekræftedes at det humane bFGF-DNA var blevet præcist indsat.

Fra denne M13-PO klon blev der renset et enkeltstrenget fag-DNA som derefter brugtes som mønster eller skabelon (template) for steddirigeret mutagenese ved hjælp af et syntetisk oligonukleotid.

(2) Stedspecifik mutagenese

I nærværelse af 0,1 mM adenosintrifosfat (ATP), 50 mM tris-(hydroxymetyl)-aminometan-hydroklorid (tris-HCl, pH 8,0), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol (DTT) og 9 enheder T4-kinase, i en samlet mængde på 50 µl, 40 picomol af det syntetiske oligonukleotid: 5'>CGT TCT TGC TGT AGA GCC GCT<3' [primer til ændring af Cys 26 til Ser (genkendelsessekvensen for restriktionsenzymet Rsa I forsvinder) (se fig. 2)] behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinasebehandlede primer, 12 picomol, opvarmedes til 67°C i 5 minutter og til 42°C i 25 minutter i 50 µl af en blanding indeholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM tris-HCl (pH 8,0), 10 mM $MgCl_2$ og 10 mM β-merkaptoætanol, hvorved primeren blev hybridiseret til 5 µg af det enkeltstrengede (ss) M13-PO DNA. Den tempererede blanding blev derefter afkølet på is og den sattes til 50 µl af reaktionsblandingen indeholdende 0,5 mM deoxynukleotid-trifosfat (dNTP), 80 mM tris-HCl (pH 7,4), 8 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 9 enheder DNA polymerase I-Klenow-fragment, 0,5 mM ATP og 2 enheder T4 DNA-ligase, og der gennemførtes reaktion ved 37°C i 3 timer og ved 25°C i 2 timer, hvorpå reaktionen blev standset ved tilsætning af 2 µl 0,2 mM EDTA. Reaktionsproduktet bruges

til at transformere inficerbare JM 105-celler; de på denne måde opnåede transformantceller fik lov til at vokse natten over hvorefter der isoleredes et ssDNA fra den ovenstående væske fra dyrkningsmediet. Under anvendelse af dette ssDNA som mønster for den 2. del af primer-forlængelsen blev gelrenset DNA af RF-type transformeret over i inficerbare JM 105-celler; de resulterende transformantceller spredtes over en agarplade og dyrkedes natten over til dannelse af fag-plakker.

(3) Steddirigeret mutagenese

Den i det foregående afsnit (2) anvendte fremgangsmåde blev gentaget, men således at den anvendte oligonukleotid-primer var: 5'>AAC GAT TAG CGC TCA CTC C<3', der ændrer det cystein-70-indkodende kodon på en sådan måde at kodonet indkoder serin (der frembragtes en genkendelsessekvens af restriktionsenzymet Hae II; se fig. 2).

(4) Steddirigeret mutagenese

Den i foranstående afsnit (2) anvendte fremgangsmåde blev gentaget, men således at den syntetiske oligonukleotid-primer var 5'>GTA ACA GAC TTA GAA GCT AGT<3', der ændrer det cystein-88-indkodende kodon på en sådan måde at kodonet indkoder serin. (Der frembragtes en genkendelsessekvens for restriktionsenzymet Alu I; se fig. 2).

(5) Steddirigeret mutagenese

Den i ovenstående afsnit (2) beskrevne fremgangsmåde blev gentaget, men således at den anvendte syntetiske oligonukleotid-primer var: 5'>TCG AAG AAG AAA GAC TCA TCC<3', der ændrer det cystein-93-inkodende kodon på en sådan måde at kodonet indkoder serin (der frembragtes en genkendelsessekvens for restriktionsenzymet Hinf I; se fig. 2).

(6) Sigtning og identificering af plakker der er gjort mutageniske

Plader indeholdende muterede M13-PO plakker (foranstående afsnit (1)) og to plader indeholdende umuterede M13-PO fag-plakker afkøledes til 4°C og plakkerne fra hver plade blev overført til to runde nitrocellulosefiltre ved at et tørt filter anbragtes på agarpladen i 5 minutter i tilfælde af det første og i 15 minutter i tilfælde af det andet filter. Filtrene holdtes placeret i 5 minutter på tykt filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at de holdtes anbragt i yderligere 5 minutter på filtrerpapir neddyppet i 0,5M tris-HCl med en pH-værdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at tørre, og dette efterfulgtes af tørring ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Hybridisering udførtes ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Filtrene vaskedes hver for sig i en pufferopløsning til vask og indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC, ved 50°C i 30 minutter. Filtrene vaskedes derefter først med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-PO plakker, blev undersøgt med hensyn til radioaktivitet ved hjælp af en Geigertæller. Under trinvis nedsættelse af koncentrationen af SSC blev kontrolfiltrene vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filteret. Den mindste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luft og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der

udførtes sigtning af 10000 muterede M13-PO plakker og 100 umuterede kontrolplakker under anvendelse af en kinasebehandlet oligonukleotid-probe. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede med proben, mens 3-10 af de muterede M13-PO plakker hybridiserede med proben.

Der blev udtaget en af de muterede M13-PO plakker og den podedes i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA og fra bakteriecelleklumperne fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der blev foretaget analyser af basesekvenserne ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Som resultat heraf blev det bekræftet henholdsvis at TGC (Cys-26) kodonet var blevet ændret til et TCT (Ser) kodon; TGT (Cys-70) kodonet til et AGC (Ser) kodon; TGT (Cys-88) kodonet til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodonet til et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-PO fager blev den fag i hvilket kodonet Cys-26 var blevet til et Ser-indkodende kodon benævnt M13-P1; den fag hvor kodonet Cys-70 var blevet til et Ser-indkodende kodon blev betegnet M13-P2; den fag i hvilken kodonet Cys-88 var blevet et Ser-indkodende kodon blev betegnet M13-P3; og den fag i hvilket kodonet Cys-93 var blevet til et Ser-indkodende kodon blev betegnet M13-P4.

Eksempel 2

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder humant bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB739 for human bFGF mutein-ekspression

Den i eksempel 1 vundne M13-P1 replikative form blev spaltet ved hjælp af restriktionsenzymerne EcoR I og Pst I til dannelse af et DNA-fragment på ca. 0,5 kb og indeholdende det område som indkoder humant bFGF-mutein.

Særskilt blev plasmidet ptrp781 (T. Kurokawa et al., Nucleic Acids Research 11, 3077-3085 (1983)) med DNA indeholdende en trp-promoter spaltet ved hjælp af EcoR I-Pst I til fraskillelse af et DNA-fragment på ca. 3,2 kb og indeholdende en trp-promoter, et tetracyklin-resistensgen og et plasmidformerings-begyndelsessted. Det ovennævnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragment indeholdende det genområde som koder humant bFGF-mutein og dette 3,2 kb DNA-fragment blev ligateret sammen ved hjælp af en T4 DNA-ligasereaktion til konstruktion af plasmidet pTB739 for human bFGF mutein-ekspression (fig. 7).

Under anvendelse af dette plasmid pTB739 blev Escherichia coli DH1 transformeret, hvorved man opnåede stammen Escherichia coli DH1/pTB739 (IFO 14575, FERM BP-1641), der rummer plasmidet pTB739 indeholdende det i fig. 3 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af en bakteriecelleekstrakt

Den ovennævnte transformant dyrkedes i et M9 medium indeholdende 1% glukose, 0,4% casaminosyre og 8 µg/ml tetracyklin, og da Klett-værdien blev ca. 200 tilsattes der 3β-indolylakrylsyre til en koncentration på 25 µg/ml, hvorefter der dyrkedes i yderligere 4 timer. Efter dyrkningen opsamledes bakterieceller og de suspenderedes i en 10%s sakkaroseopløsning indeholdende 1/20 mængde 20 mM tris-HCl (pH 7,6). Til denne suspension sattes der fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) til 1 mM, EDTA til 10 mM, NaCl til 0,1 M, spermidin-hydroklorid til 10 mM og lysozym til 100 µg/ml (alle tallene angiver slutkoncentrationer), og blandingen henstod ved 0°C i 45 minutter hvorefter den underkastedes ultralydbehandling i 30 sekunder. Denne opløsning centrifugeredes ved 18000 opm ("Sorval" centrifuge, SS34 rotor) i 30 minutter til dannelse af en ovenstående væske som derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF aktivitet af bakteriecelleekstrakt

Muse BALB/c3T3 celler i en mængde på 2 x 10^3 celler pr. rum (well) podedes i et DMEM-medium indeholdende 5% kalveserum på "Nunc"® 96-rums mikrotiterplade (flad basis) med hvert rum indeholdende 0,2 ml af mediet, og cellerne dyrkedes. Næste dag blev mediet udskiftet med et DMEM-medium indeholdende 0,5% kalveserum. Efter 3 dages dyrkning sattes der 10 µl bakteriecelleekstrakt, i forvejen seriefortyndet i 5-folds trin med et DME-medium indeholdende 0,5% BSA til hvert rum og der dyrkedes. 20 timer senerede sattes der 2 µl ^{3}H-Tdr (5 Ci/mmol, 0,5 mCi/ml RCC Amersham) til hvert rum. 6 timer senere blev cellerne strippet ved behandling med en fosfatpufret opløsning (PBS) indeholdende 0,2% trypsin-0,02% EDTA og cellerne høstedes på et glasfilter ved hjælp af en "Titertek"® cellehøster, hvorefter den mængde ^{3}H-Tdr der var optaget i cellerne bestemtes ved hjælp af en scintillationstæller.

Som resultat heraf udviste celleekstrakten fra Escherichia coli DH1/pTB739 FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS1, i hvilket Cys i stilling 26 i humant bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 3

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder humant bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB742 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den i eksempel 1 vundne M13-P2 replikative form (RF) blev spaltet ved hjælp af restriktionsenzymerne EcoR I og Pst I til dannelse af et ca. 0,5 kb DNA-fragment indeholdende et område som indkoder et humant bFGF-mutein.

Særskilt blev et plasmid ptrp781-DNA indeholdende en trp-promoter spaltet ved hjælp af EcoR I-Pst I til fraskillelse af et DNA-fragment på ca. 3,2 kb og indeholden-

de en trp-promoter, et tetracyklin-resistensgen og et plasmidformerings-begyndelsessted. Dette DNA-fragment på 3,2 kb og ovennævnte EcoR I-Pst I DNA-fragment på 0,5 kb indeholdende et genområde indkodede et human-bFGF-mutein blev ligateret sammen ved hjælp af en T4 DNA-ligasereaktion til konstruktion af plasmidet pTB742 til ekspression af et humant bFGF mutein (fig. 8).

Ved hjælp af dette plasmid pTB742 blev Escherichia coli DH1 transformeret så at der frembragtes stammen Escherichia coli DH1/pTB742 (IFO 14584, FERM BP-1642) hvilken stamme rummer plasmidet pTB742 indeholdende det i fig. 4 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes ved den i eksempel 2 (2) beskrevne metode til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten på den i ovenstående afsnit (2) opnåede bakteriecelleekstrakt, og bestemmelsen skete på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Som resultat heraf udviste celleekstrakten Escherichia coli DH1/pTB742 FGF-aktivitet.

På denne måde frembragte man muteinet CS2 i hvilket Cys i stilling 70 i humant bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 4

Ekspression i Escherichia coli af et gen indkodende human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB743 til ekspression af human-bFGF-mutein

Den i eksempel 1 vundne M13-P3 replikative form

(RF) blev spaltet ved hjælp af restriktionsenzymerne EcoR I og Pst I til dannelse af et DNA-fragment på ca. 0,5 kb og indeholdende et område som indkoder et humant bFGF-mutein.

Særskilt spaltedes et plasmid ptrp781-DNA indeholdende en trp-promoter ved hjælp af EcoR I-Pst I til fraskillelse af et DNA-fragment på ca. 3,2 kb og indeholdende en trp-promoter, et tetracyklin-resistensgen og et plasmidformerings-begyndelsessted. Dette DNA-fragment på 3,2 kb og ovennævnte EcoR I-Pst I DNA-fragment på 0,5 kb og indeholdende et genområde indkodende et humant bFGF-mutein blev ligateret sammen ved hjælp af en T4 DNA-ligasereaktion til konstruktion af plasmidet pTB743 til ekspression af human-bFGF-mutein (fig. 9).

Ved hjælp af dette plasmid pTB743 blev Escherichia coli DH1 transformeret, og herved frembragte man stammen Escherichia coli DH1/pTB743 (IFO 14585 FERM BP-1643), der rummer plasmidet pTB743 indeholdende det i fig. 5 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes på den i eksempel 2 (2) beskrevne måde til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den under ovenstående afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt og bestemmelsen skete på den i eksempel 2 (3) beskrevne måde.

Som resultat heraf udviste bakteriecelleekstrakten af Escherichia coli DH1/pTB743 FGF-aktivitet.

På denne måde frembragte man muteinet CS3, i hvilket Cys i stilling 88 af humant bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 5

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB744 for ekspression af human-bFGF-mutein

Den ifølge eksempel 1 vundne M13-P4 replikative form (RF) spaltedes ved hjælp af restriktionsenzymerne EcoR I og Pst I til dannelse af et DNA-fragment på ca. 0,5 kb og indeholdende et område som indkoder et human-bFGF-mutein.

Særskilt spaltedes et plasmid ptrp781 DNA indeholdende en trp-promoter ved hjælp af EcoR I-Pst I til fraskillelse af et ca. 3,2 kb DNA-fragment indeholdende en trp-promoter, et tetracyklin-resistensgen og et plasmidformerings-begyndelsessted. Dette 3,2 kb DNa-fragment og ovennævnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragment indeholdende et genområde indkodende et human-bFGF-mutein blev ligateret sammen ved hjælp af en T4 DNA-ligasereaktion for at konstruere plasmidet pTB744 til ekspression af et human-bFGF-mutein (fig. 10).

Ved hjælp af dette plasmid pTB744 blev Escherichia coli DH1 transformeret, og herved frembragte man stammen Escherichia coli DH1/pTB744 (IFO 14586, FERM BP-1644), der rummer plasmidet pTB744 indeholdende det i fig. 6 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af en bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes ved den i eksempel 2 (2) beskrevne måde til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget en bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den ifølge ovenstående afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt og bestemmelsen skete på den i eksempel 2 (3) beskrevne måde.

Som følge heraf udviste bakteriecelleekstrakten fra Escherichia coli DH1/pTB744 FGF-aktivitet.

På denne måde frembragte man muteinet CS4, i hvilket Cys i stilling 93 i humant bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 6

Sigtning og identificering af plakker der var gjort mutagene

Plader indeholdende muterede M13-P2 fag-plakker vundet ifølge eksempel 1 samt to plader indeholdende umuterede M13-P2 fag-plakker vundet ifølge eksempel 1 afkøledes til 4°C og plakken fra hver plade overførtes til to runde nitrocellulosefiltre ved at man holdt filteret anbragt på agarpladen i 5 minutter for første filters vedkommende og i 15 minutter for andet filters vedkommende. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at blive holdt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at tørre, og derefter tørredes de ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med enpH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Der udførtes hybridisering ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Filtrene vaskedes hver for sig i en pufferopløsning til vask og indeholdende 0,1% SDS samt en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Derefter blev filtrene først vasket med en puffer-

opløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene der indeholdt umuterede M13-P2 plakker, blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Mens SSC-koncentrationen blev nedsat trinvis blev kontrolfiltrene vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luft og derefter blev der optaget radioautografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der udførtes sigtning af 10000 muterede M13-P2 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en kinase-behandlet oligonukleotid-probe. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede til proben mens 3-10 af de muterede M13-P2 plakker hybridiserede til proben.

En af de muterede M13-P2 plakker blev opsamlet og blev podet i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den resulterende ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA og fra bakteriecelleklumpen fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der blev foretaget analyse af basesekvenserne ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Som resultat heraf bekræftedes det henholdsvis at TGC (Cys-26) kodonet var blevet ændret til et TCT (ser) kodon; TGT (Cys-88) kodonet til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodonet til et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P2 fager blev den fag, i hvilken kodonerne Cys-26 og -70 var blevet til Ser-indkodende kodoner, benævnt M13-P12; den fag i hvilken kodonerne Cys-70 og -88 var blevet Ser-indkodende kodoner blev betegnet M13-P23; og den fag i hvilken kodonerne Cys-70 og -93 var blevet til Ser-indkodende kodoner blev betegnet M13-P24.

Eksempel 7

Ekspression i Escherichia coli af et gen indkodende humant bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB762 for ekspression af human-bFGF-mutein

Den i eksempel 6 vundne M13-P23 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB762 for human bFGF-mutein-ekspression (fig. 12).

Ved hjælp af dette plasmid pTB762 blev Escherichia coli MM294 transformeret, og herved frembragtes Escherichia coli MM294/pTB762 (IFO 14613, FERM BP-1645), der rummer plasmidet pTB762 indeholdende det i fig. 11 muteinindkodende gen.

(2) Fremstilling af en bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes ved den fremgangsmåde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til fremstilling af en ovenstående væske der derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget en bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den ifølge ovenstående afsnit (2) vundne celleekstrakt og det skete ved den i eksempel 2 (2) beskrevne metode.

Som resultat heraf udviste celleekstrakten fra E. coli MM294/pTB762 FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS23, i hvilket Cys i stilling 70 og i stilling 88 var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 8

Sigtning og identificering af plakker der er gjort mutagene

Plader indeholdende muterede M13-P23 fag-plakker vundet ifølge eksempel 7 og to plader indeholdende umuterede M13-P23 fag-plakker vundet ifølge eksempel 7 blev afkølet til 4°C og plakken fra hver plade overførtes til to runde nitrocellulosefiltre ved at man holdt et tørt filter anbragt på agarpladen i 5 minutter for første filters vedkommende og i 15 minutter for andet filters vedkommende. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filterpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de blev neutraliseret ved at de holdtes anbragt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at tørre, hvorefter der skete tørring ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 24 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Hybridisering udførtes ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Hvert filter vaskedes i en pufferopløsning til vask og indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene vaskedes derefter først med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene der indeholdt umuterede M13-P23 plakker blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Under trinvis nedsættelse af SSC-koncentrationen blev kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P23 plakker, vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på fil-

trene. Den mindste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luft og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der gennemførtes sigtning af 10000 muterede M13-P23 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en kinasebehandlet oligonukleotid-probe. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede til proben, mens 3 til 10 af de muterede M13-P23 plakker hybridiserede med proben.

Der blev udtaget en af de muterede M13-P23 plakker og den podedes i et JM105 dyrkningsmedium. Ud fra den resulterende ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA, og ud fra bakteriecellemassen fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der blev foretaget analyser af basesekvenserne ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Som resultat blev det bekræftet for det første at TGC (Cys-26) kodonet var blevet ændret til et TCT (Ser) kodon; og for det andet at TGT (Cys-93) kodonet var blevet omdannet til et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P23 fager blev den fag i hvilken kodonerne Cys-26, -70 og -88 var blevet til Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P123; den fag hvor kodonerne Cys-70, -88 og -93 var blevet ændret til Ser-indkodende kodoner blev benævnt M13-P234.

Eksempel 9

Ekspression i Escherichia coli af et gen indkodende humant bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB764 til human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 8 opnåede M13-P123 replikative form (RF) blev behandlet på samme måde som beskrevet i eksempel 2 (1) til konstruktion af plasmidet pTB764 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 14).

Ved hjælp af dette plasmid pTB764 blev Escherichia coli MM294 transformeret, hvorved man frembragte stammen Escherichia coli MM294/pTB764 (IFO 14614, FERM BP-1646), der rummer plasmidet pTB764 indeholdende det i fig. 13 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af en bakteriecelleekstrakt

Den ovennævnte transformant dyrkedes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske som derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den i afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt, og det skete på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB764 havde FGF-aktivitet.

På denne måde fremstilledes muteinet CS123 i hvilket Cys i stillingerne 26, 70 og 88 i human bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 10

Sigtning og identificering af plakker som var blevet gjort mutagene

Plader indeholdende muterede M13-P123 fag-plakker opnået i eksempel 8 og to plader indeholdende umuterede M13-P123 fag-plakker vundet ifølge eksempel 8 blev afkølet til 4°C og plakken fra hver plade overførtes til to runde nitrocellulosefiltre ved at man holdt et tørt filter anbragt på agarpladen i 5 minutter for første filters vedkommende og i 15 minutter for andet filters vedkommende. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at

blive holdt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at lufttørre, hvorefter de tørredes ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiserings-pufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Hybridisering udførtes ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Filtrene blev vasket hver for sig i en pufferopløsning til vask indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Derefter vaskedes filtrene først med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P123 plakker, undersøgtes for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Under trinvis nedsættelse af koncentrationen af SSC blev kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P123 plakker, vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den mindste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Man lod filtrene tørre i luft og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der udførtes sigtning af 10000 muterede M13-P123 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en kinasebehandlet oligonukleotid-probe. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede ved proben mens 3-10 af de muterede M13-P123 plakker hybridiserede med proben.

En af de muterede M13-P123 plakker blev opsamlet og podet i et JM105 dyrkningsmedium. Ud fra den resulterende ovenstående væske blev der fremstillet et ssDNA og ud fra bakteriecelleklumperne fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Basesekvensen blev analyseret ved hjælp af en passende oligonukleotid-primer og ssDNA.

Det viste sig herved at TGT (Cys-93) kodonet var blevet udskiftet med et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P123 fager blev den fag i hvilken kodonet Cys-26, -70, -88 og -93 var blevet udskiftet med Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P1234.

Eksempel 11

Ekspression i Escherichia coli af et gen indkodende et human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB765 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 10 opnåede M13-P1234 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde for at konstruere plasmidet pTB 765 til ekspression af et human-bFGF-mutein (fig. 16).

Ved hjælp af dette plasmid pTB765 blev Escherichia coli MM294 transformeret, og herved frembragte man stammen Escherichia coli MM294/pTB765 (IFO 14615, FERM BP-1647), der rummer plasmidet pTB765 indeholdende det i fig. 15 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket ved den i eksempel 2 (2) beskrevne metode til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget en bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den i afsnit (2) opnåede celleekstrakt, og det skete på den i eksempel 2 (3) beskrevne måde.

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB765 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS1234 i hvilket Cys i stillingerne 26, 70, 88 og 93 i humant bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 12

Sigtning og identificering af plakker som var blevet gjort mutagene

Plader indeholdende M13-P1 fager muteret på den i eksempel 1 beskrevne måde ved hjælp af en syntetisk oligomer (fig. 2 (3) eller (4)) og to plader indeholdende umuterede M13-P1 fag-plakker opnået ifølge eksempel 1 blev afkølet til 4°C og plakken fra hver plade blev overført til to runde nitrocellulosefiltre ved at et tørt filter holdtes anbragt på agarpladen i 5 minutter i tilfælde af det første filter og i 15 minutter i tilfælde af det andet filter. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at blive holdt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at lufttørre, hvorefter de blev tørret ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre blev underkastet for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll" og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Hybridiseringen udførtes ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Filtrene vaskedes hver i en pufferopløsning til vask indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene blev derefter først vasket med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P1 plakker, blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Mens SSC-koncentrationen blev nedsat trinvis blev kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P1-plakker, vasket indtil der ikke

var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luften og der blev optaget radioautografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der udførtes sigtning af 10000 muterede M13-P1 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en oligonukleotid-probe behandlet med kinase i nærværelse af γ-^{32}P-ATP. Ingen af kontrolplakkerne hybridiseredes til proben, mens 3-10 af de muterede M13-P1 plakker hybridiseredes til proben.

En af de muterede M13-P1-plakker blev opsamlet og podedes i et JM105 dyrkningsmedium. Ud fra den resulterende ovenstående væske blev der fremstillet et ssDNA, og ud fra bakteriecelleklumpen blev der fremstillet et dobbeltstrenget (ds)DNA. Basesekvenserne blev analyseret ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Det viste sig herved for det første at TGT (Cys-88) kodonet var blevet omdannet til TCT (Ser) kodon og for det andet at TGT (Cys-93) kodonet var udskiftet med et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P1 fager blev den fag i hvilken kodonerne Cys-26 og -88 var blevet til Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P13, og den fag i hvilken kodonerne Cys-26 og -93 var blevet til Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P14.

Eksempel 13

Sigtning og identificering af plakker der var gjort mutagene

Plader indeholdende M13-P14 fag plakker muteret på den i eksempel 1 beskrevne måde ved hjælp af en syntetisk oligomer (fig. 2 (2) eller (3)) og to plader indeholdende umuterede M13-P14-plakker blev afkølet til 4°C og plakkerne fra hver plade overførtes til to runde nitrocellulosefiltre ved at et tørt filter holdtes anbragt på agarpladen i 5 minutter i tilfælde af første filter og i 15 minut-

ter i tilfælde af andet filter. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke filtrerpapirstykker neddyppt i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at blive anbragt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov at tørre, hvorefter der skete tørring ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Der udførtes hybridisering ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Hvert filter vaskedes i en pufferopløsning til vask indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Derefter vaskedes filtrene først med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P14 plakker, blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Mens SSC-koncentrationen blev nedsat trinvis vaskedes kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P14 plakker, indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luften og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Man sigtede 10000 muterede M13-P14 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærværelse af γ-^{32}P-ATP. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede med proben mens 3-10 af de muterede M13-P14 plakker hybridiserede med proben.

En af de muterede M13-P14 plakker blev opsamlet og podedes i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den resulterende

ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA, og fra bakteriecelleklumpen fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der blev udført analyser af basesekvenserne ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Det viste sig herved at TGT (Cys-70) kodonet var blevet ændret til TCT (Ser) kodon; og at TGT (Cys-93) kodonet var blevet til et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P14 fager blev den fag i hvilken kodonerne Cys-26, -70 og -93 var blevet udskiftet med Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P124 og den fag i hvilken kodonerne Cys-26, -88 og -93 var blevet omdannet til Ser-indkodende kodoner M13-P134.

Eksempel 14

Sigtning og identificering af plakker der var gjort mutagene

Plader indeholdende M13-P3 fag-plakker muteret på den i eksempel 1 beskrevne måde ved hjælp af en syntetisk oligomer (fig. 2 (4)) og to plader indeholdende umuterede M13-P3 fag-plakker opnået ifølge eksempel 1 blev afkølet til 4°C og plakkerne fra hver plade blev overført til to runde nitrocellulosefiltre ved at man holdt et tørt filter anbragt på agarpladen i 5 minutter i tilfælde af det første filter og i 15 minutter i tilfælde af det andet filter. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorpå de blev neutraliseret ved at blive holdt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl med en pH-værdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filteret vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov at lufttørre, og derefter blev de tørret ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiserings-pufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts

opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Der gennemførtes hybridisering ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Hvert filter blev vasket i en pufferopløsning til vask indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Derefter vaskedes filtrene først med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P3 plakker, blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geigertæller. Under trinvis nedsættelse af SSC-koncentrationen blev kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-P3 plakker, vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luften og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. Der udførtes sigtning af 10000 muterede M13-P3 plakker og 100 umuterede kontrolplakker ved hjælp af en oligonukleotid-primer behandlet med kinase i nærværelse af γ-^{32}P-ATP. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede med proben mens 3-10 af de muterede M13-P3 plakker hybridiserede med proben.

En af de muterede M13-P3 plakker blev opsamlet og podedes i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den resulterende ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA og ud fra bakteriecelleklumpen fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Basesekvenserne blev analyseret ved hjælp af en passende oligonukleotid-primer og ssDNA.

Det viste sig herved at TGT (Cys-93) kodonet var blevet ændret til et TCT (Ser) kodon.

Blandt de muterede M13-P3 fager blev den fag i hvilken kodonerne Cys-88 og -93 var blevet til Ser-indkodende kodoner benævnt M13-P34.

Eksempel 15

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktionaf plasmidet pTB776 til human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 6 opnåede replikative form (RF) af M13-P12 blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde for at konstruere plasmidet pTB776 for human-pFGF-mutein (fig. 18).

Ved hjælp af dette plasmid pTB776 blev Escherichia coli MM294 transformeret, og herved frembragte man stammen Escherichia coli MM294/pTB776 som rummer plasmidet pTB776 indeholdende det i fig. 17 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en overstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktivitet af den ifølge afsnit (2) vundne celleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB776 havde FGF-aktivitet.

Muteinet CS12, i hvilket Cys i stillingerne 26 og 70 af det humane bFGF var blevet udskiftet med Ser, frembragtes på denne måde.

Eksempel 16

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB778 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 6 opnåede M13-P24 replikative form (RF) behandledes på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB778 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 20).

Escherichia coli MM294 tranformeredes ved hjælp af dette plasmid pTB778, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB778 som rummer plasmidet pTB778 indeholdende det i fig. 19 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af en bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev gennemført en bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) vundne celleekstrakt, og det skete på den måde der beskrevet i eksempel 2 (3). Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB778 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS24, i hvilket Cys i stillingerne 70 og 93 af human-bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 17

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB779 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 12 opnåede M13-P13 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB779 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 22).

Ved hjælp af dette plasmid pTb779 blev Escherichia coli MM294 transformeret og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB779 som rummer plasmidet pTB779 indeholdende det i fig. 21 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske der derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Der blev foretaget bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) vundne celleekstrakt og det skete på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTB779 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS13, i hvilket Cys i stillingerne 26 og 88 af human-bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 18

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB763 for ekspression af human-bFGF-mutein

Den ifølge eksempel 12 vundne M13-P14 replikative form (RF) behandledes på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB763 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 24).

Ved hjælp af dette plasmid pTB763 blev Escherichia coli MM294 transformeret og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB763 som rummer plasmidet pTB763 indeholdende det i fig. 23 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske som derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) opnåede bakteriecelleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTB763 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS14, i hvilket Cys i stilingerne 26 og 93 af humant bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 19

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB777 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 14 frembragte M13-P34 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB777 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 26).

Ved hjælp af dette plasmid pTB777 blev Escherichia coli MM294 transformeret, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB777 som rummer plasmidet pTB777 indeholdende det i fig. 25 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Den ovenfor nævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske som derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

På den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3) blev der gennemført bestemmelse af human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt.

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTB777 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS34, i hvilket Cys i stillingerne 88 og 93 af human-bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 20

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB782 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 8 frembragte M13-P234 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB782 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 28).

Escherichia coli MM294 blev transformeret under anvendelse af dette plasmid pTB782, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB782 som rummer plasmidet pTB782 indeholdende det i fig. 27 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Den ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2(2) til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTb782 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS234, i hvilket Cys i stillingerne 70, 88 og 93 af humant bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 21

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB780 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 13 frembragte M13-P124 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB780 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 30).

Escherichia coli MM294 blev transformeret under anvendelse af dette plasmid pTB780, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB780 som rummer plasmidet pTB780 der indeholder det i fig. 29 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til fremstilling af en ovenstående væske der derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) vundne bakteriecelleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTB780 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS124, i hvilket Cys i stillingerne 26, 70 og 93 af human-bFGF var blevet udskiftet med Ser.

Eksempel 22

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB781 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den ifølge eksempel 13 vundne M13-P134 replikative form (RF) blev behandlet på den i eksempel 2 (1) beskrevne måde til konstruktion af plasmidet pTB781 for human-bFGF-mutein-ekspression (fig. 31).

Escherichia coli MM294 blev transformeret under anvendelse af dette plasmid pTB781, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB781 som rummer plasmidet pTB781 indeholdende det i fig. 32 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Den ovennævnte transformant dyrkedes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske som derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) fremstillede bakteriecelleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig at bakteriecelleekstrakten af E. coli MM294/pTB781 havde FGF-aktivitet.

På denne måde frembragtes muteinet CS134, i hvilket Cys i stillingerne 26, 88 og 93 i humant bFGF var blevet erstattet med Ser.

Eksempel 23

Mutein-produktivitet

FGF-aktiviteten af en række bakteriecelleekstrakter som indeholder respektive muteiner blev bestemt i overensstemmelse med den i referenceeksempel 2 (2) beskrevne metode, og således beregnedes mutein-produktiviteten af de respektive transformanter. De således fundne værdier er vist i nedenstående tabel 3.

Tabel 3

Plasmid	Mutein	Produktivitet (mg-ptFGF/kultur)
pTB739	CS1	0,3
pTB742	CS2	10,6
pTB743	CS3	13,3
pTB744	CS4	0,8
pTB776	CS12	0,2
pTB779	CS13	0,1
pTB763	CS14	0,5
pTB762	CS23	25,8
pTB778	CS24	0,3
pTB777	CS34	0,5
pTB764	CS123	0,3
pTB780	CS124	0,4
pTB781	CS134	0,2
pTB782	CS234	1,4
pTB765	CS1234	0,1
pTB669	rhbFGF	6,0
ptrp781	-	0,0

Eksempel 24

Rensning af hbFGF-mutein

Transformanter som producerer de respektive muteiner blev dyrket på den måde der er beskrevet i referenceeksempel 2, hvorved der tilvejebragtes bakteriecelleekstrakter. 25 ml af hver ekstrakt (fremstillet ud fra 500 ml af dyrkningsmediet) førtes gennem en kolonne (diameter 2 cm, højde 10 cm) af DEAE-cellulose (DE52, Wattman, Inc., United Kingdom) ækvilibreret med en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 7,4 og 0,2M NaCl, hvorved nukleinsyrebestanddelene i ekstrakten fjernedes. Effluenten fra kolonnen og de vaskevæsker der fremkom som resultat af vaskekolonnen med en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 7,4 og 0,2M NaCl forenedes og opsamledes (DEAE-effluentfraktion, 60 ml).

Denne fraktion underkastedes HPLC ved hjælp af en højtydende væskekromatograf (Gilson. Inc., Frankrig) ladet med en "Shodex" AF-pak HP-894 heparinkolonne (indvendig diameter 8 mm, højde 5 cm, fremstillet af Showa Denko, Japan). Efter vask af kolonnen med en 20 mM Tris-HCl opløsning med en pH-værdi på 7,4 og derefter med en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 7,4 og 0,5M NaCl blev der udført en lineær gradient-eluering med en NaCl-gradient på fra 0,5M til 2M (rumfang 60 ml, strømningshastighed 1,0 ml/minut) i en puffer indeholdende 20 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 7,4.

Elueringsmønstrene for de forskellige muteiner er vist i fig. 33-35. I disse figurer angiver venstre ordinat absorption for OD_{280} og højre ordinat NaCl-koncentrationen i gradienten. Absisserne angiver tiden, idet gradienteluering blev sat igang på punktet for tiden 0. Topfraktionerne blev opsamlet og deres FGF-aktivitet blev undersøgt. De respektive specifikke aktiviteter efter rensningen er vist i tabel 4.

Tabel 4

Mutein	Specifik aktivitet (mg-ptFGF/mg protein)
CS1	0,4
CS2	0,9
CS3	1,0
CS4	1,0
CS12	0,5
CS13	0,5
CS14	0,3
CS23	1,1
CS24	0,8
CS34	0,5
CS123	0,4
CS124	0,1
CS134	0,5
CS234	0,9
CS1234	0,1
rhbFGF	1,0

I tabel 4 er de specifikke aktiviteter vist på basis af FGF-aktiviteten af FGF stammende fra oksehjerne (renhed ikke under 95%), produceret af Takara Shuzo Co., Ltd.

I alle muteinerne blev den top der svarede til top I af bFGF elueret ved en elueringstid mellem 15 og 25 minutter. Dette kan også detekteres som et enkelt bånd på positionen for molekylvægt ca. 17.000 i 17,25% SDS-polyakrylamid-gelelektroforese.

Eksempel 25

Oxidation af FGF-muteiner

Hvert mutein elueret fra en heparin HPLC-kolonne og bFGF blev dialyseret særskilt to gange ved 4°C i 3 timer til den 1.000-dobbelte rumfangsmængde destilleret vand, og det efterfulgtes af frysetørring. 200 µg (proteinbasis) af hver tør standardprøve blev opløst i 200 µl af en oxidations-reaktionsvæske (50 mM Tris-HCl (pH 8,5)/0,2M NaCl/1 mg/ml BSA/20 mM H_2O_2), og oxidationen gennemførtes ved 37°C i 30 minutter.

Derefter førtes opløsningen gennem en heparin HPLC-kolonne og man undersøgte det mønster som viste sig ved eluering med saltgradienten mellem 0,6M og 2M. De opnåede elueringsmønstre er vist i fig. 36, hvor ordinaterne og absissen angiver det samme som de tre foregående figurer. I bFGF var toppene generelt lave; derimod var i CS2, CS3 og CS23 den til top I svarende top høj; top-øgningen var mærkbar navnlig i CS3 og CS23.

Dette tyder på at CS3 og CS23 er stabile overfor oxidation. Det gælder i øvrigt i alle tilfælde af CS2, CS3 og CS23 at det protein der elueredes som top, havde FGF-aktivitet.

Eksempel 26

Reduktion af FGF-muteiner

200 µg (proteinbasis) af hver frysetørret standardprøve vundet på samme måde som beskrevet i eksempel 25 blev opløst i 200 µl af en reduktions-reaktionsvæske (50 mM Tris-HCl (pH 8,5)/0,2M NaCl/1 mg/ml BSA/20 mM ditiotreitol (DTT)), og der gennemførtes reduktion ved 37°C i 30 minutter.

Opløsningen førtes derefter gennem en heparin HPLC-kolonne og det mønster som viste sig ved eluering med saltgradienten mellem 0,6M og 2M blev undersøgt. De fremkomne elueringsmønstre er vist i fig. 37, hvor ordinaterne og absissen er som i foregående figurer. Hos

bFGF og CS2 var den top som svarer til top I mærkbar, og det tydede på at de andre toppe (toppene II-IV) kan tilskrives oxidation. Det tydede også på at toppen for CS3 og CS23 ikke var påvirket af oxidation. Dette støtter den antagelse af stabilitet, som er omtalt i eksempel 25. De forskellige bFGF og muteiner elueret som disse toppe viste sig at have FGF-aktivitet.

Eksempel 27

Fremstilling af rekombinant-DNAer med mutein-indkodende basesekvens

(1) Kloning af M13 vektor for human-bFGF-gen

Det ifølge referenceeksempel 2 frembragte plasmid pTB699 blev digereret med restriktionsenzymerne EcoR I og BamH I. Fag-vektoren M13mp8's (J. Messing, Methods in Enzymology, 101, 20-78 (1983)) replikative form (RF) af DNA blandedes med et human-bFGF-DNA-fragment stammende fra pTB669, i forvejen digereret med EcoR I og BamH I. Blandingen underkastedes derefter ligatering ved hjælp af T4 DNA-ligase. Det resulterende ligaterede DNA transformeredes over i inficerbare celler af stammen Escherichia coli JM105; transformant-cellerne blev udspredt over en plade hvis indikator-species var Xgal (J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309-321 (1981)); den plak som indeholdt rekombinant-fagen (hvid plak) blev opsamlet; basesekvensen i det rekombinerede område bestemtes ved dideoxynukleotidsyntese-kædeafslutningsmetoden (J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)), hvorved det bekræftedes at human-bFGF DNA var blevet præcist indsat.

Fra denne M13-PO klon rensedes der et enkeltstrenget fag-DNA som brugtes som mønster (template) for sted-dirigeret mutagenese ved hjælp af et syntetisk oligonukleotid.

(2) Stedspecifik mutagenese

I nærværelse af 0,1 mM adenosintrifosfat (ATP), 50 mM hydroxymetylaminometan-hydroklorid (Tris-HCl) med en pH-værdi på 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiothreitol (DTT) og 9 enheder T4-kinase blev i et samlet rumfang på 50 µl 40 picomol af det syntetiske oligonukleotid: 5'-CGGGCATGAATTCGCCGCT-3' (primer til i en basesekvens at frembringe et genkendelsessted for restriktionsenzymet EcoR I, og derefter ændre Pro-14 til Met (se fig. 38 (2)) behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinase-behandlede primer (12 picomol) blev opvarmet til 67°C i 5 minutter og til 42°C i 25 minutter, i 50 µl af en blanding indeholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 8,0, 10 mM $MgCl_2$ og 10 mM β-merkaptoætanol, hvorved det blev hybridiseret til 5 µg af det enkelt-strengede (ss) M13-PO DNA. Den renaturerede blanding blev derefter afkølet på is og blev sat til 50 µl af en reaktionsblanding indeholdende 0,5 mmol deoxynukleotid-trifosfat (dNTP), 80 mM Tris-HCl med en pH-værdi på 7,4, 8 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 9 enheder DNA-polymerase I Klenowfragment, 0,5 mM ATP og 2 enheder T4 DNA-ligase, og reaktionen gennemførtes ved 37°C i 3 timer og ved 25°C i 2 timer, hvorpå den standsedes ved tilsætning af 2 µl 0,2 mM EDTA. Reaktionsproduktet brugtes til at transformere inficerbare JM 105-celler; transformantcellerne fik lov til at vokse natten over, hvorpå der isoleredes et ssDNA fra den ovenstående væske fra dyrkningsmediet. Under anvendelse af dette ssDNA som mønster eller skabelon for 2. afdeling af primer-forlængelsen blev DNA af gel-renset RF-type DNA transformeret ind i inficerbare JM 105-celler; de resulterende transformantceller spredtes over en agarplade og dyrkedes natten over til frembringelse af fag-plakker.

(3) Steddirigeret mutagenese

Fremgangsmåden ifølge foranstående afsnit (2) blev gentaget, men den anvendte syntetiske oligonukleotid-primer var: 5'-CGCCCATGGTGCCATCCTC-3' som i basesekvensen frembringer et genkendelsessted for restriktionsenzymet Nco I og samtidig ændrer dels Gly-9 til Thr og dels Ser-10 til Met (se fig. 38 (1)).

(4) Steddirigeret mutagenese

Fremgangsmåden i foranstående afsnit (2) blev gentaget, men således at den anvendte syntetiske oligonukleotid-primer var: 5'-TAACACCTTAAGAAGCCAG-3' som i basesekvensen frembringer et genkendelsessted for restriktionsenzymet Af1 II og samtidig ændrer det Lys-87 indkodende codon til et afslutningscodon (se fig. 38 (3)).

(5) Steddirigeret mutagenese

Den i foranstående afsnit (2) beskrevne fremgangsmåde blev gentaget, men den anvendte syntetiske oligonukleotid-primer var: 5'-CCGGACTCCGTTAACTCGG-3' som i basesekvensen frembringer et genkendelsessted for restriktionsenzymet Hpa I og samtidig ændrer Asp-42 til Asn (se fig. 38 (4)).

(6) Steddirigeret mutagenese

Fremgangsmåden i foranstående afsnit (2) blev gentaget, men således at den anvendte syntetiske oligonukleotid-primer var: 5'-CTTCTCCTGGACTCCGTCAAC-3' som udelukker genkendelsesstedet for restriktionsenzymet Hpa II i basesekvensen og samtidig ændrer Arg-45 til Gln (se fig. 38 (5)).

(7) Sigtning og identificering af plakker som er mutagene

Plader indeholdende muterede M13-PO plakker (ovenstående afsnit (1)) og to plader indeholdende umuterede M13-PO fag-plakker blev afkølet til 4°C og plakkerne fra hver plade blev overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved at et tørt filter anbragtes på agarpladen i 5 minutter for førte filters vedkommende og i 15 minutter for andet filters vedkommende. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de neutraliseredes ved at blive holdt i yderligere 5 minutter på filtrerpapir neddyppet i 0,5M Tris-HCl med en pH-værdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at lufttørre, hvorpå der blev foretaget tørring ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiserings-pufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Der udførtes hybridisering ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Hvert filter blev vasket ved 50°C i 30 minutter i en pufferopløsning til vask indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC. Filtrene blev derefter først vasket med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-PO plakker undersøgtes for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Under trinvis nedsættelse af SSC-koncentrationen blev kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-PO plakker, vasket indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentra-

tioner var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov til at tørre i luft og der blev taget autoradiografer ved 2-3 eksponering ved -70°C. Der udførtes sigtning af 10000 muterede M13-PO plakker og 100 umuterede kontrolplakkere ved hjælp af en oligonukleotid probe behandlet med 32p-γ-ATP. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede med proben mens 3-10 af de muterede M13-PO plakker hybridiserede med proben.

En af de muterede M13-PO plakker blev opsamlet og podet i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den resulterende ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA og fra bakteriecelleklumpen et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der blev foretaget analyser af basesekvenserne ved hjælp af passende oligonukleotid-primere og ssDNAer.

Det bekræftedes herved at GGC (Gly-9) kodonet var blevet til et ACC (Thr) kodon og ACG (Ser-10) kodonet var blevet ændret til et ATC (Met) kodon; CCG (Pro-14) kodonet var ændret til et ATG (Met) kodon; AAA (Lys-87) kodonet til et TAA (endestillet) kodon; GAC (Asp-42) kodonet til et AAC (Asn-42) kodon; og CGG (Arg-45) kodonet til et CAG (Gln-45) kodonet.

Blandt de muterede M13-PO fager blev den fag i hvilken Gly-9 kodonet var blevet til et Thr-indkodende kodon og Ser-10 kodonet var blevet et Met-indkodende kodon benævnt M13-PN10 (dets basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 39);
den fag i hvilken Pro-14 var blevet til et Met-indkodende kodon blev benævnt M13-PN14 (dens basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 40);
den fag i hvilken Lys-87 kodonet var blevet til et afslutningskodon blev benævnt M13-PC86 (dens basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 41);
den fag i hvilken Asp-42 kodonet var blevet et Asn-indkodende kodon blev benævnt M13-PDN42 (dets basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 42);
og

den fag i hvilken Arg-45 kodonet var blevet til et Gln-indkodende kodon blev benævnt M13-PRQ45 (dets basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 43).

Eksempel 28

Produktion af rekombinant-DNAer med en mutein-indkodende basesekvens

(1) Stedspecifik mutagenese

I nærværelse af 0,1 mM adenosintrifosfat (ATP), 50 mM hydroxymetylaminometan-hydroklorid (tris-HCl) med en pH-værdi på 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiothreitol (DTT) og 9 enheder T4-kinase i en samlet mængde på 50 µl, blev 40 picomol af det syntetiske oligonukleotid 5'-CGGACTCCTCTAACTCGGC-3' (primer til udeladelse af genkendelsesstedet for restriktionsenzymet Hpa I i basesekvensen og derefter ændre Asn-42 til Arg (se fig. 38 (6)) behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinasebehandlede primer blev opvarmet til 67°C i 5 minutter og til 42°C i 25 minutter, i 50 µl af en blanding indeholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM tris-HCl med en pH-værdi på 8,0, 10 mM $MgCl_2$ og 10 mM β-merkaptoætanol, hvorved den blev hybridiseret til 5 µg af det enkeltstrengede (ss) M3-PDN 42 DNA. Den renaturerede blanding blev derefter afkølet i is og sattes til 50 µl af en reaktionsblanding indeholdende 0,5 mM deoxynukleotid-trifosfat (dNTP), 80 mM tris-HCl med en pH-værdi på 7,4, 8 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 9 enheder DNA-polymerase I Klenow-fragment, 0,5 mM ATP og 2 enheder T4 DNA-ligase, og reaktionen gennemførtes ved 37°C i 3 timer og ved 25°C i 2 timer, hvorpå reaktionen standsedes ved tilsætning af 2 µl EDTA. Reaktionsproduktet brugtes til omdannelse af inficerbare JM 105 celler; transformantcellerne fik lov til at vokse natten over hvorefter der isoleredes et ssDNA fra den ovenstående væske fra dyrkningsmediet. Under anvendelse af dette ssDNA som mønster-

skabelon for anden del af primerforlængelsen blev DNA af gelrenset RF-type omdannet til inficerbare JM 105 celler; de resulterende transformantceller blev spredt over en agarplade og dyrkedes natten over til frembringelse af fagplakker.

(2) Sigtning og identificering af plakker der var gjort mutagene

Plakker indeholdende M13-PDN42 fag-plakker muteret ved den i eksempel 26 beskrevne metode under anvendelse af en syntetisk oligomer (fig. 38 (6)) og to plader indeholdende umuterede M13-PDN42 fag-plakker vundet ifølge eksempel 26 blev afkølet til 4°C og plakkerne fra hver plade blev overført til to runde cellulosefiltre ved at man holdt et tørt filter anbragt på agarpladen i 5 minutter for første filters vedkommende og i 15 minutter for andet filters vedkommende. Filtrene holdtes derefter anbragt i 5 minutter på tykke stykker filtrerpapir neddyppet i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% "Triton"® X-100, hvorefter de blev neutraliseret ved at blive anbragt i yderligere 5 minutter på filtrerpapirstykker neddyppet i 0,5M tris-HCl med en pH-værdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene vaskedes to gange på filtre neddyppet i 2 x SSC (standard natriumcitrat) på samme måde og fik lov til at tørre i luften, hvorefter de blev tørret ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtre underkastedes for-hybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter af en DNA-hybridiseringspufferopløsning (5 x SSC) med en pH-værdi på 7,0 og indeholdende 4 x Denhardts opløsning (polyvinylpyrrolidon, "Ficoll"® og okseserumalbumin, 1 x = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50 mM natriumfosfatpufret opløsning med en pH-værdi på 7,0 og 100 µg/ml denatureret laksesperma-DNA. Der gennemførtes hybridisering ved 42°C i 24 timer med 10^5 cpm/ml af en oligonukleotid-primer. Hver filter blev vasket i en pufferopløsning indeholdende 0,1% SDS og en nedsat mængde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene blev

derefter først vasket med en pufferopløsning indeholdende 2 x SSC; kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-PDN42 plakker blev undersøgt for radioaktivitet ved hjælp af en Geiger-tæller. Mens SSC-koncentrationen trinvis blev nedsat, vaskedes kontrolfiltrene, der indeholdt umuterede M13-PDN42 plakker, indtil der ikke var nogen konstaterbar radioaktivitet tilbage på filtrene. Den laveste af de anvendte SSC-koncentrationer var 0,1 x SSC. Filtrene fik lov at tørre i luften og der blev optaget autoradiografer ved 2-3 dages eksponering ved -70°C. 10000 muterede M13-PDN42 plakker og 100 umuterede kontrolplakker blev sigtet ved hjælp af en oligonukleotid-probe behandlet med kinase i nærværelse af ^{32}P-γ-ATP. Ingen af kontrolplakkerne hybridiserede sig til proben, mens 3-10 af de muterede M13-PDN42 plakker hybridiseredes til proben.

En af de muterede M13-PDN42 plakker blev opsamlet og podet i et JM105 dyrkningsmedium. Fra den resulterende ovenstående væske fremstilledes der et ssDNA og fra bakteriecelleklumpen fremstilledes der et dobbeltstrenget (ds)DNA. Der udførtes analyser af basesekvensen ved hjælp af en passende oligonukleotid-primer og ssDNA.

Det viste sig herved at AAC (Asn-42) kodonet var blevet ændret til et AGA (Arg) kodon.

Blandt de muterede M13-PDN42 fager blev den fag i hvilken Asn-42 kodonet var blevet til et Arg-indkodende kodon betegnet M13-PNR42. Dets basesekvens og den aminosyresekvens der indkodes deraf er vist i fig. 44.

Eksempel 29

Stabiliteten af muteinerne CS2, CS3 og CS23

Der blev foretaget undersøgelse af stabiliteten under sure betingelser af humant bFGF renset ved heparin-HPLC og af muteinerne CS2, CS3 og CS23 (vundet ifølge eksempel 24) på følgende måde: Muteinerne og humant bFGF i opløsning i 50 mM natriumacetat (pH 4,0) reguleret til en koncentration på 1 µg/ml, blev særskilt inkuberet ved

37°C. Inkuberingstiden varierede mellem 0 og 1 time med mellemrum på 10 minutter, og aktiviteten bestemtes for de respektive inkuberingstider ved hjælp af det foran nævnte muse-BALB/c3T3 cellesystem. Aktiviteterne for de respektive inkuberingstider blev beregnet i procentforhold baseret på aktiviteten af de ikke-inkuberede standardprøver, der blev ansat til 100%, og blev opstillet til frembringelse af de grafer der er vist i fig. 45. I fig. 45 viser - de respektive kurvemarkeringer - ● -, -▲ -, - ■ - og - o - resultaterne fra henholdsvis humant bFGF, muteinet CS2, muteinet CS3 og muteinet CS23. Humant bFGF inaktiverede sig selv næsten fuldstændigt i løbet af 10 minutter mens muteinerne forblev aktive i længere perioder i den tiltagende rækkefølge CS2, CS3 og CS23. Muteinet CS23 bevarede ca. 50% af sin aktivitet endnu 20 minutter senere. Det fremgår heraf at disse muteiner viste sig at have større stabilitet end humant bFGF.

Eksempel 30

Formeringsfremmende virkning af muteiner på vaskulære endotheliale celler fra human navlestreng

Der blev foretaget bestemmelser af den celleformeringsfremmende virkning på vaskulære endothelceller af humant bFGF renset ved heparin-HPLC og af muteinerne CS2, CS3 og CS23 (dem der var opnået i eksempel 24). Den fremgangsmåde der brugtes til bestemmelserne er som følger:. Der opnåedes humane karendothelieceller fra en vene i en menneske-navlestreng ved perfusion med en trypsinopløsning, og de opretholdtes ved en underkultur ved hjælp af et væskeformigt medium fremstillet ved tilsætning af 2,5% kalvefosterserum og 2,0 ng/ml humant bFGF til GIT-medium (fremstillet af Daigo Eiyo Kagaku K.K., Japan). Til en dyrkningsplade med 96 rum ("Nunc"®, 1-67008) blev der podet 100 µl af en suspension af 2 x 10^3 humane karendotheliceller og det efterfulgtes af dyrkning i et kammer med konstant temperatur og fyldt med kuldioxid. Næste dag til-

sattes der FGF i en sådan mængde at slutkoncentrationen var 2 ng/ml og 100 µl af et medium indeholdende prøver i varierende koncentrationer. Efter 3 dages dyrkning blev mediet indeholdende prøven bortsuget og der tilsattes 100 µl af en 1 mg/1 ml MTT-opløsning (fremstillet ved opløsning af 3-(4,5-dimetyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid i mediet), og dette efterfulgtes af inkubering i 4 timer. Derefter tilsattes der 100 µl 10%s SDS-opløsning (vandig opløsning af natirumdodecylsulfat) og der gennemførtes inkubering i 5-6 timer for at opløseliggøre cellerne og MTT-pigmentet, hvorpå OD_{590}-værdien blev bestemt ved hjælp af et spektrofotometer. Der blev foretaget beregninger af celleformeringshastigheder for respektive prøvekoncentrationer i procentforhold baseret på den maximale formeringshastighed med 8,0 ng/ml humant bFGF, ansat til 100%, og der blev foretaget bestemmelser af de specifikke aktiviteter ved sammenligning af de koncentrationer som resulterede i 50% formeringshastighed med koncentrationen af standard FGF-prøven. De således bestemte specifikke aktiviteter er vist i tabel 5.

Tabel 5

FGF	Specifik aktivitet
CS2	1,6
CS3	3,0
CS23	2,5
Humant bFGF	1,0

Det fremgår af disse resultater at muteinerne har højere specifik aktivitet end humant bFGF.

Eksempel 31

Angioneogenesestyrke af muteiner, bestemt ved CAM-metoden

Der blev foretaget undersøgelser over angioneogenese-potensen in vivo af human-bFGF og renset ved heparin-

HPLC samt muteinerne CS2, CS3 og CS23 (vundet ifølge eksempel 23). Bestemmelserne skete ved CAM (Chorio-allantoinhinde)-bestemmelse. Der brugtes en svagt modificeret teknik af Auerbachs metode (Developmental Biology 41, 391 (1974)] til CAM-bestemmelsen. Efter 3 dages inkubering ved 37°C i en inkubator, blev skallerne fjernet fra befrugtede hønseæg og de inkuberedes videre ved 37°C i endnu en uge ved hjælp af en "Napco" kuldioxidinkubator 6300 (CO_2:0%, H_2O:mættet). En vandig opløsning af hvert protein blev anbragt som en plet over polypropylenskiver med en diameter på 6 mm, således at hvert protein var til stede i mængder på 6,25, 12,5, 25,0 og 50,0 ng. Efter lufttørring i et rent kammer blev skiverne inkuberet ved 37°C i endnu 3 dage mens de stod på en hønse-chorio-allantoinhinde, og man observerede angiogenese-tilstandene ved hjælp af stereoskopi-mikroskop. De konstaterede resultater fremgår af tabel 6. Det bemærkes at der blev anvendt i alt 18 æg for hver prøve og at tabellen i procenttal angiver det antal æg hvori der var konstateret angiogenese.

Tabel 6

	Angiogenesestyrke, %			
FGF	50,0	25,0	12,5	6,25 ng
CS2	77,8	44,4	22,2	0,0
CS3	72,2	61,1	16,7	0,0
CS23	72,2	55,6	22,2	0,0
Humant bFGF	94,4	50,0	33,3	0,0
Bærer	11,1	5,6	11,1	0,0

Det er tydeligt af tabel 6 at bFGF-muteinerne har angiogenesestyrker som er næsten ækvivalente med den der konstateres hos humant bFGF.

Eksempel 32

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB854 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den i eksempel 27 vundne M13-PN10 replikative form (RF) behandledes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (1) til fremstilling af plasmidet pTB854 for human-bFGF-mutein (fig. 46).

Ved anvendelse af dette plasmid pTB854 blev Escherichia coli MM294 transformeret, og herved dannedes stammen Escherichia coli MM294/pTB854 som rummer plasmid pTB854 indeholdende det i fig. 39 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske der derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge afsnit (2) ovenfor opnåede bakteriecelleekstrakt blev bestemt ved den metode der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB854 havde FGF-aktivitet.

På denne måde fremstilledes muteinet TM910, i hvilket Gly i stilling 9 og Ser i stilling 10 af humant bFGF var blevet erstattet med henholdsvis Thr og Met.

Eksempel 33

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB852 for human-bFGF-mutein-ekspression

DNAet fra plasmidet pTB854, der var fremstillet i foranstående eksempel 32, blev spaltet med enzymerne EcoR I og NCo I for at fjerne det DNA-fragment som indkoder de 10 aminosyrerester i N-enden af humant bFGF. Den enkeltstrengede del af hver af de tilbageværende DNA-fragmenter blev fastgjort til den butte ende ved hjælp af Escherichia coli-DNA polymerase I i nærværelse af dATP, dCTP, dGTP, og dTTP og blev ligateret ved anvendelse af en T4 DNA-ligateringsreaktion til konstruktion af plasmidet pTB852 for human-bFGF-mutein (fig. 47).

Escherichia coli MM294 blev transformeret ved hjælp af dette plasmid pTB852, og herved frembragtes stammen Escherichia coli MM294/pTB852 som rummer plasmidet pTB852 med det mutein-indkodende gen som er vist i fig. 48.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket ved den fremgangsmåde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske som derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den i henhold til afsnit (2) vundne celleekstrakt blev bestemt ved den metode der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB852 havde FGF-aktivitet. På denne måde frembragtes muteinet N10, i hvilket aminosyresekvensen fra Pro i stilling 2 til Ser i stilling 10 hos human-bFGF var blevet fjernet.

Eksempel 34

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB795 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den i eksempel 27 fremstillede M13-PN14 replikative form (RF) behandledes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (1) til konstruktion af plasmidet pTB795 for human-bFGF-mutein (fig. 49).

Escherichia coli MM294 transformeredes under anvendelse af dette plasmid pTB795, hvorved man frembragte stammen Escherichia coli MM294/pTB795 (IFO 14700, FERM BP-1660), der rummer plasmidet pTB795 som indeholder det i fig. 40 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (2) til frembringelse af en ovenstående væske der derefter anvendtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den i foranstående afsnit (2) vundne celleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB795 havde FGF-aktivitet. På denne måde frembragtes muteinet N14, i hvilket aminosyresekvensen fra Pro i stilling 2 til Pro i stilling 14 i human-bFGF var blevet fjernet.

Eksempel 35

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB796 for human-bFGF-mutein-ekspression

Den i eksempel 27 frembragte M13-PC86 replikative form (RF) behandledes på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (1) til konstruktion af plasmidet pTB796 for human-bFGF-mutein (fig. 50).

Escherichia coli MM294 transformeredes ved anvendelse af dette plasmid pTB796, og herved fremkom stammen Escherichia coli MM294/pTB796 (IFO 14701, FERM BP-1661) som rummer plasmidet pTB796 indeholdende det i fig. 41 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant dyrkedes ved den i eksempel 2 (2) beskrevne måde til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Den i foranstående afsnit (2) vundne celleekstrakt underkastedes en enzym-immunbestemmelses(EIA)sandwich-metode ved anvendelse af et monoklonalt antistof som vist nedenfor under (a) til (j).

Det viste sig herved at bFGF-muteinet C86 er til stede i celleekstrakten. Således frembragtes på denne måde muteinet C86, i hvilket aminosyresekvensen fra Lys i stilling 87 til Ser i stilling 147 var blevet fjernet.

Nævnte EIA under anvendelse af et monoklonalt antistof blev udført på følgende måde:

(a) Immunisering:

I 4 uger gamle hanmus af stammen BALB/c blev der intraperitonealt injiceret antigenet human-bFGF (vundet

ifølge referenceeksempel 2) i opløsning i 0,4 ml Freunds fuldstændige adjuvans (Difco Laboratories, USA). Tre uger senere blev der intraperitonealt indgivet 10 µg af antigenet hbFGF i opløsning i 0,4 ml Freunds ufuldstændige adjuvans. Yderligere tre uger senere blev der udført samme immunisering og to uger senere blev der intraperitonelt indpodet 10 µg human bFGF i opløsning i fysiologisk saltopløsning.

(b) Cellefusion:

Fra de ifølge ovenstående (a) immuniserede mus blev milten udtaget fire dage efter den sluttelige antigenpåvirkning, og derved vandtes der celler til brug ved cellefusion. Disse celler blev suspenderet i et medium fremstillet ved sammenblanding af Isokov medium og Ham F-12 medium i et mængdeforhold på 1:1 (i det følgende betegnet IH medium).

Musemyelomcellen P3-X63-Ag 8UI blev dyrket i RPMI 1640 medium indeholdende 10% oksefosterserum under en atmosfære af 5% kuldioxid og 95% luft.

Cellefusionen gennemførtes i overensstemmelse med den fremgangsmåde der er fastlagt af Köhler og Milstein (G. Köhler og C. Milstein, Nature 256, 495 (1975)). $2,9 \times 10^7$ celler af ovennævnte myelomcellelinje og $1,5 \times 10^8$ immuniserede lymfocytter frembragt på den ovennævnte måde blev blandet sammen og centrifugeret, og derpå tilsattes der dråbevis 45% polyætylenglykol 6000 (i det følgende betegnet PEG 6000) i opløsning i 0,3 ml IH medium. PEG 6000-opløsningen forvarmedes til 37°C og tilsattes gradvist. 5 minutter senere tilsattes det til 37°C forvarmede IH-medium med en hastighed på 0,5 ml pr. minut til opfyldning til 10 ml. Opløsningen blev derefter centrifugeret ved stuetemperatur med 600 opm i 15 minutter og den overstående væske fjernedes. Dette cellebundfald blev suspenderet i 200 ml IH-medium indeholdende 20% kalveserum og suspensionen overførtes til en 24 rums mikroplade (Linbro) i en mængde på 2 ml pr. rum (well). En dag senere tilførtes

der IH-medium (indeholdende 20% kalveserum) suppleret med HAT (1 x 10^{-4} M hypoxanthin, 4 x 10^{-7} M aminopterin, 1,6 x 10^{-5} M thymidin; i det følgende benævnt HAT-medium) til mikropladen i en mængde på 1 ml pr. rum, og yderligere 3 dage senere blev halvdelen af mediet udskiftet med HAT-medium. De således dyrkede celler er hybridceller.

(c) Søgen efter antistofproducerende celler:

I forvejen var den ovenstående væske fra hybridcellekulturen i en mængde på 100 µl pr. rum tilført til en 36-rums mikrotiterplade fremstillet af polystyren og med human-bFGF immobiliseret dertil, og der udførtes inkubering ved stuetemperatur i 2 timer. Den ovenstående væske fra inkuberingen blev fjernet og efter vask tilsattes der peberrods-peroxidase mærket (HRP-mærket) antimuse IgG gedeantistof (Miles Laboratories) som det sekundære antistof, og inkuberingen gennemførtes ved stuetemperatur i 2 timer. Det sekundære antistof fjernedes og efter grundig vask af rummene blev der gennemført en farvereaktion i nærværelse af tilsat reaktionssubstrat (EIA-metoden). På denne måde konstateredes der kraftig valens i tre rum.

(d) Kloning af hybridceller:

Celler i hver af disse tre rum blev udsået i en mængde på 0,5 celle pr. rum i en 96-rums mikrotiterplade på hvilken der var udsået 10^4 celler pr. rum, nemlig thymocytter som vegetative celler, og der udførtes kloning. Som resultat heraf fremkom der tre kloner, nemlig musehybridomet HbF52 (IFO 50143) og musehybridomet HbF78 (IFO 50144).

(e) Ascites-dannelse af hybridceller:

2 x 10^6 celler af hver af musehybridomerne HbF52 eller musehybridomet HbF78 blev indpodet i mus i hvilke der i forvejen intraperitonealt var indgivet mineralolie. Ti dage senere opsamledes der 2 ml ascites fra hver af musene, og herved opnåede man henholdsvis det monoklonale antistof MoAb52 og det monoklonale antistof MoAb78.

(f) Det således vundne monoklonale antistof MoAb78 blev underkastet rensning for ascitesvæske i overensstemmelse med den metode der er angivet af Stachelin et al., The Journal of Biological Chemistry 256, 9750 (1981). Det på denne måde vundne antistof koncentreredes til mere end 2 mg/ml og underkastedes dialyse i 0,2M fosfatpuffer (pH 7,0). Til den derved fremkomne 1,4 ml opløsning af MoAb78 (koncentration 2,8 mg/ml) sattes der 50 µl S-acetylmerkaptoravsyreanhydrid (Aldrich Co., USA) opløst i N,N'-dimetylformamid således at koncentrationen blev 11,5 mg/ml. Luften i reaktionsbeholderen blev udskiftet med nitrogengas. Beholderen lukkedes hermetisk og der omrørtes til fremkaldelse af en reaktion med indføring af SH-gruppen. Det uomsatte S-acetylmerkaptoravsyreanhydrid blev inaktiveret ved behandling i 10 minutter ved 130 µl 0,2M tris.HCl (pH 7,0), 13 µl 0,2M EDTA og 130 µl 2M hydroxyamin (pH 7,0). MoAb78 udvandtes ved gelfiltrering på en kolonne pakket med "Sephadex"® G-25 (diameter 1 cm, 80 cm høj, Farmacia, Sverige; og strømningshastighed 20 ml/time).

(g) 10 mg peberrodsoxidase (HRP, Boehringer Manheim, Grade I, Vesttyskland) opløses i 1,4 ml 0,1M fosfatpuffer (pH 6,8). På den anden side opløstes 14 mg N-hydroxysuccinimidester af N-(4-karboxycyklohexylmetyl)-maleimid i 335 µl DMF, og 100 µl af den således vundne opløsning sattes til den ovennævnte HRP-opløsning. Luften i reaktionsbeholderen udskiftedes med nitrogengas og beholderen lukkedes hermetisk. Efter 1 times reaktion ved stuetemperatur blev der foretaget gelfiltering ved hjælp af en kolonne pakket med "Sephadex"® G-25 som beskrevet ovenfor under (f) til udvinding af proteiner af den del af det monoklonale MoAb78, hvori der var indført SH-grupper.

(h) 6 ml den del af det monoklonale antistof MoAb78, hvori der var indført SH-grupper, vundet ovenfor i henhold til (f), og 2 ml af den portion HRP hvori der var indført maleimidgrupper i henhold til foranstående afsnit (g) sammenblandedes og blandingen koncentreredes til 1 ml ved hjælp af en collodiumpose (Sartorius, Vesttyskland) under

nedsat tryk ved 4°C i 20 timer. Efter reaktionen blev det uomsatte HRP, hvori der var indført SH-grupper, fjernet ved hjælp af en kolonne med "Ultrogel"® AcA44 (LKB Co., diameter 1 cm x 80 cm, strømningshastighed 10 ml/time). Blandt eluaterne har den fraktion som indeholder 2,4 HPR/antistof de højeste HRP-tal pr. antistofmolekyle. Det på denne måde vundne materiale anvendtes i EIA nedenfor under (i).

(i) Det monoklonale antistof MoAb52 vundet ovenfor under (e) blev renset på den måde der er beskrevet ovenfor under (f). Det monoklonale antistof MoAb52 blev fortyndet med PBS til en koncentration på 10 µg/ml eller 20 µg/ml, og fortyndingsmidlet udhældtes i "Immuno"®-plate ("Nunc"®, Danmark) så det androg 100 µl/rum. Pladen henstod ved 4°C natten over for at adsorbere det monoklonale antistof MoAb52 til pladen. Efter fjernelse af den del af antistof som ikke var adsorberet, blev pladen vasket tre gange med PBS, og der sattes PBS indeholdende 0,01% mertiolat og 1% okseserumalbumin (BSA) til pladen i en mængde på 200 µl/rum hvorpå pladen henstod natten over ved 4°C.

(j) Celleekstrakten indeholdende bFGF-mutein C86, vundet som ovenfor beskrevet under (2), blev fortyndet med PBS indeholdende 0,1% BSA. BSA-opløsningen fjernedes fra den i henhold til ovenstående punkt (i) vundne plade, pladen vaskedes fire gange med PBS og det fortyndede bFGF-mutein C86 sattes til pladen til en mængde på 100 µl/rum for at adsorbere til pladen ved 4°C natten over. Det uomsatte mutein C86 fjernedes og pladen vaskedes fire gange med PBS. Det monoklonale antistof konjugeret med HRP vundet som beskrevet ovenfor under (h) blev fortyndet med BPS indeholdende 0,1% BSA til 1/300 og fortyndingsmidlet sattes til pladen således at mængden androg 100 µl/rum. Reaktionen udførtes i 4 timer ved stuetemperatur. Efter fjernelse af antistoffet blev pladen vasket 6 gange med PBS og der sattes substrat for oxidase (BioRad Co., USA) til pladen indtil 100 µl/rum. Der udførtes mængdebestemmelse ved absorptionsmålinger ved 415 nm, og det bekræftedes at

der var dannet en lille mængde af muteinet C86.

Eksempel 36

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmid pTB855 for human-bFGF-mutein-ekspression

DNA fra plasmidet pTB669, vundet ifølge foranstående referenceeksempel 2, blev spaltet med et restriktionsenzym Hinc II og det blev ligateret med EcoR I kobler p(5' CATGAATTCATG 3') under T4 DNA-ligasereaktion. Det således vundne DNA blev yderligere spaltet med restriktionsenzymerne EcoR I og Pst I til udvinding af et DNA-fragment på ca. 0,35 kb. Dette DNA-fragment blev ligateret med det i eksempel 2 (1) vundne DNA-fragment på ca. 3,2 kb, hvilket fragment var opnået ved spaltning af plasmidet ptrp781 med EcoR I-Pst I, hvorved plasmidet pTB855 for human-bFGF-mutein-ekspression blev konstrueret (fig. 48).

Escherichia coli MM294 blev transformeret ved hjælp af dette plasmid pTB855, og herved vandtes stammen Escherichia coli MM294/pTB855 som rummer plasmidet pTB855 med

det i fig. 49 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den i eksempel 2 (2) beskrevne måde til frembringelse af en ovenstående væske der derefter brugtes som bakteriecelleekstrakt.

(3) Human-bFGF-aktivitet af bakteriecelleekstrakten

Human-bFGF-aktiviteten af den ifølge (2) ovenfor vundne bakteriecelleekstrakt blev bestemt på den måde der er beskrevet i eksempel 2 (3).

Det viste sig herved at bakteriecelleekstrakten fra E. coli MM294/pTB855 havde FGF-aktivitet. Der var således frembragt muteinet N41, i hvilket aminosyresekvensen fra Pro i stilling 2 til Val i stilling 41 af human-bFGF var udgået.

Eksempel 37

Ekspression i Escherichia coli af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmidet pTB856 for human-bFGF-mutein-ekspression

DNA fra plasmidet pTB669, der var vundet ifølge referenceeksempel 2, blev delvis spaltet med et restriktionsenzym BamHI til dannelse af et BamHI-genkendelsessted i bFGF-genet. Stedet blev yderligere spaltet med DNA-polymerase I fra Escherichia coli i nærværelse af dATP, dCTP, dGTP og dTTP til at give den butte ende. Dette DNA ligateredes med NheI-kobler p(5'CTAGCTAGCTAG 3') under en T4 DNA-ligasereaktion. Efter behandling med restriktionsenzymet NheI og ligatering af det spaltede sted under en T4 DNA-ligasereaktion blev plasmidet pTB856 for human-bFGF-mutein-ekspression konstrueret (se fig. 50).

Escherichia coli MM294 blev transformeret ved hjælp af dette plasmid pTB856, og herved frembragtes stammen

Escherichia coli MM294/pTB856 som rummer plasmidet pTB856 som er udstyret med det i fig. 51 viste mutein-indkodende gen.

(2) Fremstilling af bakteriecelleekstrakt

Ovennævnte transformant blev dyrket på den måde som er beskrevet i eksempel 2 (2); den herved fremkomne overstående væske blev derpå brugt som bakteriecelleekstrakt.

(3) Den under (2) ovenfor vundne celleekstrakt blev underkastet en enzym-immunbestemmelse (EIA), sandwich-metoden, på den måde der er beskrevet i eksempel 35 (3). Det bekræftedes herved at bFGF-muteinet er til stede i celleekstrakten. Der var således frembragt muteinet C129, i hvilket aminosyresekvensen fra Lys i stilling 130 til Ser i stilling 147 var blevet udeladt.

Eksempel 38

Ekspression i en dyrecelle af et gen som indkoder human-bFGF-mutein

(1) Konstruktion af plasmiderne pTB831, pTB833 og pTB835 for human-bFGF-mutein-ekspression

Det ifølge eksempel 7 opnåede plasmid pTB762 blev spaltet med restriktionsenzymerne EcoR I-BamHI til frembringelse af et DNA-fragment på 0,38 kb og indeholdende et kodende område som indkoder human-bFGF-mutein CS23, i hvilket Cys i stilling 70 og i stilling 88 er blevet udskiftet med Ser.

På den anden side blev plasmidet pTB504 (eksempel 1 (ii) i japansk offentliggjort patentansøgning nr. 62-175182, der svarer til europæisk patentpublikation nr. 225 701) spaltet med restriktionsenzymet Cla I-EcoR I til frembringelse af et DNA-fragment på 1,7 kb og indeholdende leukæmivirus (MuL V) LTR-område, SV40 tidlig promoter, sammensplejsningssted og en human-interleukin-2 (IL-2) ledersekvens.

Endvidere blev plasmidet pTB627, opnået ifølge referenceeksempel 1, spaltet med restriktionsenzymet Cla I-EcoR I til dannelse af et 2 kb stort DNA-fragment, og plasmidet pTB389 blev spaltet med restriktionsenzymet Cla I-EcoR I til dannelse af et 2,6 kb stort DNA-fragment. De således vundne DNA-fragmenter på henholdsvis 2 kb og 2,6 kb blev ligateret til dannelse af plasmidet pTB675, der indkoder human-bFGF. Ovennævnte plasmid pTB389 blev opnået ved omdannelse både af PstI-spaltningsstedet i det 5'-terminale område og BamHI-spaltningsstedet i det 3'-terminale område af interleukin-2 gen-området af plasmidet pTB106 (angivet i japansk offentliggjort patentansøgning nr. 61-63282 som svarer til europæisk patentpublikation nr. 172619) til EcoRI, for at fjerne interleukin-2 genområdet. Derefter blev plasmidet pTB675 spaltet med restriktionsenzymerne ClaI-BamHI til dannelse af et DNA-fragment på 3,4 kb, der indeholder et kodende område for aminosyrer i C-enden af human-bFGF, et ikke-kodende område, et ampicillinresistent gen stammende fra plasmidet pBR322 og en formeringsoprindelse i Escherichia coli.

De ovennævnte tre DNA-fragmenter (dvs. 0,38 kb DNA-fragmentet, 1,7 kb DNA-fragmentet og 3,4 kb DNA-fragmentet) blev ligateret ved hjælp af T4 DNA-ligase til dannelse af plasmidet pTB831 (fig. 52).

På tilsvarende måde blev det ifølge eksempel 18 vundne plasmid pTB763, der indkoder human-bFGF-muteinet CS14 (i hvilket Cys i stillingerne 26 og 93 af human-bFGF var blevet udskiftet med Ser) eller plasmidet pTB765 vundet ifølge eksempel 11, der indkoder human-bFGF-muteinet CS1234 (i hvilket Cys i stillingerne 26, 70, 88 og 93 af human-bFGF var blevet udskiftet med Ser) anvendtes i stedet for plasmidet pTB762 i den ovenfor beskrevne fremgangsmåde, hvorved man konstruerede henholdsvis plasmidet pTB833 og plasmidet pTB835.

(2) Ekspression i dyreceller

Abe COS7-celler blev podet i vævskulturskåle med en diameter på 6 cm, med DMEM-medium indeholdende 10% kalvefosterserum, og efter 24 timer blev dyrkningsmediet udskiftet med et nyt. Efter 4 timer blev 10 µg DNA fra plasmidet pTB831, pTB833 eller pTB835 overført til COS7-celler i overensstemmelse med kalciumfosfatmetoden (Graham et al., Virology, 52, 456 (1973)). Næste dag blev dyrkningsmediet udskiftet med DMEM-medium indeholdende 1% kalvefosterserum. Efter 48 timers dyrkning blev den dyrkede væske inklusive celler opsamlet og cellerne fraskiltes. Cellerne vaskedes to gange med PBS og suspenderedes derefter i PBS. Suspensionen blev underkastet ultralydsbehandling i kort tid og derefter underkastet centrifugering i 15 minutter ved 15000 opm til frembringelse af en ovenstående væske.

Der blev gennemført en bestemmelse af human-bFGF-aktivitet på den dyrkede dyrkningsvæske for COS7-celler inficeret med plasmidet og på ekstrakten fra cellerne; bestemmelsen skete på den i eksempel 2 (3) beskrevne måde. De herved konstaterede resultater fremgår af tabel 7.

Tabel 7

Plasmid	Mutein	FGF-aktivitet (ng/skål) Dyrket væske	Ekstrakt fra celler
pTB831	CS23	115	420
pTB833	CS14	0,2	35
pTB835	CS1234	1,1	20
-		<0,02	1

P A T E N T K R A V

1. Mutein af basisk fibroblastvækstfaktor (bFGF), som er et udskiftningstypemutein eller en kombination af et udskiftningstype- og et udeladelsestypemutein, hvor

et udskiftingstypemutein er et mutein, hvor mindst én af de fire cysteinrester i den indgående aminosyresekvens af den naturlige type bFGF udskiftes med én aminosyre anden end cystein, og

et udeladelsestypemutein er et mutein, hvor 1-41 aminosyrer mangler fra aminoterminalen af den indgående aminosyresekvens af bFGF og/eller 1-61 aminosyrer mangler fra carboxyterminalen af den indgående aminosyresekvens af bFGF.

2. Mutein ifølge krav 1, hvor den naturlige type bFGF indbefatter aminosyresekvensen:
Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro
i dens molekyle.

3. Mutein ifølge krav 1 og 2, hvor den nye indførte aminosyre er en neutral aminosyre.

4. Mutein ifølge krav 3, hvor den neutrale aminosyre udvælges fra gruppen bestående af glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin og methionin.

5. Mutein ifølge krav 4, hvor den neutrale aminosyre er serin eller threonin.

6. Mutein ifølge krav 5, hvor den neutrale aminosyre er serin.

7. Mutein ifølge krav 6, hvor cysteinresten i position 70 af human bFGF er udskiftet med serin.

8. Mutein ifølge krav 6, hvor cysteinresten i position 88 af human bFGF er udskiftet med serin.

9. Mutein ifølge krav 6, hvor cysteinresterne i position 70 og position 88 af human bFGF er udskiftet

med serin.

10. Mutein ifølge krav 1, hvor mindst én aminosyre mangler fra aminoterminalen af de indgående aminosyrer af bFGF.

11. Mutein ifølge krav 1, hvor mindst én aminosyre mangler fra carboxyterminalen af de indgående aminosyrer af bFGF.

12. Rekombinant DNA med en basesekvens, som koder for muteiner af basisk fibroblastvækstfaktor (bFGF), som defineret i et vilkårligt af kravene 1-11.

13. Rekombinant DNA ifølge 12, hvor den nye indførte aminosyre er en neutral aminosyre, udvalgt fra gruppen bestående af glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin og methionin.

14. Rekombinant DNA ifølge krav 13, hvor den nye indførte aminosyre er serin.

15. Rekombinant DNA ifølge krav 12, hvori mindst én aminosyre mangler fra aminoterminalen eller carboxyterminalen af de indgående aminosyrer af bFGF.

16. Transformant indeholdende en vector, indeholdende et rekombinant DNA med en basesekvens, som koder for muteinet af basisk fibroblastvækstfaktor (bFGF), som defineret i et vilkårligt af kravene 1-11.

17. Transformant ifølge krav 16, hvor den nye indførte aminosyre er en neutral aminosyre, udvalgt fra gruppen bestående af glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin og methionin.

18. Transformant ifølge krav 17, hvor den nye indførte aminosyre er serin.

19. Transformant ifølge krav 16, hvor mindst én aminosyre mangler fra aminoterminaler eller carboxyterminalen af den indgående aminionsyre af bFGF.

20. Fremgangsmåde til fremstilling af et mutein af

basisk fibroblastvækstfaktor (bFGF), som omfatter dyrkning af en transformant, indeholdende en vector, indeholdende et rekombinant DNA med en basesekvens, som koder for et mutein af bFGF, som defineret i et vilkårligt af kravene 1-11 i et dyrkningsmedie for at producere og ophobe muteinet i kulturvæsken.

21. Fremgangsmåde ifølge krav 20, hvor den nye indførte aminosyre er en neutral aminosyre, udvalgt fra gruppen bestående af glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, tryptofan, serin, threonin og methionin.

22. Fremgangsmåde ifølge krav 21, hvor den nye indførte aminosyre er serin.

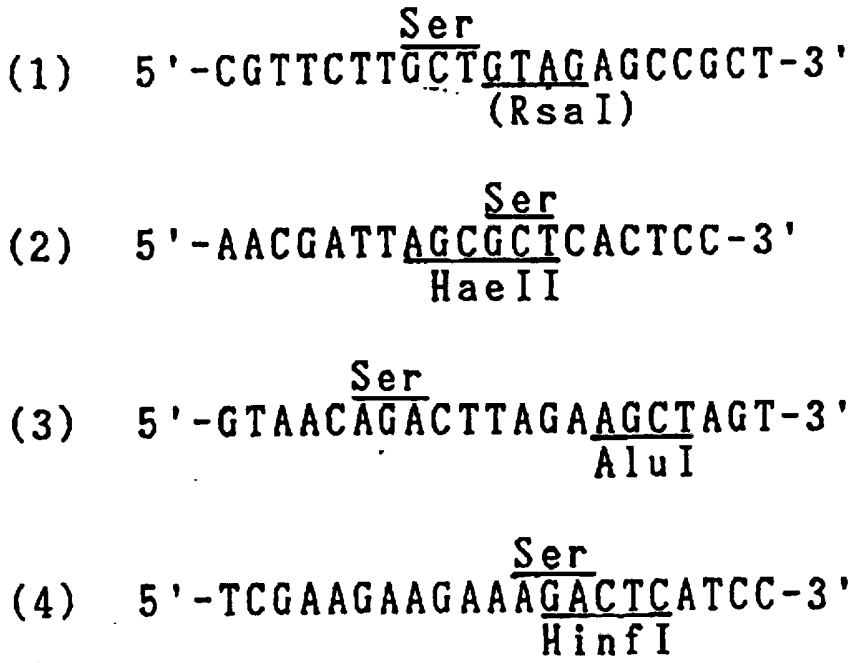
23. Fremgangsmåde ifølge krav 20, hvor mindst én aminosyre mangler fra aminoterminalen eller carboxyterminalen af den indgående aminosyre for bFGF.

Figur 1

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA    120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG    180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT    240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu     100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA    300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys     120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA    360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT    420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                         147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                         444
```

DK 173269 B1

Figur 2


(1) 5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3'
Ser
(RsaI)
(2) 5'-AACGATTAGCGCTCACTCC-3'
Ser
HaeII
(3) 5'-GTAACAGACTTAGAAGCTAGT-3'
Ser
AluI
(4) 5'-TCGAAGAAGAAAGACTCATCC-3'
Ser
HinfI

Figur 3

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe      140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444
```

Figur 4

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA    120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG    180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT    240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu     100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA    300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys     120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA    360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT    420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                         147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                         444
```

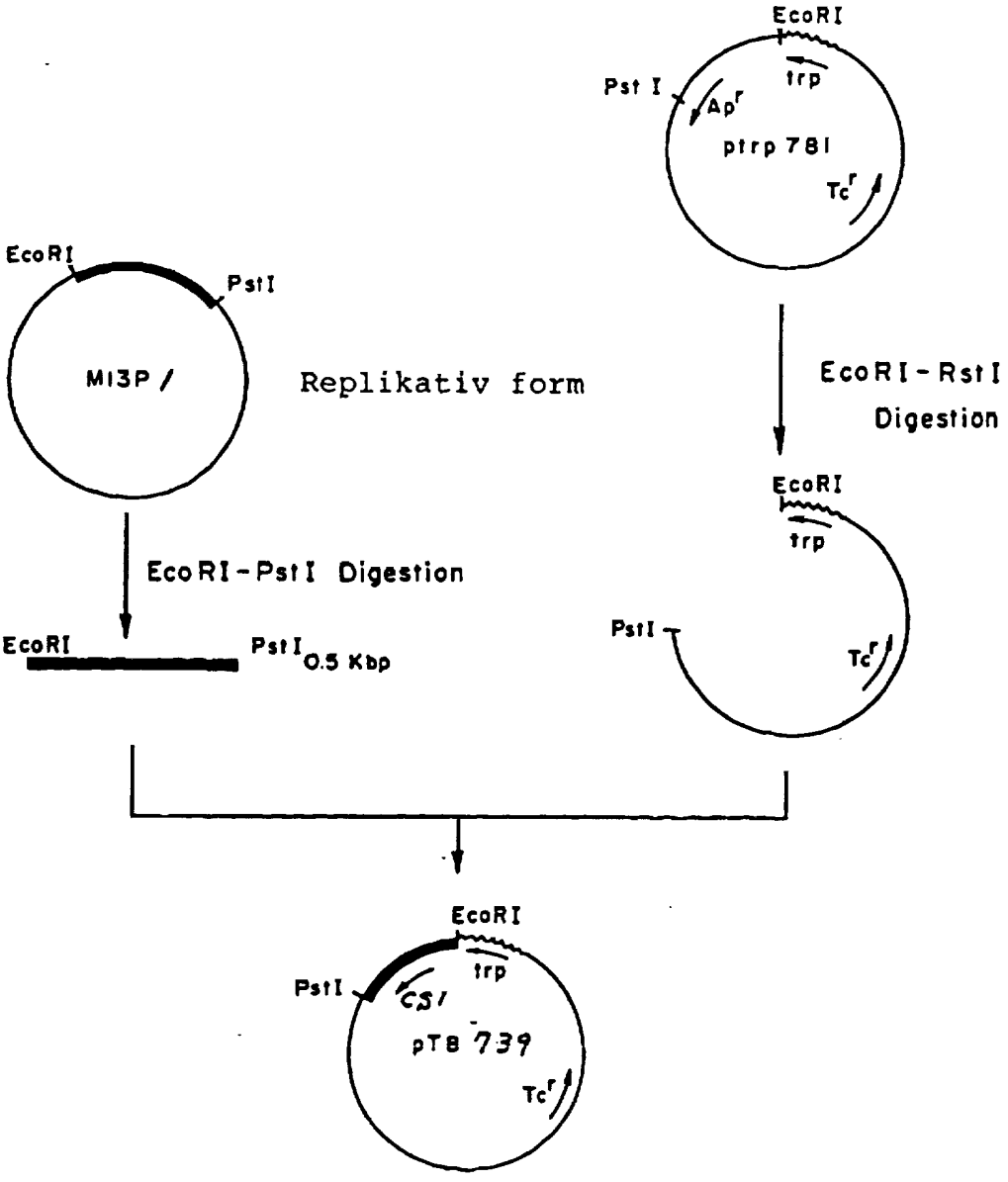
Figur 5

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA    120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG    180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT    240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu     100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA    300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys     120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA    360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT    420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                         147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                         444
```

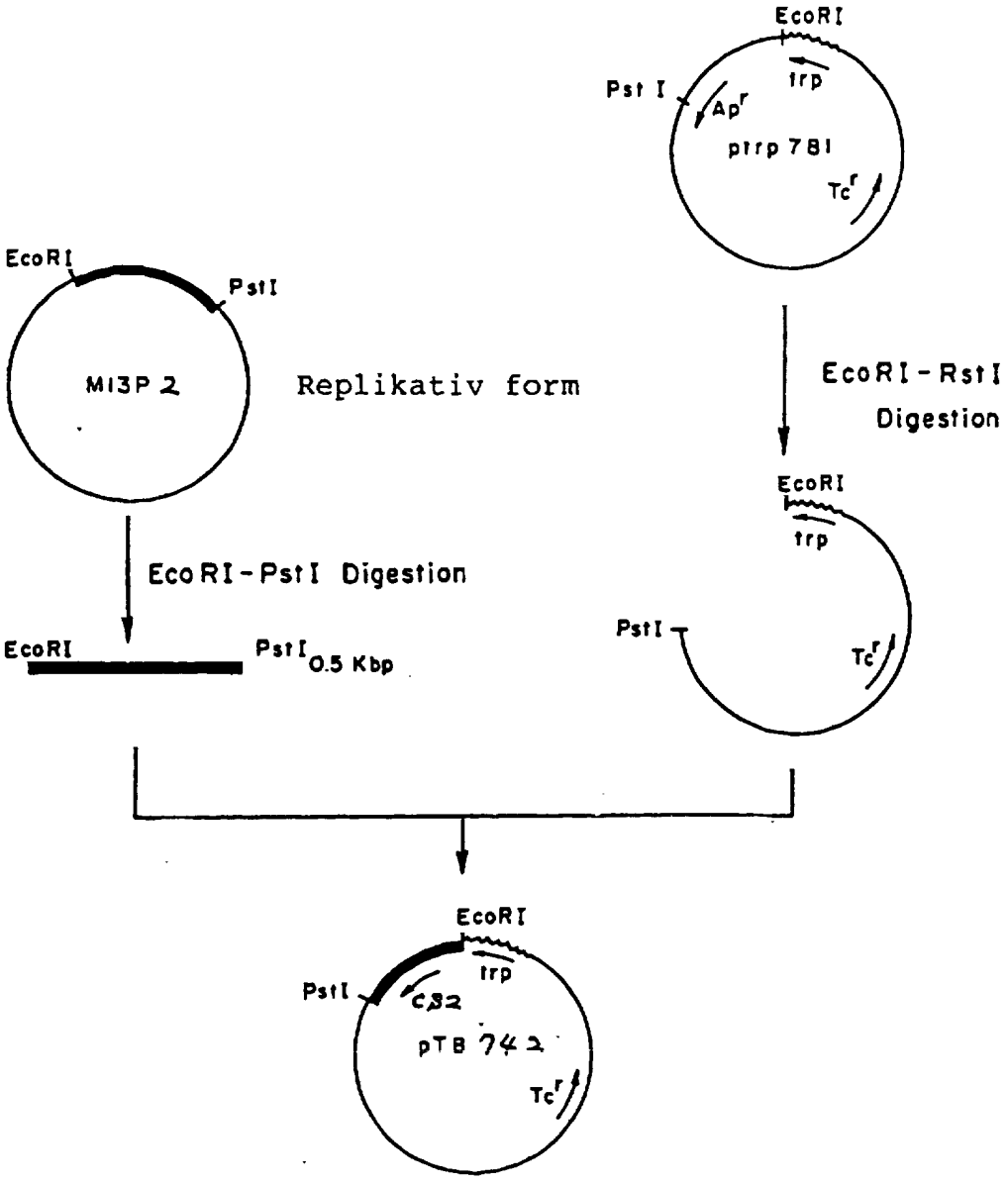
Figur 6

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA    120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG    180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT    240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu     100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA    300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys     120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA    360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT    420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                         147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                         444
```

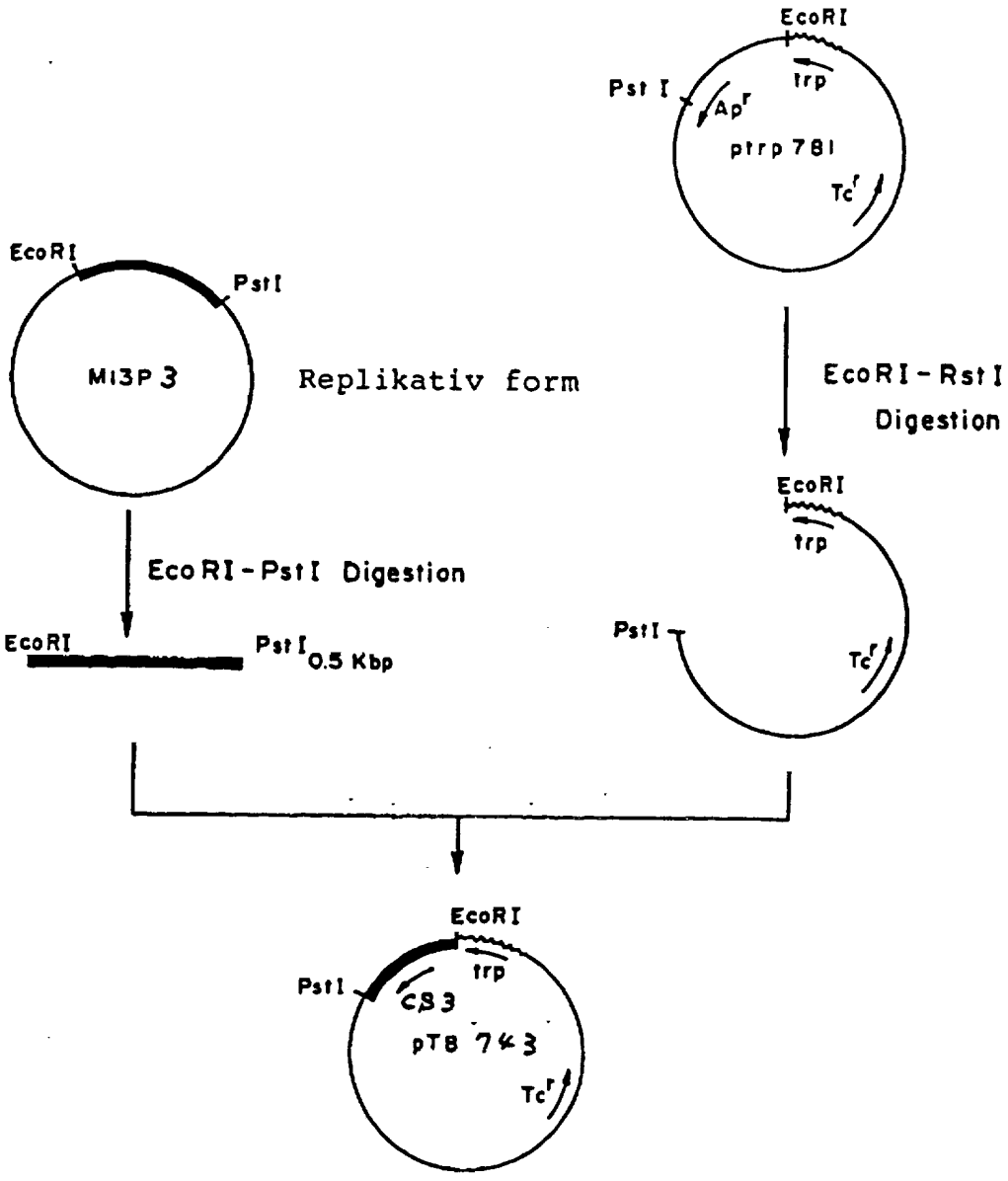
Figur 7


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P /
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS/
pTB 739
Tc^r

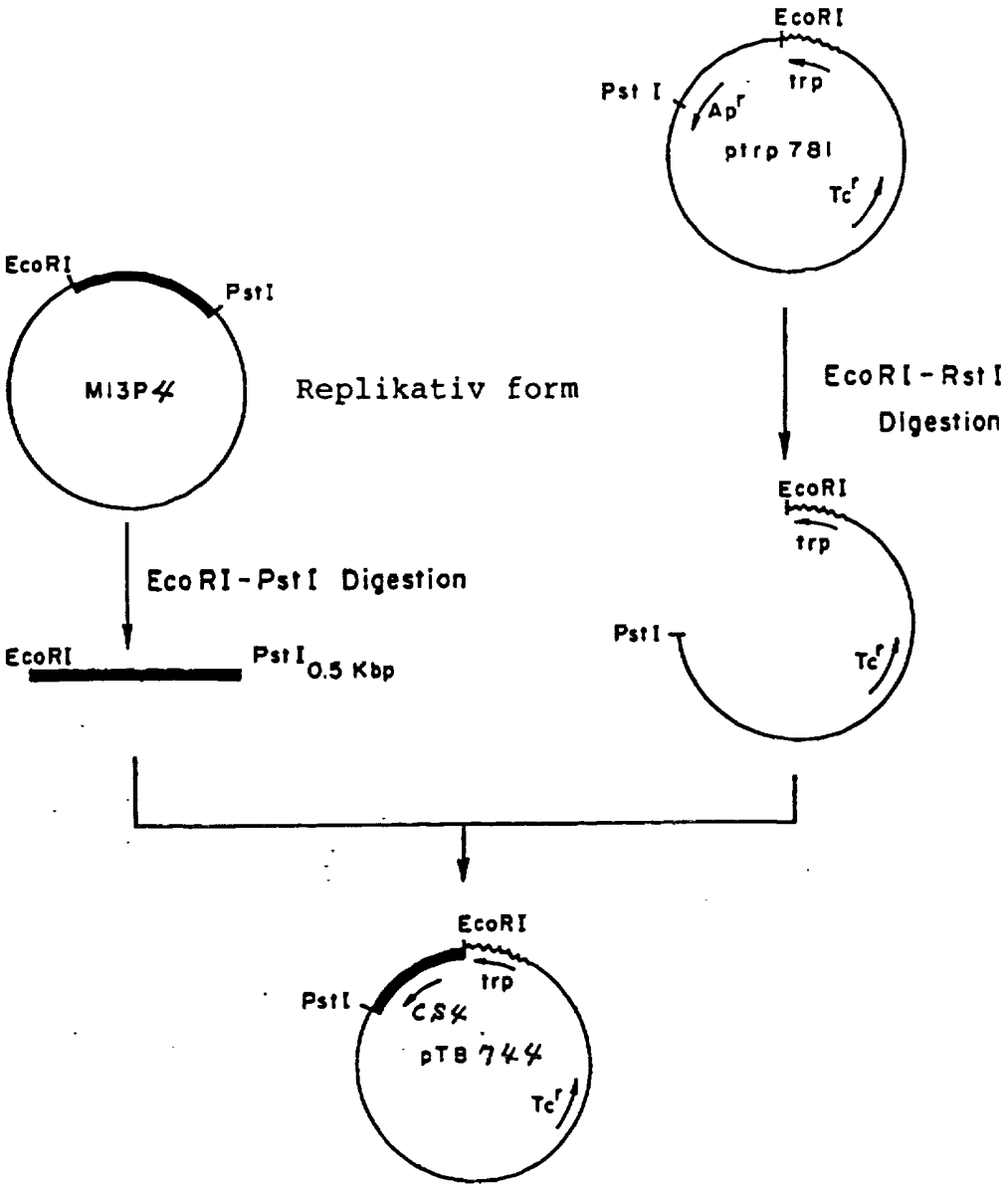
Figur 8


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 2
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
PstI
trp
CS2
pTB 742
Tc^r

Figur 9


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 3
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS 3
pTB 743
Tc^r

Figur 10

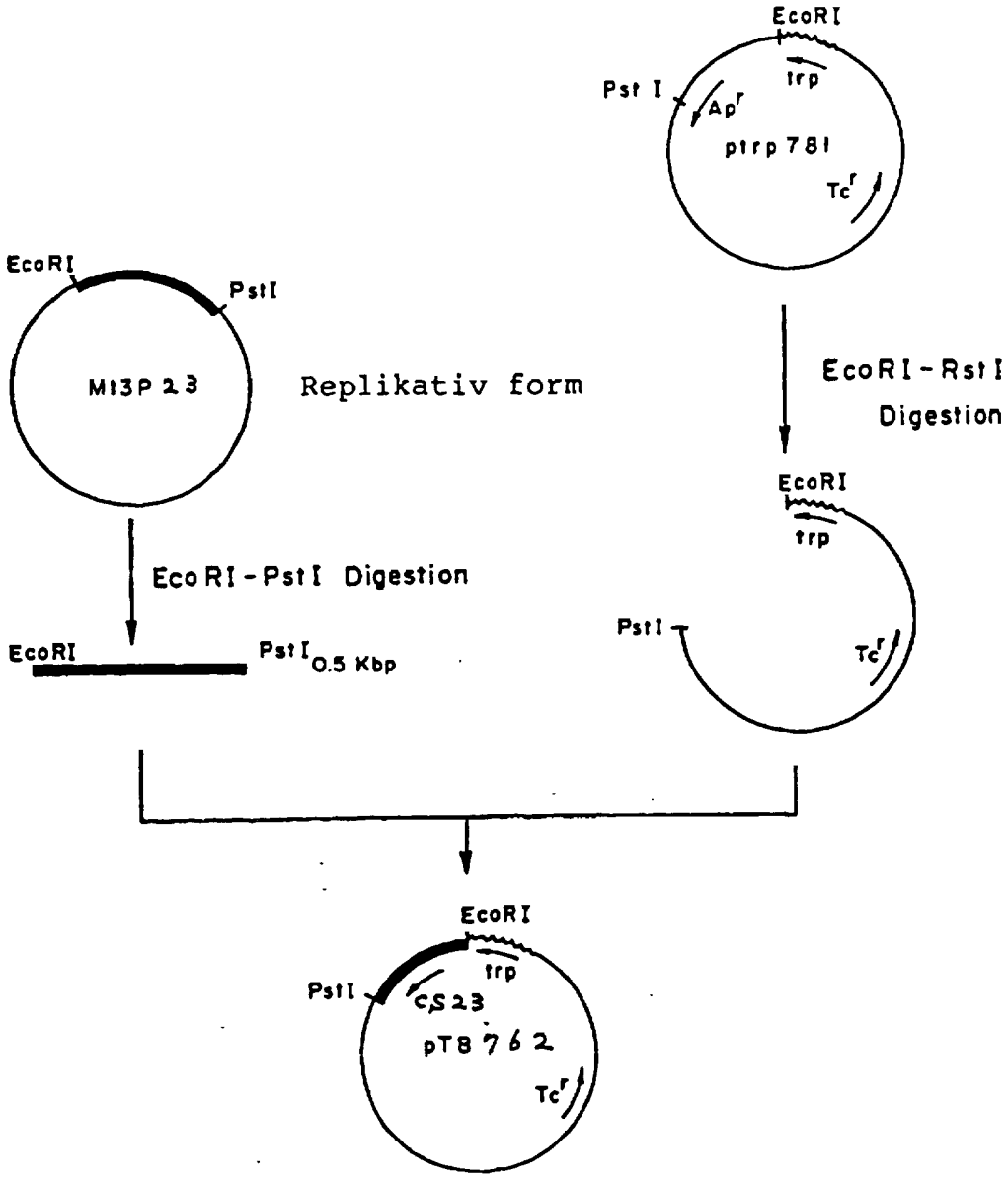

EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
MI3P4
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS4
pTB 744
Tc^r

Figur 11

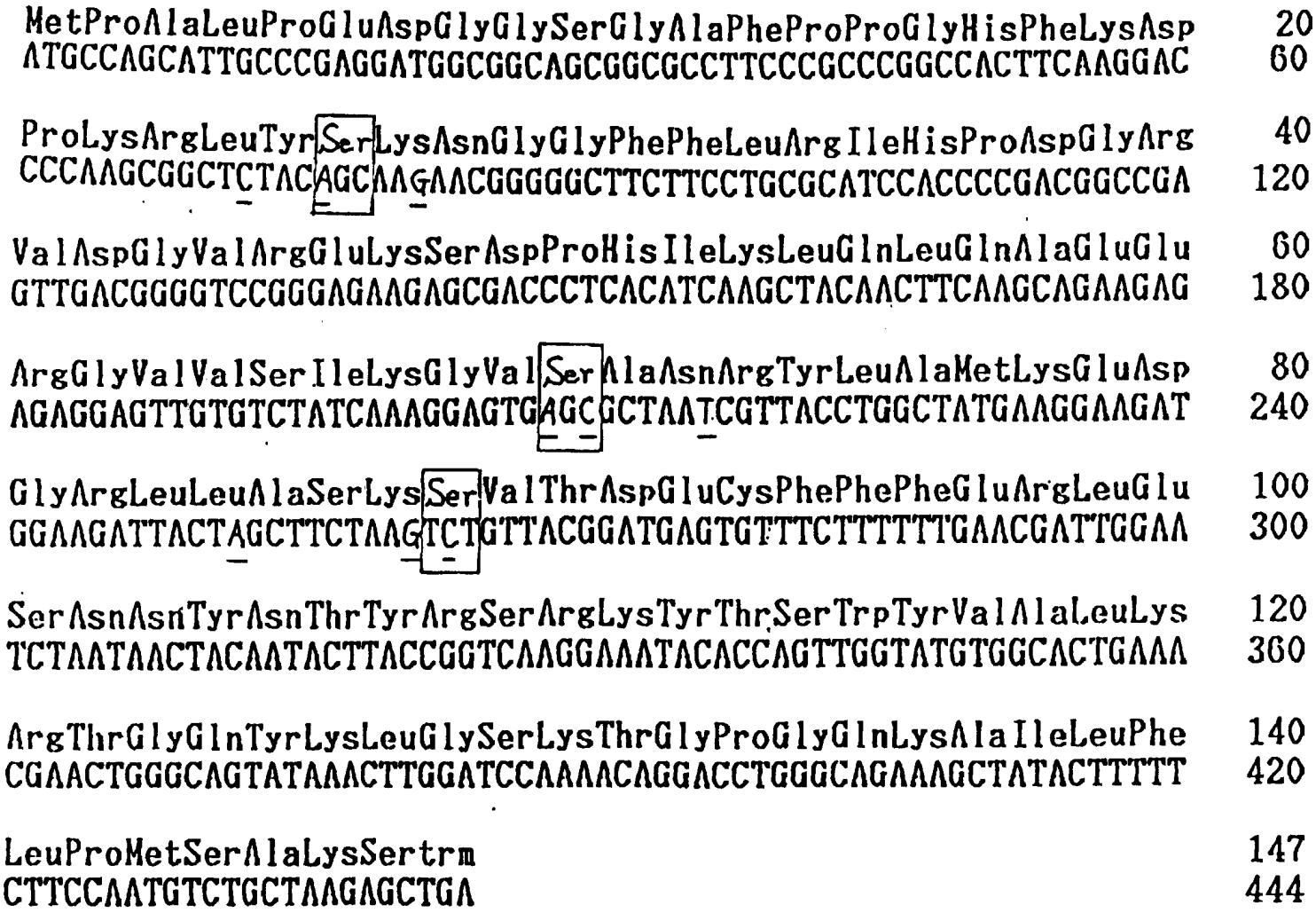
```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444
```

DK 173269 B1

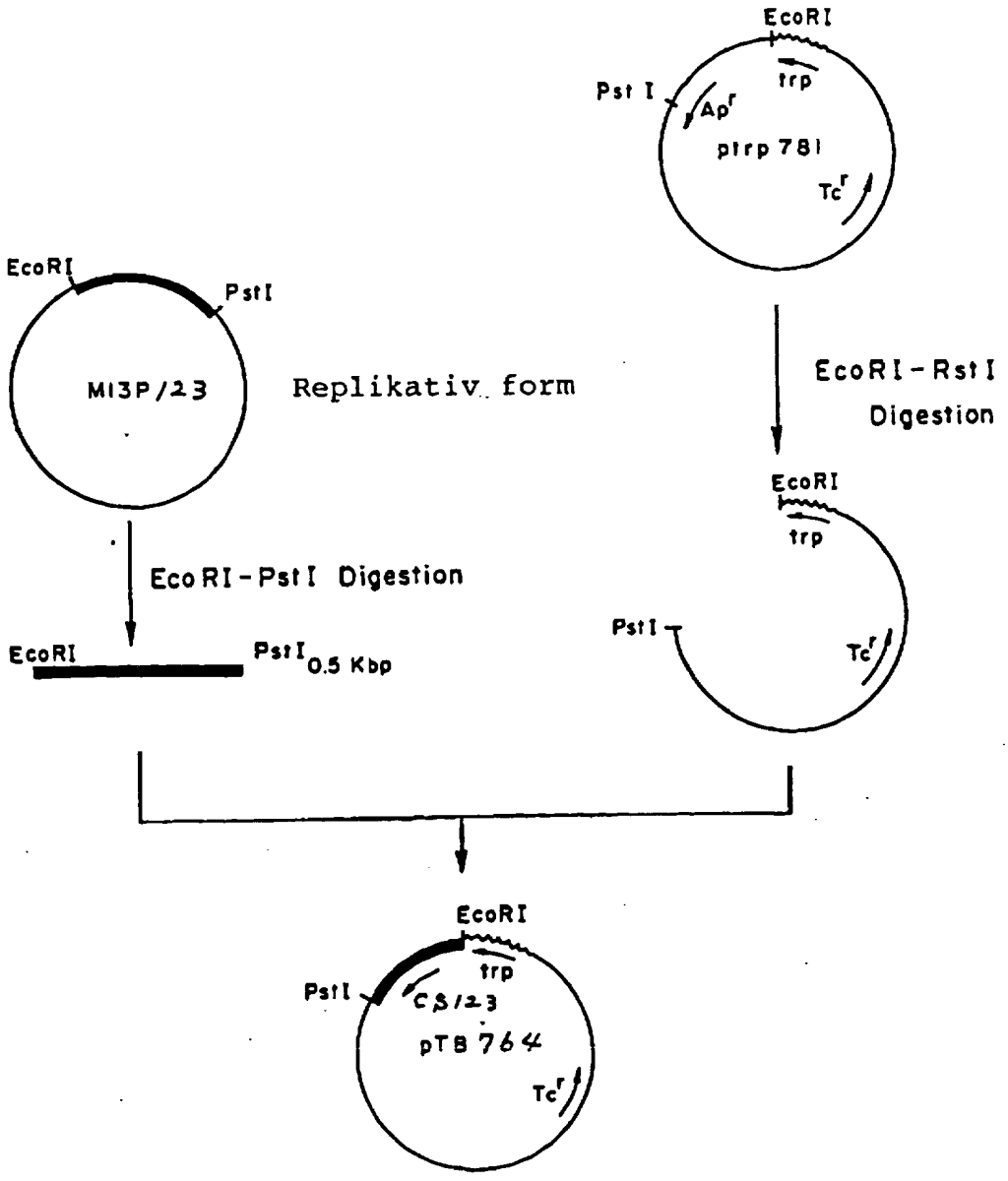
Figur 12


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 23
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS 23
pT8 762
Tc^r

Figur 13


MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp 20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC 60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg 40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu 60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp 80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu 100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys 120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe 140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT 420
LeuProMetSerAlaLysSertrm 147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA 444

Figur 14

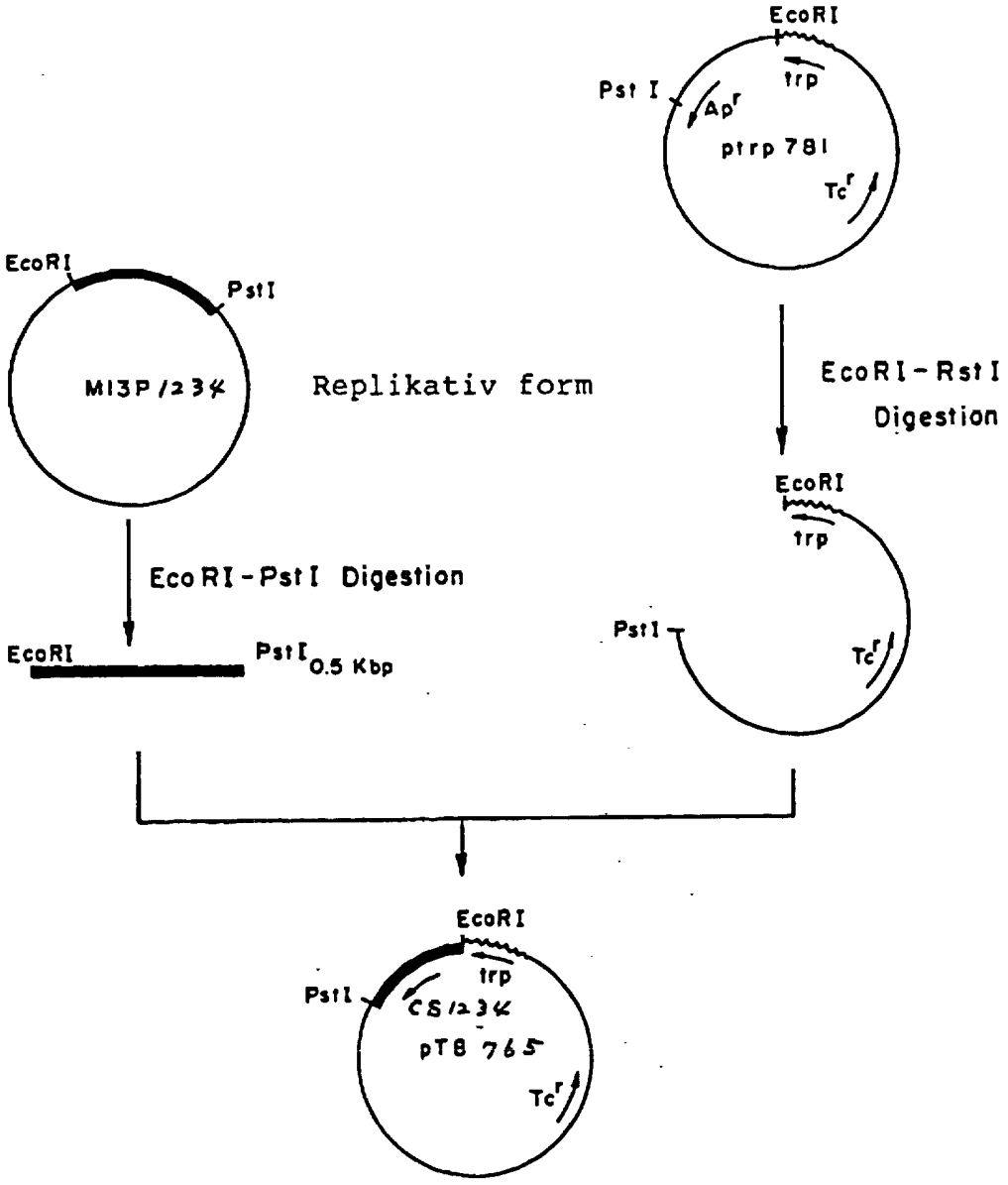

EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P/23
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS/23
pTB 764
Tc^r

Figur 15

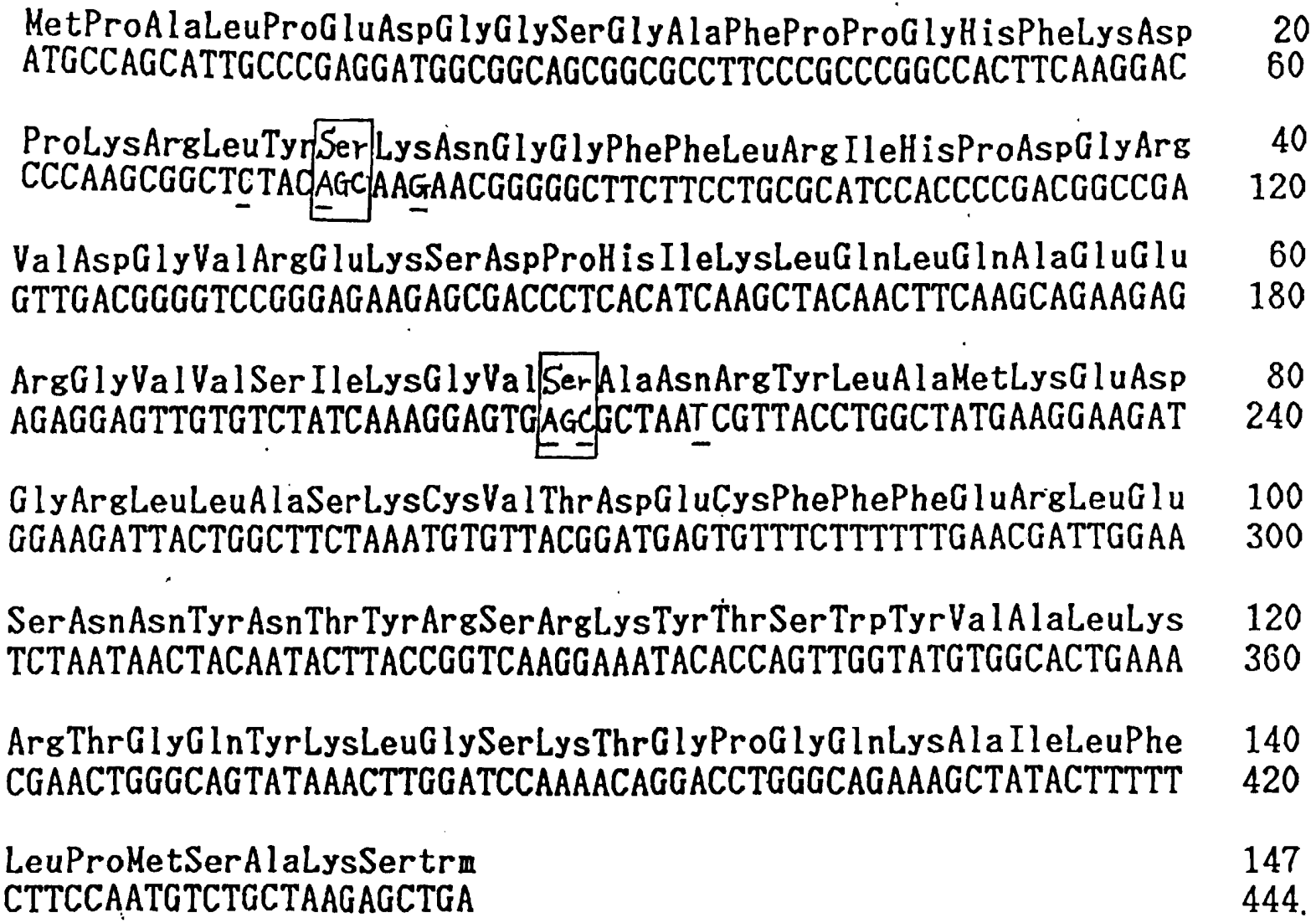
```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe      140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444
```

DK 173269 B1

Figur 16

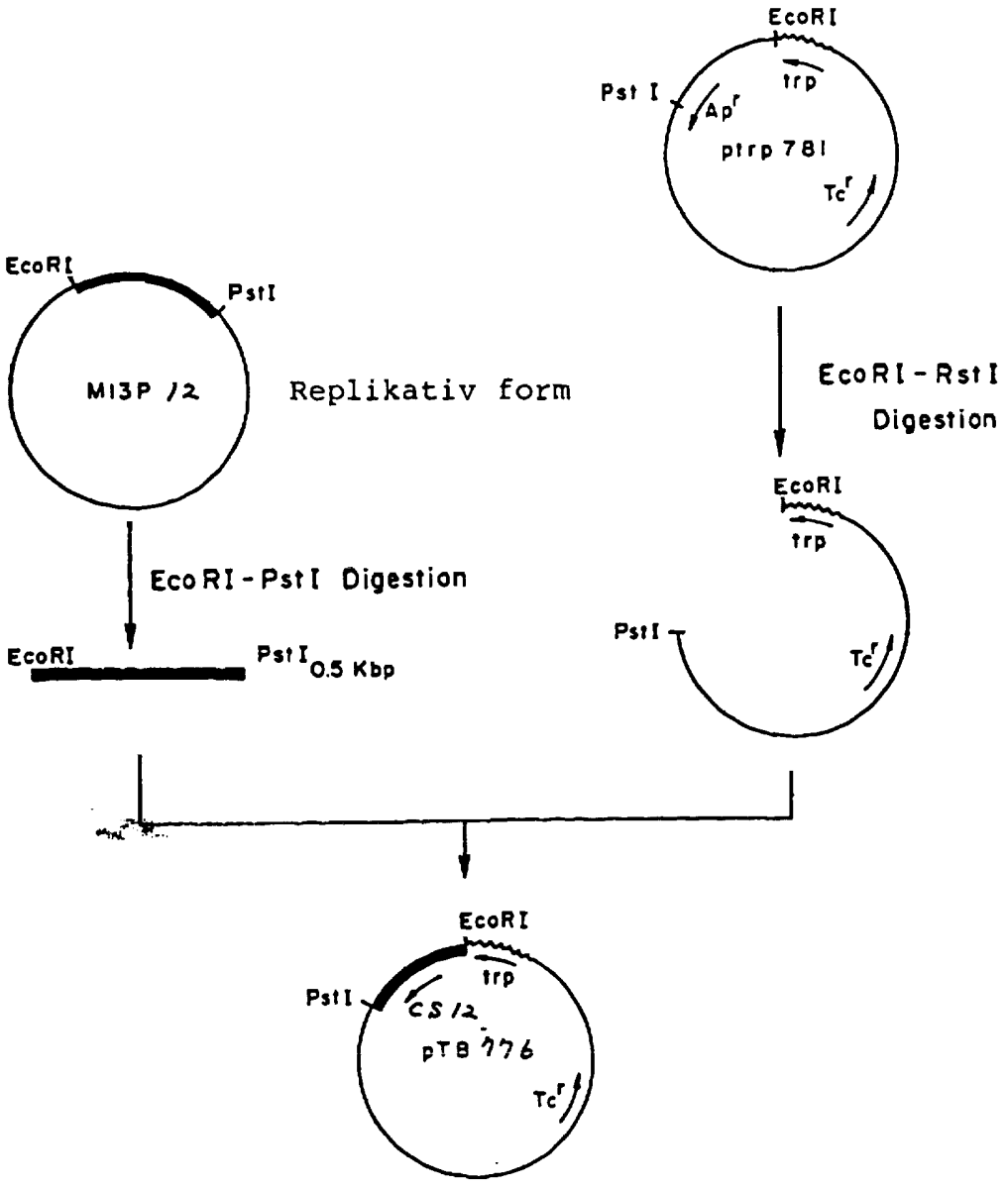

EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P/23K
Replikativ form
EcoRI-RstI
Digestion
EcoRI-PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS/23K
pT8 765
Tc^r

Figur 17



DK 173269 B1

Figur 18

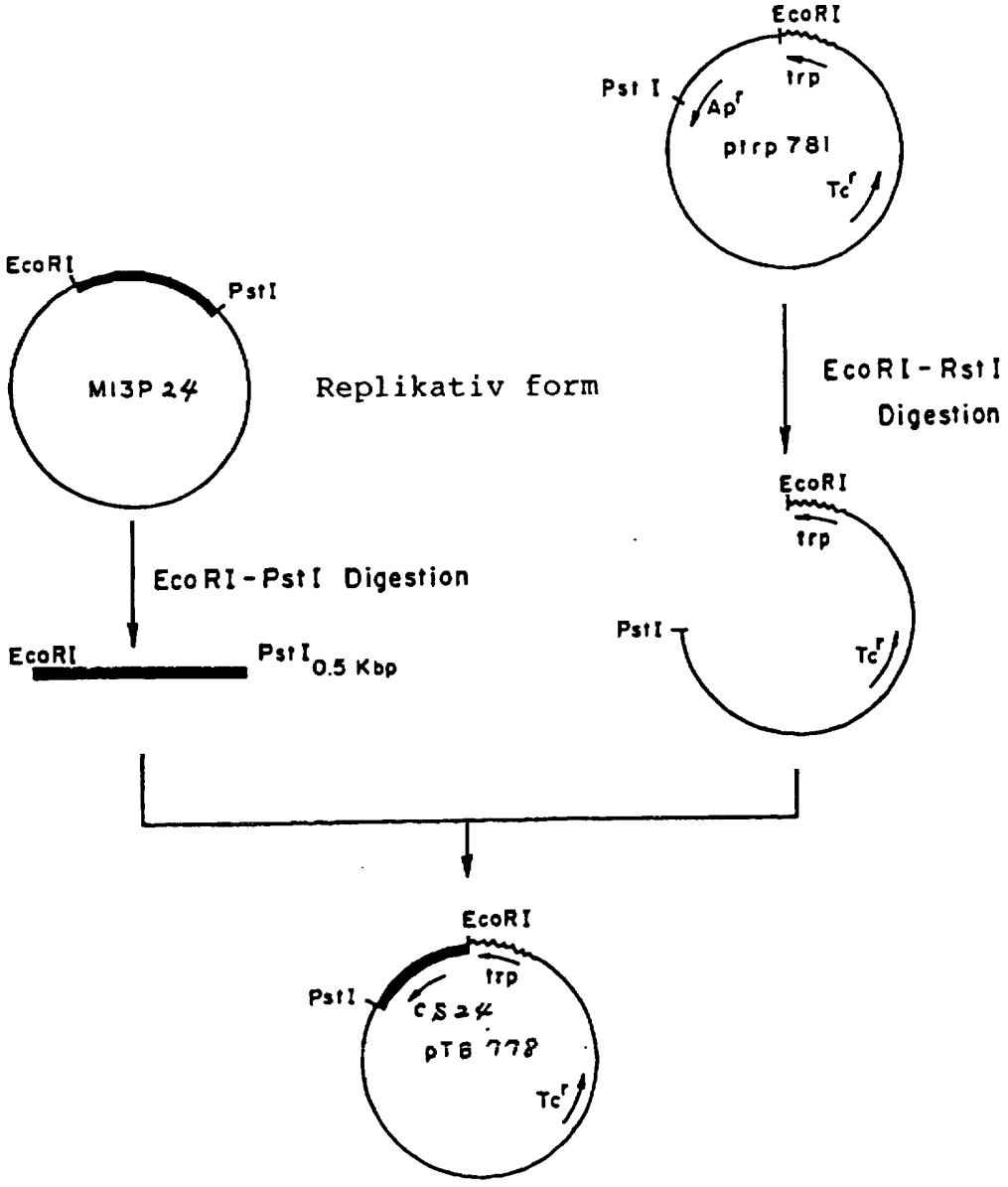

EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P /2
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS /2
pTB 776
Tc^r

Figur 19

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe      140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

Figur 20

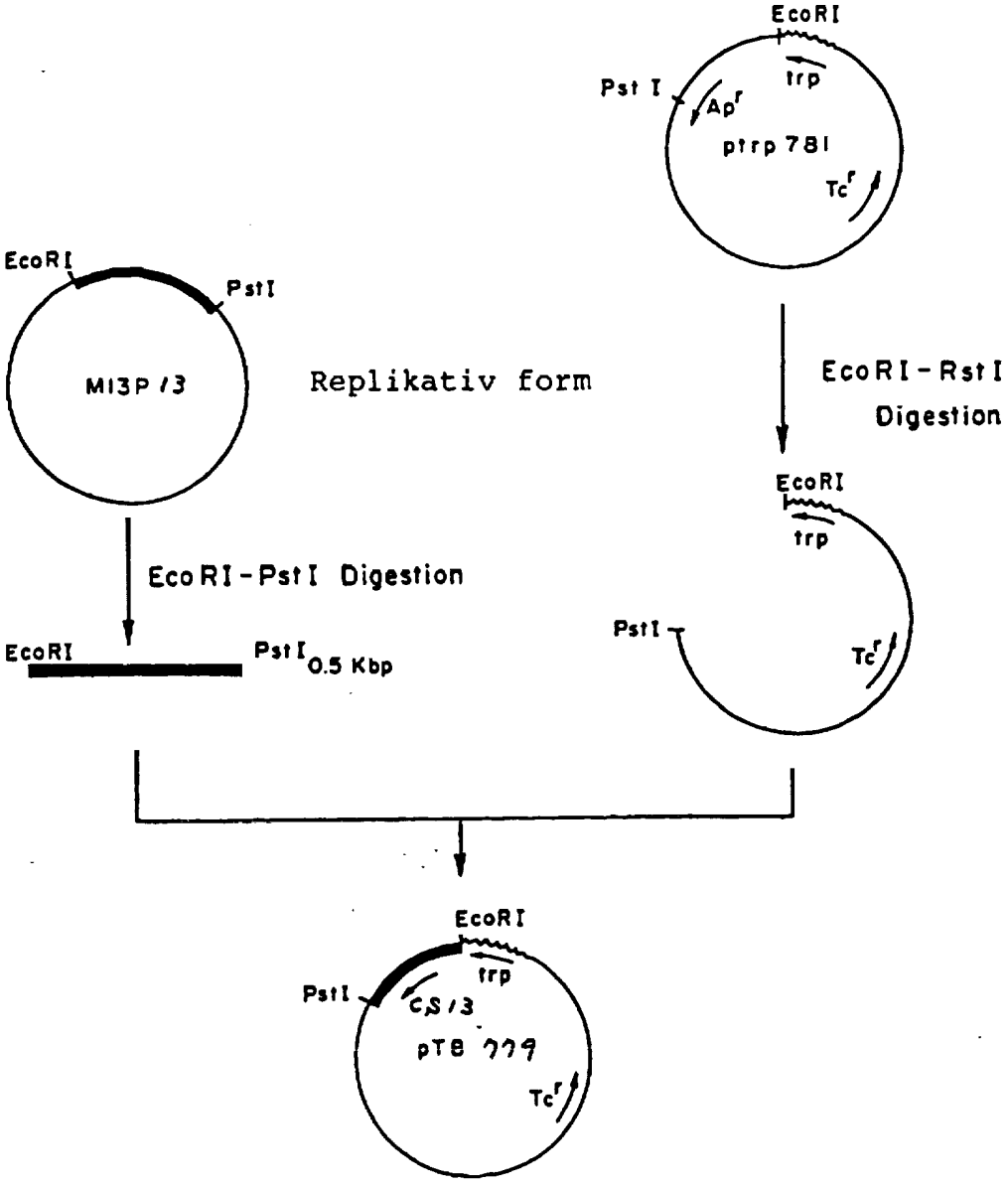

EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 24
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
pTB 778
Tc^r

Figur 21

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

Figur 22

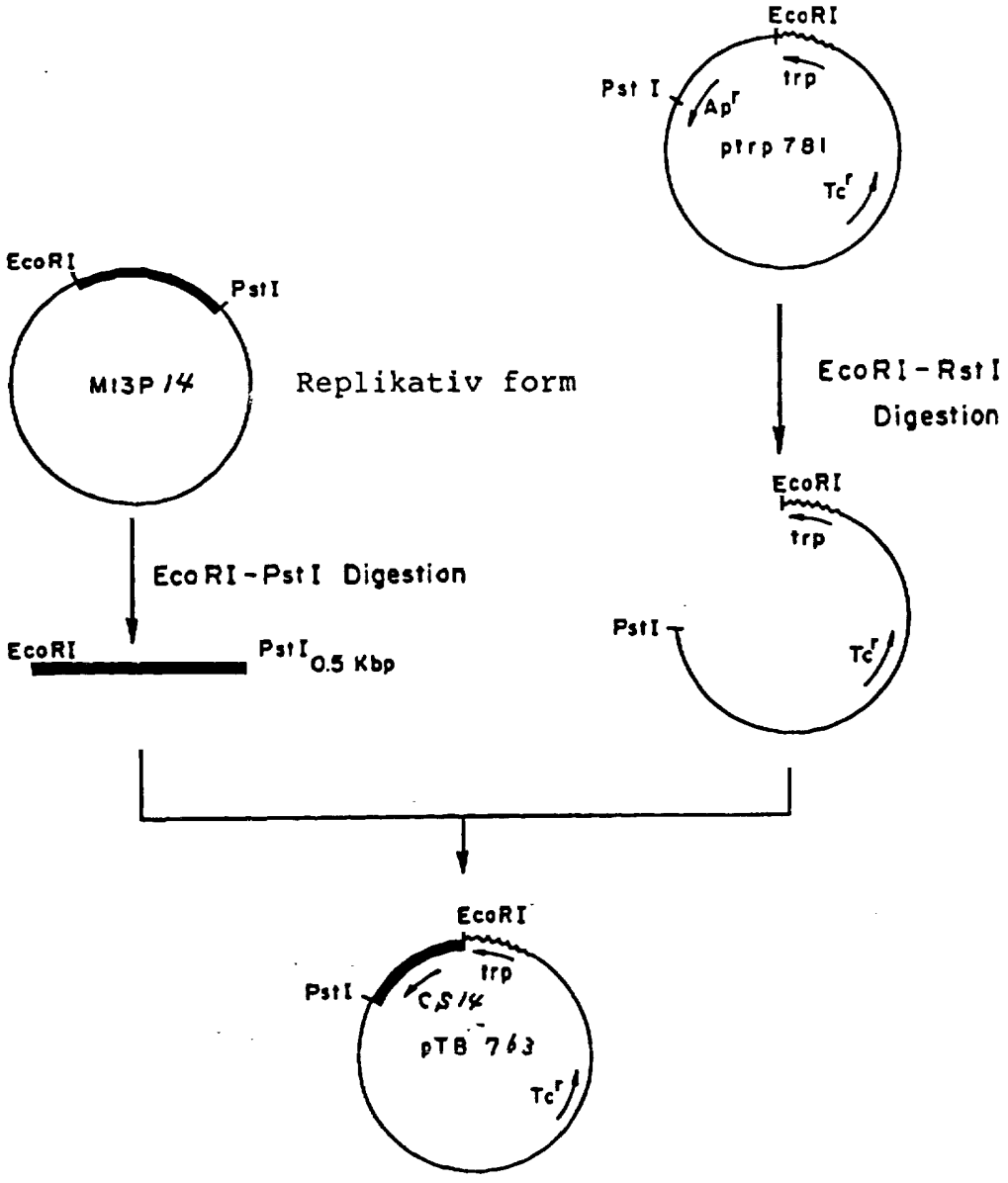

EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 13
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
PstI
Tc^r
EcoRI
trp
PstI
CS 13
pTB 779
Tc^r

Figur 23

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe      140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

Figur 24

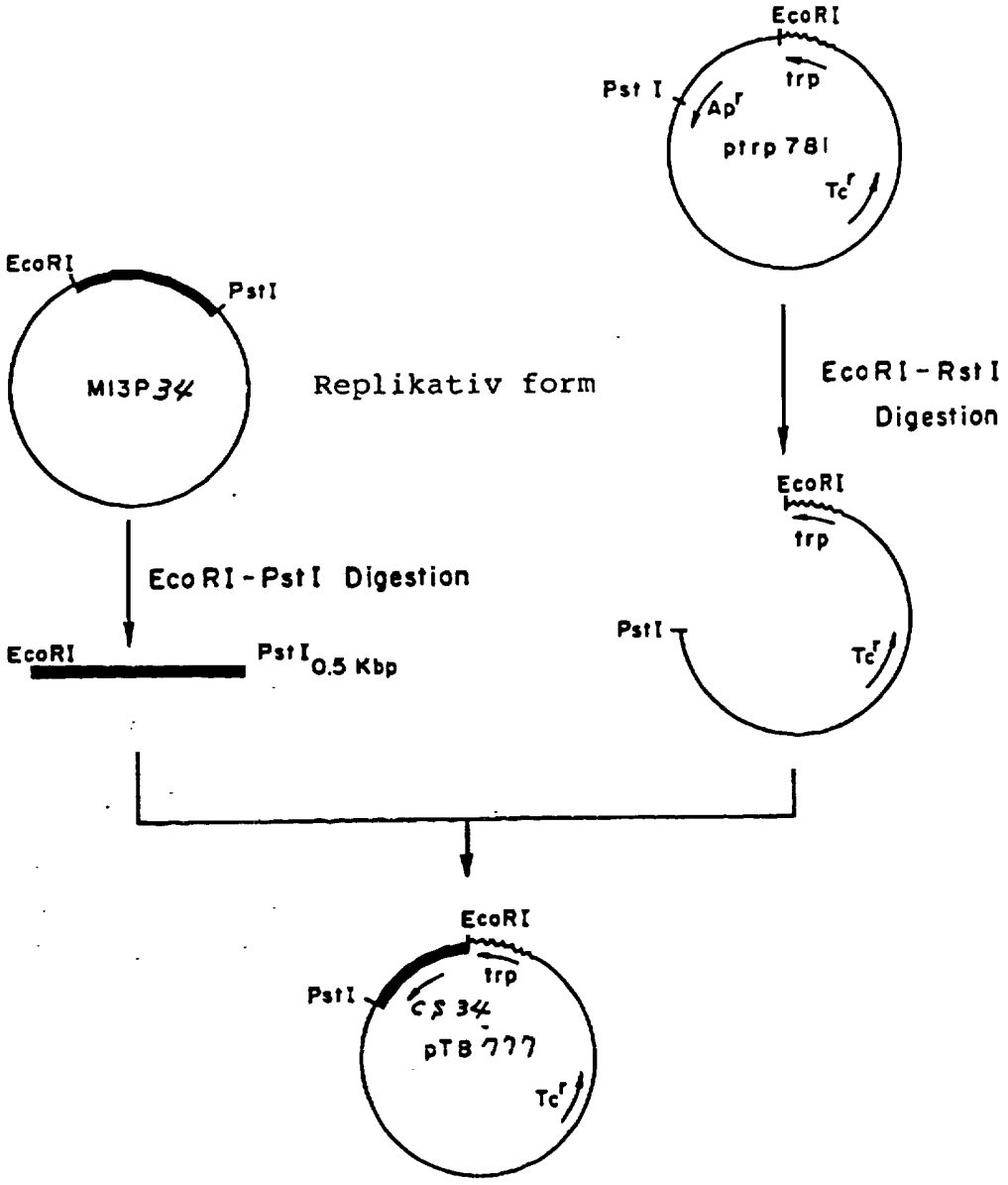

EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P14
Replikativ form
EcoRI-RstI
Digestion
EcoRI-PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS14
pTB 763
Tc^r

Figur 25

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

Figur 26

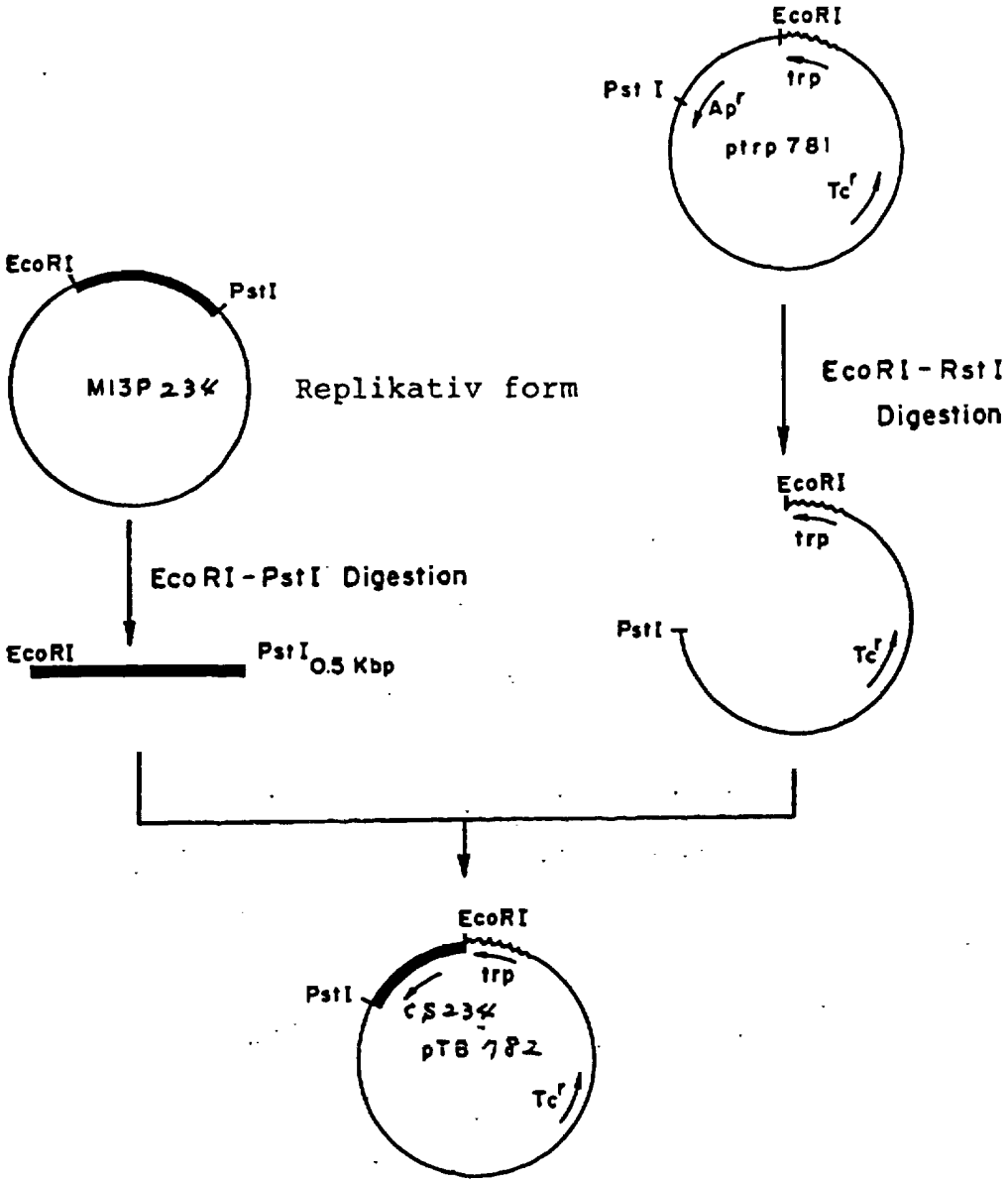

EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P34
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
PstI
Tc^r
EcoRI
trp
PstI
cs 34
pTB 777
Tc^r

Figur 27

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444
```

DK 173269 B1

Figur 28

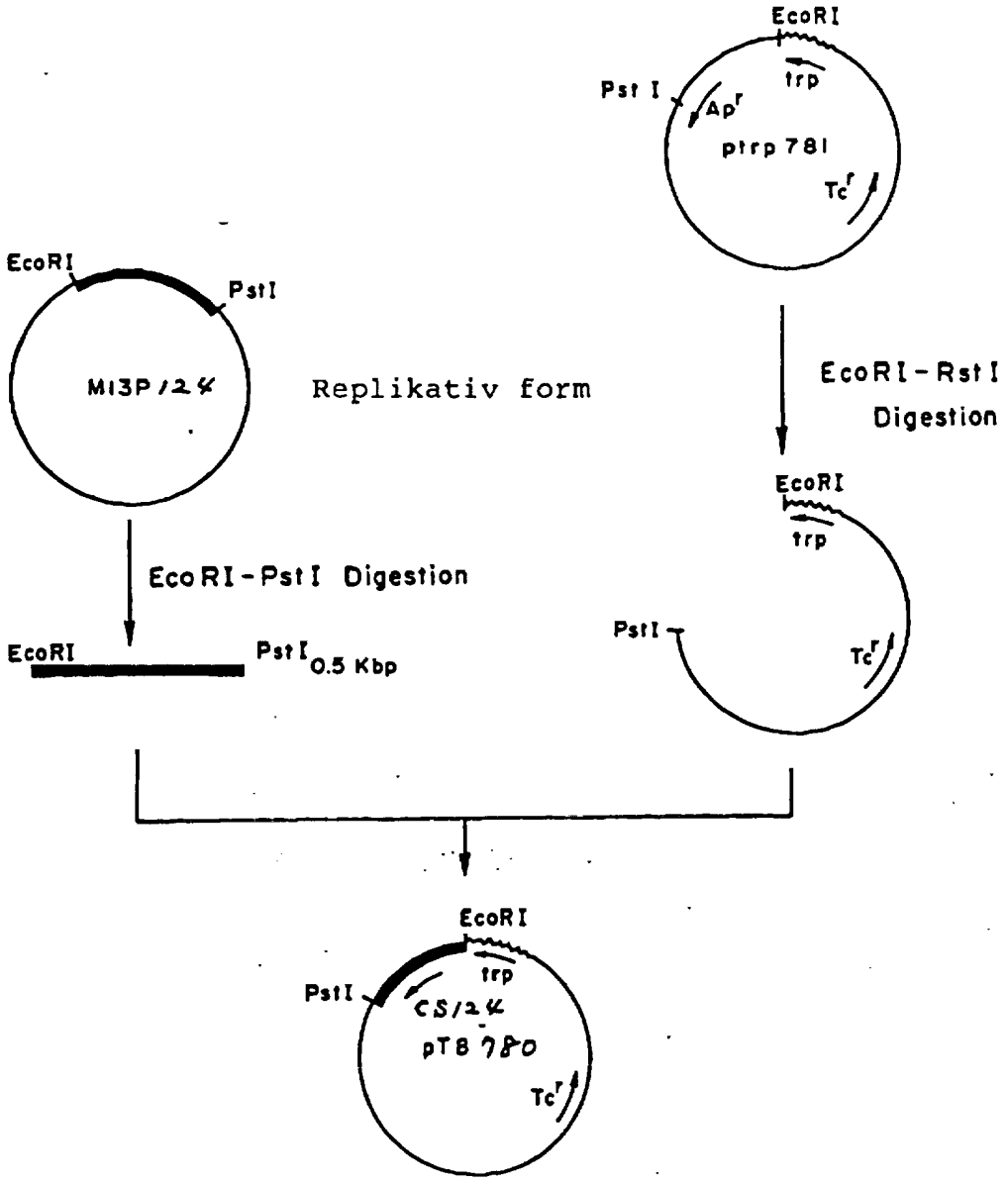

EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P 234
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
cI 234
pTB 782
Tc^r

Figur 29

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

Figur 30

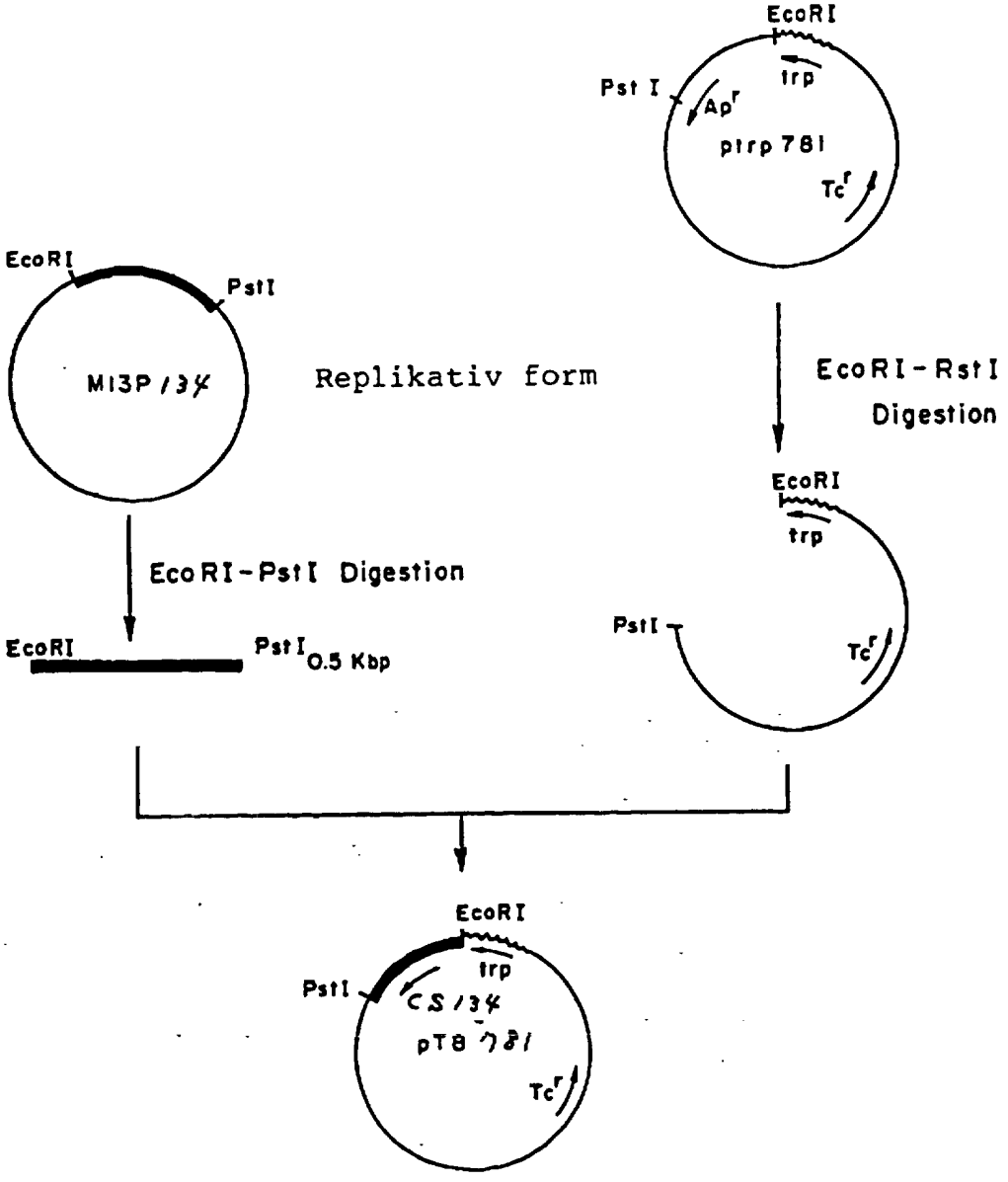

EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P/2μ
Replikativ form
EcoRI-RstI
Digestion
EcoRI-PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS/2μ
pTB 780
Tc^r

Figur 31

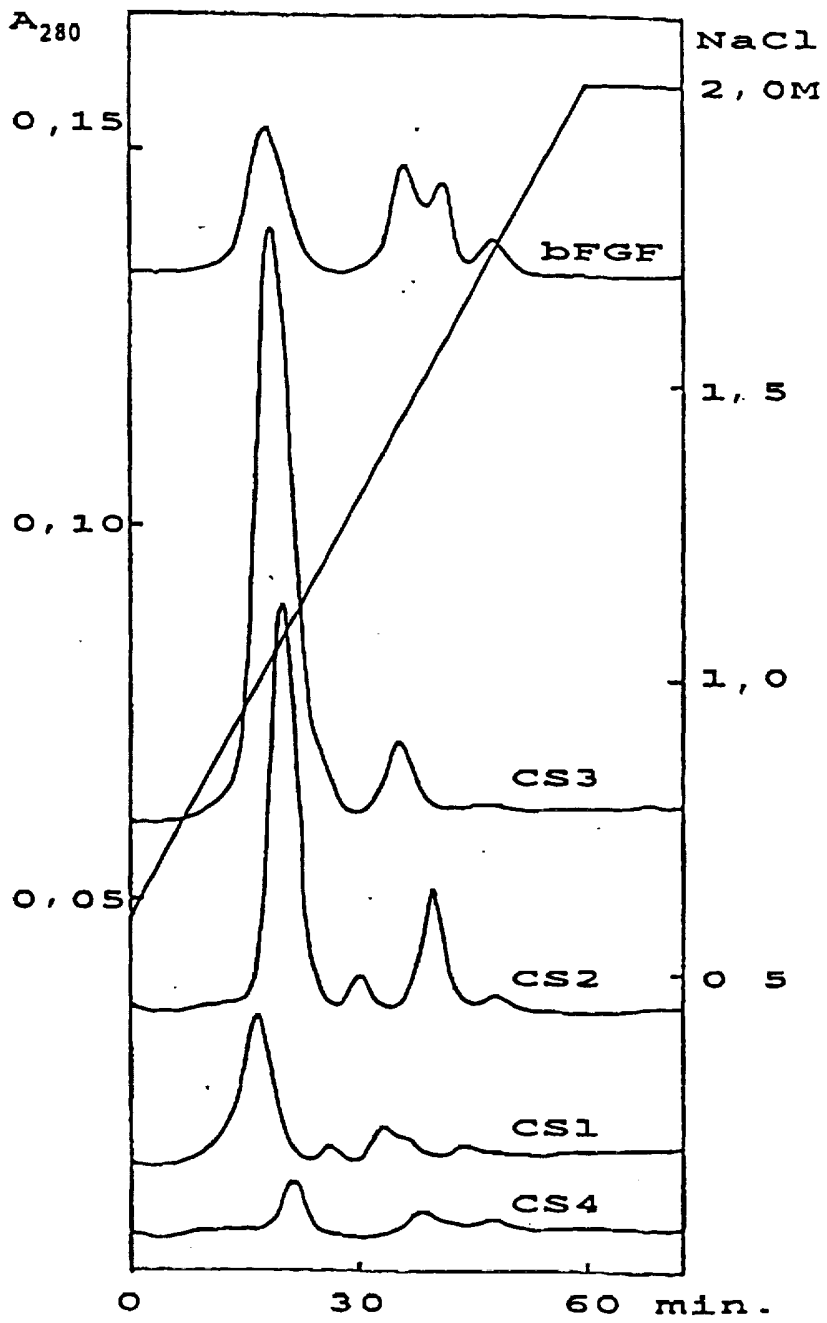
```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444.
```

DK 173269 B1

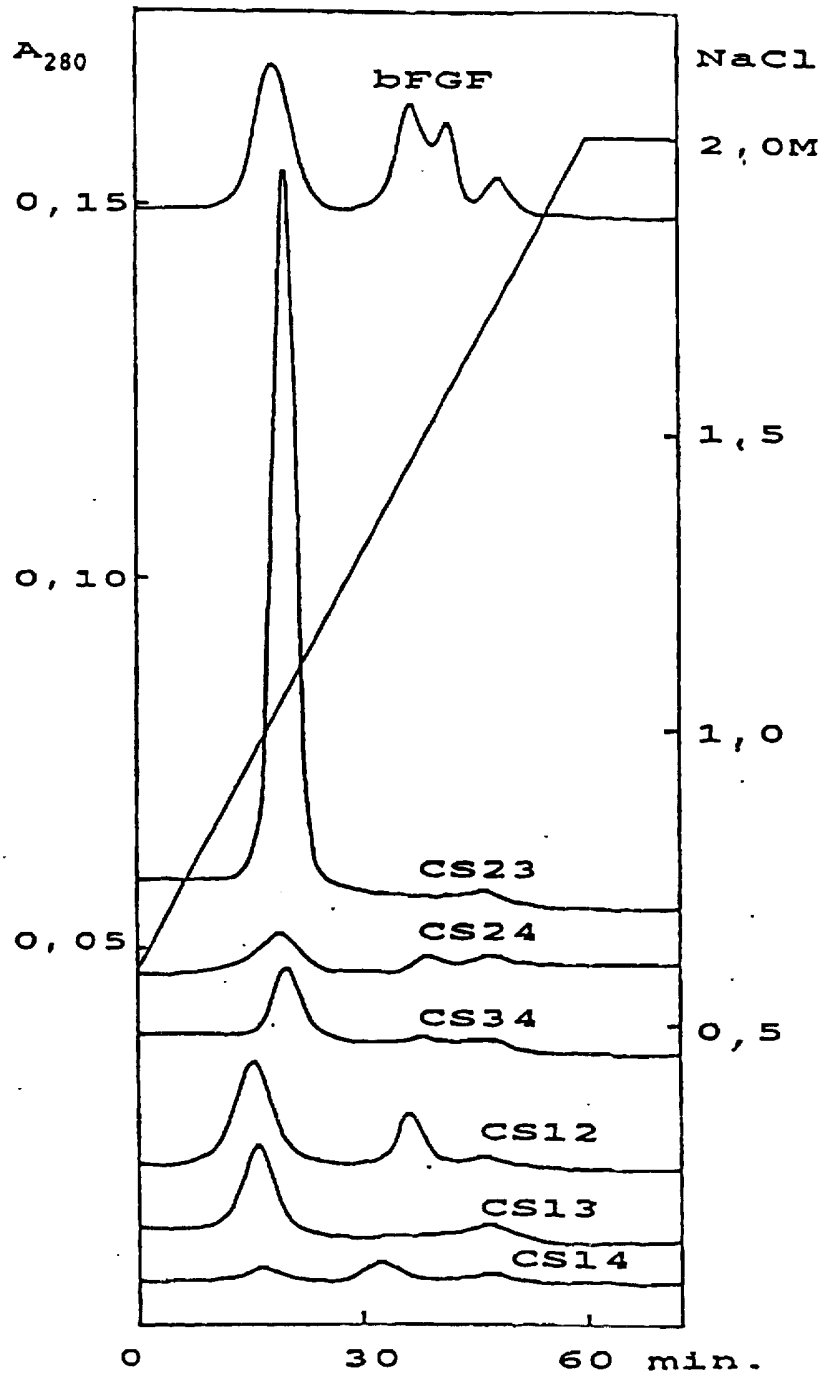
Figur 32


EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P/3K
Replikativ form
EcoRI-RstI
Digestion
EcoRI-PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
CS/3K
pT8 781
Tc^r

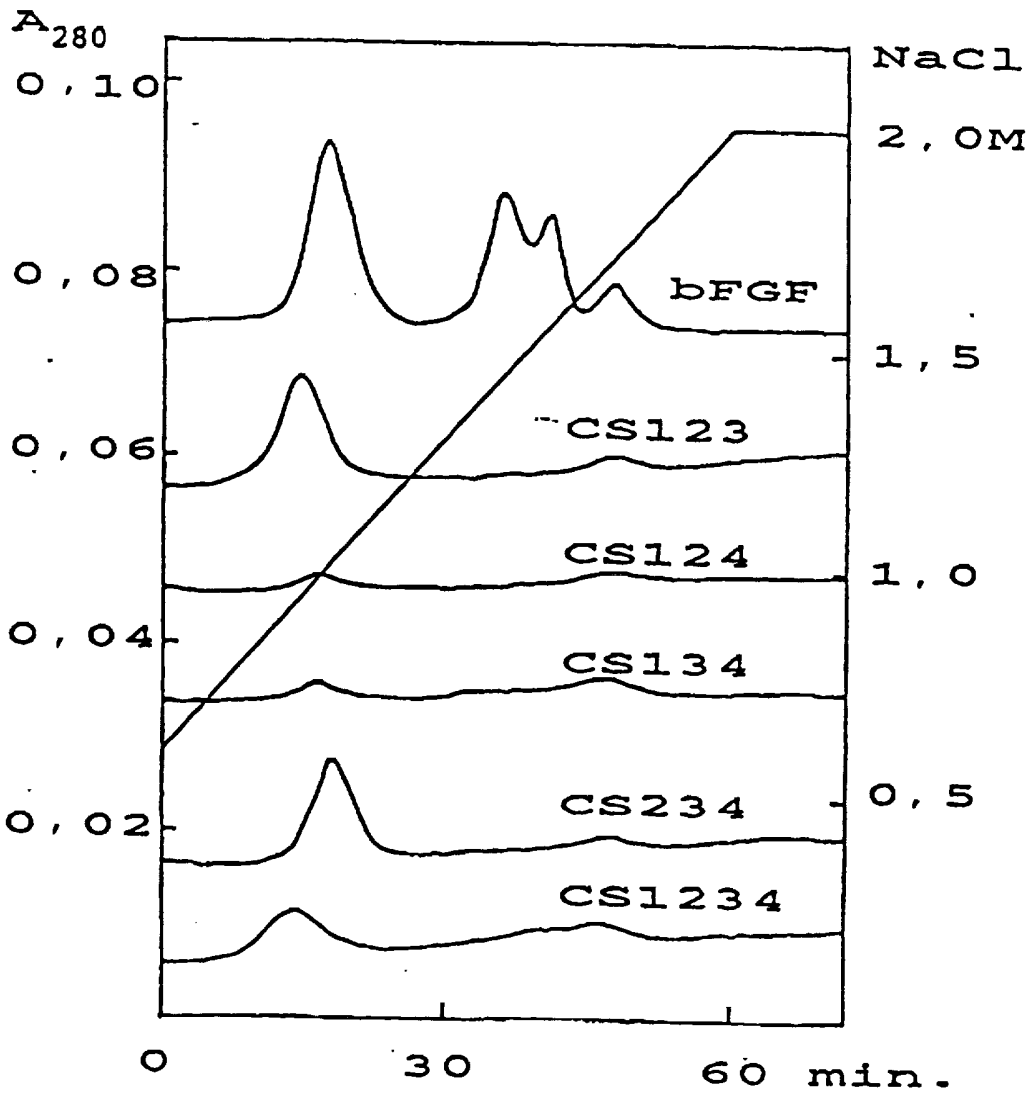
Figur 33


A280
0,15
0,10
0,05
NaCl
2,0M
1,5
1,0
0 5
bFGF
CS3
CS2
CS1
CS4
0
30
60 min.

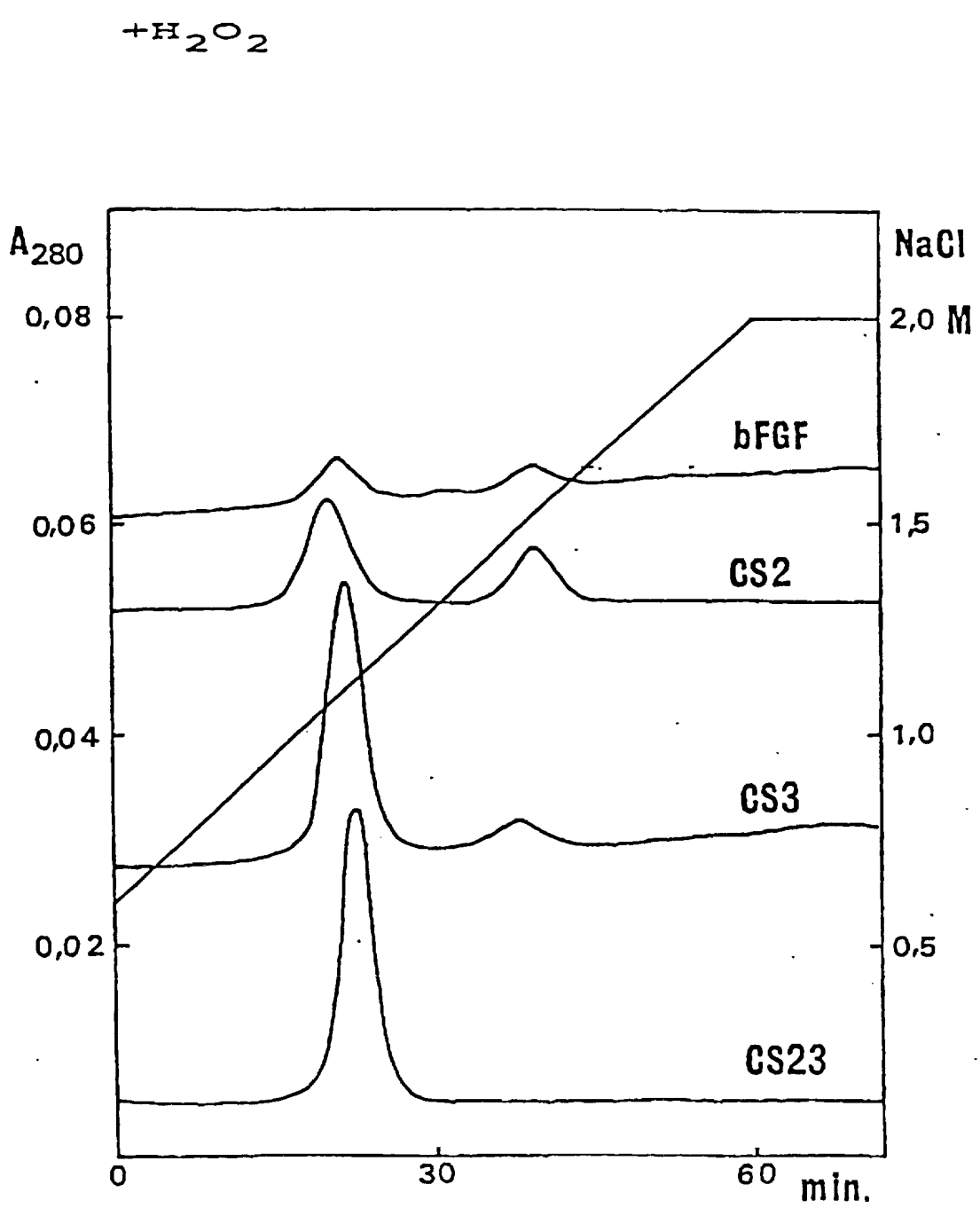
Figur 34


A280
bFGF
NaCl
2,0M
0,15
1,5
0,10
1,0
CS23
0,05
CS24
CS34
0,5
CS12
CS13
CS14
0
30
60 min.

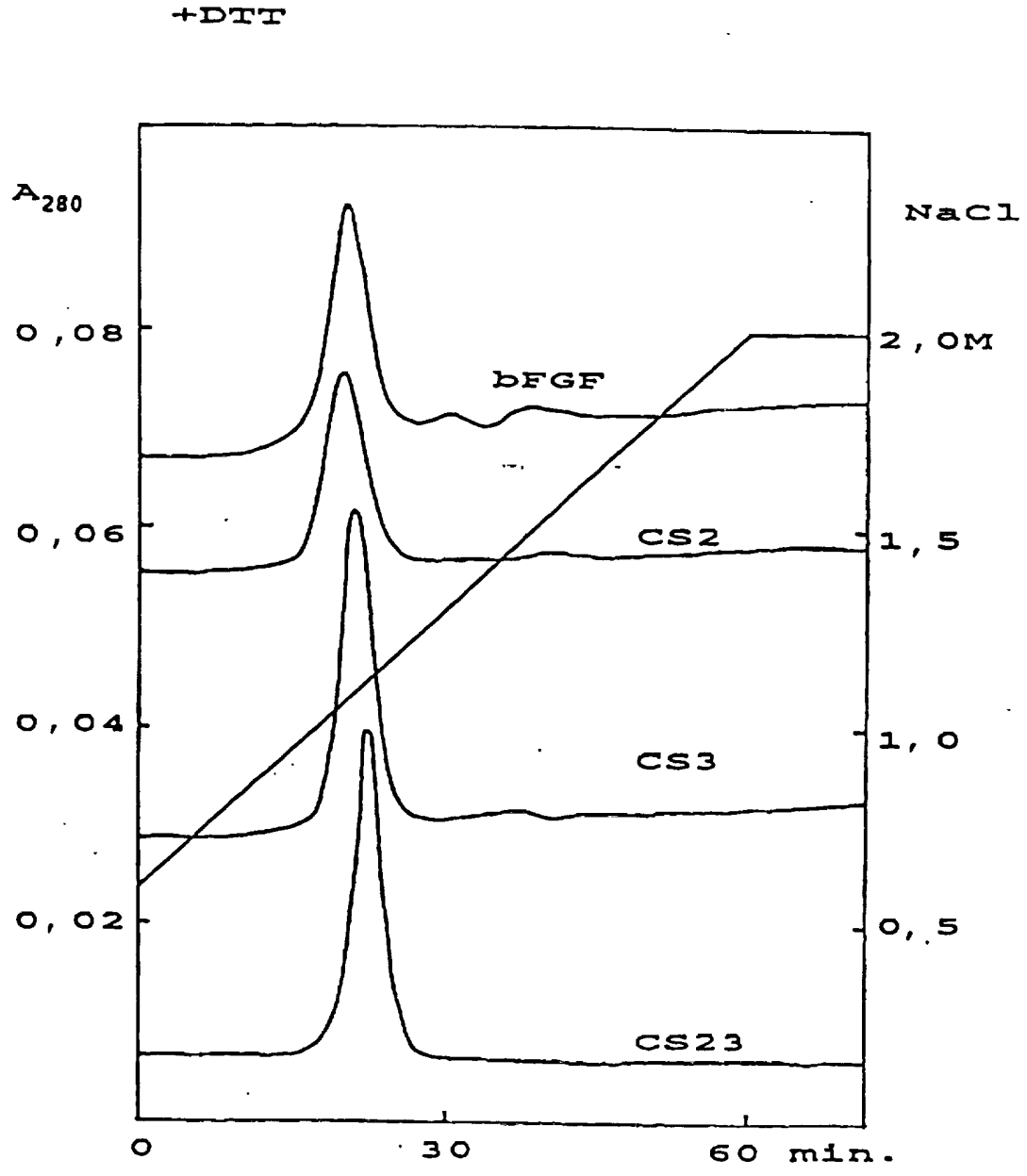
Figur 35


A280
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
NaCl
2,0M
1,5
1,0
0,5
bFGF
CS123
CS124
CS134
CS234
CS1234
0
30
60 min.

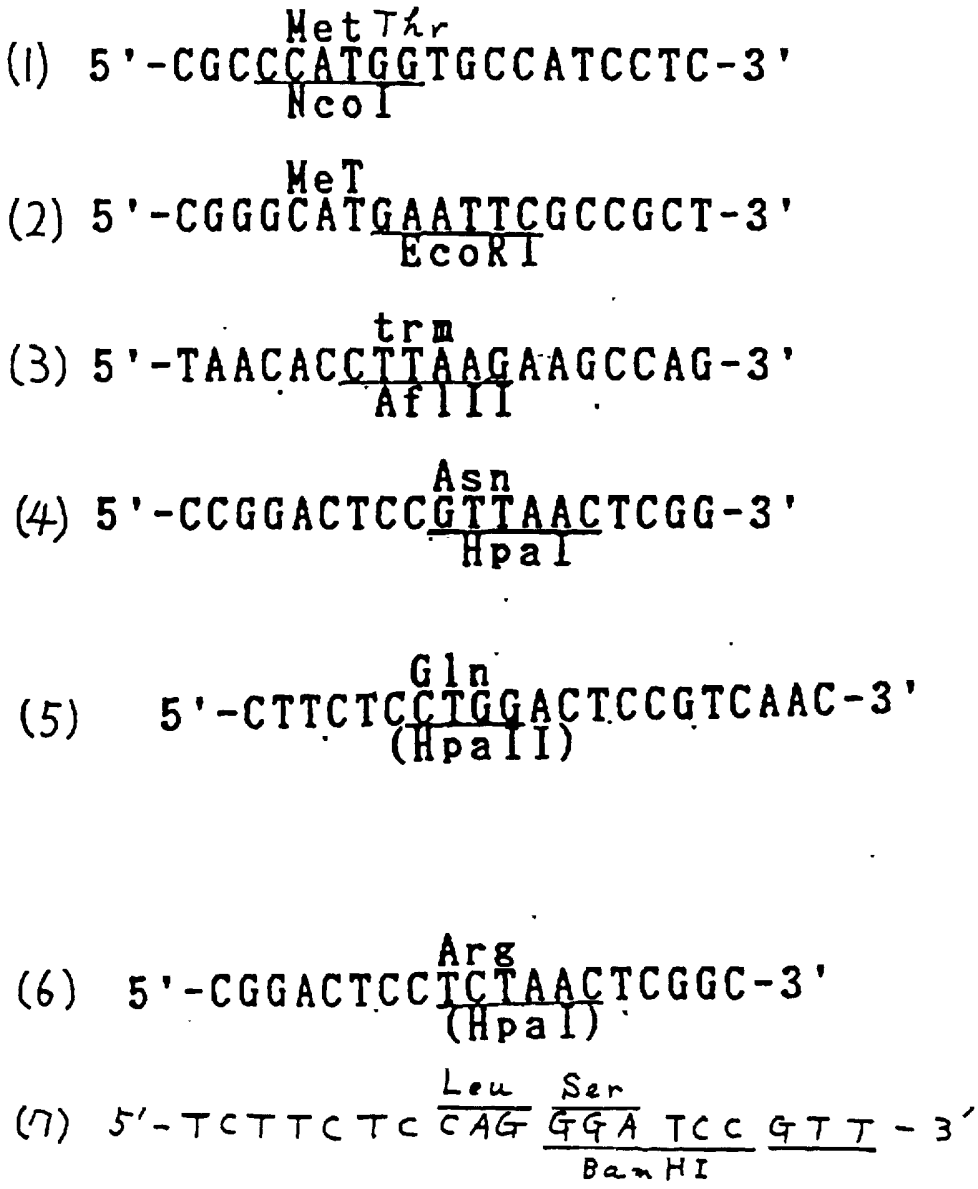
Figur 36


+H2O2
A280
0,08
0,06
0,04
0,02
NaCl
2,0 M
1,5
1,0
0,5
bFGF
CS2
CS3
CS23
0
30
60
min.

Figur 37


+DTT
A280
0,08
0,06
0,04
0,02
bFGF
CS2
CS3
CS23
NaCl
2,0M
1,5
1,0
0,5
0
30
60 min.

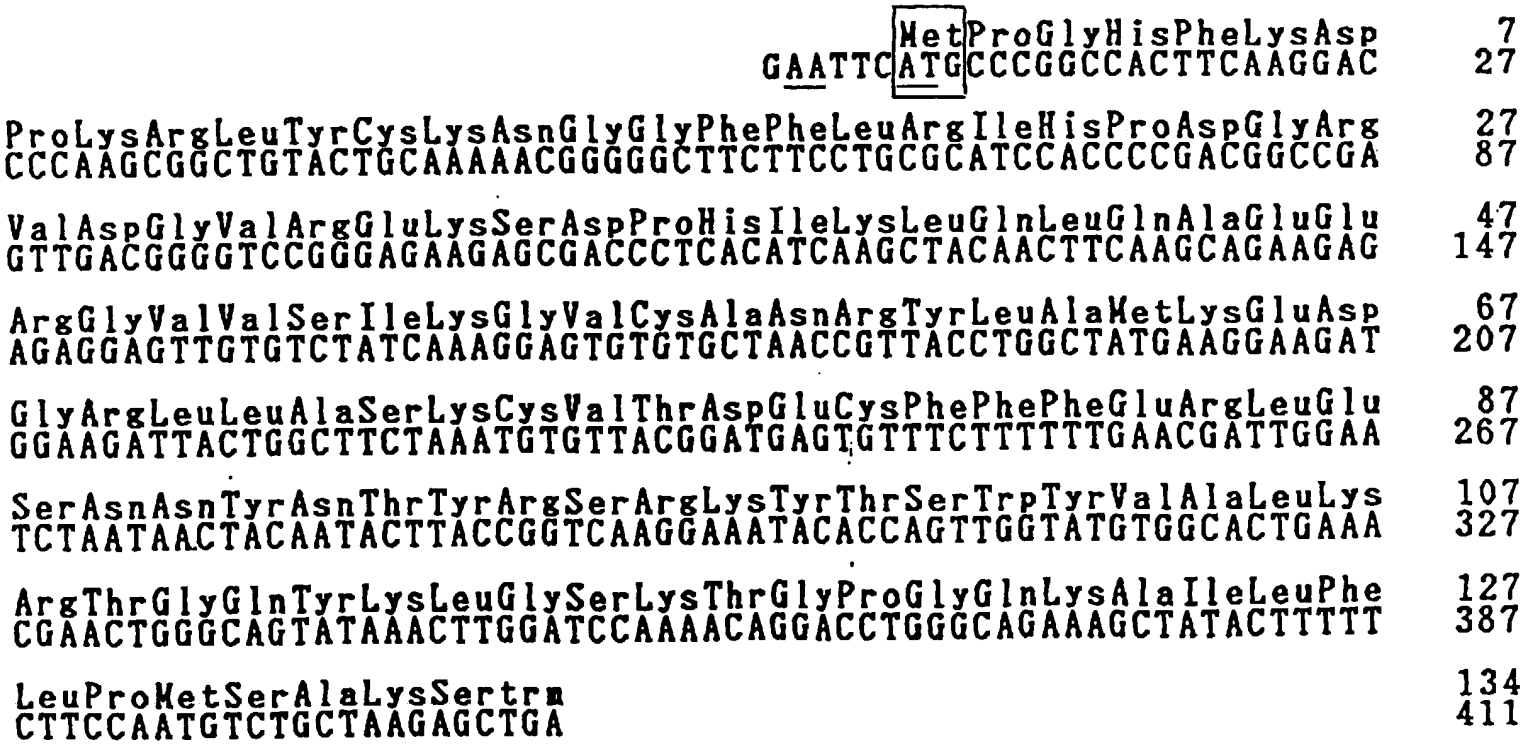
Figur 38


(1) 5'-CGCCCATGGTGCCATCCTC-3'
Met Thr
NcoI
(2) 5'-CGGGCATGAATTCGCCGCT-3'
MeT
EcoRI
(3) 5'-TAACACCTTAAGAAGCCAG-3'
trm
AflII
(4) 5'-CCGGACTCCGTTAACTCGG-3'
Asn
HpaI
(5) 5'-CTTCTCCTGGACTCCGTCAAC-3'
Gln
(HpaII)
(6) 5'-CGGACTCCTCTAACTCGGC-3'
Arg
(HpaI)
(7) 5'-TCTTCTC CAG GGA TCC GTT-3'
Leu Ser
BamHI

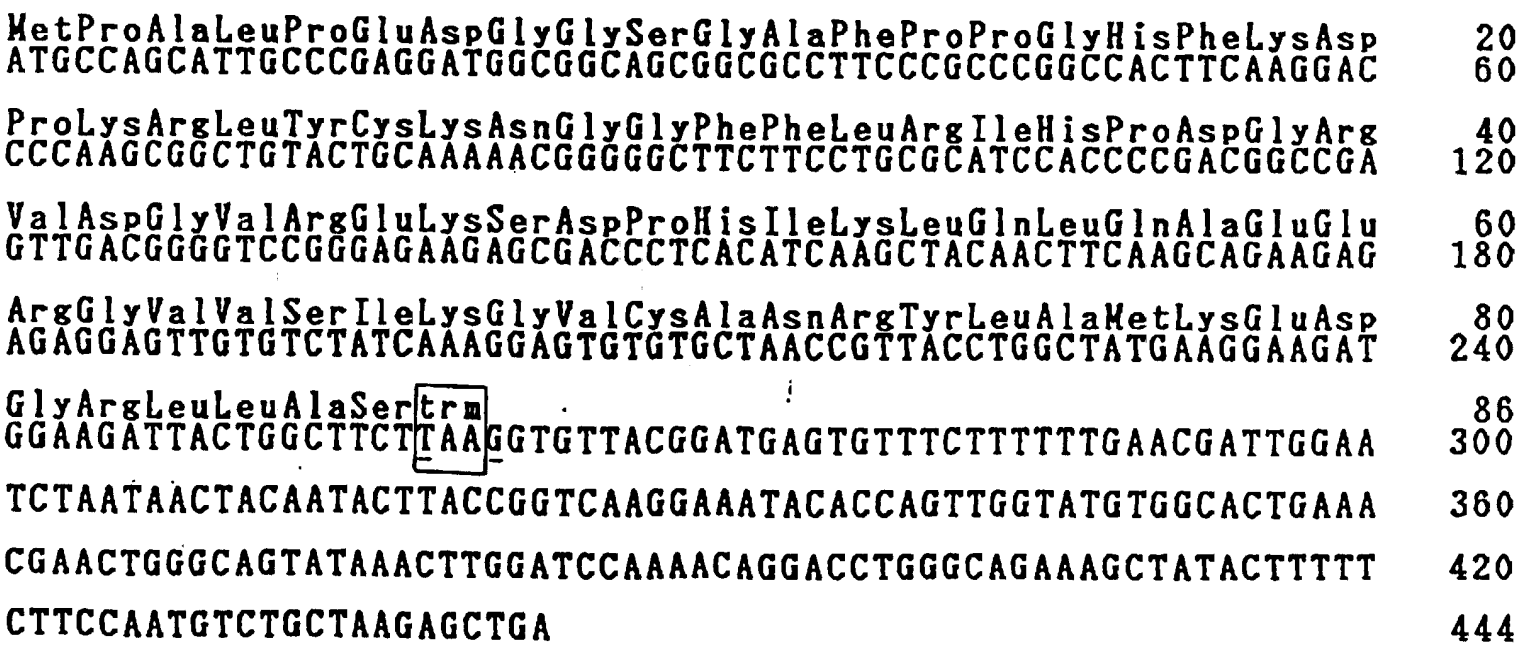
Figur 39

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyThrMetGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCACCATGGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC      60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu     100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys     120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe     140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                         147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                         444
```

Figur 40

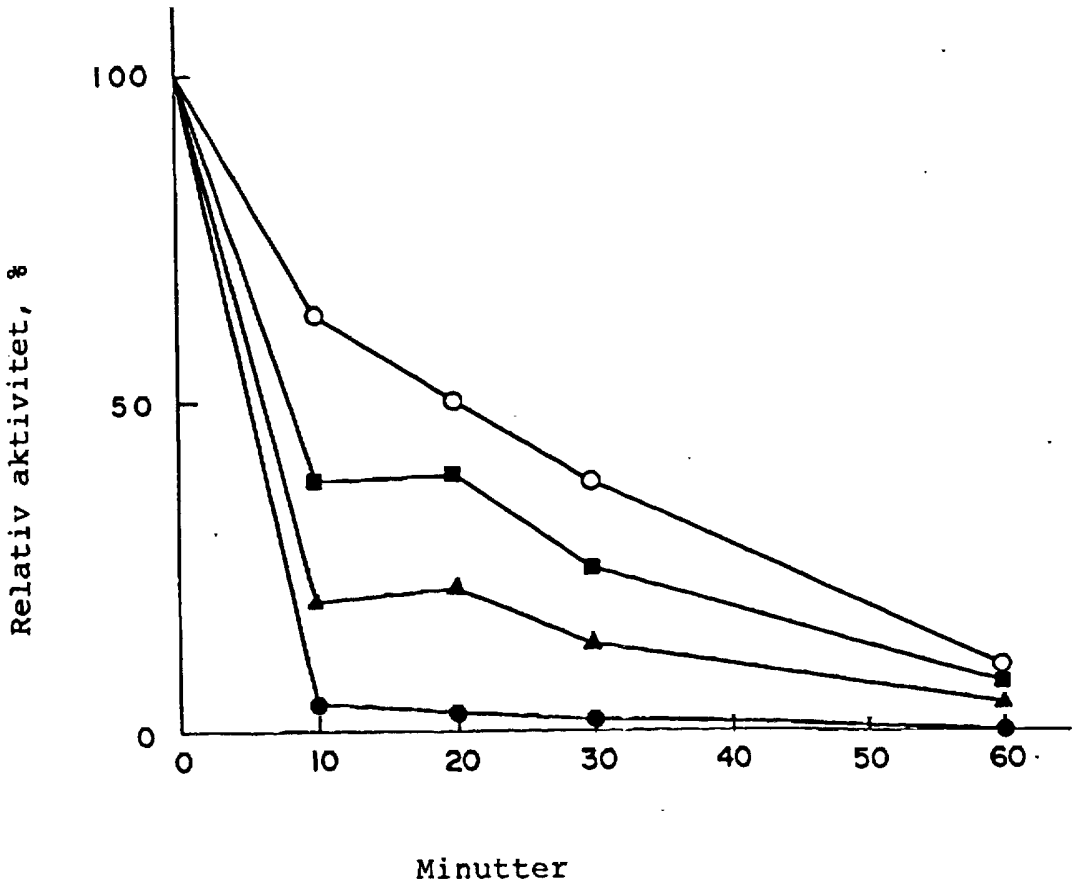

Met
GAATTCATG
ProGlyHisPheLysAsp
CCCGGCCACTTCAAGGAC
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT
LeuProMetSerAlaLysSertrm
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

Figur 41

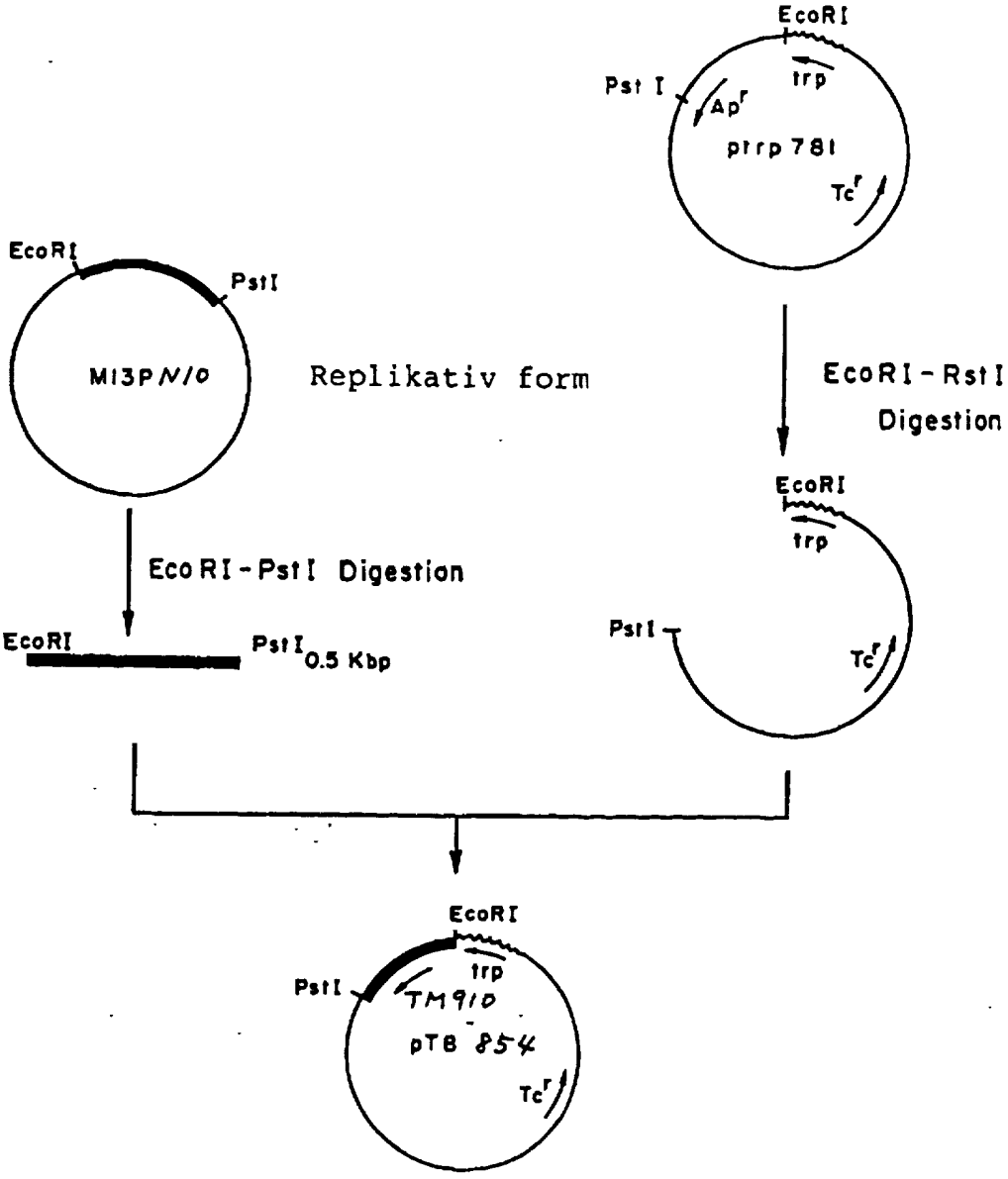


DK 173269 B1

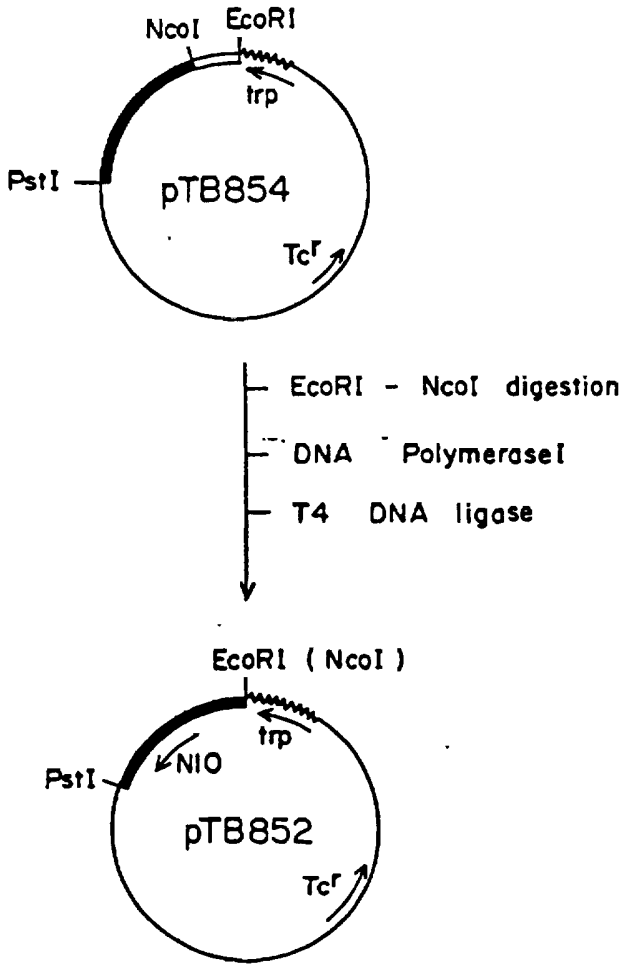
Figur 42



Figur 43


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13P N/O
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI 0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
TM910
pTB 854
Tc^r

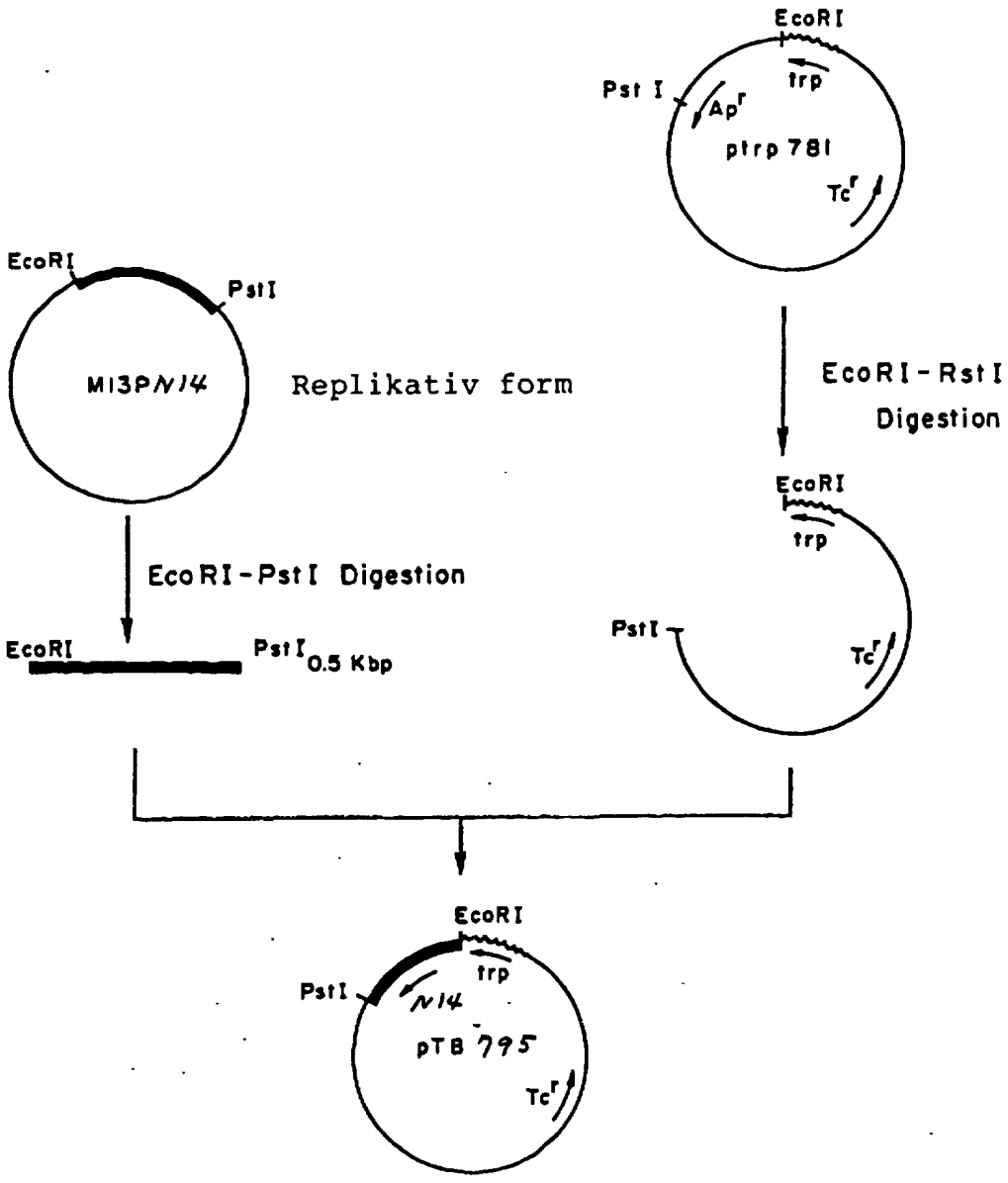
Figur 44


NcoI
EcoRI
trp
PstI
pTB854
Tc^r
EcoRI - NcoI digestion
DNA Polymerase I
T4 DNA ligase
EcoRI (NcoI)
trp
PstI
NIO
pTB852
Tc^r

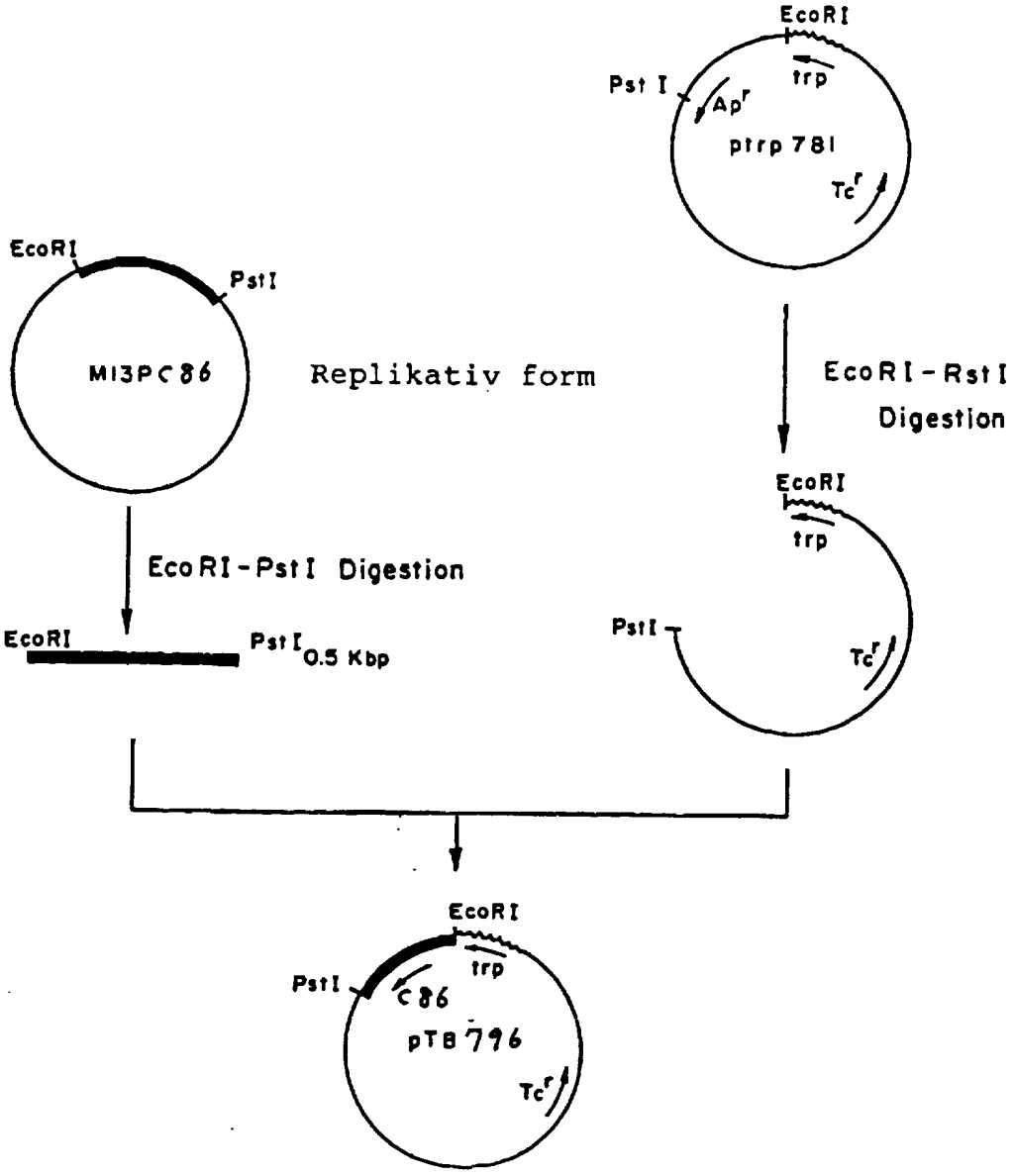
Figur 45

```
                                  Met GlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp
                          GAATTCATGGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT

LeuProMetSerAlaLysSertrm
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA
```

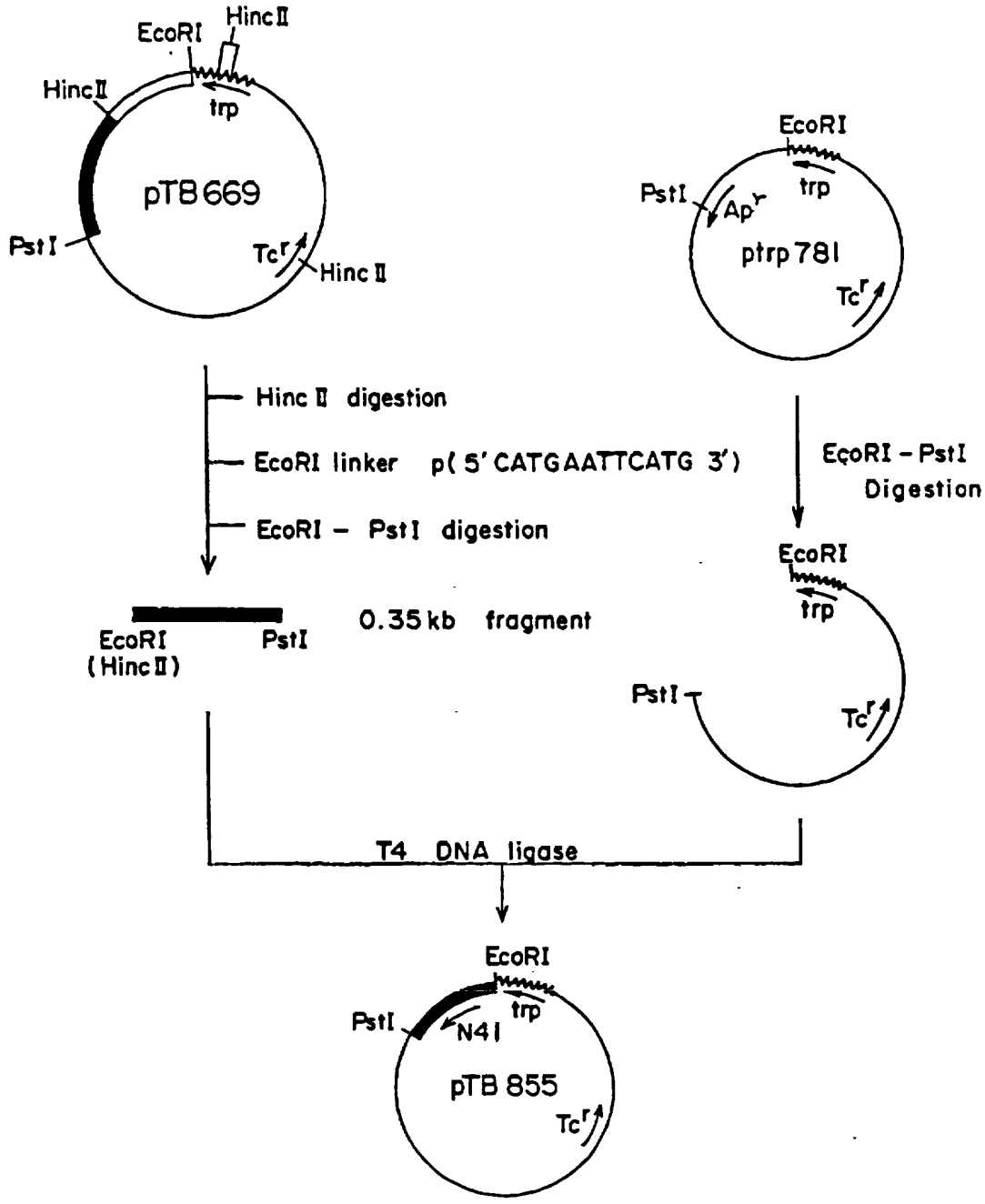
Figur 46


EcoRI
Pst I
trp
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13PN14
Replikativ form
EcoRI - RstI
Digestion
EcoRI - PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
N14
pTB 795
Tc^r

Figur 47


EcoRI
trp
Pst I
Ap^r
ptrp 781
Tc^r
EcoRI
PstI
M13PC86
Replikativ form
EcoRI-RstI
Digestion
EcoRI-PstI Digestion
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
EcoRI
PstI
0.5 Kbp
EcoRI
trp
PstI
C86
pTB796
Tc^r

Figur 48


EcoRI
HincII
HincII
trp
pTB669
PstI
Tc^r
HincII
EcoRI
PstI
Ap^r
trp
ptrp781
Tc^r
HincII digestion
EcoRI linker p(5'CATGAATTCATG 3')
EcoRI – PstI digestion
EcoRI – PstI Digestion
EcoRI
(HincII)
PstI
0.35 kb fragment
EcoRI
trp
PstI
Tc^r
T4 DNA ligase
EcoRI
PstI
trp
N41
pTB 855
Tc^r

Figur 49

GAATTC

Met AspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu
ATG GACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT

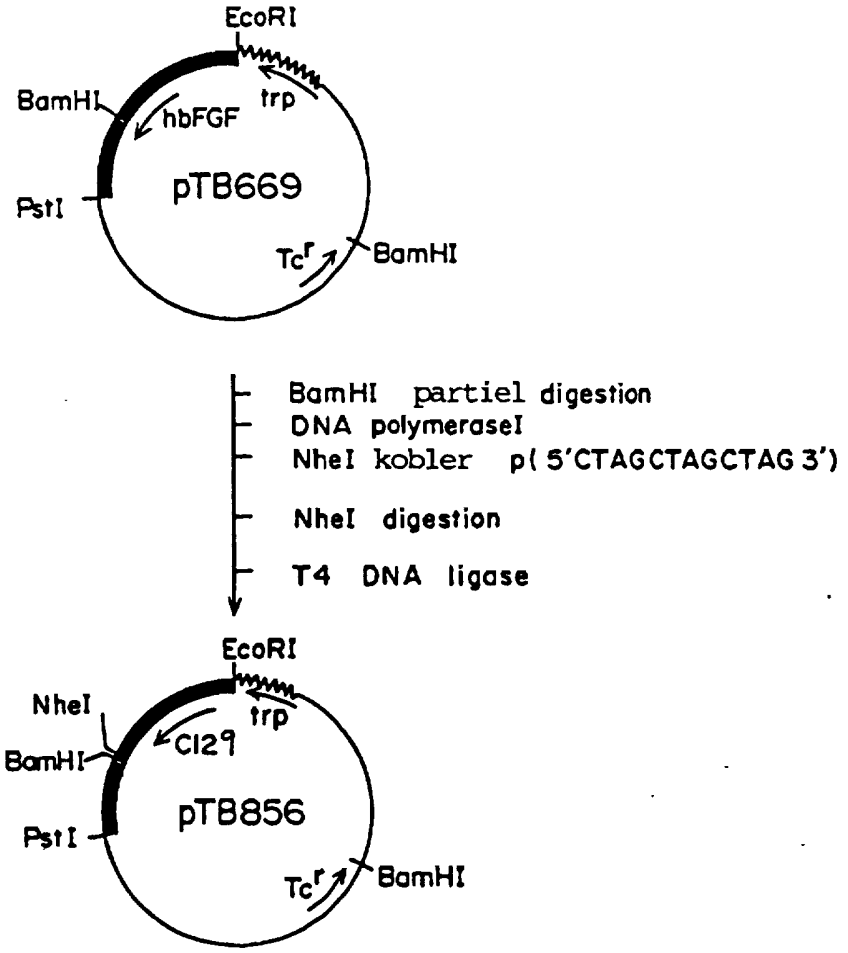
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT

LeuProMetSerAlaLysSertrm
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

Figur 50

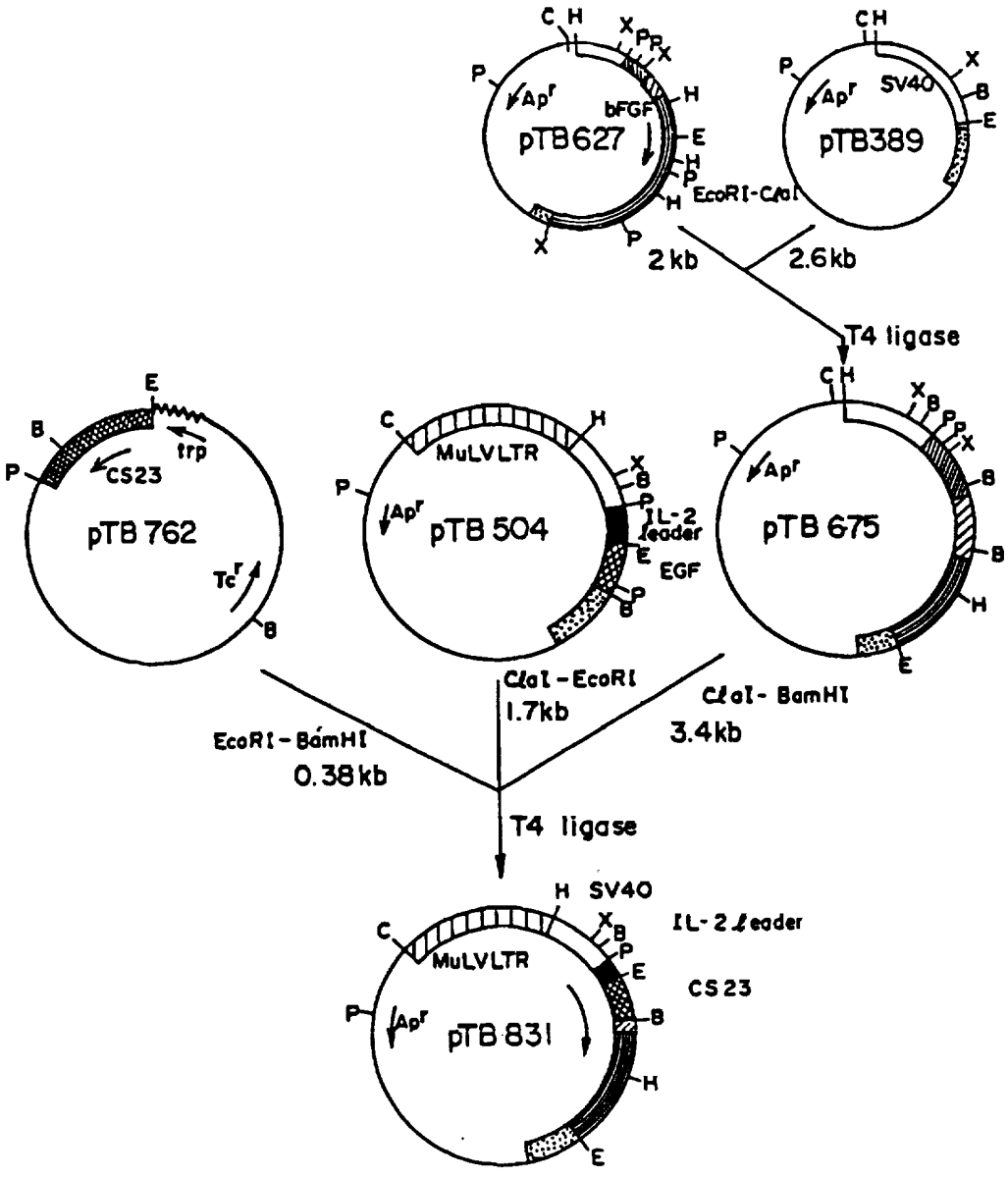

EcoRI
BamHI
hbFGF
trp
pTB669
PstI
Tc^r
BamHI
BamHI partiel digestion
DNA polymeraseI
NheI kobler p(5'CTAGCTAGCTAG 3')
NheI digestion
T4 DNA ligase
EcoRI
NheI
trp
C129
BamHI
pTB856
PstI
Tc^r
BamHI

Figur 51

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySer trm                                   129
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCC TAG                                   390
```

DK 173269 B1

Figur 52


pTB627
Ap^r
bFGF
EcoRI-ClaI
pTB389
SV40
2kb
2.6kb
T4 ligase
pTB762
CS23
trp
Tc^r
pTB504
MuLVLTR
IL-2 leader
EGF
pTB675
ClaI-EcoRI
1.7kb
ClaI-BamHI
3.4kb
EcoRI-BamHI
0.38kb
T4 ligase
pTB831
MuLVLTR
SV40
IL-2 leader
CS23