



NORGE

(12) UTLEGNINGSSKRIFT

(19) NO

(11) 180305

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 07 K 14/50, C 12 N 15/12

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	880719	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	18.02.88	søknadsnummer	
(24) Løpedag	18.02.88	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	25.08.88	(30) Prioritet	24.02.87, JP, 42218/87
(44) Utlegningsdato	16.12.96		25.02.87, JP, 43444/87
			02.04.87, JP, 81977/87
			12.06.87, JP, 147511/87
			11.08.87, JP, 201510/87
			17.11.87, JP, 290283/87
			26.01.88, JP, 16260/88

(71) Søker	Takeda Chemical Industries Ltd, 27, Doshomachi 2-chome,
	Higashi-ku, Osaka 541, JP
(72) Oppfinner	Masaharu Senoo, Toyonaka, Osaka, JP
	Tsutomu Kurokawa, Kawanishi, Hyogo, JP
	Koichi Igarashi, Kyoto, JP
	Reiko Sasada, Nagaokakyo, Kyoto, JP
(74) Fullmektig	Lars Brevig, Bryns Patentkontor AS, 0106 OSLO

(54) Benevnelse	Rekombinant DNA som koder for et mutein av basisk fibroblastvekstfaktor, transformant som kan produsere dette og fremgangsmåte for fremstilling derav
-----------------	---

(56) Anførte publikasjoner	EP A1 109748
----------------------------	--------------

(57) Sammendrag	Mutein til basisk fibroblast-vekstfaktorer (bFGF) inneholdende fibroblast-vekstfremmende aktivitet, vekststimulerende aktivitet til kapillære endotelceller og karvekststimulerende aktivitet, har høy stabilitet og lav toksisitet. Og derfor, kan foreliggende mutein bli anvendt som en legings-akselerator for brannsar osv., et terapeutisk medikament for trombose, osv., og en celledyrkingspromoter.
	MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp 20
	ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCGCCCCGCCACTTCAAGGAC 60
	ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg 40
	CCCAAGCGGCTCTAAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA 120
	ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu 60
	GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACCTCAAGCAGAGAG 180
	ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp 80
	AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGAGTGTGTGTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT 240
	GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu 100
	GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTCTTTTGAACGATTGGAA 300
	SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys 120
	TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAAGTTGGTATGTGGCACTGAAA 360
	ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe 140
	CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT 420
	LeuProMetSerAlaLysSerTrm 147
	CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA 444

Foreliggende oppfinnelse vedrører et rekombinant DNA som koder for et mutein av basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF) av erstatnings- eller delesjonstypen eller en kombinasjon derav, en transformant som er i stand til å produsere nevnte mutein samt en fremgangsmåte for fremstilling av muteinet.

Et basisk polypeptidhormon med en molekylvekt på omtrent 17.000 som hovedsakelig blir utskilt av hypofysen, bFGF ble først separert som en faktor utvisende sterk vekstfremmende virkning på fibroblaster såsom BALB/c3T3 [D. Gospodarowicz; Nature, 249, 123 (1974)]. Det ble deretter bevist at den utviser vekstfremmende virkning på nesten alle celler avledet fra mesoblast [D. Gospodarowicz et al.; National Cancer Institute Monograph, 48, 109 (1978)]. Den karvekst-stimulerende virkningen til bFGF, sammen med dens cellevekstfremmende virkning, tyder på at den eventuelt kan anvendes som et terapeutisk medikament for skader og som et forebyggende og terapeutisk medikament for trombose, arteriosklerose, osv.

Bovin bFGF ble først beskrevet i "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 82, s. 6507 (1985)". I "Science, 233, 545 (1986)" de bovine bFGF-bestanddelaminosyrene (i det følgende betegnet aminosyrebestanddeler) avledet fra klonen som var produsert ved kloning av cDNA til humant bFGF var beskrevet der.

Når det gjelder humant bFGF er det rapportert i Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 135, s. 541 (1986) at humant bFGF var ekstrahert fra menneskehjerne.

I European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal, vol. 5, s. 2523 (1986) og PCT International Publication nr. W087/01728, er det vist at de humane bFGF-bestanddel aminosyrene ble deduktivt spesifisert på basis av klonen som var blitt dannet ved kloning av cDNA fra humant bFGF ved bruk av bovint bFGF som en probe.

I FEBS Letters, 213, 189 (1987) er produksjon av humant bFGF ved dyrking av en transformant tilveiebragt ved kloning av cDNA fra human bFGF i tillegg beskrevet.

5 Ved sammenligning av humant bFGF og bovint bFGF, har det humane Thr i 112-posisjonen, mens det bovine har Ser; det humane har Ser i 128-posisjonen, mens det bovine har Pro. (I dette tilfellet, er den N-terminale Pro bestemt til å være 1. aminosyre.)

10

I foreliggende sammenheng ble det antatt at ved modifisering av aminosyresekvensen, ble bFGF forbedret når det gjelder stabilitet, produktivitet i en celle og celleprolifererende aktivitet pr. molekul, og i tillegg, ble dets uidentifiserte
15 bioaktiviteter forbedret.

20

Biologisk aktive proteiner som er mikrobiologisk produsert ved DNA-rekombinasjonsteknikk inneholder cysteinresidier som ikke er essensielle for deres aktiviteter, men som kan danne
20 uønskede intermolekulære eller intramolekulære bindinger.

25

Ved produksjon av bFGF ved rekombinant DNA-teknikk, ble heterogene konformasjoner funnet i Escherichia coli ekstrakt inneholdende en høy konsentrasjon av bFGF. Det antas at disse
25 konformasjonene er blitt dannet på grunn av vilkårlig intra-intermolekulær disulfidbrodannelse, og forårsaker vanskeligheter ved bFGF-rensing og reduksjon i utbytte.

30

På grunn av dette faktum, ville man i foreliggende sammenheng
30 modifisere mikrobiologisk produserte bioaktive proteiner såsom rekombinant bFGF på en slik måte at, mens deres aktiviteter ikke ble påvirket i negativ retning, så ble deres evne til dannelsen av slike intermolekulære broer og intra-molekulære bindinger, som vil resultere i dannelsen av
35 uønskede tertiære strukturer (f.eks. konformasjoner som reduserer proteinaktiviteten), redusert eller eliminert.

I foreliggende sammenheng ble det konstruert modifiserte bFGF-muteiner ved DNA-rekombinasjon og sete-rettet mutagenese, og det ble foretatt undersøkelser for å forbedre deres stabilitet, forbedre deres intracellulære produktiviteter og aktiviteter, og beskrive forandringer i deres bioaktiviteter; som et resultat av dette, kom man frem til et mutein som tjener disse hensiktene. Det ble videre foretatt undersøkelser basert på dette funnet, og foreliggende oppfinnelse ble således fullført.

Foreliggende oppfinnelse innbefatter:

- (1) et rekombinant DNA som har en basesekvens som koder for det ovenfornevnte muteinet (1),
- (2) en transformant inneholdende en vektor som inneholder et rekombinant DNA som har basesekvensen som koder for det ovenfor nevnte muteinet (1), og
- (3) en fremgangsmåte for fremstilling av det ovenfor nevnte muteinet (1) som innbefatter dyrking av en transformant inneholdende en vektor som inneholder et rekombinant DNA som har en basesekvens som koder for nevnte mutein for å produsere og akkumulere dette i kulturmediet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således tilveiebragt rekombinant DNA som koder for et mutein av basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF) av erstatnings- eller delesjonstypen eller en kombinasjon derav, kjennetegnet at den koder for

et mutein av erstatningstypen i hvilket i det minste en av de fire cysteinrestene i den angjeldende aminosyresekvensen i den naturlige bFGF typen er erstattet med en nøytral aminosyre som er forskjellig fra cystein, og

et mutein av delesjonstypen hvori 1 til 41 aminosyrer mangler i amino-terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF og/eller 1 til 61 aminosyrer mangler i karboksyl-terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF,

forutsatt at muteinet av delesjonstypen utelukker et mutein av delesjonstypen som omfatter aminosyrer (16-146)-OH, (24-120)-OH og (20-110)-NH₂ i den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF.

5

Videre er det ifølge oppfinnelsen tilveiebragt en transformant som er i stand til å produsere et mutein av den ovenfor nevnte type, og dette transformanten er kjennetegnet ved at den omfatter en ekspresjonsvektor som inneholder en rekombinant DNA som definert ovenfor og i krav 1 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsregulerende sekvenser som dirigerer ekspresjonen av den muteinkodende rekombinante DNA-sekvensen.

10

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling det ovenfor beskrevne muteinet, og denne fremgangsmåten er kjennetegnet ved dyrking av en transformant som omfatter en ekspresjonsvektor inneholdende et rekombinant DNA som definert ovenfor og i krav 1 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsregulerende sekvenser som kan dirigere ekspresjonen av den muteinkodende rekombinante DNA-sekvensen, i et kulturmedium for dannelselse og akkumulering av muteinet i det dyrkede mediet og isolering av muteinet.

20

Humane, bovine og murine bFGFer kan benyttes i foreliggende sammenheng.

25

Spesielt, bFGFer av naturlig type, polypeptider som innbefatter aminosyresekvensen representert som følger:

30

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

er foretrukket.

35

Mer spesifikt er bFGF av naturlig type, polypeptid representert ved formelen:

5 **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-
10 **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]

15 hvor X representerer Thr eller Ser; når X er Thr, representerer Y Ser, og når X er Ser, representerer Y Pro, foretrukket.

Mer spesifikt er bFGF av naturlig type, polypeptid inneholdende aminosyresekvensen:

20 **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-
25 **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

30 foretrukket.

Muteinet har i alt vesentlig aminosyresekvensen til det opprinnelige peptidet eller proteinet; som variasjoner kan nevnes addisjon av aminosyre(r), delesjon av aminosyre(r)-bestanddel(er) og substitusjon av aminosyre(r)-bestanddel(er)

35 med annen aminosyre(r).

Slik addisjon av aminosyre innbefatter addisjon av minst en aminosyre.

Slik delesjon av aminosyrebestanddel innbefatter delesjon av minst en bFGF-bestanddel-aminosyre.

5 Slik substitusjon av aminosyrebestanddel med andre aminosyrer innbefatter substitusjon av minst en bFGF-bestanddel aminosyre med annen aminosyre.

10 Den minst ene aminosyren i muteinet som minst har en aminosyre som er satt til bFGF utelukke metionin som er avledet fra initieringskodon anvendt for peptidekspresjon og signalpeptid.

15 Antall tilsatte aminosyrer er minst 1, men den kan være hvilken som helst, forutsatt at det karakteristiske ved bFGF ikke blir tapt. Foretrukne aminosyrer bør innbefatte en del eller hele aminosyresekvensene til proteinene som har homologi med bFGF og som utviser aktiviteter som ligner de til bFGF.

20 Som eksempler på slike adderte aminosyrer, kan en del eller hele aminosyresekvensen til proteiner såsom sure fibroblastvekstfaktorer (aFGF), interleukin 1- α (IL1- α), interleukin 1- β (IL1- β), og et protein som er kodet av int-2 i onkogenene bli nevnt.

25 Slike aFGFer innbefatter de som er avledet fra mennesker og de som er avledet fra boviner. Slike IL1- α 'er og IL1- β 'er innbefatter de som er avledet fra mennesker.

30 Aminosyresekvensene av slike bovine aFGFer innbefatter:

35 **NH₂-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 til humane IL1- α innbefatter:

NH₂-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 til humane IL1- β innbefatter:

NH₂-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-
 5 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

10 Aminosyresekvenser som er kodet av int-2 innbefatter:

NH₂-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-
 15 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-
 20 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-
 25 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

Når det gjelder antallet deleterte bFGF-bestanddelaminosyrer
 30 i foreliggende mutein som mangler minst 1 bFGF-bestanddel-
 aminosyre, kan det være hvilken som helst, forutsatt at det
 karakteristiske ved bFGF ikke blir tapt.

Som eksempler på slike deleterte aminosyrebestanddeler, kan
 35 følgende nevnes:

Delesjon av aminosyrer fra den aminoterminalen eller kar-
 boksylterminalen enden;

de 10 residiene i den aminoterminalen enden til humant bFGF:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser

de 14 residiene i den aminoterminalen enden til humant bFGF:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro

5 de 41 residiene i den aminoterminalen enden til humant bFGF:

1 2 3 4 41

Met-Pro-Ala-Leu- -Val

eller de 61 residiene i den karboksylterminale enden til humant bFGF:

10 87 88 146 147

Lys-Cys- -Lys-Ser

er deletert.

Når det gjelder antallet på minst 1 bFGF-bestanddel aminosyrer før substitusjon i muteinet som minst har 1 bFGF-bestanddelaminosyre substituert med andre aminosyrer, kan det være hvilken som helst, forutsatt at det karakteristiske ved bFGF ikke blir tapt.

20 Som eksempler på aminosyrebestanddeler før substitusjon, kan cystein og aminosyrer forskjellig fra cystein nevnes. Cystein er foretrukket. Som aminosyrebestanddel forskjellig fra cystein før substitusjon, kan asparaginsyre, arginin, glycin, serin, valin og så videre bli nevnt.

25 Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er cystein foretrekkes for eksempel nøytrale aminosyrer som substituerte aminosyrer. Spesifikke eksempler på slike nøytrale aminosyrer, er glycin, valin, alanin, leucin, isoleucin, tyrosin, fenyilalanin, histidin, tryptofan, serin, treonin og metionin. 30 Serin og treonin er spesielt foretrukket.

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er en hvilken som helst annen enn cystein, blir denne aminosyren substituert med valgte aminosyrer som er forskjellige fra aminosyren før substitusjon i en egenskap såsom hydrofilisitet, hydrofobisitet eller elektrisk ladning.

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er asparaginsyre, innbefatter substituerte aminosyrer asparagin, treonin, valin, fenylalanin og arginin; asparagin og arginin er foretrukket.

5

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er arginin, innbefatter substituerte aminosyrer glutamin, treonin, leucin, fenylalanin og asparaginsyre; glutamin er foretrukket.

10

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er glycin, innbefatter substituerte aminosyrer treonin, leucin, fenylalanin, serin, glutaminsyre og arginin; treonin er foretrukket.

15

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er serin, innbefatter substituerte aminosyrer metionin, alanin, leucin, cystein, glutamin, arginin og asparaginsyre; metionin er foretrukket.

20

Når aminosyrebestanddelen før substitusjon er valin, innbefatter substituerte aminosyrer serin, leucin, prolin, glycin, lysin og asparaginsyre; serien er foretrukket.

25

Som aminosyrebestanddel før substitusjon, er asparaginsyre, arginin, glycin, serin og valin foretrukket.

Som substituert aminosyre er asparagin, glutamin, arginin, treonin, metionin, serin og leucin foretrukket.

30

Som foretrukket fremstilling for substitusjon i muteinet, er en substitusjon av serin for cystein (dvs. cystein blir erstattet med serin) mest foretrukket.

35

I nevnte substitusjon kan ikke mindre enn 2 substitusjoner forekomme, og to eller tre substitusjoner er foretrukket.

Muteinet kan være en kombinasjon av to eller tre av de ovenfor nevnte tilsetningene, delesjonene og substisjonene.

I tillegg til konvensjonell DNA-rekombinasjonsteknikk, blir
5 seterettet mutagenese benyttet for å produsere muteinet. Nevnte teknikk er velkjent, og den er beskrevet i Genetic Engineering, Lather, R.F. og Lecoq, J.P., Academic Press, s. 31 til 50 (1983). Mutagenese rettet mot oligonukleotid er
10 beskrevet i Genetic Engineering: Principles and Methods, Smith, M. og Gillam, S., Plenum Press, Vol. 3, s. 1 til 32 (1981).

Produksjon av det strukturelle genet som koder for muteinet ifølge foreliggende oppfinnelse blir for eksempel utført ved:

- 15 (a) hybridisering med en mutagen oligonukleotidprimer en enkelt-trådet DNA innbefattende 1 tråd av det strukturelle genet til bFGF,
- (b) forlenging av primeren ved bruk av DNA-polymerase for å danne en mutasjonsbar heterodupleks, og
- 20 (c) replikering av denne mutasjonsbare heterodupleksen.

Størrelsen på oligonukleotidprimer avhenger av betingelser som er essensielle for å stabilisere hybridisering av primer til genregionen hvor mutasjonen skal bli introdusert, og til
25 begrensninger i tilgjengelige fremgangsmåter for oligonukleotidsyntese. Faktorene som må tas i betraktning ved konstruering av oligonukleotidet som skal bli anvendt for mutagenese styrt av oligonukleotidet (f.eks. størrelsen på nukleotidet og størrelsen på den ikke riktige baseparringsdelen ved
30 mutasjonssetet) som beskrevet av Smith, M. og Gillam, S. i den ovenfor nevnte litteraturen. Lengden til oligonukleotidet blir justert til en slik lengde at stabil og unik hybridisering ved mutasjonssetet blir optimalisert, og forlengelsen mellom mutasjonssetet og 5'- og 3'-terminale endene blir gitt
35 tilstrekkelig størrelse for å forhindre mutasjonsredigering forårsaket av eksonukleaseaktivitet til DNA polymerase.

Oligonukleotidene som blir anvendt for mutagenese i henhold til foreliggende oppfinnelse inneholder vanligvis 12 til 24 baser, fortrinnsvis 14 til 20 baser, og mest foretrukket 14 til 18 baser. Disse inneholder vanligvis minst omtrent 3 base 3'-terminalt for kodonene som skal bli forandret.

For å for eksempel oppnå et mutein som har en tilsatt aminosyre, blir et mutagent bFGF-gen produsert ved syntetisering av genet som koder for aminosyresekvensen som skal bli tilsatt, og, retter deretter eller etter fragmentering ved spalting med restriksjonsenzym, sette det inn eller tilføye det inn i et hensiktsmessig sete i bFGF-genet ved bruk av DNA-ligase. Når ikke et egnet restriksjonsenzym gjenkjenningssete er tilstede i bFGF-genet, kan restriksjonsenzym-gjenkjenningsseter bli produsert ved den ovenfor nevnte seterrettede mutagenesen.

For å for eksempel tilveiebringe et mutein som mangler bFGF-bestanddelaminosyrer, blir et mutagent bFGF-gen produsert på 3 forskjellige måter. I et av de 3 tilfellene, blir aminoterminalen til bFGF deletert; i et annet tilfelle blir midtområdet til bFGF deletert; og i det gjenværende ene tilfellet blir karboksyterminalen deletert.

Ved delesjon av aminoterminalen, blir et kodon til genet som koder for karboksyterminalen til aminosyresekvensen som skal bli deletert forandret til Met-kodende kodonet ATG ved seterrettet mutagenese, og kodonet har en hensiktsmessig restriksjonsenzym-gjenkjenningssete produsert i den 5'-terminale siden derav for å lette dets ligering til promoteren.

Når det gjelder delesjon av et sentralt område til aminosyresekvensen, blir et unikt restriksjonsenzym-gjenkjenningssete produsert, ved seterrettet mutagenese, i hver av de 5'-terminale og 3'-terminale sidene til genet som koder for sekvensen som skal bli deletert, og det relevante genet blir spaltet av genet ved enzymatisk spalting, og deretter re-

ligering av de gjenværende 2 genfragmentene for å konstruere det ønskede genet som koder for bFGF som nå mangler de spesifiserte aminosyrene. Det er selvfølgelig viktig ikke å forandre leserammen ved spalting med restriksjonsenzymene.

Når det gjelder delesjon av en aminosyresekvens i den karboksylterminale siden, blir et kodon for genet som koder for amino-terminale aminosyrer i sekvensen som skal bli deletert forandret til et stoppkodon ved sete-rettet mutagenese.

For å tilveiebringe et mutein som har fått aminosyrebestanddelen cystein substituert, blir et mutagent bFGF-gen produsert ved eliminering, for eksempel, av Cys-ekspresjonskodonet eller ved indusering av sete-rettet mutagenese i Cys-ekspresjonskoden TGC eller TGT ved bruk av en syntetisk nukleotidprimer som forandrer kodonet slik at det koder for en annen aminosyre. En primer blir hybridisert med en plusstråd til FGF-genet, for eksempel, for å forandre cystein (26-posisjonen) til humant bFGF til serin. Som en hensiktsmessig nukleotidprimer, kan for eksempel, 5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3', bli nevnt, hvori den understrekkede tripletten representerer det forandrede kodonet.

Som en hensiktsmessig primer for å forandre cystein (70-posisjonen) til serin, kan 5'-AACGATTAGCGCTCACTC-3' bli nevnt, hvori den understrekkede tripletten representerer det forandrede kodonet.

Som en hensiktsmessig primer for forandring av cystein (88-posisjonen) til serin, kan 5'-GTAACAGACTTAGAAGCTAGT-3', hvori den understrekkede tripletten representerer det forandrede kodonet.

Som en hensiktsmessig primer for forandring av cystein (93-posisjonen) til serin, kan 5'-TCGAAGAAGAAAGACTCATCC-3' bli

nevnt hvori den understrekede tripletten representerer det forandrede kodonet.

5 Når det gjelder Cys (26-posisjonen) forandres cystein til serin via T → A ombytting av den første basen; når det gjelder Cys (70-posisjon) forandres cystein til serin via T → C ombytting av den første basen og T → C ombytting av den andre basen; og når det gjelder Cys (88-posisjonen, 93-posisjonen), forandres cystein til serin via G → C ombytting
10 av den andre basen.

En bør merke seg at ved produsering av bFGF-muteinprotein ved sete-rettet mutagenese kan 2 eller flere variasjoner bli indusert i DNA-sekvensen, dvs. DNA-kodonene som korresponde-
15 rer til aminosyrene er blitt degenerert.

For å tilveiebringe et mutein som har fått substituert med en annen aminosyre enn aminosyrebestanddelen cystein, blir et mutagent bFGF-gen produsert ved forandring av et kodon ved
20 bruk av en oligonukleotidprimer på samme måte som et cystein.

Oligonukleotidprimerkonstruksjonen varierer selvfølgelig avhengig av hvilken aminosyre som skal bli forandret.

25 Primeren blir hybridisert til en enkelt-trådet fag resulterende fra kloning av en enkelt tråd av bFGF-genet, såsom M13 [Yanish-Perron, C. Vieira, og J. Messing, Gene, 33, 103-119 (1985); Messing, J., Methods in Enzymology, 101, 20-78 (1983)], fd [R. Herrman et al., Molecular and General
30 Genetics, 177, 231 (1980) eller Ø X 174 [M. Smith og S. Gillam, Genetic Engineering, Plenum Press, Vol.3, s. 1-32 (1981)]. Det blir bemerkt at fagen har evnen til å bære enten plusstråden eller minustråden til genet. Når fagen bærer en minustråd, i tillegg til uoverensstemmelser fra det
35 relevante kodonet som bestemmer en triplett som koder for en annen aminosyre, kan primeren ha uoverensstemmelser forårsaket av kodondegenerasjon fra plusskjederegionen som

inneholder kodonet hvor mutasjonen skal bli indusert i. Når fagen bærer en plusstråd, behøver ikke primeren å være komplementær til plusstrådregionen som inneholder kodonet som skal bli mutert, likeledes hensiktsmessige uoverensstemmelser fra tripletten som blir parret til kodonet som skal bli deletert. Betingelsene som blir anvendt for hybridisering er beskrevet av M. Smith og S. Gillam i litteraturen nevnt ovenfor. Temperaturen er vanligvis mellom omtrent 0°C og 70°C, vanligvis mellom omtrent 10°C og 50°C. Etter hybridisering blir primeren forlenget på fag-DNAet ved reaksjon ved Escherichia coli DNA-polymerase I, T4 DNA-polymerase, revers transkriptase eller annen hensiktsmessig DNA-polymerase. Resulterende dsDNA blir omdannet til en lukket sirkulær dsDNA ved behandling med DNA-ligase såsom T4 DNA-ligase. DNA-molekylene som inneholder enkelt-trådede regioner kan bli nedbrutt ved S1 endonukleasebehandling.

Den resulterende muterte heterodupleksen blir benyttet for å transformere en infiserbar vertsorganisme eller celle. Når verten replikerer heterodupleksen, blir avkom produsert fra begge trådene. Etter replikasjon blir mutantgenet isolert fra et avkom med den mutante tråden, og blir satt inn i en hensiktsmessig vektor, som deretter blir benyttet for å transformere en hensiktsmessig vertsorganisme eller celle.

Fag-DNA som inneholder mutasjonsgenet blir deretter isolert, og inkorporert i et plasmid.

Eksempler på plasmider hvori DNA blir inkorporert, innbefatter plasmider avledet 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 avledet fra Bacillus subtilis såsom pUB110 [Biochemical and Biophysical Research Communication, 112, 678 (1983)]; men andre plasmider kan også bli benyttet, forutsatt at det blir replikert og opprettholdt i verten.

Som fremgangsmåter for inkorporering i plasmid, kan for eksempel fremgangsmåten beskrevet i Molecular Cloning, T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, s. 239 (1982), bli nevnt.

5

Det klonede genet blir ligert nedstrøms for en promoter i et egnet befordringsmiddel (vektor) for ekspresjon for å tilveiebringe en ekspresjonsvektor.

10

Vektorer innbefatter de ovenfor nevnte plasmidene avledet fra *Escherichia coli* (f.eks. pBR322, pBR325, pUC12 og pUC13), plasmidene avledet fra *Bacillus subtilis* (f.eks. pUB110, pTP5 og pC194), plasmider avledet fra gjær (f.eks. pSH19 og pSH15), bakteriofag såsom λ -fag, og dyrevirus såsom retrovirus og vaksiniavirus.

15

Nevnte gen kan ha ATG som et translasjonsinitieringskodon ved dets 5'-terminale ende, og kan også ha TAA, TGA eller TAG som et translasjonstermineringskodon ved dets 3'-terminale ende. For ekspresjon av nevnte gen blir en promoter ligert oppstrøms for dette. En hvilken som helst promoter kan bli anvendt i foreliggende oppfinnelse, forutsatt at det korresponderer riktig til verten som blir benyttet for genekspressjon.

20

Når verten for transformasjon er en bakterie fra slekten *Escherichia*, er trp promoter, lac promoter, rec A promoter, λ PL promoter, lpp promoter, osv. hensiktsmessige; når verten er en bakterie fra slekten *Bacillus*, er SP01 promoter, SP02 promoter, penP promoter osv. hensiktsmessige; når verten er gjær, er PH05 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter, osv. hensiktsmessige. Det er foretrukket at verten er en bakterie fra slekten *Escherichia*, og at promoteren er en trp-promoter eller λ PL promoter.

25

30

35

Når verten er en dyrecelle, innbefatter hensiktsmessige promotere, promotere avledet fra SV40 og retrovirus-promotere; spesielt foretrukket er promotere avledet fra SV40.

5 Når vektoren som er konstruert slik blir anvendt, som inneholder et rekombinant DNA med en mutein-kodende basesekvens, blir en transformant produsert.

10 Som verter, kan for eksempel bakterien fra slekten *Escherichia*, bakterier fra slekten *Bacillus*, gjær, dyreceller osv. bli nevnt.

Som eksempler på nevnte bakterier fra slekten *Escherichia*, kan *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)] bli nevnt.

20 Som eksempler på nevnte bakterier fra slekten *Bacillus*, kan *Bacillus subtilis* MI114 [Gene, 24, 255 (1983)] og 207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)].

25 Som eksempler på nevnte gjær, kan *Saccharomyces cerevisiae* AH22R⁻, NA87-11A og DKD-5D bli nevnt.

Som eksempler på dyreceller, kan simiancelle COS-7, Vero, kinesisk hamster ovariecelle CHO, muse L-celle og humant FL-celle bli nevnt.

30 Transformasjon av ovenfor nevnte bakterier fra slekten *Escherichia* blir utført i henhold til, for eksempel, fremgangsmåten beskrevet i Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972), Gene, 17, 107 (1982), osv.

Transformasjon av bakterier fra slekten *Bacillus* blir utført i henhold til, for eksempel, fremgangsmåtene beskrevet i *Molecular and General Genetics*, 168, 111 (1979) osv.

- 5 Transformasjon av gjær blir utført i henhold til, for eksempel, fremgangsmåten beskrevet i *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978).

- 10 Transformasjon av dyreceller blir utført i henhold, for eksempel, fremgangsmåten beskrevet i *Virology*, 52, 456 (1973).

- 15 En transformant som inneholder en vektor inneholdende et rekombinant DNA med en mutein-kodende basesekvens blir dermed tilveiebragt.

Nevnte transformant blir dyrket i et medium som lar det produsere mutein.

- 20 Ved dyrking av en transformant hvor verten er en bakterie fra slekten *Escherichia* eller *Bacillus*, er væskemedium hensiktsmessig for dyrkingen, som inneholder karbonkilder, nitrogenkilder, mineral, og andre stoffer som er essensielle for veksten til nevnte transformant. Som karbonkilder kan for eksempel glukose, dekstrin, oppløselig stivelse, sukrose, osv., bli nevnt; som nitrogenkilder kan for eksempel uorganiske eller organiske stoffer såsom ammoniumsalter, nitrater, maisekstraktvæske, pepton, kasein, kjøttekstrakt, soyabønnekake og potetetekstrakt bli nevnt; som mineraler kan for eksempel kalsiumklorid, natriumdihydrogenfosfat og magnesiumklorid bli nevnt. Gjærekstrakter, vitaminer, vekstakselererende midler osv., kan også bli tilsatt.

- 35 Det er ønskelig at pH på mediet er omtrent 6 til 8.

Som et eksempel på hensiktsmessig medium for dyrking av bakterier fra slekten *Escherichia*, kan M9-medium inneholdende

glukose og kasaminytre bli nevnt [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)]. Kjemikalier såsom 3 -indolylakrylsyre kan også bli tilsatt når det er nødvendig å
5  ke promoter-effektiviteten.

Når verten er en bakterie fra slekten Escherichia, blir dyrkingen vanligvis utført ved omtrent 15 til 43 C i omtrent 3 til 24 timer, og lufting og/eller omrøring kan også bli
10 tilført hvis nødvendig.

Når verten er en bakterie fra slekten Bacillus utføres dyrkingen vanligvis ved 30 til 40 C i fra 6 til 24 timer, og lufting og/eller omrøring kan om nødvendig bli benyttet.
15

Som et medium for dyrking av transformanter hvor verten er gj r, kan for eksempel Burkholders minimalmedium [Bostian, K.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)] bli nevnt. Det er foretrukket at pH på mediet blir justert til
20 omtrent 5 til 8. Dyrkingen blir vanligvis utført ved omtrent 20 til 35 C i omtrent 24 til 72 timer, og lufting og/eller omrøring blir tilsatt hvis nødvendig.

Som medium for dyrking av transformanter hvor verten er en
25 dyrecelle kan for eksempel MEM-medium inneholdende omtrent 5 til 20  føtalt bovinserum [Science, 122, 501 (1952)], DMEM-medium [Virology, 8, 936 (1959)], RPMI1640-medium [Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)] og 199-medium [Proceeding of the Society for the Biological Medi-
30 cine, 73, 1 (1950)]. Det er foretrukket at pH er på omtrent 6 til 8. Dyrkingen blir vanligvis utført ved omtrent 30 til 40 C i omtrent 15 til 60 timer, og lufting og/eller omrøring kan også bli tilsatt hvis nødvendig.

35 Separasjon og rensing av muteinet fra den ovenfor nevnte kulturen kan for eksempel bli utført med følgende fremgangsmåter.

Ved ekstrahering av mutein fra dyrkede bakterier, sopp eller dyreceller, kan det for eksempel bli benyttet, hvis det er hensiktsmessig, fremgangsmåten hvori bakterier, sopp eller dyreceller, etter dyrking, blir samlet ved bruk av en kjent fremgangsmåte, og suspendert i en bufferoppløsning inneholdende et proteindenaturerende middel såsom guanidinhydroklorid for å eluere det ønskede proteinet ut av cellene, og fremgangsmåten hvori bakterier, sopp og dyreceller, etter nedbrytning ved French press, ultrasonikering, lysozymbehandling og/eller frysing-tining, blir utsatt for sentrifugering for å tilveiebringe muteinet. Fremgangsmåten som anvender lysozymbehandling i kombinasjon med ultrasonikering er foretrukket.

Rensing av mutein fra supernatanten slik tilveiebragt kan bli utført ved bruk av velkjente fremgangsmåter for separasjon og rensing i hensiktsmessige kombinasjoner. Som eksempler på velkjente fremgangsmåter for separasjon og rensing, kan fremgangsmåtene basert på oppløselighet såsom ut-salting og oppløsningsmiddelpresipitering; fremgangsmåter hovedsakelig basert på forskjeller i molekylvekt såsom dialyse, ultrafiltrering, gelfiltrering og SDS-polyakrylamidgelelektroforese; fremgangsmåter basert på forskjeller i elektrisk ladning, såsom ionebytte-kromatografi; fremgangsmåter basert på spesifikk affinitet såsom affinitets-kromatografi; fremgangsmåter basert på forskjeller i hydrofobisitet såsom revers fase high performance liquid chromatography; og fremgangsmåte basert på forskjeller i isoelektrisk punkt såsom isoelektrisk elektroforese kan bli nevnt.

Ved utsetting av den ovenfornevnte supernatanten for ionebytte-kromatografi ved bruk av DEAE cellulose osv. som bærer, kan urenheter såsom nukleinsyrer og surt protein bli fjernet. Det er for eksempel effektivt å sende supernatanten gjennom en DEAE cellulosekolonne ekvilibrert med en nesten nøytral bufferoppløsning såsom Tris, og oppsamling av fraksjonen som ikke blir adsorbert til kolonnen. Ved videre å

utsette den samlede fraksjonen for ione-byttekromatografi ved bruk av en CM cellulosebærer eller lignende, er det mulig å adsorbere muteinet til bæreren, og eluere muteinet med en salt oppløsning. Disse eluatene kan bli frysetørket etter dialyse.

Affinitetskromatografi ved bruk av heparin-Sepharose er velegnet for rensing av bFGF-mutein i ekstraktene. bFGF-muteinproteinet kan blant annet bli rensset ved å applisere eluatene nevnt ovenfor på en heparin-Sepharose-kolonne ekvilibrert med nesten nøytral buffer (f.eks. Tris eller fosfatbuffer), nøye vasking av kolonnen og utføring av elueringen med lineær gradient som er dannet med NaCl eller lignende.

Heparinkolonner (f.eks. Shodex AF-pak HR-894, tilgjengelig fra Showa Denko, Japan) utviklet for high performance liquid kromatografi (HPLC) er spesielt effektiv.

I dette tilfellet kan bFGF-muteinet bli utvunnet som homogent produkt på samme måte som i heparin-Sepharose-kolonnetilfellet nevnt ovenfor, dvs. ved å applisere prøven på en heparin-kolonne med en omtrent nøytral buffer, nøye vasking av kolonnen og utføre eluering på en lineær gradient som er dannet med NaCl.

Det slik tilveiebragte produktet kan ved dialyse og frysetørring bli laget til et tørt pulver. Å bevare produktet med en tilsatt bærer (f.eks. serumalbumin) er ønskelig siden adsorpsjon av produktet på karveggen dermed kan bli forhindret.

Det er også foretrukket å tilsette en liten mengde av et reduserende middel i løpet av rensingen eller bevaringen, for å forhindre oksydering av produktet.

Som eksempler på reduserende middel kan β -merkaptoetanol, ditiontreitol, gluation osv. bli nevnt.

På denne måten kan vesentlig rent bFGF-muteinprotein bli tilveiebragt. Det vesentlig rene bFGF-muteinproteinet ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter produkter med bFGF-muteinproteininnhold som ikke er mindre enn 95% (w/w) og, fortrinnsvis, produkter med bFGF-muteininnhold som ikke er mindre enn 98% (w/w).

Muteinet som blir tilveibragt slik inneholder fibroblast-vekstfremmende aktivitet, vekststimulerende aktivitet til kapillære endotel-celler og karvekst-stimulerende aktivitet, har høy stabilitet og er lite toksisk; derfor kan det bli benyttet som et helbredingsakselererende middel for brannskader, sår, postoperative vev, osv., eller som et terapeutisk medikament basert på dets karvekststimulerende virkning for trombose, arterosklerose, osv. Det kan også bli benyttet som et reagens for akselerering av celledyrking.

Et mutein hvori minst en cysteinbestanddel er erstattet med serin er foretrukket, fordi muteinet er veldig stabilt.

Muteinet fremstilt ifølge oppfinnelsen, kan når det blir anvendt som et farmasøytisk stoff trygt bli administrert parenteralt eller oralt til varmblodige dyr (f.eks. mennesker, mus, rotter, hamstere, kaniner, hunder og katter) rett i pulverform eller etter preparering til en farmasøytisk komposisjon (f.eks. injeksjon, tabletter, kapsler, oppløsninger og salver) med andre farmasøytiske tillatbare bærere, tilsetningsstoffer eller fortynningsmidler.

Preparering for injeksjon blir utført i henhold til en rutinefremgangsmåte ved anvendelse av for eksempel en fysiologisk saltvannoppløsning eller en vannholdig oppløsning inneholdende glukose og andre hjelpemidler. Farmasøytiske

preparater såsom tabletter og kapsler kan også bli fremstilt i henhold til vanlige fremgangsmåter.

Nevnte mutein fremstilt ifølge oppfinnelsen, blir for eksempel når det blir anvendt som et hvilket som helst av de ovenfor nevnte farmasøytiske stoffene, administrert til de ovenfor nevnte varmblodige dyrene i hensiktsmessig mengde selektert i området fra 1 ng/kg til 100 µg/kg daglig, med hensyn på administreringsvei, symptomer osv.

Muteinet blir fortrinnsvis tilsatt mediet når det blir anvendt som et reagens for akselerering av celledyrkingen, slik at det er i en mengde fra 0,01 til 10 µg pr. 1 liter medium, fortrinnsvis fra 0,1 til 10 µg pr. 1 liter medium.

Forkortingene for baser, aminosyrer osv., som er benyttet i foreliggende spesifikasjon og tegningene, er basert på forkortelsene spesifisert av IUPAC-IUB kommisjonen til biokjemisk nomenklatur eller de som vanligvis blir benyttet innenfor relevante områder, og tilfeller er sammenfattet nedenfor. Hvis det i en aminosyre er mulig for tilstedeværelse av en optisk isomer, er isomeren en L-form hvis ikke noe annet er spesifisert.

DNA	:	Deoksyribonukleinsyre
cDNA	:	Komplementær deoksyribonukleinsyre
A	:	Adenin
T	:	Tymin
G	:	Guanin
C	:	Cytosin
RNA	:	Ribonukleinsyre
dATP	:	Deoksyadenosintrifosfat
dTTP	:	Deoksytymidintrifosfat
dGTP	:	Deoksyguanosintrifosfat
dCTP	:	Deoksyctydidintrifosfat
ATP	:	Adenosintrifosfat
Tdr	:	Tymidin

	EDTA :	Etylendiamintetraeddiksyre
	SDS :	Natriumdodecylsulfat
	Gly :	Glysin
	Ala :	Alanin
5	Val :	Valin
	Leu :	Leucin
	Ile :	Isoleucin
	Ser :	Serin
	Thr :	Treonin
10	Cys :	Cystein
	Met :	Metionin
	Glu :	Glutaminsyre
	Asp :	Asparaginsyre
	Lys :	Lysin
15	Arg :	Arginin
	His :	Histidin
	Phe :	Fenylalanin
	Tyr :	Tyrosin
	Trp :	Tryptofan
20	Pro :	Prolin
	Asn :	Asparagin
	Gln :	Glutamin

I foreliggende spesifikasjon og tegninger, når det gjelder
25 nummerering av de humane bFGF-bestanddelaminosyrene, er Met
som kommer fra translasjonsinitieringskodonet bestemt som den
første aminosyren, hvis ikke noe annet blir spesifisert.

Følgende transformanter som ble produsert i referanse-
30 eksemplene eller eksemplene nevnt nedenfor ble deponert ved
Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Japan og ved the
Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science
and Technology, Ministry of International Trade and Industry
(FRI), Japan, under aksesjonsnumrene på deponeringsdatoene
35 vist i tabell 1 (Deponeringsdatoene er indikert i parentes).
Når det gjelder deponeringsnummeret til FRI, FERM BP nummeret
betegner deponeringsnummeret under Budapest Treaty; og når

det gjelder både FERM P nummer og FERM BP nummer som beskrevet, viser det at deponeringen under nummeret til FERM P er blitt omdannet til deponering under Budapest Treaty og transformantene er blitt lagret i FRI under numrene til FERM BP.

TABELL 1

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

Følgende hybridomaer som ble produsert i eksempel 35(3)(d) nevnt nedenfor ble deponert til IFO den 17 August 1987 under aksesjonsnumrene indikert nedenfor.

Muse HbF 52-celle: IFO 50143

Muse HbF 78-celle: IFO 50144

Kort forklaring av tegningene

5 Figur 1 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF og aminosyresekvensen som utledet derifra.

Figur 2 viser de syntetiske oligomerene anvendt som primere for å mutere Cys-kodende kodoner til Ser-kodende kodoner.

10

Figur 3 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS1, båret av plasmid pTB739 tilveiebragt i eksempel 2, og aminosyresekvensen til humant bFGF-mutein CS1, som blir kodet derfra. De muterte basene er understreket, og regionen som inneholder den omdannede aminosyren er omgitt med en firkant.

15

Figur 4 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS2, båret av plasmid pTB742 tilveiebragt i eksempel 3, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS2, som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionen som inneholder den omdannede aminosyren er omgitt med en firkant.

20

Figur 5 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS3, båret av plasmid pTB743 tilveiebragt i eksempel 4, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS3, som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionen som inneholder den omdannede aminosyren er omgitt med en firkant.

25

30

Figur 6 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS4, båret av plasmid pTB744, tilveiebragt i eksempel 5, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-muteinet CS4, som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionen som inneholder den omdannede aminosyren er omgitt med en firkant.

35

Figur 7 viser konstruksjonsskjemaet for plasmid pTB739 i eksempel 2(1).

Figur 8 viser konstruksjonsskjemaet for plasmid pTB742 i eksempel 3(1).

Figur 9 viser konstruksjonsskjemaet for plasmid pTB743 i eksempel 4(1).

Figur 10 viser konstruksjonsskjemaet for plasmid pTB744 i eksempel 5(1).

Figur 11 viser basesekvensen for koder for det humane bFGF-mutein CS23, båret av plasmid pTB762 tilveiebragt i eksempel 7, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS23, som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder begge de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 12 viser konstruksjonskartet til plasmid pTB762 i eksempel 7(1).

Figur 13 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS123, båret av plasmid pTB764 tilveiebragt i eksempel 9, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS123 som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 14 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB764 i eksempel 9(1).

Figur 15 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS1234, båret av plasmid pTB765 tilveiebragt i eksempel 11 og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS1234, som blir kodet derav. Muterte baser er understreket, og

regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 16 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB765 i eksempel 11(1).

Figur 17 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS12, båret av plasmid pTB776 tilveiebragt i eksempel 15, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS12, som er kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 18 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB776 i eksempel 15(1).

Figur 19 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS24, båret av plasmid pTB778 tilveiebragt i eksempel 16, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS24, som er kodet derav. De muterte basene er understreket og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 20 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB778 i eksempel 16(1).

Figur 21 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS13, båret av plasmid pTB779 tilveiebragt i eksempel 17, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS13, som er kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 22 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB779 i eksempel 17(1).

Figur 23 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS14, båret av plasmid pTB763 tilveiebragt i eksempel 18, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS14, som er kodet derav. De muterte basene er understreket og regionene som inneholder omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 24 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB763 i eksempel 18(1).

Figur 25 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS34, båret av plasmid pTB777 tilveiebragt i eksempel 19, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS34, som er kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 26 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB777 i eksempel 19(1).

Figur 27 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS234, båret av plasmid pTB782 tilveiebragt i eksempel 20, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS234, som er kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 28 viser konstruksjonsskjemaet for plasmid pTB782 i eksempel 16(1).

Figur 29 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS124, båret av plasmid pTB780 tilveiebragt i eksempel 21, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS124, som blir kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 30 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB780 i eksempel 21(1).

Figur 31 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein CS134, båret av plasmid pTB781 tilveiebragt i eksempel 22, og aminosyresekvensen til det humane bFGF-mutein CS134, som er kodet derav. De muterte basene er understreket, og regionene som inneholder de omdannede aminosyrene er omgitt med firkanter.

Figur 32 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB781 i eksempel 22(1).

Figurene 33 til 35 viser HPLC (high performance liquid chromatography) elueringsmønstrene til muteinet tilveiebragt i eksempel 24.

Figur 36 viser HPLC (high performance liquid chromatography) elueringsmønstrene til muteinoksydene tilveiebragt i eksempel 25.

Figur 37 viser HPLC (high performance liquid chromatography) elueringsmønstrene til muteinreduksjonsproduktene tilveiebragt i eksempel 26.

Figur 38 viser de syntetiske oligomerene anvendt som primere for å fremstille mutein-kodende DNAer.

Figur 39 viser basesekvensen til fag M13-PN10 tilveiebragt i eksempel 27 og aminosyresekvensen til mutein TM910 som er kodet derav, mutein TM910 er tilveiebragt i eksempel 32.

Figur 40 viser basesekvensen til fag M13-PN14 tilveiebragt i eksempel 27 og aminosyresekvensen til mutein N14 som er kodet derav, mutein N14 blir tilveiebragt i eksempel 34.

Figur 41 viser basesekvensen til fag M13-PC86 tilveiebragt i eksempel 27, og aminosyresekvensen til mutein C86 som er kodet derav, mutein C86 blir tilveiebragt i eksempel 35.

5 Figur 42 viser basesekvensen til fag M13-PDN42 tilveiebragt i eksempel 27 og aminosyresekvensen til mutein DN42 som er kodet derav, mutein DN42 blir tilveiebragt i eksempel 36.

10 Figur 43 viser basesekvensen til fag M13-PRQ45 tilveiebragt i eksempel 27 og aminosyresekvensen til mutein RQ45 som er kodet derav, mutein RQ45 blir tilveiebragt i eksempel 37.

15 Figur 44 viser basesekvensen til fag M13-PNR42 tilveiebragt i eksempel 28, og aminosyresekvensen til mutein NR42 som er kodet derav, mutein NR42 blir tilveiebragt i eksempel 38.

Figur 45 viser stabiliteten av de humane bFGF-muteinene CS2, CS3 og CS23 tilveiebragt i eksempel 29.

20 Figur 46 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB854 i eksempel 32.

Figur 47 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB852 i eksempel 33.

25 Figur 48 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein N10, båret av plasmid pTB852 tilveiebragt i eksempel 33, og aminosyresekvensen til mutein N10 som er kodet derav, mutein N10 blir tilveiebragt i eksempel 33. De muterte basene er understreket.

Figur 49 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB795 i eksempel 34.

35 Figur 50 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB796 i eksempel 35.

Figur 51 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB797 i eksempel 36.

Figur 52 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB799 i eksempel 37.

Figur 53 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB798 i eksempel 38.

Figur 54 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein FINT, båret av plasmid pTB853 tilveiebragt i eksempel 39, og aminosyresekvensen til mutein FINT som er kodet derav, mutein FINT blir tilveiebragt i eksempel 39. De muterte basene er understreket.

Figur 55 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB853 i eksempel 39.

Figur 56 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB855 i eksempel 40.

Figur 57 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein N41 båret av plasmid pTB855 tilveiebragt i eksempel 40, og aminosyresekvensen til mutein N41 som blir kodet derav, mutein N41 blir tilveiebragt i eksempel 40. De muterte basene er understreket.

Figur 58 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB856 i eksempel 41.

Figur 59 viser basesekvensen som koder for det humane bFGF-mutein C129 båret av plasmid pTB856 tilveiebragt i eksempel 41, og aminosyresekvensen til mutein C129 som er kodet derav, mutein C129 blir tilveiebragt i eksempel 41. De muterte basene er understreket.

Figur 60 viser konstruksjonsskjemaet til plasmid pTB831 i eksempel 42.

Referanse-eksempel 1

5 (Konstruksjon av plasmid som inneholder genet som koder for humant bFGF)

(1) Isolering av cDNA-inneholdende plasmid:

Et cDNA hvor verten er Escherichia coli x1776 og som ble
10 fremstilt ved inkorporering av en primær kulturcelle mRNA avledet fra menneske-forhud i pCD-vektor [med referanse til Okayama et al., Molecular Cell Biology, 3, 280 (1983)] ble levert av Dr. Okayama ved the National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, USA. Fra dette DNA
15 ble et plasmid DNA ekstrahert ved alkalifremgangsmåten [Birnboim, H.C. og Doly, J., Nucleic Acids Research, 1, 1513 (1979)], og dette DNA ble infisert med Escherichia coli DH1 for å produsere omtrent 2×10^6 kloner av cDNA-bibliotek med Escherichia coli DH1.

20

Nevnte cDNA-bibliotek ble med bruk av Escherichia coli DH1 spredt ut over 10 nitrocellulosefiltre (Millipore Inc., U.S.A. HATF filtre) i en mengde på omtrent 5×10^4 kloner/-filter, deretter ble totalt 20 kopi (replica) filtre i par
25 preparert ved bruk av de øverste 10 filtrene som hovedfiltre. Escherichia coli celler på kopifiltrene ble lysert med en 0,5N NaOH oppløsning, og det utsatte denaturerte plasmid DNA ble immobilisert til filtrene [Grunstein, M. and Hogness, D.S. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 3961 (1975)].

30

Basert på aminosyre nr. 13 til 20 (Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro) og aminosyre nr. 89 til 96 (Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu) av aminosyresekvensen til bovin basisk fibroblastvekstfaktor som rapportert av F. Esch et al [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6507 (1985)], ble basesekvensene korresponderende til disse aminosyresekvensene kjemisk syntetisert. (For noen kodoner, ble 3. bokstav vilkårlig fastsatt.

35

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, respektivt. De understrekede bokstavene representerer de fastsatte basene). For hver av disse oligonukleotidene ble reaksjonen utført ved 37°C i en time i 50 µl av en reaksjonsvæske ved bruk av T4 polynukleotid kinase (produsert av Takara Shuzo Co., Ltd., Japan) [oligonukleotid 0,1 µg, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,10 mM MgCl₂, 10 mM merkaptoetanol, 50 µCi γ-³²P ATP (>5000Ci/mmol), 3 enheter T4 polynukleotidkinase) for å merke den 5'-terminale enden til oligonukleotidene med ³²P.

Ved bruk av de 2 oligonukleotidene som ble merket i fremgangsmåten ovenfor som prober, ble disse uavhengig assosiert til et kopifilter hvor DNAet hadde blitt immobilisert. Assosiasjonsreaksjoner ble utført ved 35°C i 16 timer i en oppløsning bestående av 5 X SSPE [180 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA (pH 7,4) 5 X Denhardts oppløsning, 0,1 % SDS og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA inneholdende 10 µCi probe. Etter reaksjonen ble filteret vasket med en 0,1% SDS-oppløsning bestående av 5 X SSC [0,15M NaCl, 0,015M natriumsitrat] ved romtemperatur i 30 minutter 3 ganger, og deretter ved 45°C i 30 minutter 2 ganger [T. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, s. 309 (1982)].

Radioautogrammer ble tatt fra de vaskede filtrene, og det ble lett etter stammer som reagerte på begge probene ved overlapping av de 2 radioautogrammene fra hvert kopifilter-par. Ved bruk av denne fremgangsmåten ble 1 stamme som reagerte på begge probene [Escherichia coli K12 DH1/pTB627 (IFO 14494, FERM BP-1280)] tilveiebragt fra 5 X 10⁵ kloner.

(2) Fra stammen tilveiebragt i (1) ovenfor [Escherichia coli K12 DH1/pTB627 (IFO 14494, FERM BP-1280)] ble et plasmid DNA (pTB627) ekstrahert og rensset ved bruk av alkalifremgangsmåten [Nucleic Acids Research, 1, 1513 (1979)].

Referanse-eksempel 2

(Ekspresjon av genet som koder for humant bFGF i *Escherichia coli*).

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB669 for ekspresjon av humant bFGF:

Plasmid pTB627 inneholdende et humant bFGF cDNA tilveiebragt i referanse-eksempel 1 (2) ovenfor ble spaltet ved bruk av restriksjonsenzymene Ava I og Bal I for å tilveiebringe et
10 0,44 kb DNA-fragment inneholdende regionen som koder for humant bFGF. Til Bal I spaltesetet (butt ende) til dette DNA-fragmentet ble Bgl II linker pCAGATCTG ligert ved bruk av T4 DNA-ligase, og et 0,44 kb Ava I-Bgl II DNA-fragment ble separert. Til dette 0,44 kb Ava I-Bgl II DNA-fragment ble T4
15 DNA-ligase tilsatt for å ligere sammen Bgl II-spaltings-setene, og dette ble etterfulgt av DNA-polymerase (Klenow-fragment) reaksjon i nærvær av dXTP for å gjøre Ava I spaltesetet butt. Til dette DNA-fragmentet ble de syntetiske oligonukleotidene 5'AATTCTATGCCAGCATTGC3' og
20 5'GCAATGCTGGCATAG3' ligert etter fosforylering, ved bruk av T4 DNA-ligase, og dette ble etterfulgt av spalting ved bruk av EcoR I-Bgl II for å fremstille et DNA-fragment på omtrent 0,46 kb. DNAet til plasmid ptrp781 [Kurokawa, T. et al., Nucleic Acids Research, 11, 3077-3085 (1983)], som har trp
25 promoter, ble spaltet ved bruk av Pst I, og ble gjort butt ved T4 DNA-polymerase reaksjon. Etter ligering av Bgl II linker pCAGATCTG til den butte enden ved bruk av en T4 DNA-ligasereaksjon, ble spalting ved bruk av EcoR I-Bgl II utført for å separere et DNA-fragment på omtrent 3,2 kb inneholdende
30 trp-promoter, tetracyklinresistensgenet og et plasmid replikasjonsinitieringssete. Det ovenfor nevnte 0,46 kb EcoR I-Bgl II DNA-fragmentet inneholdende genregionen som koder for humant bFGF og dette 3,2 kb DNA-fragmentet ble ligert sammen ved en T4 DNA-ligase reaksjon for å konstruere pTB669
35 for human bFGF-ekspresjon.

Ved bruk av dette plasmid pTB669 ble *Escherichia coli* DH1 transformert, hvorpå *Escherichia coli* Dh1/pTB669, som inneholder plasmid pTB669 ble tilveiebragt.

5 I tillegg ble *Escherichia coli* K12 MM294 og C600 transformert på samme måte som ovenfor ved bruk av pTB669, hvorved *Escherichia coli* K12 MM294/pTB669 (IFO 14532, FERM BP-1281) og *E. coli* C600/pTB669 ble respektivt tilveiebragt.

10 (2) Preparering av bakterielle celleekstrakter:

Hver av de ovenfor nevnte transformantene ble dyrket i et M9 medium inneholdende 1% glukose, 0,4% kasaminyre og 8 µg/ml tetracyklin, og når Klett-verdien var omtrent 200, ble 3β-indolyllakrylsyre i en konsentrasjon på 25 µg/ml satt til, og dette ble etterfulgt av dyrking i 4 timer til. Etter dyrking ble de bakterielle cellene samlet, og ble suspendert i en 10% sukroseoppløsning inneholdende en 1/20 mengde av 20 mM Tris-HCl (ph 7,6). Til denne suspensjonen ble 1mM fenylmetyl-sulfonylfluorid (PMSF), 10 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 10 mM spermidinhydroklorid og 100 µg/ml lysozym tilsatt (hvert tall viser den finale konsentrasjonen), og blandingen ble latt stå ved 0°C i 45 minutter, hvorpå den ble utsatt for ultrasonisering i 30 sekunder. Denne oppløsningen ble sentrifugert ved 18000 rpm (Sorval-sentrifuge, SS34 rotor) i 30 minutter for å tilveiebringe en supernatant, som ble benyttet som et bakterielt celleekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i bakterielle celleekstrakter:

30 Humane bFGF-aktiviteter er indikert ved vekten til standardprøven av rensset bovin hjerne-FGF (produsert av Takara Shuzo Co., Ltd.) i mengder som var ekvivalent til det som er bakterielle celleekstrakter i aktivitet i vekstfremmende virkning på BALB/c3T3-celler.

35

Muse BALB/c3T3-celler, i en mengde på 2×10^3 celler per brønn, ble inokulert i et DMEM-medium inneholdende 5 %

kalveserum på en Nunc 96-brønn mikrotiterplate (flat bunn) hvor hver brønn inneholder 0,2 ml medium, og som deretter ble dyrket. Neste dag ble mediet erstattet med et DMEM-medium inneholdende 0,5% kalveserum. Etter dyrking i 3 dager ble 10 μ l av et bakterielt celleekstrakt, som var blitt seriefor-

5 tynnet i 5-ganger trinn med et DME-medium inneholdende 0,5 % BSA, satt til hver brønn, og ble dyrket. 20 timer senere ble 2 μ l ^3H -Tdr (5 Ci/mmol, 0,5 Ci/ml RCC Amersham, UK) satt til hver brønn. 6 timer senere ble cellene strippet ved

10 behandling med en fosfatbufret oppløsning (PBS) inneholdende 0,2% trypsin-0,02% EDTA, og cellene ble høstet på et glassfilter ved bruk av en Titertech cellehøster, hvorefter mengden ^3H -Tdr i cellene ble bestemt ved bruk av en scintillasjonsteller. Ved bruk av samme fremgangsmåte, ble aktivi-

15 tetene til bovine hjerne FGF-prøver (produsert av Takara Shuzo) med kjent vekt bestemt. Fra arbeidskurven som slik ble tilveiebragt, ble mengdene av humant bFGF i de bakterielle celle-ekstraktprøvene beregnet. Resultatene er vist i tabell 2.

20 For kontroll ble den humane bFGF-produktiviteten til transformant E. coli DH1/ptrp781 tilveiebragt ved transformasjon av Escherichia coli DH1 ved bruk av plasmid ptrp781 bestemt.

25 Tabell 2. Humane bFGF-produktiviteter

Transformant	Humane bFGF-produktiviteter (per liter kulturmedium)
E. coli DH1/pTB669	2,95 mg
30 E. coli MM294/pTB669	23,15
E. coli C600/pTB669	8,15
E. coli DH1/ptrp781	<0,0005

Eksempel 1

(Produksjon av rekombinante DNAer inneholdende mutein-kodende basesekvens)

5 (1) Kloning av det humane bFGF-genet i M13-vektor:
Plasmid pTB669 tilveiebragt i referanse-eksempel 2 ble
spaltet med restriksjonsenzymene EcoR I og BamH I. Fagvektor
M13mp8 [J. Messing, Methods, en Enzymology, 101, 20-78
(1983)] replikerende-form (RF) DNA ble spaltet med restriks-
10 sjonsenzymene EcoR I og BamH I, og blandet med det humane
bFGF DNA-fragmentet avledet fra spaltet pTB669. Blandingen
ble deretter ligert sammen ved bruk av T4 DNA-ligase; det
ligerte DNAet ble transformert inn i en infiserbar celle av
stammen Escherichia coli JM105; den resulterende transforman-
15 ten ble inokulert på en plate ved bruk av Xga 1 som en
indikator [J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309-
321 (1981)]; plaquen inneholdende rekombinant fag (hvite
plaque) ble plukket; basesekvensen til den rekombinante
regionen ble bestemt ved dideoksynukleotid syntetisk kjede-
20 termineringsfremgangsmåte [J. Messing et al., Nucleic Acids
Research, 9, 309 (1981)], hvorved det ble bekreftet at humant
bFGF DNA var blitt satt inn riktig.

Fra denne M13-P0 klonen ble enkelt-trådet fag-DNA rensset, som
25 deretter ble benyttet som et templat for sete-rettet mutagen-
ese ved bruk av en syntetisk oligonukleotid.

(2) Sete-spesifikk mutagenese:

I nærvær av 0,1 mM adenosintrifosfat (ATP), 50 mM Tris
30 (hydroksymetyl)aminometanhydroklorid (Tris-HCl, pH 8,0), 10
mM MgCl₂, 5mM ditiotreitol (DTT) og 9 enheter T4 kinase, i en
total mengde på 50 µl, 40 pikomol syntetisk oligonukleotid:

5'>CGT TCT TGC TGT AGA GCC GCT <3'

[primer for omdanning av Cys 26 til Ser (gjenkjenningssekven-
35 sen for restriksjonsenzym Rsa I blir borte) (se figur 2)] ble
behandlet med T4 kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinase-
behandlede primeren (12 pikomol) ble varmet ved 67°C i 5

minutter, og ved 42°C i 25 minutter, i 50 µl av en blanding inneholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM MgCl₂ og 10mM β-merkaptoetanol, hvorpå primeren ble hybridisert til 5 µg enkelttrådet (ss) M13-P0 DNA. Den sammensmeltede blandingen ble deretter avkjølt på is, og satt til en 50 µl reaksjonsblanding inneholdende 0,5 mM deoksynukleotidtrifosfat (dNTP), 80 mM Tris-HCl (pH 7,4), 8mM MgCl₂, 100mM NaCl, 9 enheter DNA-polymerase I Klenow fragment, 0,5 mM ATP og 2 enheter T4 DNA-ligase, og reaksjonen ble utført ved 37°C i 3 timer, og ved 25°C i 2 timer, hvorpå reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 2 µl 0,2 mM EDTA. Reaksjonsproduktet ble benyttet for å transformere infiserbare JM 105-celler; transformantcellene som ble tilveiebragt slik, ble latt vokse over natt, hvorefter ssDNA ble isolert fra kulturmediumsupernatanten. Ved bruk av dette ssDNA som et templat for den andre syklusen i primer-forlenging, ble rensset RF-type DNA transformert inn i infiserbare JM 105-celler; de resulterende transformantcellene ble sådd ut over en agarskål, og ble dyrket over natt for å tilveiebringe fagplaques.

(3) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den anvendte syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'>AAC GAT TAG CGC TCA CTC C<3'

som dermed forandrer cystein-70-kodende kodonet slik at kodonet koder for serin. (En gjenkjenningsssekvens til restriksjonsenzym Hae II ble produsert). (Se figur 2).

(4) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den anvendte syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'>GTA ACA GAC TTA GAA GCT AGT<3'

som dermed forandrer cystein-88-kodende kodonet slik at kodonet koder for serin. (En gjenkjenningsssekvens for restriksjonsenzym Alu I ble produsert). (Se figur 2).

(5) Sete-rettet mutagenese:

Frengangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den anvendte syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'>TCG AAG AAG AAA GAC TCA TCC<3'

5 som dermed forandrer cystein-93-kodende kodonet slik at kodonet koder for serin. (En gjenkjenningssekvens for rekstriksjonsenzym Hinf I ble produsert). (Se figur 2).

10 (6) Screening og identifikasjon av plakk som er blitt gjort mutagene:

Plater inneholdende muterte M13-P0 plaques [ovenfor i (1)] og 2 plater inneholdende ikke-muterte M13-P0 fag plaque ble avkjølt til 4°C, og plaquene fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltere ved å holde et tørt filter
15 plassert på agarskålen i 5 minutter når det gjelder første filter, og i 15 minutter når det gjelder det andre filter. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorpå de ble nøytralisert ved å plassere dem i 5 minutter
20 til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl med en pH-verdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filter nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter tørket, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuurnovn. De overlappede filtrene ble
25 utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfat-
30 bufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hver av filtrene ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30
35 minutter. Filtrene ble deretter vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P0 plaques, ble undersøkt med en Geiger-

teller om de inneholdt radioaktivitet. Mens SSC-konsentrasjonen trinnvis ble redusert, ble kontrollfiltrene vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografer ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P0 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en kinasebehandlet oligonukleotidprobe. Ingen av kontrollplaqueene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P0 plaqueene hybridiserte til proben.

Et av de muterte M13-P0 plaqueene ble tatt, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra supernatanten ble ssDNA fremstilt, og fra bakteriecellepelletten ble en dobbelt-trådet (ds) DNA fremstilt. Basesekvensanalyser ble utført ved bruk av hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer.

Som et resultat, ble det respektivt bekreftet at TGC (Cys-26) kodonet var blitt forandret til et TCT (Ser) kodon; TGT (Cys-70) kodonet, til et AGC (Ser) kodon; TGT (Cys-88) kodon, til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodon, til et TCT (Ser) kodon.

I de muterte M13-P0 fagene ble fag hvori kodon Cys-26 var blitt et Ser-kodende kodon betegnet M13-P1; fag hvori kodonet Cys-70 var blitt et Ser-kodende kodon ble betegnet M13-P2; fag hvori kodonet Cys-88, M13-P3; og fag hvori kodonet Cys-93 var blitt et Ser-kodende kodon, ble betegnet M13-P4.

Eksempel 2

(Ekspresjon av genet som koder for det humane bFGF-muteinet i Escherichia coli)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB739 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P1 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 1 ovenfor ble spaltet ved bruk av restriksjonsenzymene EcoR I og Pst I for å tilveiebringe DNA-fragment med omtrent 0,5 kb inneholdende regionen som koder for det humane bFGF-muteinet.

5

Plasmid ptrp781 [Kurokawa, T. et al., Nucleic Acids Research, 11, 3077-3085 (1983)] DNA inneholdende et trp-promoter ble spaltet ved bruk av EcoR I-Pst I for å separere et omtrent 3,2 kb DNA-fragment inneholdende en trp-promoter, et tetracyklinresistensgen og et plasmid replikasjonsinitieringssete. Det ovenfor nevnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragmentet inneholdende genregionen som koder for det humane bFGF-muteinet og dette 3,2 kb DNA-fragmentet ble ligert ved en T4 DNA-ligasereaksjon for å konstruere plasmid pTB739 for human bFGF-muteinekspresjon (figur 7).

15

Ved bruk av plasmid pTB739 ble Escherichia coli DH1 transformert, hvorpå stamme Escherichia coli DH1/pTB739 (IFO 14575, FERM BP-1641) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB739 inneholdende det muteinkodende genet vist i figur 3.

20

(2) Preparering av bakterielt celleekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket i et M9-medium inneholdende 1% glukose, 0,4% kasaminyre og 8 µg/ml tetracyklin, og når Klett-verdien ble omtrent 200 ble 3β-indolylakrylsyre satt til i en konsentrasjon på 25 µg/ml, og dette ble etterfulgt med dyrking i 4 timer til. Etter dyrking ble de bakterielle cellene samlet og suspendert i en 10% sukroseoppløsning inneholdende 1/20 mengde av 20mM Tris-HCl (pH 7,6). Til denne suspensjonen ble fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) til 1mM, EDTA til 10mM, NaCl til 0,1M, spermidinhydroklorid til 10mM og lysozym til 100 µg/ml tilsatt (hvert tall viser den finale konsentrasjonen), og blandingen ble hensatt ved 0°C i 45 minutter, hvorpå den ble utsatt for ultrasonisering i 30 sekunder. Denne oppløsningen ble sentrifugert ved 18.000 rpm, (Sorval sentrifuge, SS34 rotor) i 30 minutter for å

35

tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

Muse BALB/c3T3-celler i en mengde på 2×10^3 -celler per brønn, ble inokulert i et DMEM-medium inneholdende 5% kalveserum i Nunc 96-brønn mikrotiterplate (flat bunn) hvor hver brønn inneholdende 0,2 ml medium, og disse ble deretter dyrket. Neste dag ble mediet erstattet med et DMEM-medium inneholdende 0,5% kalveserum. Etter dyrking i 3 dager ble 10 μ l av det bakterielle celle-ekstraktet, som nylig ble seriefortynnet i 5-ganger trinn med et DME-medium inneholdende 0,5% BSA, satt til hver brønn, og ble dyrket. 20 timer senere ble 2 μ l ^3H -Tdr (5 Ci/mmol, 0,5 mCi/ml RCC Amersham) satt til hver brønn. 6 timer senere ble cellene strippet ved behandling med en fosfat-bufret oppløsning (PBS) inneholdende 0,2% trypsin-0,02% EDTA, og cellene ble høstet på et glassfilter ved bruk av en Titertech cellehøster, og deretter ble mengden ^3H -Tdr i cellene bestemt ved bruk av en scintillasjonsteller.

Som et resultat utviste det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli DH1/pTB739 FGF-aktivitet.

Mutein CS1, hvori Cys i 26-posisjonen til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 3

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for det humane bFGF-muteinet)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB742 for human bFGF-mutein ekspresjon:

M13-P2 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 1 ovenfor ble spaltet ved bruk av restriksjonsenzymene EcoR I og Pst I for å tilveiebringe et DNA-fragment på omtrent 0,5

kb inneholdende en region som koder for et humant bFGF-mutein.

Adskilt fra dette ble plasmidptrp781 DNA inneholdende en trp-promoter spaltet ved bruk av EcoR I-Pst I for å separere et omtrent 3,2 kb DNA-fragment inneholdende en trp-promoter, et tetracyklinresistensgen og et plasmid replikasjonsinitieringssete. Dette 3,2 kb DNA-fragmentet og det ovenfornevnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragmentet inneholdende en genregion som koder for et humant bFGF-mutein ble ligert ved bruk av T4 DNA-ligasereaksjon for å konstruere plasmid pTB742 for ekspresjon av et humant bFGF-mutein (figur 8).

Ved bruk av plasmid pTB742, ble *Escherichia coli* DH1 transformert, hvorpå stamme *Escherichia coli* DH1/pTB742 (IFO 14585, FERM BP-1642) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB742 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 4.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble anvendt som et bakterielt celleekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet: Human bFGF-aktivitet på det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Som et resultat av dette utviste det bakterielle celle-ekstraktet til *E. coli* DH1/pTB742 FGF-aktivitet.

Mutein CS2 hvori Cys i 70-posisjonen til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 4

(Ekspresjon i *Escherichia coli* av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB743 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P3 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 1 ovenfor ble spaltet ved bruk av restriksjonsenzymene EcoR I og Pst I for å tilveiebringe et omtrent 0,5 kb DNA-fragment
10 inneholdende en region som koder for et humant bFGF-mutein.

Adskilt fra dette ble plasmid ptrp781 DNA inneholdende en trp-promoter spaltet ved bruk av EcoR I-Pst I for å separere et omtrent 3,2 kb DNA-fragment inneholdende en trp-promoter,
15 et tetracyklinresistensgen og et plasmidreplikasjonsinitieringssete. Dette 3,2 kb DNA-fragment og ovenfornevnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragment inneholdende en genregion som koder for et humant bFGF-mutein ble ligert ved bruk av T4 DNA-ligasereaksjon for å konstruere plasmid pTB743 for
20 ekspresjon av humant bFGF-mutein (figur 9).

Ved bruk av plasmid pTB743, ble *Escherichia coli* DH1 transformert, hvorved stammen *Escherichia coli* DH1/pTB743 (IFO 14585, FERM BP-1643) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid
25 pTB743 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 5.

(2) Preparering av bakterielt celleekstrakt:

Ovenfor nevnte transformant ble dyrket som beskrevet i eksempel 2(2) for å tilveiebringe en supernatant, som
30 deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celleekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).
35

Som et resultat av dette utviste det bakterielle celle-ekstraktet til E. coli DH1/pTB743 FGF-aktivitet.

5 Mutein CS3, hvori Cys i 88-posisjonen i humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 5

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

10 (1) Konstruksjon av plasmid pTB744 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P4 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 1 ovenfor ble spaltet ved bruk av restriksjonsenzymene EcoR I og Pst I for å tilveiebringe et omtrent 0,5 kb DNA-fragment
15 inneholdende en region som koder for et humant bFGF-mutein.

Adskilt fra dette ble plasmid ptrp781 DNA inneholdende en trp-promoter spaltet ved bruk av EcoR I-Pst I for å separere
20 et omtrent 3,2 kb DNA-fragment inneholdende en trp-promoter, et tetracyklinresistensgen og et plasmidreplikasjonsinitieringssete. Dette 3,2 kb DNA-fragmentet og det ovenfornevnte 0,5 kb EcoR I-Pst I DNA-fragmentet inneholdende en genregion som koder for et humant bFGF-mutein ble ligert
25 sammen ved bruk av T4 DNA-ligasereaksjon for å konstruere plasmid pTB744 for ekspresjon av humant bFGF-mutein (figur 10).

30 Ved bruk av plasmid pTB744, ble Escherichia coli DH1 transformert, hvorved stammen Escherichia coli DH1/pTB744 (IFO 14586, FERM BP-1644) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB744 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 6.

(2) Preparering av bakterielt celleekstrakt:

35 Ovenfor nevnte transformant ble dyrket som beskrevet i eksempel 2(2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celleekstraktet: Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

5

Som et resultat av dette utviste det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli DH1/pTB744 FGF-aktivitet.

10

Mutein CS4, hvori Cys i 93-posisjonen i humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 6

(Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort mutagene)

15

Skåler inneholdende muterte M13-P2 fag plaques tilveiebragt i eksempel 1 og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-P2 fag plaque tilveiebragt i eksempel 1 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltere ved å anbringe et tørt filter i 5 minutter på agarplaten når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å plassere dem i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl (pH-verdi på 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtere som var nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter fikk de tørke ved rombetingelser etterfulgt av videre tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappede filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleo-

35

tidprimer. Hver av filtrene ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en reduserende mengde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; 5 kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P2 plakk, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen trinnvis ble redusert, ble kontrollfiltrene vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentra- 10 sjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og radioautografi ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P2 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en kinasebehandlet oligonukleotidprobe. Ingen av kontroll- 15 plakkene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P2 plaquene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P2 plaquene ble tatt, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble 20 ssDNA fremstilt, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA fremstilt. Analyser på basesekvensen ved bruk av hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer ble utført.

25 Som et resultat ble det respektivt bekreftet at TGC (Cys-26) kodonet var blitt omdannet til et TCT (Ser) kodon; TGT (Cys-88) kodonet, til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodon, til et TCT (Ser) kodon.

30 Når det gjelder de muterte M13-P2 fagene, ble fag hvori kodon Cys-26 og -70 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P12; fagene hvori kodonet Cys-70 og -88 var blitt Ser-kodende kodoner, M13-P23; og fag hvori kodonet Cys-70 og 93 var blitt Ser-kodende kodoner, M13-P24.

Eksempel 7

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB762 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P23 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 6 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB762 for et humant bFGF-muteinekspresjon
10 (figur 12).

Ved bruk av plasmid pTB762 ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorpå stammen Escherichia coli MM294/pTB762 (IFO 14613, FERM BP-1645) tilveiebragt, som inneholder
15 plasmid pTB762 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 11.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten
20 beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:
25

Den humane bFGF-aktiviteten til det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

30 Som et resultat utviste det bakterielle celleekstraktet fra E. coli MM294/pTB762 FGF-aktivitet.

Mutein CS23, hvori Cys i 70-posisjon og i 88-posisjon var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 8

(Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort mutagene)

5 Skåler inneholdende muterte M13-P23 fag plaques tilveiebragt i eksempel 7 og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-P23 fagplaque tilveiebragt i eksempel 7 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å anbringe et tørt filter i 5 minutter på
10 agarplaten når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å plassere dem i 5 minutter til på filter-
15 papir nedsenket i 0,5M Tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtre som var nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter ble de latt tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble
20 utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfat-
25 bufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hver av filtrene ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30
30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P23 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, mens kontrollfiltrene som inne-
35 holdt ikke mutert M13-P23 plaques ble vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X

SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografene ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C . Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P23 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en kinasebehandlet oligonukleotidprobe. Ingen av kontrollplaqueene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P23 plaqueene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P23 plaqueene ble tatt, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA fremstilt. Analyser av basesekvensen ved bruk av hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer ble utført.

Som et resultat ble det respektivt bekreftet at TGC (Cys-26) kodonet var blitt omdannet til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodonet, til et TCT (Ser) kodon.

Av de muterte M13-P23 fagene, ble fag hvori kodonene Cys-26, -70 og -88 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P123; og fag hvori kodonet Cys-70, -88 og -93 var blitt Ser-kodende kodoner, M13-P234.

Eksempel 9

(Ekspresjon i *Escherichia coli* av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB764 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P123 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 8 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB764 for human bFGF-mutein-ekspresjon (figur 14).

Ved bruk av plasmid pTB764 ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorpå stammen *Escherichia coli* MM294/pTB764

(IFO 14614, FERM BP-1646) tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB764 inneholdende mutein-kodende genet vist i figur 13.

5 (2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:
Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangs-
måten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en
supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt
celle-ekstrakt.

10 (3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstrak-
tet:
Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet
tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av frem-
15 gangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Som et resultat utviste det bakterielle celleekstraktet fra
E. coli MM294/pTB764 FGF-aktivitet.

20 Mutein CS123, hvori Cys i 26-, 70- og i 88-posisjonene i
humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveie-
bragt.

Eksempel 10

25 (Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort
mutagene)

Skåler inneholdende muterte M13-P123 fag plaques tilveiebragt
i eksempel 8 og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-P123
30 fagplaque tilveiebragt i eksempel 8 ble avkjølt til 4°C, og
plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellu-
losefiltere ved å holde et tørt filter plassert på agarskålen
i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15
minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble
35 deretter holdt i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i
0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble
nøytralisert ved å holde dem plassert i 5 minutter på filter-

papir nedsenket i 0,5M Tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtere som var nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter fikk de tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hver av filtrene ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P123 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke-mutert M13-P123 plaques vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografiene ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P123 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en kinasebehandlet oligonukleotidprobe. Ingen av kontrollplaquene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P123 plaquene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P123 plaquene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA fremstilt. Analyser av basesekvensen ble utført ved bruk av en hensiktsmessig oligonukleotidprimer og ssDNA.

Som et resultat ble det bekreftet at TGT (Cys-93) kodonet var blitt omdannet til et TCT (Ser) kodon.

Av de muterte M13-P123 fagene, ble fag hvori kodonene Cys-26, -70, -88 og -93 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P1234.

Eksempel 11

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB765 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-P1234 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 10 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB765 for ekspressjon av et humant bFGF-mutein (figur 16).

Ved bruk av plasmid pTB765, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorpå stammen Escherichia coli MM294/pTB765 (IFO 14615, FERM BP-1647) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB765 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 15.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultat viste at det bakterielle celleekstraktet fra E. coli MM294/pTB765 utviste FGF-aktivitet.

Mutein CS1234, hvori Cys i 26-, 70-, 88- og 93-posisjonene i humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 12

(Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort mutagene)

Skåler inneholdende muterte M13-P1 fag mutert ved fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ved bruk av en syntetisk oligomer [Figur 2 (3) eller (4)] og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-P1 fagplaque tilveiebragt i eksempel 1 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver skål ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å holde et tørt filter plassert på agarskålen i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å holde dem plassert i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtre som var nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter fikk de tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hver av filtrene ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30

minutter. Filtrene ble deretter vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P1 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-P1 plaques vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og radioautografiene ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P1 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærvær av γ - 32 P-ATP. Ingen av kontrollplaqueene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P1 plaqueene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P1 plaqueene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ved bruk av en hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer ble utført.

Resultat bekreftet respektivt at TGT (Cys-88) kodonet var blitt forandret til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodonet, til et TCT (Ser) kodon.

Av de muterte M13-P1 fagene, ble fag hvori kodonene Cys-26 og -88 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P13; og fag hvori kodonene Cys 26 og -93 var blitt Ser-kodende kodoner, M13-P14.

Eksempel 13

(Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort mutagene)

5 Skåler inneholdende muterte M13-P14 fag plaques mutert ved fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ved bruk av en syntetisk oligomer [Figur 2 (2) eller (3)] og 2 plater inneholdende ikke-muterte M13-P14 fagplaque ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre

10 ved å holde et tørt filter plassert på agarskålen i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter holdt i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble

15 nøytralisert ved å holde dem plassert i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl (pH 7,5) og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtre nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter fikk de tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer

20 i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1%

25 natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert lakseperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hvert filter ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1%

30 SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P14 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble

35 trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-P14 plaques, vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-

konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografiene ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P14 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærvær av γ -³²-ATP. Ingen av kontrollplaqueene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P14 plaqueene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P14 plaqueene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ved bruk av hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer ble utført.

Resultatet bekreftet respektivt at TGT (Cys-70) kodonet var blitt forandret til et TCT (Ser) kodon; og TGT (Cys-93) kodon, til et TCT (Ser) kodon.

Av de muterte M13-P14 fagene, ble fag hvori kodonene Cys-26, -70, og -93 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P124; og fag hvori kodonene Cys-26, -88 og -93 var blitt Ser-kodende kodoner, M13-P134.

Eksempel 14

(Screening og identifikasjon av plaques som var blitt gjort mutagene)

Skåler inneholdende muterte M13-P3 fagplaques mutert ved fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ved bruk av en syntetisk oligomer [Figur 2 (4)] og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-P3 fagplaque tilveiebragt i eksempel 1 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å holde et tørt filter plassert på agarplaten i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene

ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å plassere dem i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl med en pH-verdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtere nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og deretter fikk de tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hvert filter ble vasket i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P3 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-P3 plaques, vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografiene ble tatt etter 2 - 3 dager eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P3 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærvær av γ -³²-ATP. Ingen av kontrollplaquene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P3 plaquene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P4 plaquene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en

dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ble utført ved bruk av en hensiktsmessig oligonukleotidprimer og ssDNA.

5 Resultatet bekreftet at TGT (Cys-93) kodonet var blitt forandret til et TCT (Ser) kodon.

Av de muterte M13-P3 fagene, ble fag hvori kodonene Cys-88, -93 var blitt Ser-kodende kodoner betegnet M13-P34.

10

Eksempel 15

(Ekspresjon i *Escherichia coli* av genet som koder for humant bFGF-mutein)

15 (1) Konstruksjon av plasmid pTB776 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P12 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 6 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB776 for humant bFGF-mutein (figur 18).

20

Ved bruk av plasmid pTB776, ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorpå stammen *Escherichia coli* MM294/pTB776 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB776 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 17.

25

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

30

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet: Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble undersøkt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

35

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet fra E. coli MM294/pTB776 utviste FGF-aktivitet.

Mutein CS12, hvori Cys i 26- og 70-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 16

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB778 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-P24 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 6 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB778 for human bFGF-muteinekspresjon (figur 20).

Ved bruk av plasmid pTB778, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB778 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB778 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 19.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet fra E. coli MM294/pTB778 utviste FGF-aktivitet.

Mutein CS24, hvori Cys i 70- og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 17

5 (Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB779 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

10 M13-P13 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 12 ovenfor ble behandlet slik som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB779 for human bFGF-muteinekspressjon (figur 22).

15 Ved bruk av plasmid pTB779, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB779 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB779 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 21.

20 (2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

25

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet: Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

30

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB779 utviste FGF-aktivitet.

35 Mutein CS13, hvori Cys i 26- og 88-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 18

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB763 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-P14 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 12 ovenfor ble behandlet slik som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB763 for human bFGF-muteinekspressjon
10 (figur 24).

Ved bruk av plasmid pTB763, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorpå stammen Escherichia coli MM294/pTB763 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB763 inneholdende
15 det mutein-kodende genet vist i figur 23.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en
20 supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt ved fremgangsmåten
25 beskrevet i eksempel 2 (3).

Som et resultat viste det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB763 FGF-aktivitet.
30

Mutein CS14, hvori Cys i 26- og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.
35

Eksempel 19

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB777 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-P34 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 14 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB777 for human bFGF-muteinekspressjon
10 (figur 26).

Ved bruk av plasmid pTB777, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB777 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB777 inneholdende
15 det mutein-kodende genet vist i figur 25.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-
20 ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

25 Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble undersøkt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB777 utviste FGF-aktivitet.
30

Mutein CS34, hvori Cys i 88- og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 20

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB782 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-P234 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 8 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB782 for human bFGF-muteinekspressjon
10 (figur 28).

Ved bruk av plasmid pTB782, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB782 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB782 inneholdende
15 det mutein-kodende genet vist i figur 27.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-
20 ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

25 Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB782 utviste FGF-aktivitet.
30

Mutein CS234, hvori Cys i 70-, 88- og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.
35

Eksempel 21

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

- 5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB780 for human bFGF-mutein-ekspressjon:
M13-P124 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 13 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB780 for human bFGF-muteinekspressjon
10 (figur 30).

Ved bruk av plasmid pTB780, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB780 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB780 inneholdende
15 det mutein-kodende genet vist i figur 29.

- (2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:
Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-
20 ekstrakt.

- (3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:
Den humane bFGF-aktiviteten i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).
25

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB780 utviste FGF-aktivitet.
30

Mutein CS124, hvori Cys i 26-, 70-og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.
35

Eksempel 22

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB781 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-P134 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 13 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB781 for human bFGF-muteinekspressjon
10 (figur 31).

Ved bruk av plasmid pTB781, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB781 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB781 inneholdende
15 det mutein-kodende genet vist i figur 32.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-
20 ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).
25

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet til E. coli MM294/pTB781 utviste FGF-aktivitet.
30

Mutein CS134, hvori Cys i 26-, 88- og 93-posisjonene til humant bFGF var blitt erstattet med Ser, ble dermed tilveiebragt.
35

Eksempel 23

(Muteinproduktiviteter)

FGF-aktivitetene til de bakterielle celleekstraktene innehol-
dende de respektive muteinene ifølge fremgangsmåten i
referanseeksempel 2 (2), ble bestemt, hvorved muteinprodukt-
iviteterne til de respektive transformantene ble beregnet.
Verdiene som ble tilveiebragt er vist i tabell 3.

TABELL 3

10

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

30

Eksempel 24

(Rensing av hbFGF-mutein)

Transformanter produserende de respektive muteinene ble
dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i Referanseeksempel 2,
hvorved de bakterielle celleekstraktene ble preparert. 25 ml
av hvert ekstrakt (preparert fra 500 ml kulturmedium) ble

35

sendt gjennom en DEAE cellulosekolonne (Ø2 X 10 cm) (DE52, Wattman, Inc., United Kingdom) ekvilibrert med en oppløsning inneholdende 20mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4 og 0,2M NaCl, hvorved nukleinsyrebestanddelene i ekstraktet ble fjernet. Eluatet fra kolonnen og vaskevannene, som resulterte fra vasking av kolonnen med en oppløsning inneholdende 20mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4 og 0,2mM NaCl ble slått sammen og samlet (DEAE-eluatfraksjon, 60 ml).

Denne fraksjonen ble utsatt for HPLC (high performance liquid chromatography) ved bruk av en HPL-kromatograf (Gilson, Inc., France) inneholdende en Shodex AF-pak HR-894 heparinkolonne (8 mm ID X 5 cm, produsert av Showa Denko, Japan). Etter vasking av kolonnen med en 20mM Tris-HCl oppløsning med en pH-verdi på 7,4, og deretter med en oppløsning inneholdende 20mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4 og 0,5M NaCl, ble lineær gradient eluering utført med en NaCl-gradient på fra 0,5M til 2M (60 ml volum, 1,0 ml/min. strømningshastighet) i en buffer inneholdende 20mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4.

Elueringsmønstrene til de respektive muteinene er vist i figurene 33 til 35. I disse figurene, representerer ordinatene absorpsjoner ved OD₂₈₀ og NaCl konsentrasjoner i gradienten. Abscissen representerer tiden, hvor gradientelueringen blir påbegynt ved tid-0-punkt. Toppfraksjonene ble samlet, og deres FGF-aktiviteter ble undersøkt. De etter-rensingsspesifikke aktivitetene derav er vist i tabell 4.

TABELL 4

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

I tabell 4 er de spesifikke aktivitetene vist på basis av FGF-aktiviteten til bovin hjerne-avledet FGF (renhet, ikke mindre enn 95%) produsert av Takara Shuzo Co., Ltd.

I alle muteinene, eluerte toppen korresponderende til Topp I til bFGF ved elueringstider mellom 15 og 25 minutter. Dette kan også bli detektert som et enkelt bånd i en posisjon på omtrent 17.000 molekylvekt i 17,25% SDS polyakrylamid-gelelektroforese.

Eksempel 25

(Oksydering av FGF-muteiner)

Hvert mutein eluert fra en heparin HPLC-kolonne og bFGF ble adskilt dialysert to ganger ved 4°C i 3 timer mot en 1000-ganger mengde ved volum av destillert vann, og dette ble etterfulgt av frysetørring. 200 µg (proteinbasis) av hver tørre standardprøve ble løst opp i 200 µl oksyderingsreaksjonsvæske [50mM Tris-HCl (pH 8,5)/0,2M NaCl/1 mg/ml BSA/20mM H₂O₂], og oksydering ble utført ved 37°C i 30 minutter.

Løsningen ble deretter sendt gjennom en heparin HPLC-kolonne, og mønsteret som fremkom ved eluering med en saltgradient mellom 0,6M og 2M ble undersøkt. De tilveiebragte elueringsmønstrene er vist i figur 36. I bFGF var toppene generelt
5 lave; mens i CS2, CS3 og CS23 var toppen korresponderende til Topp I høy; forhøyning av toppen var spesifikt synlig i CS3 og CS23.

Det antas dermed at CS3 og CS23 er stabile mot oksydasjon. I tillegg, i CS2, CS3 og CS23, eluerte proteinet som toppen som
10 utviser FGF-aktivitet.

Eksempel 26

(Reduksjon av FGF-muteiner)

15 200 µg (proteinbasis) av hver frysetørret standardprøve tilveiebragt på samme måte som i eksempel 25 ble løst opp i 200 µl av en reduksjonsreaksjonsvæske [50mM Tris-HCl (pH 8,5)/0,2M NaCl/1 mg/ml BAS/20mM ditiotreitol (DTT)], og reduksjonen ble utført ved 37°C i 30 minutter.

20 Oppløsningen ble deretter sendt gjennom en heparin HPLC-kolonne, og mønsteret som fremkom ved eluering med en saltgradient mellom 0,6M og 2M ble undersøkt. De tilveiebragte elueringsmønstrene er vist i figur 37. I bFGF og CS2
25 var toppen korresponderende til Topp I synlig, og det ble foreslått at de andre toppene (Toppene II til IV) er egnet for oksydasjon. Det ble foreslått at i CS3 og CS23, ikke er påvirket av oksydasjon. Dette understøtter stabiliteten referert til eksempel 25. bFGF og muteinene som eluerte som
30 disse toppene viste seg å utvise FGF-aktivitet.

Eksempel 27

(Produksjon av rekombinante DNAer inneholdende mutein-kodende baseksekvens)

35 (1) Kloning av M13-vektor for det humane bFGF-genet:

Plasmid pTB669 tilveiebragt i Referanseeksempel 2 ble spaltet med restriksjonsenzymene EcoR I og BamH I. Fagvektor M13mp8 [J. Messing, Methods in Enzymology, 101, 20 ~ 78 (1983)] replikerende form (RF) DNA ble blandet med et humant bFGF DNA-fragment avledet fra pTB669, som nylig var blitt spaltet med EcoR I og BamH I. Blandingen ble deretter utsatt for ligering ved bruk av T4 DNA-ligase. Det resulterende ligerte DNAet ble transformert inn i infiserbare celler fra stammen Escherichia coli JM105; de transformerte cellene ble spredt utover en skål hvor Xgal var indikatoren [J.Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309-321 (1981)]; plaquen inneholdende den rekombinante fagen (hvite plaque) ble plukket ut; og basesekvensen til den rekombinante regionen ble bestemt ved dideoksynukleotidsyntese-kjedetermineringsfremgangsmåten [J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)], hvorved det ble bekreftet at det humane bFGF DNAet var blitt satt inn på riktig måte.

Fra denne M13-P0-klonen ble enkelt-trådet fag-DNA rensset, og som ble benyttet som et templat for sete-rettet mutagenese ved bruk av et syntetisk oligonukleotid.

(2) Sete-spesifikk mutagenese:

I nærvær av 0,1mM adenosin trifosfat (ATP), 50mM hydroksymetylaminometanhydroklorid (Tris-HCl) med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂, 5mM ditiotreitol (DTT) og 9 enheter T4-kinase, i en total mengde på 50 µl, 40 pikomol av det syntetiske oligonukleotidet:

5'-CGGGCATGAATTCGCGCT-3'

[primer for produsering av et gjenkjenningssete for restriksjonsenzym EcoR I i basesekvensen, og deretter forandring av Pro-14 til Met (se figur 38 (2))] ble behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinase-behandlede primeren (12 pikomol) ble varmet ved 67°C i 5 minutter, og ved 42°C i 25 minutter, i 50 µl av en blanding inneholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM Tris-HCl med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂ og 10mM β-merkapttoetanol, hvorpå den ble hybridisert til 5µg av enkelt-

trådet (ss) M13-P0 DNA. Den sammensmeltede blandingen ble deretter avkjølt på is, og ble satt til 50 µl av en reaksjonsblanding inneholdende 0,5mM deoksynukleotidtrifosfat (dNTP), 80mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4, 8mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 9 enheter DNA-polymerase I Klenow-fragment, 0,5mM ATP og 2 enheter T4 DNA-ligase, og reaksjonen ble utført ved 37°C i 3 timer, og ved 25°C i 2 timer, deretter ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 2 µl 0,2mM EDTA. Reaksjonsproduktet ble benyttet for å transformere infiserbare JM105-celler; de transformerte cellene fikk vokse over natt, og deretter ble ssDNA isolert fra kulturemediumsupernatanten. Ved bruk av dette ssDNA som et templat for den andre cyklusen i primer-elongeringen, ble gel-renset RF-type DNA transformert inn i infiserbare JM105-celler, de resulterende transformerte cellene ble spredt utover en agariskål, og ble dyrket over natt for å tilveiebringe fagplaques.

(3) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten (2) ovenfor ble gjentatt men den benyttede syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'-CGCCCATGGTGCCATCCTC-3'

som produserer et gjenkjenningssete for restriksjonsenzym Nco I i basesekvensen, og dermed forandrer Gly-9 til Thr og Ser-10 til Met, respektivt. [Se figur 38 (1)].

(4) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den benyttede syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'-TAACACCTTAAGAAGCCAG-3'

som produserer et gjenkjenningssete for restriksjonsenzym Af1 II i basesekvensen, og dermed forandrer Lys-87-kodende kodonet til et termineringskodon. [Se figur 38 (3)].

(5) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den benyttede syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'-CCGGACTCCGTTAACTCGG-3'

som produserer et gjenkjenningssete for restriksjonsenzym Hpa I i basesekvensen, og dermed forandrer Asp-42 til Asn. [Se figur 38 (4)].

5 (6) Sete-rettet mutagenese:

Fremgangsmåten i (2) ovenfor ble gjentatt, men den benyttede syntetiske oligonukleotidprimeren var:

5'-CTTCTCCTGGACTCCGTCAAC-3'

10 som deleterer gjenkjenningssetet for restriksjonsenzym Hpa II i basesekvensen, og dermed forandrer Arg-45 til Gln. [Se figur 38 (5)].

(7) Screening og identifikasjon av plaque som var mutagene:

Skåler inneholdende muterte M13-P0 plaques (ovenfor i (1) og
15 2 plater inneholdende ikke-muterte M13-P0 fagplaque ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver skål ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å holde et tørt filter plassert på agar-skålen i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre
20 filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å holde dem i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl med en pH-verdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to
25 ganger på filtre nedsenket i 2 X SSC (standard natrium-sitrat) på samme måte, og fikk tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5
30 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natrium-fosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperme-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C
35 i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hvert filter ble vasket ved 50°C i 30 minutter i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde

SSC. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-P0 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-P0 plaques, vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografier ble tatt etter 2 - 3 dagers eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-P0 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med $^{32}\text{-}\gamma\text{-ATP}$. Ingen av kontrollplaqueene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-P0 plaqueene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-P0 plaqueene ble tatt, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ble utført ved bruk av hensiktsmessige oligonukleotidprimere og ssDNAer.

Resultatet bekreftet respektivt at GGC (Gly-9) kodonet var blitt forandret til et ACC (Thr) kodon og AGC (Ser-10) kodonet var blitt forandret til et ATG (Met) kodon; CCg (Pro-14) kodonet, til et ATG (Met) kodon; AAA (Lys-87) kodonet, til et TAA (terminerings) kodon; GAC (Asp-42) kodonet, til et AAC (Asn-42) kodon; og CGG (Arg-45) kodonet, til et CAG (Gln-45) kodon.

Av de muterte M13-P0 fagene, ble fag hvori Gly-9 kodonet var blitt Thr-kodende kodon og Ser-10 kodonet var blitt Met-kodende kodon betegnet M13-PN10 [Basesekvensen og aminosyresekvensen som blir kodet derav er vist i figur 39];

fag hvori Pro-14 kodonet er blitt et Met-kodende kodon, M13-PN14 (Dets basesekvens og aminosyresekvens som er kodet derav er vist i figur 40);

fag hvori Lys-87 kodonet er blitt et termineringskodon, M13-PC86 (Dets basesekvens og aminosyresekvens som blir kodet derav er vist i figur 41);

fag hvori Asp-42 kodonet er blitt et Asn-kodende kodon, M13-PDN42 (Dets basesekvens og aminosyresekvens som blir kodet derav er vist i figur 42); og,

fag hvori Arg-45 kodonet er blitt et Gln-kodende kodon, M13-PRQ45 (Dets basesekvens og aminosyresekvens som blir kodet derav er vist i figur 43).

Eksempel 28

(Produksjon av rekombinante DNAer som har muteinkodende basesekvens)

(1) Sete-rettet mutagenese:

I nærvær av 0,1mM adenosintrifosfat (ATP), 50mM hydroksymetylaminometanohydroklorid (Tris-HCl) med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂, 5mM ditiotreitol (DTT) og 9 enheter T4-kinase, i en total mengde på 50 µl, 40 pikomol av det syntetiske oligonukleotidet:

5'-CGGACTCCTCTAACTCGGC-3'

[primer for deletering av gjenkjenningssetet for restriksjonsenzym Hpa I i basesekvensen, og påfølgende forandring av Asn-42 til Arg (Se figur 38 (6))] ble behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinase-behandlede primeren ble varmet ved 67°C i 5 minutter, og ved 42°C i 25 minutter, i 50 µl av en blanding inneholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM Tris-HCl med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂ og 10mM β-merkapttoetanol, hvorved den ble hybridisert til 5µg av enkelt-trådet (ss) M3-PDN 42 DNA. Den sammensmeltede blandingen ble deretter avkjølt på is, og ble satt til 50 µl av en reaksjonsblanding inneholdende 0,5mM deoksynukleotidtrifosfat (dNTP), 80mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4, 8mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 9 enheter DNA-polymerase I Klenow-fragment, 0,5mM ATP og 2 enheter T4 DNA-ligase, og reaksjonen ble utført ved 37°C i 3 timer, og ved 25°C i 2 timer, deretter ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 2 µl 0,2mM EDTA. Reaksjonsproduktet ble benyttet for å transformere infiserbare JM105-celler; de

transformerte cellene ble latt vokse over natt, og deretter ble ssDNA isolert fra kulturemediumsupernatanten. Ved bruk av dette ssDNA som et templat for den andre cyklusen til primer-forlengingen, ble gel-renset RF-type DNA transformert inn i infiserbare JM105-celler; de resulterende transformerte cellene ble spredt utover en agarskål, og ble dyrket over natt for å tilveiebringe fagplaques.

(2) Screening og identifikasjon av plaque som var gjort mutagene:

Skåler inneholdende muterte M13-PDN42 fagplaques som er blitt mutert ved fremgangsmåten i eksempel 26 ved bruk av en syntetisk oligomer (Figur 38 (6)) og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-PDN42 fagplaque tilveiebragt i eksempel 26 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver plate ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å holde et tørt filter plassert på agarskålen i 5 minutter når det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å holde dem i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl med en pH-verdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtre nedsenket i 2 X SSC (standard natrium-sitrat) på samme måte, og fikk tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natrium-fosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert laksesperma-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hvert filter ble vasket ved 50°C i 30 minutter i en bufferoppløsning for vasking inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC. Filtrene ble deretter først vasket med en buffer-

oppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-PDN42 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Mens SSC-konsentrasjonen ble trinnvis redusert, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-PDN42 plakk, vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografier ble tatt etter 2 - 3 dagers eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-PDN42 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærvær av $^{32}\text{-}\gamma\text{-ATP}$. Ingen av kontrollplaquene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-PDN42 plaquene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-PDN42 plaquene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ble utført ved bruk av hensiktsmessig oligonukleotid-primer og ssDNA.

Resultatet bekrefter at AAC (Asn-42) kodonet var blitt forandret til et AGA (Arg) kodon.

Av det muterte M13-PDN42 fagene, ble fag hvori Asn-42 kodonet var blitt et Arg-kodende kodon betegnet M13PNR42. Dets basesekvens og aminosyresekvens som blir kodet derav er vist i figur 44.

Eksempel 29

(Stabiliteten til muteinene CS2, CS3 og CS23)

Undersøkelser på stabilitetene under sure betingelser til humant bFGF renses ved heparin HPLC og muteinene CS2, CS3 og CS23 (de som ble tilveiebragt i eksempel 24) som følger: Muteinene og humant bFGF, i oppløsning i 50mM Na-acetat (pH 4,0) justert til 1 µg/ml konsentrasjon ble inkubert adskilt

ved 37°C. Inkubasjonstiden ble variert mellom 0 og 1 time i intervaller på 10 minutter, og aktiviteter ble bestemt for respektive inkubasjonstider ved bruk av muse-BALB/c3T3 celledsystemet (nevnt ovenfor). Aktiviteter for respektive inkubasjonstider ble beregnet i prosentforhold basert på aktivitetene til ikke-inkuberte standardprøver, som 100%, og ble plottet og tilveiebragte de grafiske fremstillingene vist i figur 45. I figur 45, - ● -, - ▲ -, - ■ - og - ○ - respektivt indikerer resultatene for humant bFGF, muteinet CS2, muteinet CS3 og muteinet CS23. Humant bFGF inaktiverte nesten seg selv fullstendig i løpet av 10 minutter, mens muteinene forble aktive i lengre perioder og er ført opp i oppadgående rekkefølge: CS2, CS3 og CS23. Muteinet CS23 hadde omtrent 50% aktivitet igjen selv 20 minutter senere. Disse muteinene viser dermed å ha høyere stabilitet enn stabiliteten til humant bFGF.

Eksempel 30

(Human navlestreng vaskulær endotelisk celleproliferasjons-fremmende aktiviteter i muteinene)

Bestemmelsene ble utført på vaskulære endotelisk celleproliferasjons-fremmende aktiviteter til humant bFGF renset ved heparin HPLC og muteinene CS2, CS3 og CS23 (de som ble tilveiebragt i eksempel 24). Fremgangsmåten som ble benyttet for bestemmelsen er som følger: Humane vaskulære endoteliske celler ble tilveiebragt fra human navlestreng-vene ved perfusjon ved bruk av en trypsinoppløsning, og ble opprettholdt ved subkultur ved bruk av væskemedium fremstilt ved tilsetting av 2,5% føtalt bovint serum og 2,0 ng/ml humant bFGF til GIT medium (produsert av Daigo Eiyo Kagaku K.K., Japan). Til en 96-brønn dyrkeplate (Nunc, 1-67008) ble 100 µl av en 2×10^3 human vaskulær endotelisk celleduspensjon sådd ut, og dette ble etterfulgt av dyrking i et kammer med konstant temperatur fylt med karbondioksyd. Neste dag ble FGF i slike mengder at den finale konsentrasjonen var 2 ng/ml og 100 µl av et medium inneholdende prøver i forskjellige

konsentrasjoner tilsatt. Etter dyrking i 3 dager, ble mediet inneholdende prøven aspirert, og 100 µl av en 1 mg/1 ml MTT-oppløsning (fremstilt ved oppløsning av 3-(4,5-dimetyl-2-tiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid i mediet) tilsatt, og dette ble etterfulgt av inkubering i 4 timer. 100 µl av en 10% SDS-oppløsning (vannholdig oppløsning av natriumdodecylsulfat) ble deretter tilsatt, og deretter inkubert i 5 til 6 timer for å løse opp cellene og MTT-pigment, deretter ble OD₅₉₀-verdien bestemt ved bruk av et spektrofotometer. Beregninger ble gjort av celleprolifererings-hastighetene for de respektive prøvekonsentrasjonene i prosentforhold basert på den maksimale proliferasjonshastigheten tilveiebragt med 8,0 ng/ml humant bFGF, som 100%, og de spesifikke aktivitetene ble bestemt ved sammenligning av konsentrasjonene som resulterte i 50% proliferasjonshastighet med konsentrasjonen til standard FGF-prøve. De spesifikke aktivitetene som ble bestemt på denne måten er vist i tabell 5.

TABELL 5

<u>FGF</u>	<u>Spesifikk aktivitet</u>
CS2	1,6
CS3	3,0
CS23	2,5
Humant bFGF	1,0

Basert på disse resultatene ble det oppdaget at muteinene har høyere spesifikk aktivitet enn humant bFGF.

Eksempel 31

(Karvekst-stimulerende evne til muteinene, bestemt ved CAM-fremgangsmåten)

Undersøkelser ble gjort på den karvekst-stimulerende evnen in vivo til humant bFGF rensset ved heparin HPLC og muteinene CS2, CS3 og CS23 (de som ble tilveiebragt i eksempel 24). Fremgangsmåten som ble benyttet var CAM (Chorio-allantoic membrane) analyse. En noe modifisert teknikk i Auerbachs

fremgangsmåte [Developmental Biology, 41, 391 (1974)] ble benyttet for CAM-analyse. Etter inkubering i 3 dager ved 37°C i en inkubator, ble skallene fra befruktede hønseegg fjernet, og de ble videre inkubert ved 37°C i 1 uke til ved bruk av en
 5 Napco karbondioksyd inkubator 6300 (CO₂:0%, H₂O:mettet). En vannholdig oppløsning av hvert protein ble dråpevis applisert over polypropylenskiver som hadde en diameter på 6 mm slik at hvert protein var tilstede i mengder på 6,25, 12,5, 25,0 og 50,0 ng. Etter lufttørking på steriliseringsbenk, ble skivene
 10 inkubert ved 37°C i 3 dager til mens de ble holdt stående på hønse chorio-allantoic membran, og observasjoner ble utført angående karvekst-stimulerende tilstander ved bruk av et stereoeskop-mikroskop. De tilveiebragte resultatene er vist i tabell 6. NB: Totalt ble 18 egg fra hver prøve benyttet, og
 15 tallene i tabellen representert i prosentforhold antallet egg hvori karvekst-stimulering ble oppdaget.

TABELL 6

	Karvekststimulerende evne (%)			
	<u>50,0</u>	<u>25,0</u>	<u>12,5</u>	<u>6,25 ng</u>
FGF				
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
25 Humant bFGF	94,4	50,0	33,3	0,0
Bærer	11,1	5,6	11,1	0,0

Tabell 6 viser tydelig at bFGF-muteinene har karvekst-stimulerende evner som nesten er ekvivalent til det som
 30 kontrollhuman bFGF har.

Eksempel 32

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5

(1) Konstruksjon av plasmid pTB854 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

10

M13-PN10 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 27 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB854 for humant bFGF (Figur 46).

15

Ved bruk av plasmid pTB854, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorpå stammen Escherichia coli MM294/pTB854 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB854 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 39.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

20

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

25

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

30

Resultatet viste at det bakterielle celleekstraktet fra E. coli MM294/pTB854 utviste FGF-aktivitet.

Mutein TM910 hvori Gly i 9-posisjonen og Ser i 10-posisjonen til humant bFGF var blitt erstattet med Thr og Met, respektivt, ble dermed tilveiebragt.

35

Eksempel 33

(Ekspresjon i *Escherichia coli* av genet som koder for humant bFGF mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB852 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

DNA fra plasmid pTB854 som ble tilveiebragt i eksempel 32 ovenfor ble spaltet med restriksjonsenzymene EcoRI og NcoI for å fjerne DNA-fragmentet som koder for de 10 aminosyrene
10 til den N-terminale enden av humant bFGF. Den enkelttrådede delen av det gjenværende DNA-fragmentet ble behandlet med *Escherichia coli* DNA-polymerase I i nærvær av dATP, dCTP, dGTP, dTTP for å tilveiebringe butt ende, og ble ligert ved bruk av T4 DNA-ligeringsreaksjon for å konstruere plasmid
15 pTB852 for humant bFGF-mutein (figur 47).

Ved bruk av plasmid 852, ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorved stammen *Escherichia coli* MM294/pTB852, som inneholder plasmid pTB852 inneholdende det mutein-kodende
20 gene vist i figur 48.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en
25 supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

30 Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultatet viser at det bakterielle celle-ekstraktet fra *E. coli* MM294/pTB852 utviste FGF-aktivitet. Mutein N10, hvori
35 aminosyresekvensen fra Pro i 2-posisjonen til Ser i 10-

posisjonen til humant bFGF var blitt deletert, ble slik tilveiebragt.

Eksempel 34

5 (Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB795 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

10 M13-PN14 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 27 ovenfor ble behandlet som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB795 for humant bFGF-mutein (figur 49).

Ved bruk av plasmid pTB795, ble Escherichia coli MM294
15 transformert, hvorpå stammen Escherichia coli MM294/pTB795 (IFO 14700, FERM BP-1660) ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB795 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 40.

20 (2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

25

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:
Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

30

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli MM294/pTB795 utviste FGF-aktivitet. Mutein N14, hvori aminosyresekvensen fra Pro i 2-posisjon til Pro i 14-posisjon i humant bFGF var blitt deletert, ble dermed tilveiebragt.

35

Eksempel 35

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB796 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-PC86 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 27 ovenfor ble behandlet på en måte beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB796 for humant bFGF-mutein (figur 10 50).

Ved bruk av plasmid pTB796, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB796 (IFO 14701, FERM BP-1661) ble tilveiebragt, og som inneholder 15 plasmid pTB796 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 41.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten 20 beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

25 Celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble utsatt for en enzym immunoanalyse (EIA), sandwich-fremgangsmåte, ved bruk av monoklonalt antistoff som vist nedenfor (a) til (j).

Resultatet bekrefter at bFGF-mutein C86 er tilstede i 30 celleekstraktet. Mutein C86, hvori aminosyresekvensen fra Lys i 87-posisjon til Ser i 147-posisjon var blitt deletert, ble dermed tilveiebragt.

Nevnte EIA ved bruk av monoklonalt antistoff ble utført ved 35 bruk av følgende fremgangsmåte:

(a) Immunisering:

BALB/c mus (hankjønn, 4 uker gamle) ble injisert intreperitonealt med antigenet humant bFGF (slik det ble tilveiebragt i referanseeksempel 2) i oppløsning i 0,4 ml Freunds fullstendige adjuvans (Difco Laboratories, USA). Tre uker senere ble 10 µg av antigenet hbFGF i oppløsning i 0,4 ml Freunds ufullstendige adjuvans intraperitonealt administrert. Tre uker senere ble den samme immuniseringen utført, og to uker senere ble 10 µg av humang bFGF i oppløsning i fysiologisk saltvann inokulert intreperitonealt.

(b) Cellefusjon:

Fra de immuniserte musene nevnt i (a), ble milten skåret ut 4 dager etter siste antigen-behandling for dermed å tilveiebringe celler som skal bli benyttet for cellefusjonen. Disse cellene ble suspendert i et medium som ble fremstilt ved sammenblanding av Isokov-medium og Ham F-12-medium i et forhold på 1:1 (heri etter referert til som IH-medium).

Musemyelom-cellen P3-X63-Ag 8UI ble sub-dyrket i RPMI 1640-medium inneholdende 10% føtalt bovinserum og under en atmosfære på 5% karbondioksyd og 95% luft.

Cellefusjonen ble utført i henhold til fremgangsmåten etablert av Köhler og Milstein [Köhler, G. and Milstein, C.: Nature, 256, 495 (1975)]. $2,9 \times 10^7$ celler fra den ovenfor nevnte myelomcellelinjen og $1,5 \times 10^8$ immunserte lymfocytter tilveiebragt ved den ovenfor nevnte fremgangsmåten ble blandet sammen og sentrifugert, og 45% polyetylenglykol 6000 (heri etter referert til som PEG 6000) i oppløsning i 0,3 ml IH-medium ble dråpevis tilsatt. PEG 6000 oppløsningen ble forvarmet til 37°C, og deretter gradvis tilsatt. 5 minutter senere ble det 37°C-forvarmede IH-mediet tilsatt i en hastighet på 0,5 ml per minutt for å danne 10 ml. Oppløsningen ble deretter sentrifugert i romtemperatur ved 600 rpm i 15 minutter, og supernatanten ble fjernet. Dette cellepresipitatet ble suspendert i 200 ml IH-medium inneholdende

20% kalveserum, og denne suspensjonen ble overført til en 24-brønn mikroplate (Linbro) i en mengde på 2 ml per brønn. En dag senere, ble IH-medium (inneholdende 20% kalveserum) supplementert med HAT (1×10^{-4} M hipoksantin, 4×10^{-7} M aminopterin, $1,6 \times 10^{-5}$ M tymidin) (heri etter referert til som HAT-medium) satt til mikroplaten i en mengde på 1 ml per brønn, og 3 dager senere ble en halv mengde medium erstattet med HAT-medium. Cellene som vokser slik er hybride celler.

(c) Leting av antistoff-produserende celler:

Den hybride cellekultur-supernatanten ble tilsatt i en mengde på 100 μ l per brønn til en 96-brønn mikrotiterplate laget av polystyren og humant bFGF var immobilisert dertil, og inkubasjon ble utført ved romtemperatur i 2 timer. Inkubasjonssupernatanten ble fjernet, og etter vasking ble pepperrot-peroksidase (HRP)-merket antimuse IgG geiteantistoff (Miles Laboratories) tilsatt som sekundært antistoff, og inkubasjonen ble utført ved romtemperatur i 2 timer. Det sekundære antistoffet ble fjernet, og etter grundig vasking av brønnene, ble fargingsreaksjon utført i nærvær av tilsatt reaksjonssubstrat (EIA-fremgangsmåte). Ved denne fremgangsmåten ble sterk valens observert i 3 brønner.

(d) Kloning av hybride celler:

Cellene i hver av disse tre brønnene ble sådd med 0,5 celle per brønn til en 96-brønn mikrotiterplate som var blitt sådd med 10^4 celler/brønn musetymocytter som vegetative celler, og kloning ble utført. Som et resultat ble tre kloner tilveiebragt, dvs. musehybridoma HbF52 (IFO 50143) og musehybridoma HbF78 (IFO 50144) ble tilveiebragt.

(e) Ascitisering av hybride celler:

2×10^6 celler av både muse-hybridoma HbF52 og musehybridoma HbF78 ble inokulert til mus som tidligere var blitt administrert intraperitonealt med mineralolje. Ti dager senere ble ascites (bukhinnevæske) i en mengde på 2 ml samlet fra hver

mus, hvorved monoklonalt antistoff MoAb52 og monoklonalt antistoff MoAb78 respektivt ble tilveiebragt.

(f) Det slik tilveiebragte monoklonale antistoffet MoAb 78 ble utsatt for rensing av ascitesvæske i henhold til fremgangsmåten til Stachelin et al. The Journal of Biological chemistry, 256, 9750 (1981). Det slik tilveiebragte antistoffet ble konsentrert til mer enn 2 mg/ml, og utsatt for dialyse i 0,2M fosfatbuffer (pH 7,0). Til en slik tilveiebragt 1,4 ml oppløsning av MoAb 78 (2,7 mg/ml konsentrasjon), 50 µl S-acetylmerkaptto-ravanhydrid (Aldrich Co., U.S.A) løst opp i N,N'-dimetylformamid ble tilsatt slik at konsentrasjonen ble 11,5 mg/ml. Luften i reaksjonskaret blir erstattet med nitrogengass. Karet ble forseglet, og utsatt for omrøring for å tilveiebringe reaksjonen som introduserer SH-grupper. Ikke-reagert S-acetylmerkaptto-ravsyreanhydrid ble inaktivert ved behandling i 10 minutter med 130 µl 0,2M Tris·HCl (pH 7,0), 13 µl 0,2M EDTA og 130 µl 2M hydroksyamin (pH 7,0). MoAb 78 ble utvunnet ved gelfiltrering ved bruk av en kolonne pakket med Sephadex g-25 (diameter 1 cm X 80 cm, Farmacia, Sverige) (strømningshastighet: 20 ml/time).

(g) 10 mg pepperrotperoksidase (HRP, Boehringer Mannheim, Kvalitet I, Vest-Tyskland) ble løst opp i 1,4 ml 0,1M fosfatbuffer (pH 6,8). På den andre side ble 14 mg N-hydroksysuksinimidester av N-(4-korboksykloheksylmetyl) maleimid løst opp i 335 µl DMF, og 100 µl av slik tilveiebragt oppløsning ble satt til HRP oppløsningen nevnt ovenfor. Luften i reaksjonskaret ble erstattet med nitrogengass, og karet ble forseglet. Etter 1 times reaksjon ved romtemperatur, ble proteiner fra den delen av det monoklonale MoAb 78 som var blitt introdusert med SH-grupper utvunnet ved gelfiltrering ved bruk av en kolonne pakket med Sephadex G-25 som ovenfor (f).

(h) 6 ml av den delen av det monoklonale antistoffet MoAb 78 introdusert med SH-gruppe tilveiebragt i (f) ovenfor og 2 ml

av den delen av HRP introdusert med maleimid-gruppe tilveiebragt i (g) ovenfor ble blandet, og blandingen ble konsentrert til 1 ml ved bruk av kollodion-bag (Sartorius, Vest-Tyskland) under redusert trykk ved 4°C i 20 timer. Etter reaksjonen ble ikke-reagert HRP introdusert med SH-gruppe fjernet med bruk av Ultrogel AcA44 (LKB Co., diameter 1 cm X 80 cm, Sverige) kolonne (strømningshastighet: 10 ml/time). I eluatene har fraksjonen inneholdende 2,4 HPR/antistoff det høyeste HRP-antallet per antistoffmolekyl. Denne ble benyttet i EIA i følgende punkt (i).

(i) Det monoklonale antistoffet MoAb52 tilveiebragt i (e) ovenfor ble renset som beskrevet i (f) ovenfor. Monoklonalt antistoff MoAb 52 ble fortynnet med PBS slik at det ble 10 µg/ml eller 20 µg/ml, og fortynningsmiddelet ble helt inn i Immunoplate (Nunc. Danmark) slik at det ble 100 µl/brønn. Platen ble latt stå ved 4°C natten over for å adsorbere det monoklonale antistoffet MoAb 52 til platen. Etter fjerning av antistoff som ikke var blitt adsorbent, ble platen vasket tre ganger med PBS, PBS inneholdende 0,01% mertiolat og 1% bovinserumalbumin (BSA) ble satt til platen med 200 µl/brønn, og platen ble latt stå ved 4°C natten over.

(j) Celle-ekstraktet inneholdende bFGF-mutein C86 tilveiebragt i (2) ovenfor ble fortynnet med PBS inneholdende 0,1% BSA. BSA-oppløsning ble fjernet fra platen tilveiebragt i (i) ovenfor, og platen ble vasket med PBS fire ganger, og fortynnet bFGF-mutein C86 ble satt til platen slik at det ble 100 µl/brønn for å adsorbere til platen ved 4°C over natt. Ikke-reagert mutein C86 ble fjernet, og platen ble vasket med PBS fire ganger. Det monoklonale antistoffet konjugert med HRP tilveiebragt i (h) ovenfor ble fortynnet med PBS inneholdende 0,1% BSA til 1/300, og fortynningsmiddelet ble satt til platen slik at det ble 100 µl/brønn. Reaksjonen ble utført i 4 timer ved romtemperatur. Etter fjerning av antistoff ble platen vasket med PBS 6 ganger, substrat for oksydase (Bio. Rad Co. U.S.A.) ble satt til platen slik at

det ble 100 µl/brønn. Kvanifisering ble tilveiebragt ved absorpsjonsmålinger ved 415 nm, og det ble bekreftet at en liten mengde mutein C86 var blitt produsert.

Eksempel 36

(Ekspresjon i *Escherichia coli* av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB797 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-PDN42 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 27 ovenfor ble behandlet på en måte beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB797 for humant bFGF-mutein (figur 51).

Ved bruk av plasmid pTB797, ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorved stammen *Escherichia coli* MM294/pTB797 (IFO 14702, FERM BP-1662) ble tilveiebragt, og som inneholder plasmid pTB797 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 42.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra *E. coli* MM294/pTB797 utviste FGF-aktivitet. Mutein DN42, hvori Asp i 42-posisjonen til humant bFGF var blitt erstattet med Asn, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 37

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

5 (1) Konstruksjon av plasmid pTB799 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

M13-PRQ45 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 27 ovenfor ble behandlet på samme måte som beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB799 for humant bFGF-mutein
10 (figur 52).

Ved bruk av plasmid pTB799, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB799 ble tilveiebragt, og som inneholder plasmid pTB799 innehold-
15 ende det mutein-kodende genet vist i figur 43.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en superna-
20 tant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet
25 tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli MM294/pTB799 utviste FGF-aktivitet. Mutein RQ45, hvori
30 Arg i 45-posisjonen til humant bFGF var blitt erstattet med Gln, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 38

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant
35 bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB798 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-PNR42 replikerende form (RF) tilveiebragt i eksempel 28 ovenfor ble behandlet på en måte beskrevet i eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB798 for humant bFGF-mutein (figur 53).

Ved bruk av plasmid pTB798, ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorved stammen *Escherichia coli* MM294/pTB798 ble tilveiebragt, og som inneholder plasmid pTB798 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 44.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra *E. coli* MM294/pTB798 utviste FGF-aktivitet. Mutein NR42, hvori Asp i 42-posisjonen til humant bFGF er blitt erstattet med Arg, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 39

(Produksjon av rekombinante DNAer som har muteinkodende basesekvens)

(1) Sete-spesifikk mutagenese:

I nærvær av 0,1mM adenosintrifosfat (ATP), 50mM hydroksymetylaminometanohydroklorid (Tris-HCl) med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂, 5mM ditiotreitol (DTT) og 9 enheter T4-

kinase, i en total mengde på 50 µl, 40 pikomol av det syntetiske oligonukleotidet:

5'-TCTTCTCCAGGGATCCGTT-3'

[primer for tilsetting av gjenkjenningssettet for restriksjonsenzym BamHI i basesekvensen, og og dermed forandre Val-44 til Ser og Arg 45 til Leu (Se figur 38 (7))] ble behandlet med T4-kinase ved 37°C i 1 time. Denne kinase-behandlede primeren ble varmet ved 67°C i 5 minutter, og ved 42°C i 25 minutter, i 50 µl av en blanding inneholdende 50 mM NaCl, 1,0 mM Tris-HCl med en pH-verdi på 8,0, 10mM MgCl₂ og 10mM β-merkaptoetanol, hvorved den ble hybridisert til 5µg av enkelt-trådet (ss) M3-PDN 42 DNA. Denne sammensmeltede blandingen ble deretter avkjølt på is, og satt til 50 µl av en reaksjonsblanding inneholdende 0,5mM deoksynukleotidtrifosfat (dNTP), 80mM Tris-HCl med en pH-verdi på 7,4, 8mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 9 enheter DNA-polymerase I Klenow-fragment, 0,5mM ATP og 2 enheter T4 DNA-ligase, og reaksjonen ble utført ved 37°C i 3 timer, og ved 25°C i 2 timer, deretter ble reaksjonen stoppet ved tilsetting av 2 µl EDTA. Reaksjonsproduktet ble benyttet for å transformere infiserbare JM105-celler; de transformerte cellene ble latt vokse over natt, og deretter ble ssDNA isolert fra kulturmediumsupernatanten. Ved bruk av dette ssDNA som et templat for den andre primerforlengingscyklusen, ble gel-renset RF-type DNA transformert inn i infiserbare JM105-celler; de resulterende transformerte cellene ble sådd utover en agarskål, og ble dyrket over natt for å tilveiebringe fagplaques.

(2) Screening og identifikasjon av plaque som var gjort mutagene:

Skåler inneholdende muterte M13-PDN42 fagplaques som er blitt mutert ved fremgangsmåten i eksempel 27 ved bruk av nevnte syntetiske oligomer (oligonukleotid) (Figur 38 (7)) og 2 skåler inneholdende ikke-muterte M13-PDN42 fagplaque tilveiebragt i eksempel 26 ble avkjølt til 4°C, og plaque fra hver skål ble overført til 2 runde nitrocellulosefiltre ved å holde et tørt filter plassert på agarskålen i 5 minutter når

det gjelder det første filteret, og i 15 minutter når det gjelder det andre filteret. Filtrene ble deretter plassert i 5 minutter på tykke filterpapir nedsenket i 0,2N NaOH, 1,5M NaCl og 0,2% Triton X-100, hvorefter de ble nøytralisert ved å holde dem plassert i 5 minutter til på filterpapir nedsenket i 0,5M Tris-HCl med en pH-verdi på 7,5 og 1,5M NaCl. Filtrene ble vasket to ganger på filtere nedsenket i 2 X SSC (standard natriumsitrat) på samme måte, og fikk tørke, og dette ble etterfulgt av tørking ved 80°C i 2 timer i en vakuumovn. De overlappende filtrene ble utsatt for prehybridisering ved 55°C i 4 timer med 10 ml/filter av en DNA-hybridiseringsbufferoppløsning (5 X SSC) med en pH-verdi på 7,0 inneholdende 4 X Denhardts oppløsning (polyvinylpyrrolidon, Ficoll og bovinserumalbumin, 1 X = 0,02%), 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 50mM natriumfosfatbufret oppløsning med en pH-verdi på 7,0 og 100 µg/ml denaturert lakse-sperm-DNA. Hybridisering ble utført ved 42°C i 24 timer med 10⁵ cpm/ml av en oligonukleotidprimer. Hvert filter ble vasket i en bufferoppløsning inneholdende 0,1% SDS og en redusert mengde SSC ved 50°C i 30 minutter. Filtrene ble deretter først vasket med en bufferoppløsning inneholdende 2 X SSC; kontrollfiltrene, som inneholdt ikke-muterte M13-PDN42 plaques, ble undersøkt for radioaktivitet ved bruk av en Geigerteller. Ved trinnvis redusering av SSC-konsentrasjonen, ble kontrollfiltrene som inneholdt ikke mutert M13-PDN42 plaques, vasket helt til det ikke var noe detekterbar radioaktivitet igjen på filtrene. Den minste SSC-konsentrasjonen som ble benyttet var 0,1 X SSC. Filtrene ble latt tørke i luft, og autoradiografer ble tatt etter 2 - 3 dagers eksponering ved -70°C. Screening ble utført på 10.000 muterte M13-PDN42 plaques og 100 ikke-muterte kontrollplaques ved bruk av en oligonukleotidprobe behandlet med kinase i nærvær av ³²-γ-ATP. Ingen av kontrollplaquene hybridiserte til proben, mens 3 til 10 av de muterte M13-PDN42 plaquene hybridiserte til proben.

En av de muterte M13-PDN42 plaquene ble tatt ut, og inokulert i et JM105 kulturmedium. Fra den resulterende supernatanten ble ssDNA preparert, og fra de bakterielle cellepelletene ble en dobbelt-trådet (ds) DNA preparert. Analyser av basesekvensene ble utført ved bruk av hensiktsmessig oligonukleotid-primer og ssDNA.

Resultatet bekrefter at GTC (Val-44)-kodonet og CGG (Arg-45)-kodonet var blitt omdannet til et TCC (Ser)-kodon og CTG (Leu)-kodon, respektivt.

Av de muterte M13-PDN42 fagene, ble fag hvori Val-44-kodonet og Arg-45-kodonet var blitt et Ser-kodende kodon og Leu-kodende kodon, respektivt betegnet M13-PINT. Dets basesekvens og aminosyresekvens som blir kodet derav er vist i figur 54.

(3) Konstruksjon av plasmid pTB853 for human bFGF-mutein-ekspressjon:

M13-PINT replikerende form (RF) tilveiebragt i (2) ovenfor ble behandlet som beskrevet i Eksempel 2 (1) for å konstruere plasmid pTB853 for humant bFGF-mutein (figur 55).

Ved bruk av plasmid pTB853, ble *Escherichia coli* MM294 transformert, hvorved stammen *Escherichia coli* MM294/pTB853 ble tilveiebragt, som inneholder plasmid pTB853 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 54.

(4) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfor nevnte transformant ble dyrket ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(5) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet

tilveiebragt i (4) ovenfor ble bestemt, ved fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli MM294/pTB853 utviste FGF-aktivitet. Mutein FINT, hvori Asp i 42-posisjonen, Val i 44-posisjonen og Arg i 45-posisjonen eller humant bFGF var blitt erstattet med Asn, Ser og Leu, respektivt, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 40

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB855 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

DNAet i plasmid pTB669 som ble tilveiebragt i ovenfornevnte referanseeksempel 2 ble spaltet med et restriksjonsenzym Hinc II, og ble ligert med EcoR I linker p(5' CATGAATTCATG 3') under T4 DNA-ligasereaksjon. Slik tilveiebragt DNA ble videre spaltet med restriksjonsenzymene EcoR I og Pst I for å tilveiebringe et DNA-fragment på omtrent 0,35 kb. Dette DNA-fragmentet ble ligert med det omtrent 3,2 kb DNA-fragmentet tilveiebragt i eksempel 2 (1), fragmentet som ble tilveiebragt ved spalting av ptrp781 med EcoR I-PstI, for å tilveiebringe plasmid pTB855 for human bFGF-muteinekspresjon ble konstruert (figur 56).

Ved bruk av plasmid pTB855, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB855 som inneholder plasmid pTB855 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 57.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Human bFGF-aktivitet til det bakterielle celle-ekstraktet:

Human bFGF-aktivitet i det bakterielle celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble bestemt, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 2 (3).

Resultatet viste at det bakterielle celle-ekstraktet fra E. coli MM294/pTB855 utviste FGF-aktivitet. Mutein NR41, hvori aminosyresekvensen fra Pro i 2-posisjon til Val i 41-posisjonen til humant bFGF var blitt deletert, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 41

(Ekspresjon i Escherichia coli av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmid pTB856 for human bFGF-mutein-ekspresjon:

DNAet til plasmid pTB669 som ble tilveiebragt i ovenfornevnte referanseeksempel 2 ble delvis spaltet med et restriksjonsenzym BamHI for å tilveiebringe BamHI-gjenkjenningssete i bFGF-genet. Setet ble videre spaltet med Escherichia coli DNA-polymerase I i nærvær av dATP, dCTP, dGTP, dTTP for tilveiebringe butt ende. Dette DNAet ble ligert med NheI linker p(5' CTAGCTAGCTAG 3') i en T4 DNA-ligasereaksjon. Etter behandling med restriksjonsenzym NheI og ligering av det spaltede setet i en T4 DNA-ligasereaksjon, ble plasmid pTB856 for human bFGF-muteinekspresjon konstruert (figur 58).

Ved bruk av plasmid pTB856, ble Escherichia coli MM294 transformert, hvorved stammen Escherichia coli MM294/pTB856 som inneholder plasmid pTB856 inneholdende det mutein-kodende genet vist i figur 59 tilveiebragt.

(2) Preparering av bakterielt celle-ekstrakt:

Ovenfornevnte transformant ble dyrket ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (2) for å tilveiebringe en

supernatant, som deretter ble benyttet som et bakterielt celle-ekstrakt.

(3) Celle-ekstraktet tilveiebragt i (2) ovenfor ble utsatt for en enzymimmunoanalyse (EIA), sandwichfremgangsmåte, som beskrevet i Eksempel 35 (3). Resultatet bekreftet at bFGF-muteinet er tilstede i celle-ekstraktet. Mutein C129, hvori aminosyresekvensen fra Lys i 130-posisjonen til Ser i 147-posisjonen var blitt deletert, ble dermed tilveiebragt.

Eksempel 42

(Ekspresjon i dyreceller av genet som koder for humant bFGF-mutein)

(1) Konstruksjon av plasmidene pTB831, pTB833 og pTB835 for human bFGF-muteinekspresjon.

Plasmid pTB762, som ble tilveiebragt i eksempel 7 ovenfor, ble spaltet med restriksjonsenzymene EcoR I-Bam HI for å tilveiebringe et 0,38 kb DNA-fragment inneholdende en kodende region som koder for det humane bFGF-mutein CS23, hvor Cys i 70-posisjonen og i 88-posisjonen er blitt erstattet med Ser.

Plasmid pTB504 (Eksempel 1 (ii) i Japansk patent Laid-open nr. 62-175182 som korresponderer til Europa patent publisasjon nr. 225, 701) ble spaltet med restriksjonsenzymet Cla I-EcoR I for å tilveiebringe et 1,7 kb DNA-fragment inneholdende murin leukemivirus (MuLV) LTR-område, SV40 tidlig promoter, spleiseforbindelsespunkt og human interleukin-2(IL-2) ledersekvens.

Plasmid pTB627, som ble tilveiebragt i referanseeksempel 1, ble spaltet med restriksjonsenzym Cla I-EcoR I for å tilveiebringe 2 kb DNA-fragmentet, og plasmid pTB389 ble spaltet med restriksjonsenzym Cla I-EcoR I for å tilveiebringe 2,6 kb DNA-fragmentet. Det slik tilveiebragte 2 kb DNA-fragmentet og 2,6 kb DNA-fragmentet ble ligert og dannet plasmid pTB675, som koder for humant bFGF. Plasmid pTB389 ble tilveiebragt ved omdanning av hver av PstI spaltingssetene i 5'-terminale

regionen og BamHI spaltingssete i 3'-terminale regionen i interleukin-2 gen regionen til plasmid pTB106 (beskrevet i Japansk patent Laid-open nr. 61-63282 som korresponderer til Europa patentpublikasjon nr. 172, 619) til EcoRI, for å
5 fjerne interleukin-2 genregionen. Deretter ble plasmid pTB675 spaltet med restriksjonsenzymene ClaI-BamHI for å tilveiebringe 3,4 kb DNA-fragmentet som inneholder en kodende region for aminosyrer ved den C-terminale enden til humant bFGF, en
10 ikke-kodende region, ampicillinresistent-genet som opprinnelig kommer fra plasmid pBR322, et replikasjonsorigo i *Escherichia coli*.

De ovenfor tre DNA-fragmentene (dvs. 0,38 kb DNA-fragmentet, 1,7 kb DNA-fragment og 3,4 kb DNA-fragment) ble ligert ved
15 bruk av T4 DNA-ligase for å tilveiebringe plasmid pTB831 (figur 60).

På lignende måte ble plasmid pTB763 tilveiebragt i eksempel 18, som koder for humant bFGF-mutein CS14 (hvor i Cys i 26- og
20 93-posisjonene til humant bFGF er blitt erstattet med Ser) eller plasmid pTB765 tilveiebragt i eksempel 11, som koder for humant bFGF-mutein CS1234 (hvor i Cys i 26-, 70-, 88- og 93-posisjonene til humant bFGF er blitt erstattet med Ser) benyttet istedenfor plasmid pTB762 i fremgangsmåten ovenfor,
25 hvorved plasmid pTB833 og plasmid pTB835, respektivt, ble konstruert.

(2) Ekspresjon i dyreceller:

Apekatt COS7-celler ble sådd på vevskulturskåler som har en
30 diameter på 6 cm med DMEM-medium inneholdende 10% føtalt kalveserum, og etter 24 timer ble kulturmediet erstattet med et nytt. Etter 4 timer ble 10 µg DNA fra plasmid pTB831, pTB833 eller pTB835 transfektert til COS7-celler i henhold til kalsiumfosfat-fremgangsmåten [Graham et al. Virology, 52,
35 456 (1973)]. Neste dag ble kulturmediet erstattet med DMEM-medium inneholdende 1% føtalt kalveserum. Etter 48 timers dyrking, ble det dyrkede mediet innbefattende cellene samlet

og cellene ble utvunnet. Cellene ble to ganger vasket med PBS og deretter suspendert i PBS. Suspensjonen ble utsatt for ultrasonisk behandling i en kort tid, og deretter utsatt for sentrifugering i 15 minutter ved 15.000 rpm for å tilveiebringe en supernatant.

Bestemmelse av den humane bFGF-aktiviteten ble gjort på dyrkningsmediet til COS7-cellene infisert med plasmidet og på ekstraktet fra cellene, ved bruk av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 (3). Resultatene som ble tilveiebragt er vist i tabell 7.

TABELL 7

FGF-aktivitet (ng/skål)			
<u>Plasmid</u>	<u>Mutein</u>	<u>Kulturmedium</u>	<u>Ekstrakt fra celler</u>
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.

Rekombinant DNA som koder for et mutein av basisk
5 fibroblastvekstfaktor (bFGF) av erstatnings- eller delesjons-
typen eller en kombinasjon derav, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det koder for

10 et mutein av erstatningstypen i hvilket i det minste en av de
fire cysteinrestene i den angjeldende aminosyresekvensen i
den naturlige bFGF typen er erstattet med en nøytral
aminosyre som er forskjellig fra cystein, og

15 et mutein av delesjonstypen hvori 1 til 41 aminosyrer mangler
i amino-terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i
bFGF og/eller 1 til 61 aminosyrer mangler i karboksyl-
terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF,
forutsatt at muteinet av delesjonstypen utelukker et mutein
av delesjonstypen som omfatter aminosyrer (16-146)-OH, (24-
20 120)-OH og (20-110)-NH₂ i den angjeldende aminosyresekvensen
i bFGF.

2.

Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
25 v e d at det koder for nevnte bFGF av naturlig type som
innbefatter aminosyresekvensen:

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

i dens molekyl.

3.

Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den nyinnførte nøytrale aminosyren er serin.

4.

Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at muteinet sekvensen koder for er CS 2.

5.

Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at muteinet sekvensen koder for er CS 3.

5 6.

Rekombinant DNA ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at muteinet sekvensen koder for er CS 23.

7.

10 Transformant som er i stand til å produsere et mutein av
basisk firbroblastvekstfaktor (bFGF) av erstatnings- eller
delesjonstypen eller en kombinasjon derav, hvor

et mutein av erstatningstypen hvori minst en av de fire
15 cysteinrestene i den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF er
erstattet med en nøytral aminosyre som er forskjellig fra
cystein, og

et mutein av delesjonstypen i hvilket 1 til 41 aminosyrer
20 mangler i amino-terminalen til den angjeldende aminosyresek-
vensen i bFGF og/eller 1 til 61 aminosyrer mangler i
karboksyl-terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i
bFGF, forutsatt at muteinet av delesjonstypen utelukker et
mutein av delesjonstypen som omfatter aminosyrer (16-146)-OH,
25 (24-120)-OH og (20-110)-NH₂ i den angjeldende aminosyresek-
vensen i bFGF,

k a r a k t e r i s e r t v e d at transformanten
omfatter en ekspresjonsvektor som inneholder en rekombinant
30 DNA som definert i krav 1 i kombinasjon med transskripsjons-
og translasjonsregulerende sekvenser som dirigerer ekspre-
sjonen av den muteinkodende rekombinante DNA-sekvensen.

8.

35 Transformant ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at nevnte bFGF som transformanten produserer er av
naturlig type og innbefatter aminosyresekvensen:

Phe-Phe-Leu-Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-
Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro
i dens molekyl.

5 9.

Transformant ifølge krav 7, karakterisert
ved at den nyinnførte nøytrale aminosyren i nevnte mutein
av erstatningstypen som transformanten produserer er serin.

10 10.

Transformant ifølge krav 7, karakterisert
ved at den er E.coli DH1/pTB 742 (FERM BP-1642).

11.

15 Transformant ifølge krav 7, karakterisert
ved at den er E.coli DH1/pTB 743 (FERM BP-1643).

12.

20 Transformant ifølge krav 7, karakterisert
ved at den er E.coli MM294/pTB 762 (FERM BP-1645).

13.

Fremgangsmåte for fremstilling av et mutein av basisk
fibroblastvekstfaktor (bFGF) som er et mutein av erstatnings-
25 eller delesjonstypen eller en kombinasjon derav, hvor

et mutein av erstatningstypen i hvilket minst en av de fire
cysteinrestene i den angjeldende aminosyresekvensen av den
naturlige bFGF typen er erstattet med en naturlig aminosyre
30 som er forskjellig fra cystein, og

et mutein av delesjonstypen i hvilket 1 til 41 aminosyrer
mangler i amino-terminalen til den angjeldende aminosyresek-
vensen i bFGF og/eller 1 til 61 aminosyrer mangler i
35 karboksyl-terminalen til den angjeldende aminosyresekvensen i
bFGF, forutsatt at muteinet av delesjonstypen utelukker et
mutein av delesjonstypen som omfatter aminosyrer (16-146)-OH,

(24-120)-OH og (20-110)-NH₂ i den angjeldende aminosyresekvensen i bFGF,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d dyrking av en transformant som omfatter en ekspresjonsvektor inneholdene en rekombinant DNA som definert i krav 1 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsregulerende sekvenser som kan dirigere ekspresjonen av den muteinkodende rekombinante DNA-sekvensen, i et kulturmedium for dannelselse og akkumulering av
10 muteinet i det dyrkede mediet og isolering av muteinet.

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte bFGF av naturlig type som fremstilles
15 innbefatter aminosyresekvensen:

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

i dens molekyll.

20 15.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at den nye aminosyren som innføres er serin.

16.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at muteinet som fremstilles er CS 2.

17.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at muteinet som fremstilles er CS 3.

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at muteinet som fremstilles er CS 23.

Figur 1

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGGCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	20 60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg CCCAAGCGGCTGTACTGC AAAACGGGGCTTCTTCCCTGGGCATCCACCCCGACGGCCGA	40 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu GTTGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	60 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp AGAGGAGTTGTGTCTATCA AAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	80 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA	100 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAGCTGAAA	120 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	140 420
LeuProMetSerAlaLysSertm CTTCCCAATGTCTGTCTAAGAGCTGA	147 444

180305

Figur 2

- (1) 5'-CGTTCTT^{Ser}GCTGTAGAGCCGCT-3'
(RsaI)
- (2) 5'-AACGATT^{Ser}AGCGCTCACTCC-3'
HaeII
- (3) 5'-GTAACAGACTTAGA^{Ser}AAGCTAGT-3'
AluI
- (4) 5'-TCGAAGAAGAA^{Ser}AGACTCATCC-3'
HinfI

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGCAACGGGGGCTTCTTCCCTGGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGCTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACCTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAAATGCTGCTAAGAGCTGA	444
	180305

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGCGCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGCTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCCAGTTGGTATGTGGCCTGAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAAATGTCTGCTAAGAGCTGA	448

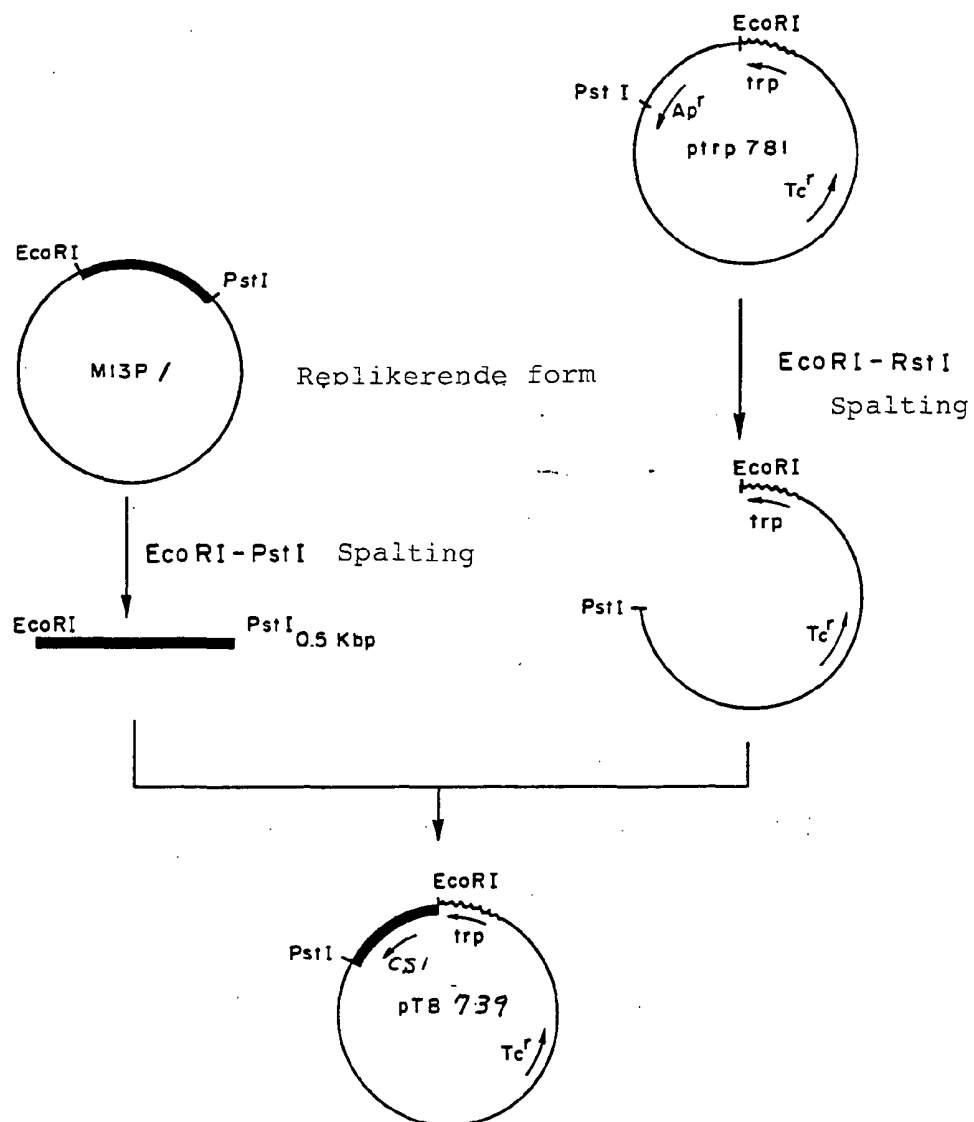
Figure 5

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCTGGCGCATCCACCCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAATAACACCAAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAAGTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCCAATGTCTCTAAGAGCTGA	444
	180305

Figur 6

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGCGGCCCTTCCCCCGCCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCATAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGCTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTGTACGGATGAGTCTTCTTCTTCGACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATATTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444
	180305

Figur 7



Figur 8

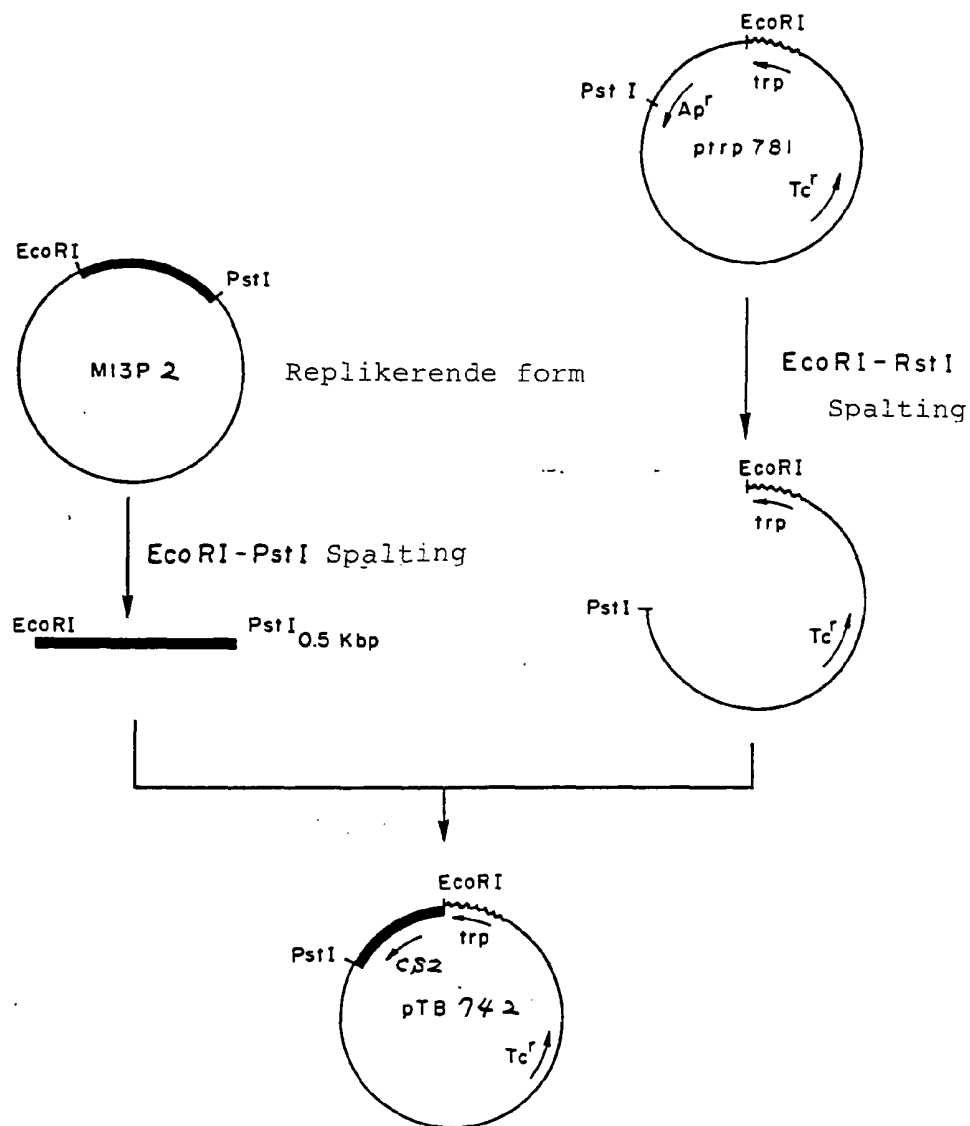
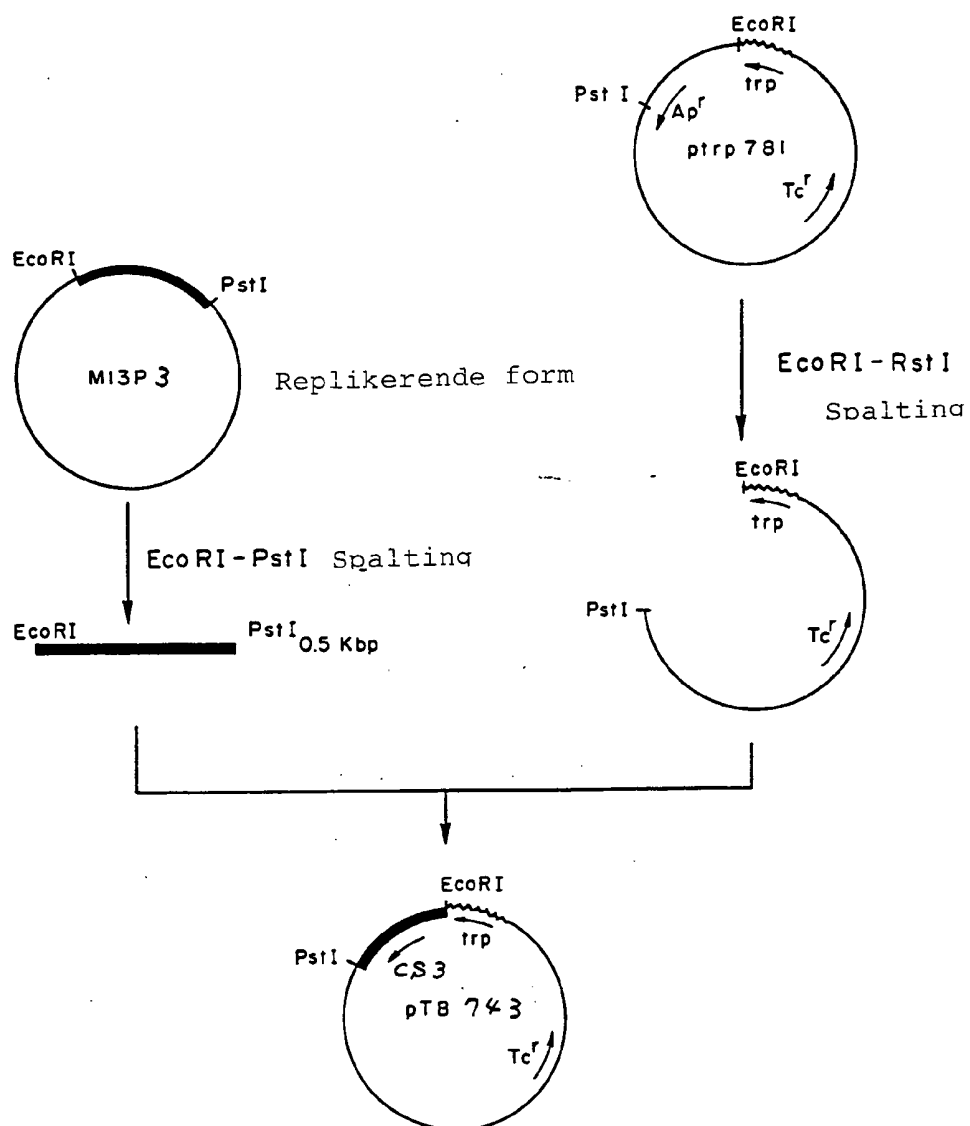
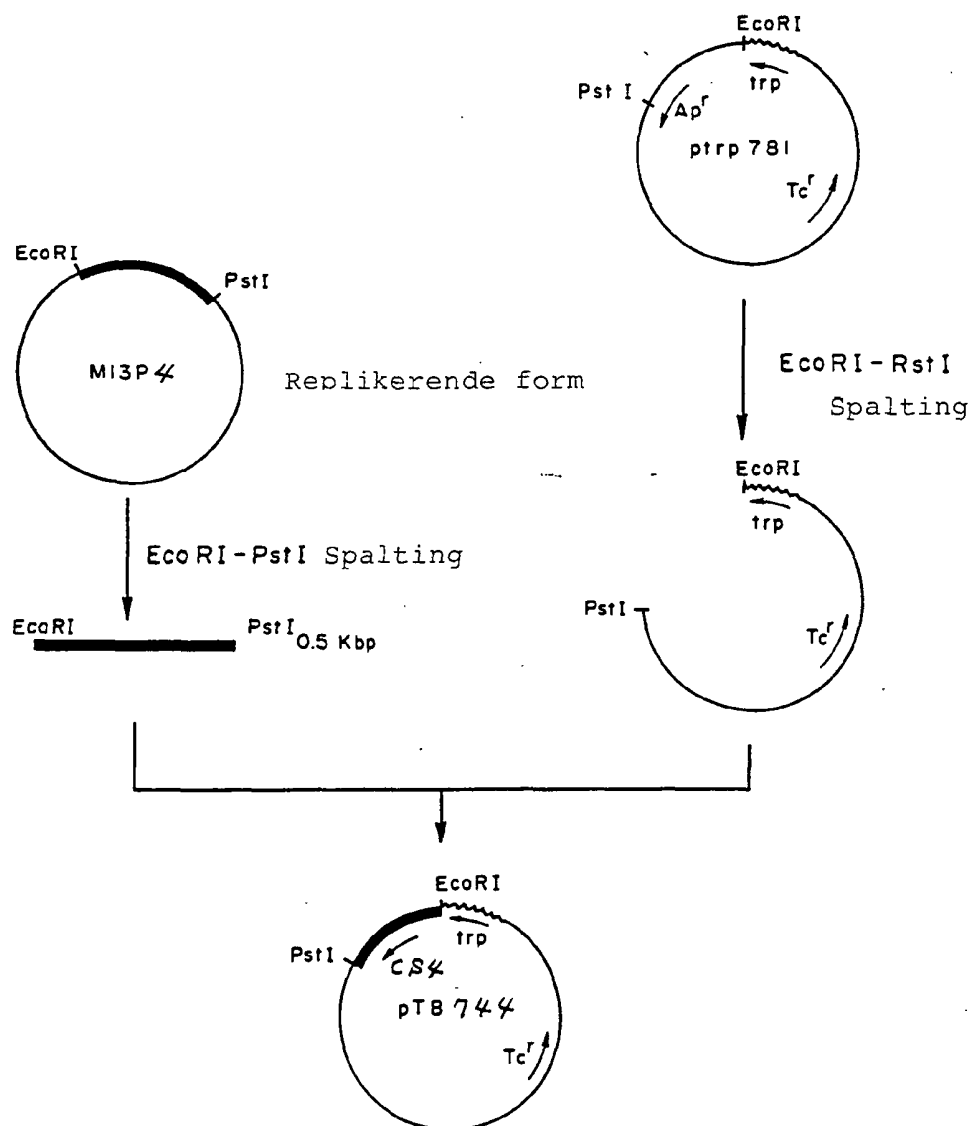


Figure 9



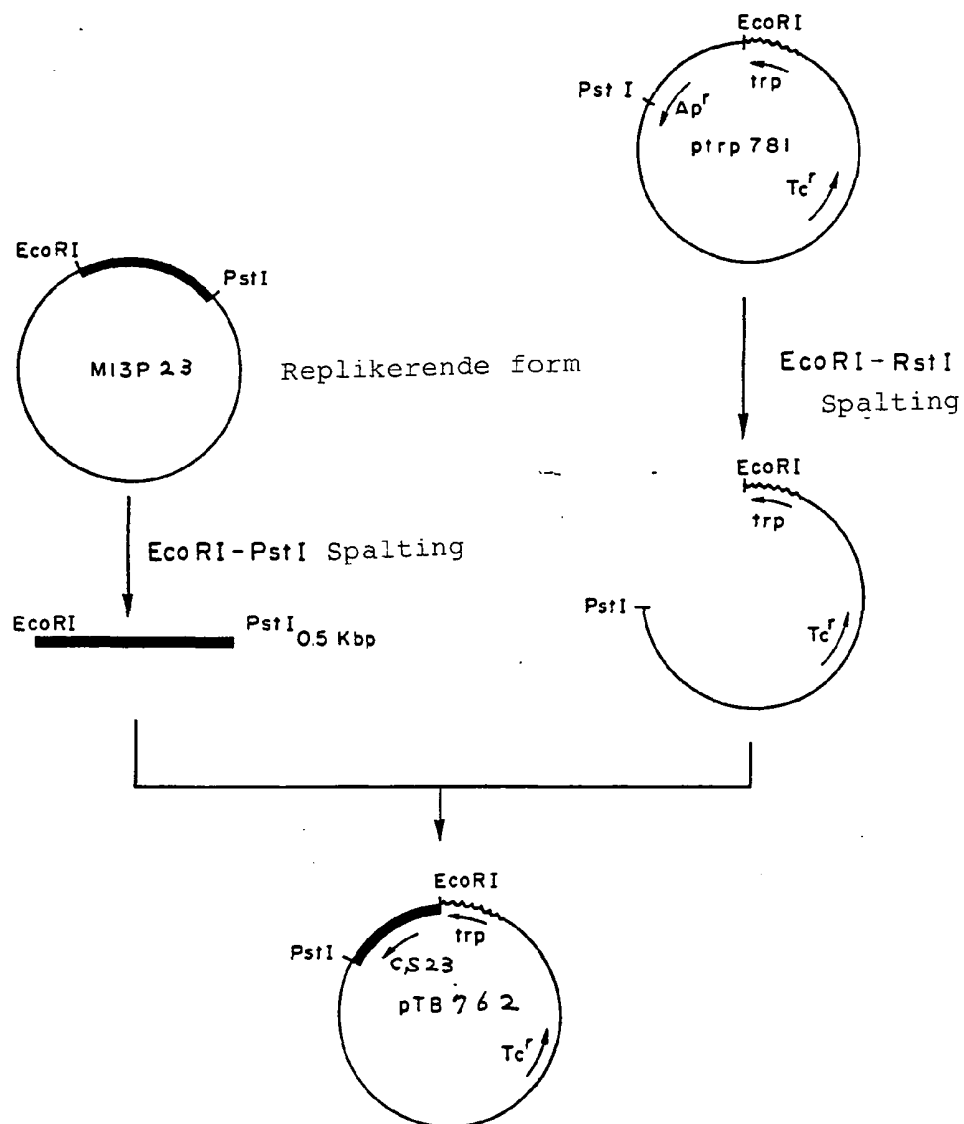
Figur 10



MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGC AAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCA AAGGAGTGAGCGCTAAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCGAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSerTrm	147
CTTCCAAATGTCTGTCTAAGAGCTGA	444

180305

Figur 12

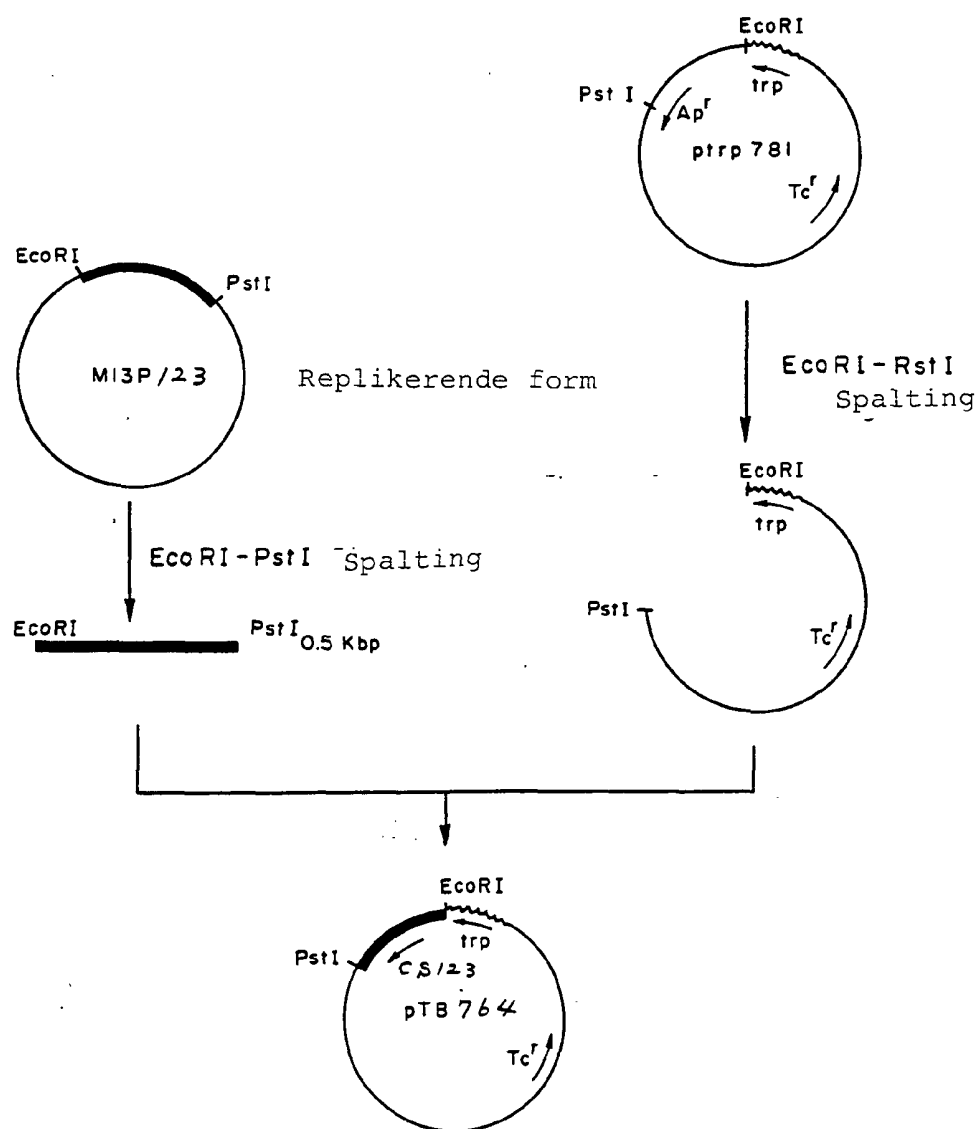


Figur 13

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGCGCTTCCCGCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTAGCTTCTTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTTCTTTTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCCTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTCTAAGAGCTGA	444

180305

Figur 14

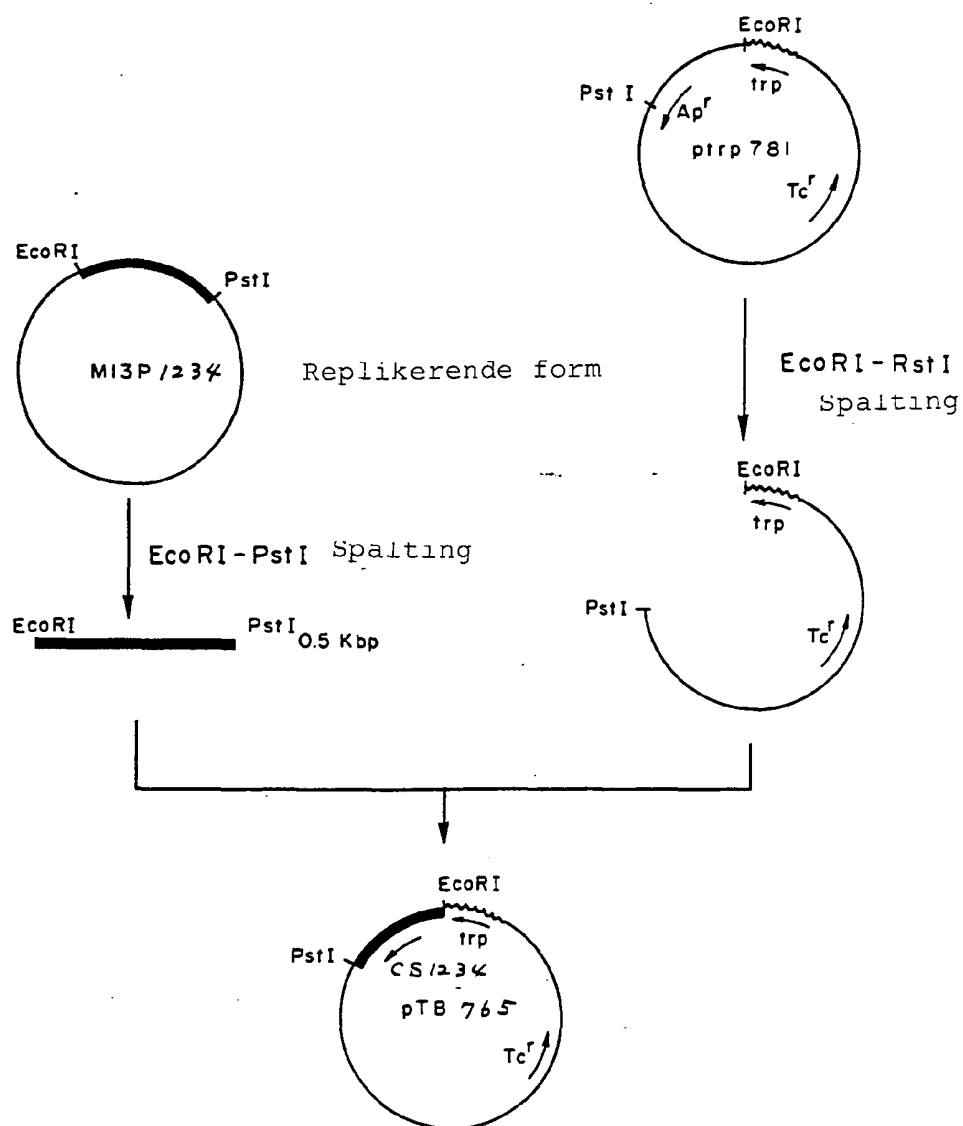


Figur 15

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGCGCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	20 60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAAACGGGGGCTTCTTCCTGGCATCCACCCGACGGCCGA	40 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAGAG	60 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	80 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu GGAAGATTACTAGCTTCTTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTCTTCTTCTCGAACGATTGGAA	100 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys TCTAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAGCTGAAA	120 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe CGAACCTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	140 420
LeuProMetSerAlaLysSertrm CTTCCAAATGCTCTGCTAAGAGCTGA	147 444

180305

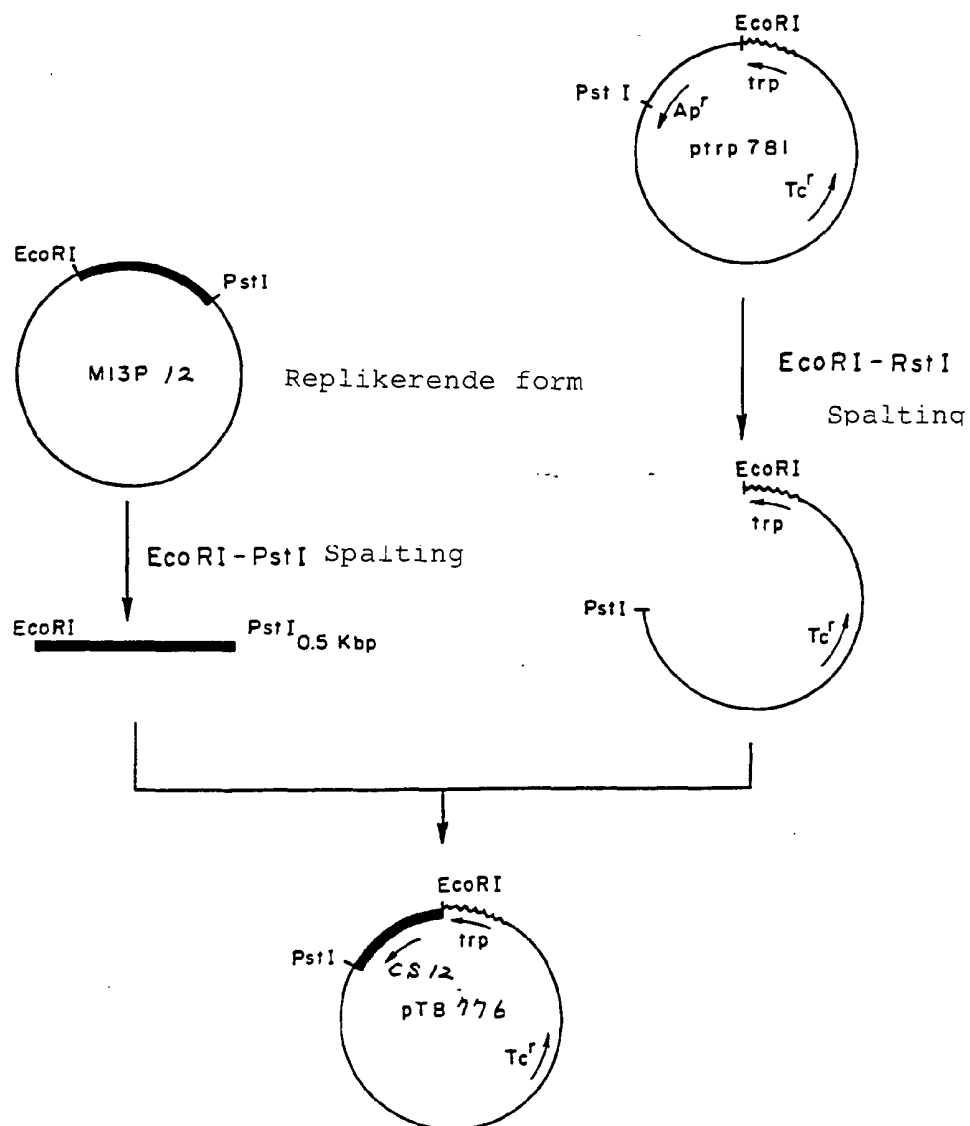
Figur 16



Figur 17

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp ATGCCAGCATTTGCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	20 60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGCTTCTTCTCGGCATCCACCCGACGGCCGA	40 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	60 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	80 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTCTTTTGAACGATTGGAA	100 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	120 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATCTTTT	140 420
LeuProMetSerAlaLysSertrm CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	147 444
	180305

Figur 18



Figur . 19

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCGAGGATGGCGGCAGCGGGCTTCCCGCCGCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACACTTCAAGCAGAGAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTGGCTTCTAATGTGTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444.

180305

Figur 20

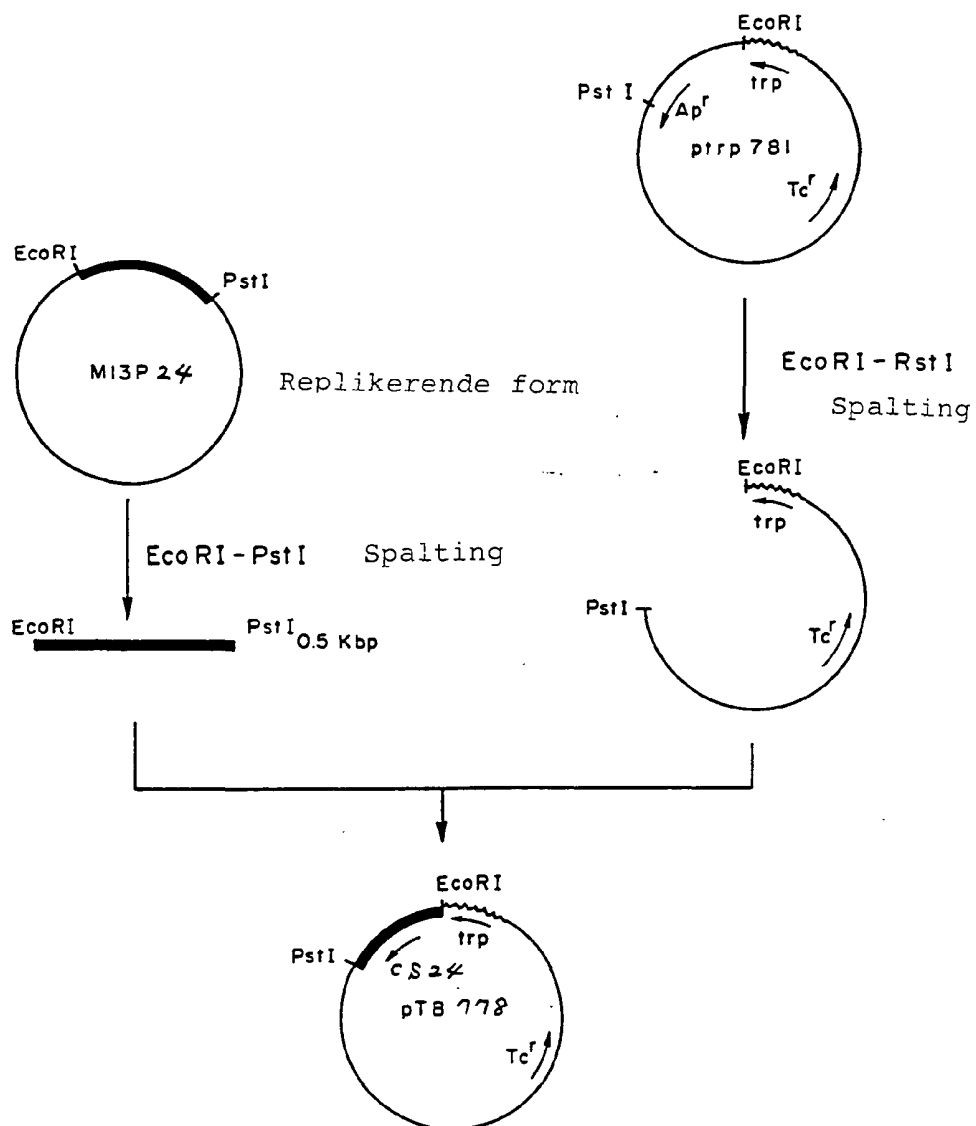
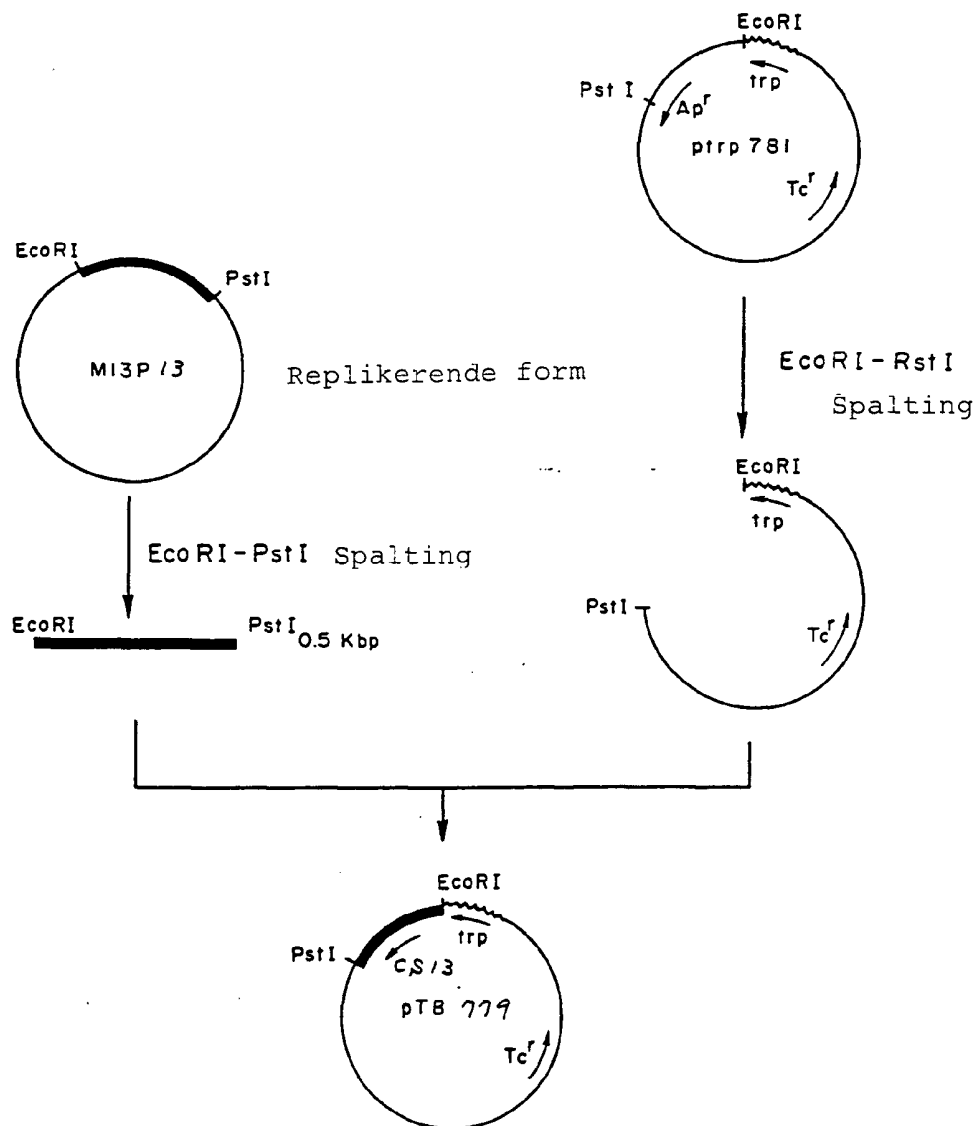


Figure 21

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	20 60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg CCCAGCGGCTCTACAGCAAGAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA	40 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu GTTGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	60 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	80 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu GGAAATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTGTCTTCTTTTGAACGATTGGAA	100 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	120 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	140 420
LeuProMetSerAlaLysSertrm CTTCCAATGCTCTGCTAAGAGCTGA	147 444.
	180305

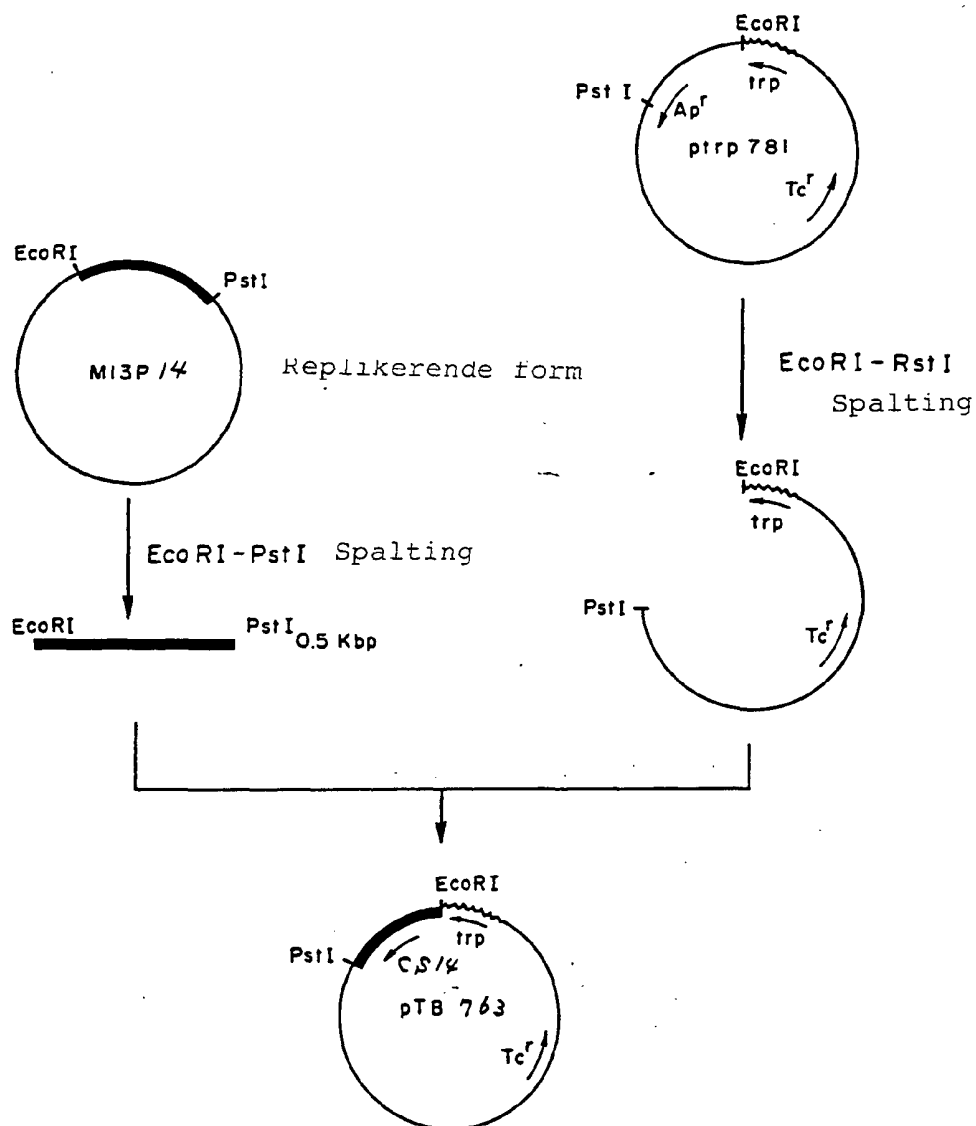
Figura 22



MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTCGCCGAGGATGGCGGACAGCGGCCCTTCCCGCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAATTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGACCGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAAATGTCTGTCTAAGAGCTGA	444

180305

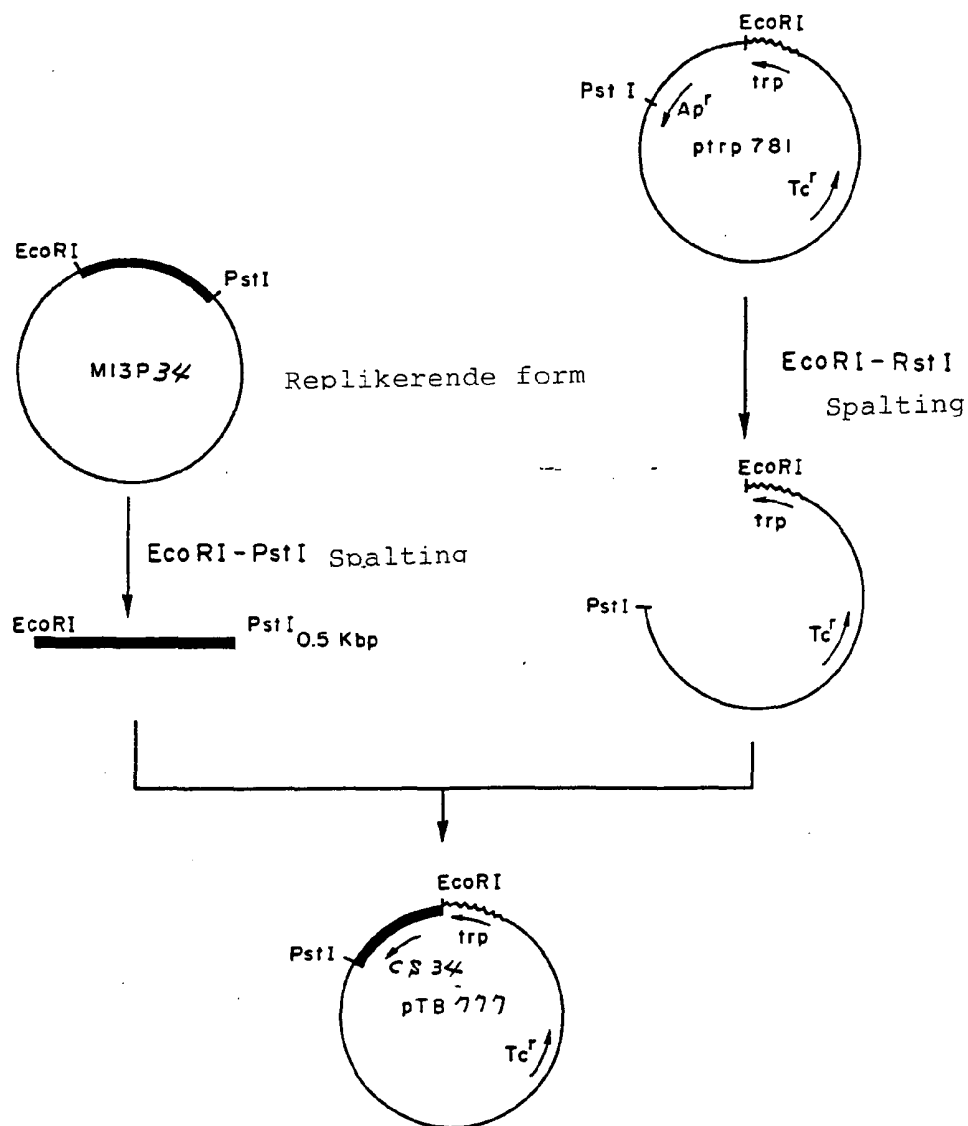
Figur 24



Figur. 25

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCTGGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAATTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTCTTCTTCTCGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSerTrp	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444.
	180305

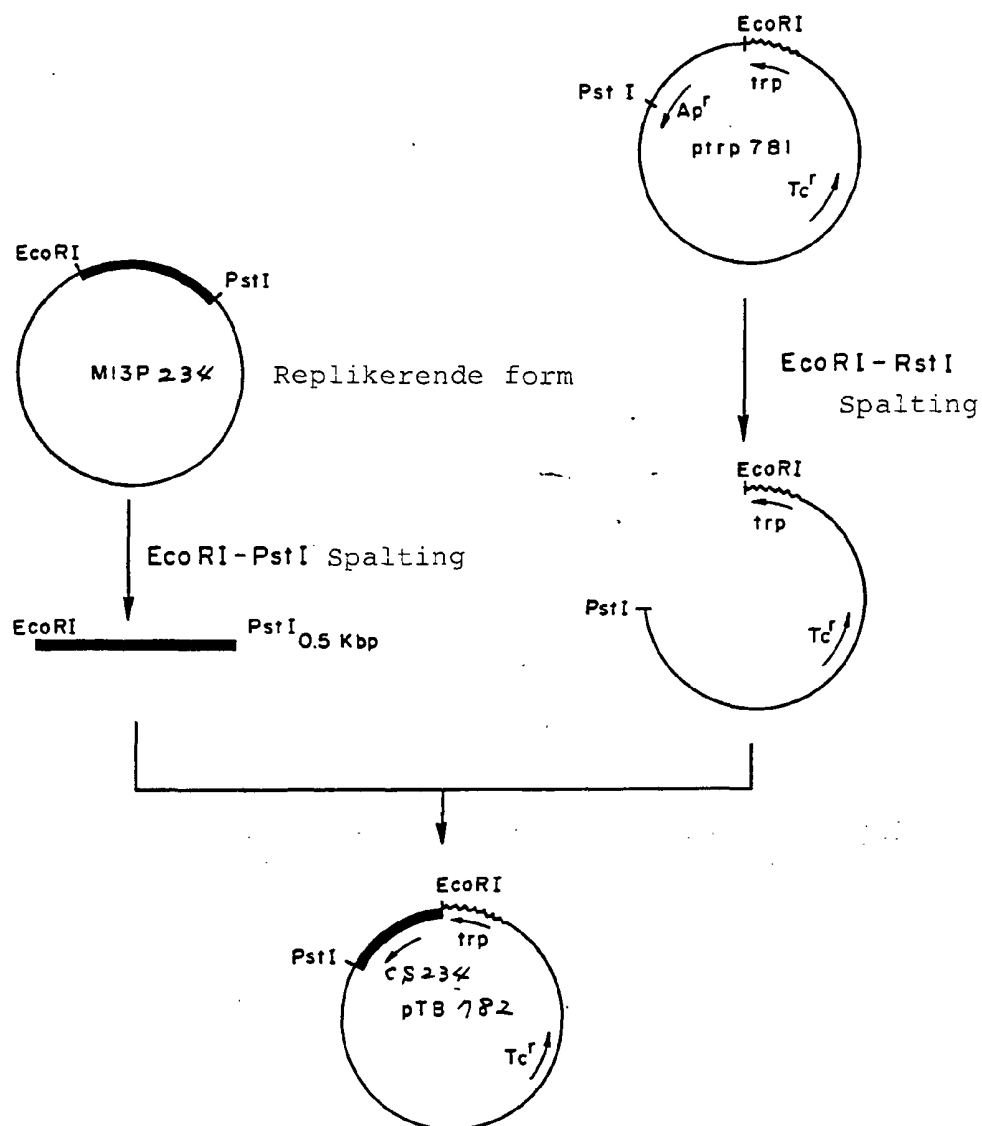
Figur. 26



Figur 27

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTCGCCGAGGATGGCGGACGGCGCCTTCCCGCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTCTCGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGCGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTTACGGATGAGTCTTCTCTTCGACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444
	180305

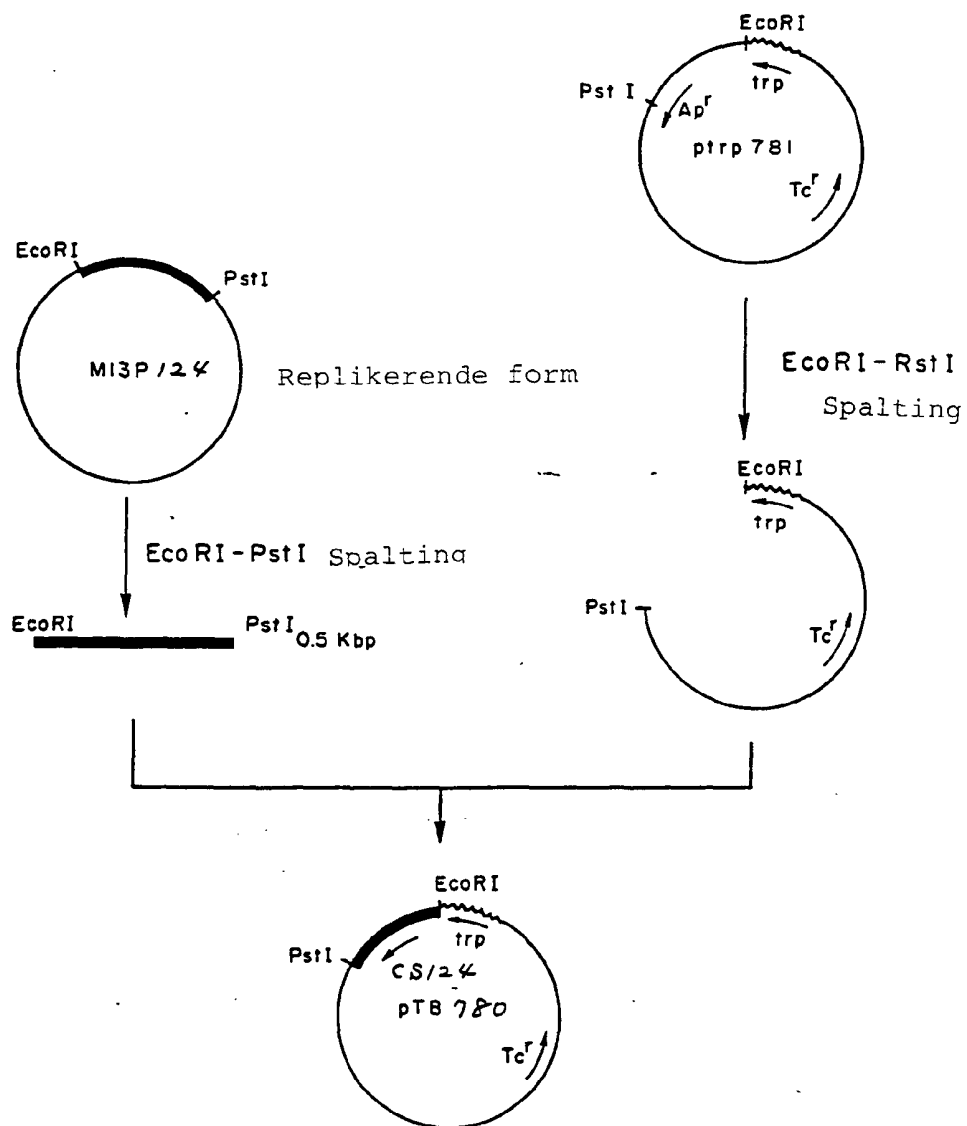
Figur 28



MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGAGGGGGCTTCCCGCCGCGCCACTTCAAGGAC	20 60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGGGCATCCACCCGACGGCCGA	40 120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAGAG	60 180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValSerAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGAGGCTAATCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	80 240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTCTTTCTTCTTCGACGATTGGAA	100 300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAAGTTGGTATGTGGCAGCTGAAA	120 360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	140 420
LeuProMetSerAlaLysSertrm CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	147 444.

180305

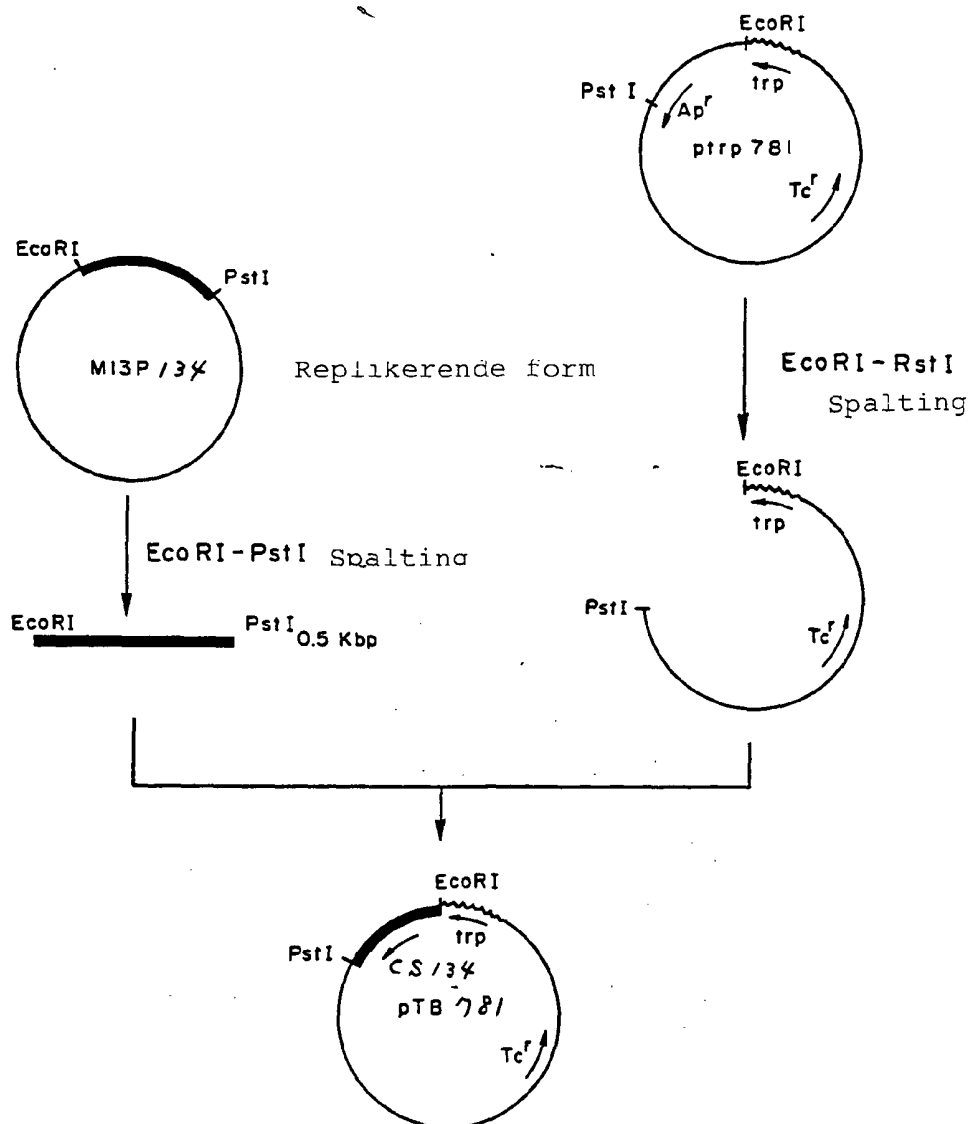
Figur 30



MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGACGGGGCCTTCCCGCCGCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTCTACAGCAAGAACGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysSerValThrAspGluSerPhePhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTAGCTTCTAAGTCTGTACGGATGAGTCTTCTTCTTCGACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAAGTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSerTrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

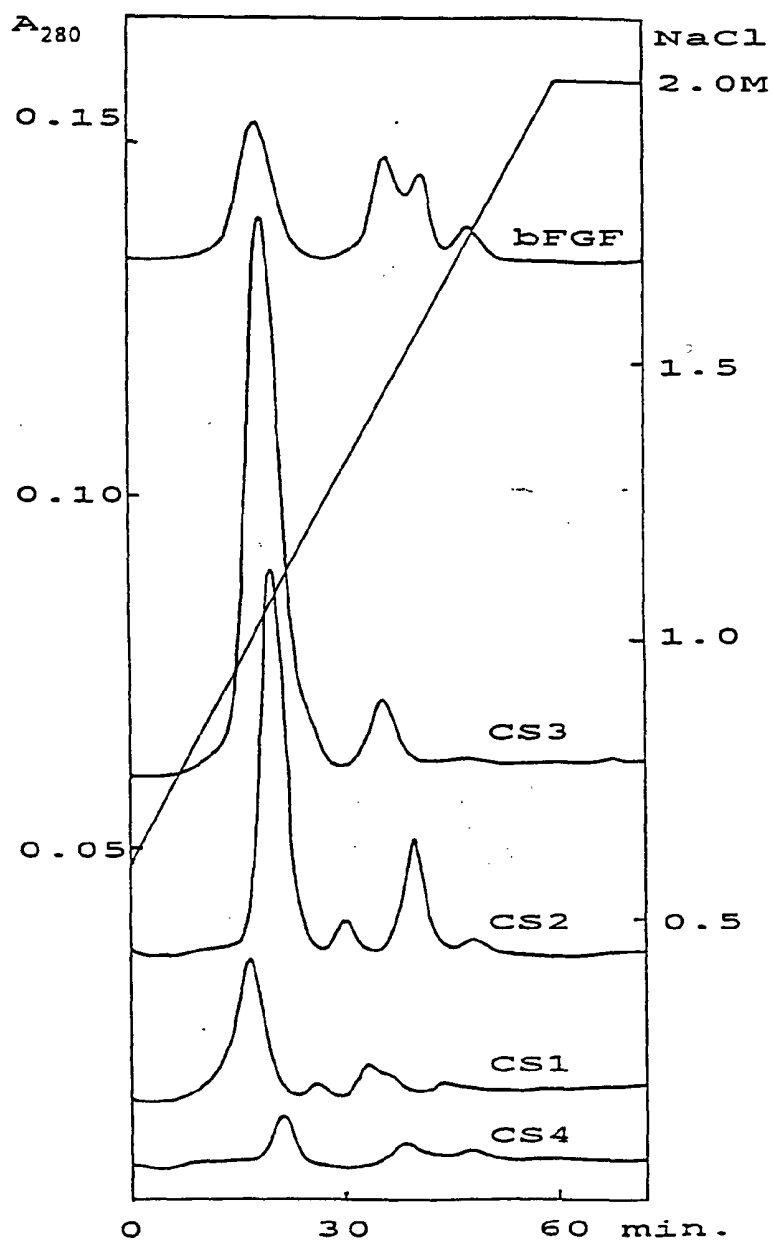
180305

Figure 32



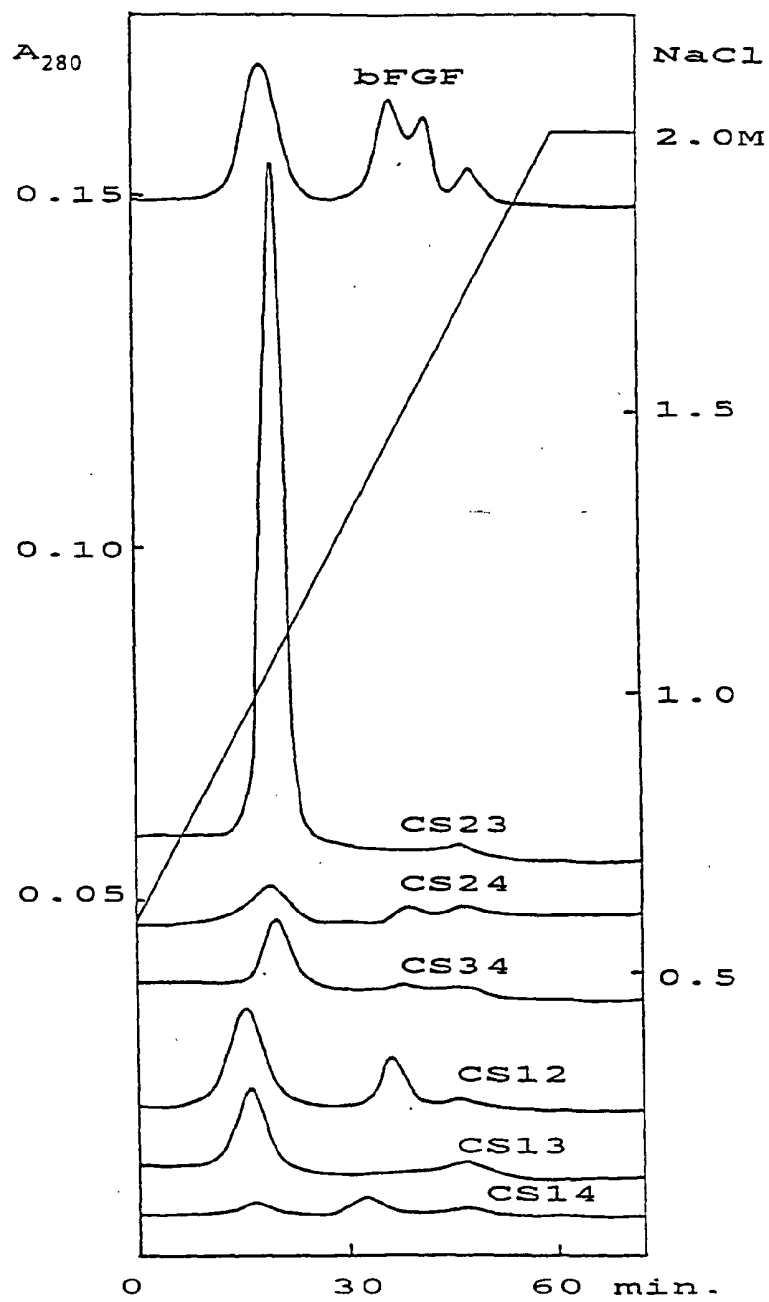
180305

Figure 33



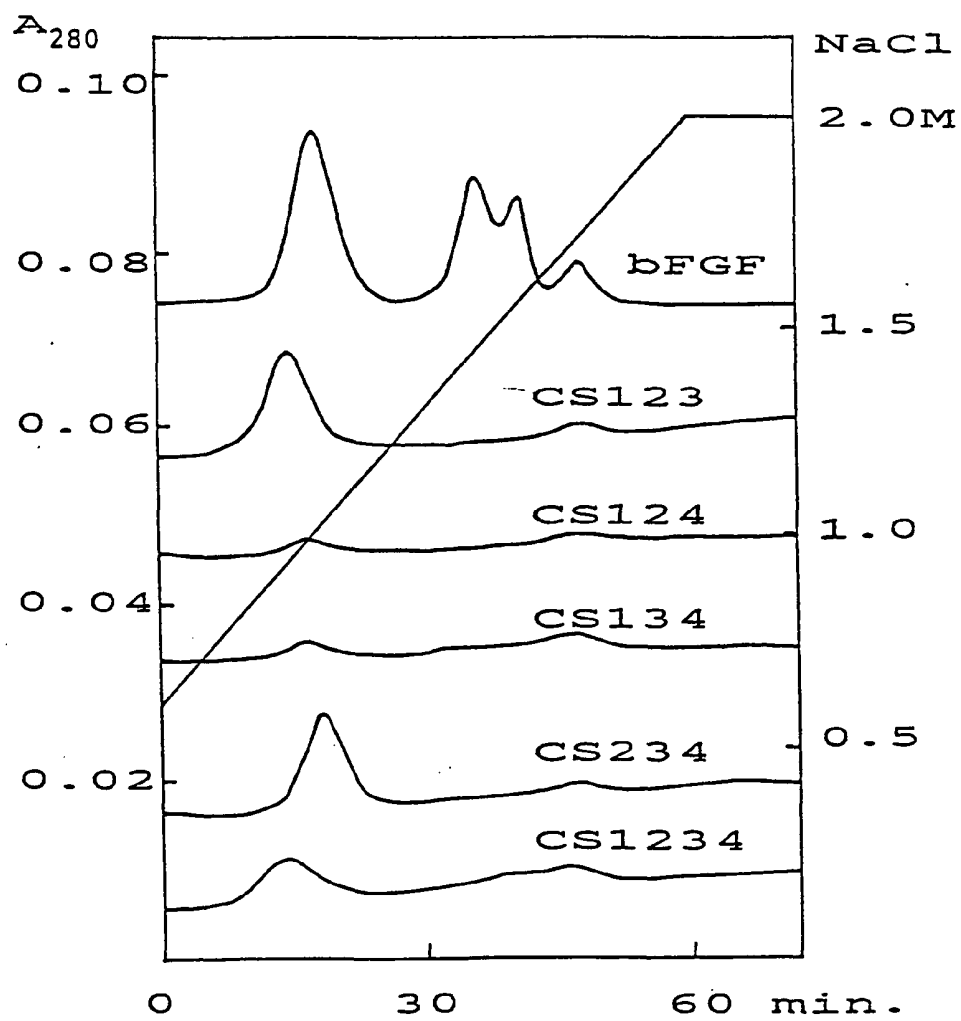
180305

Figur 34



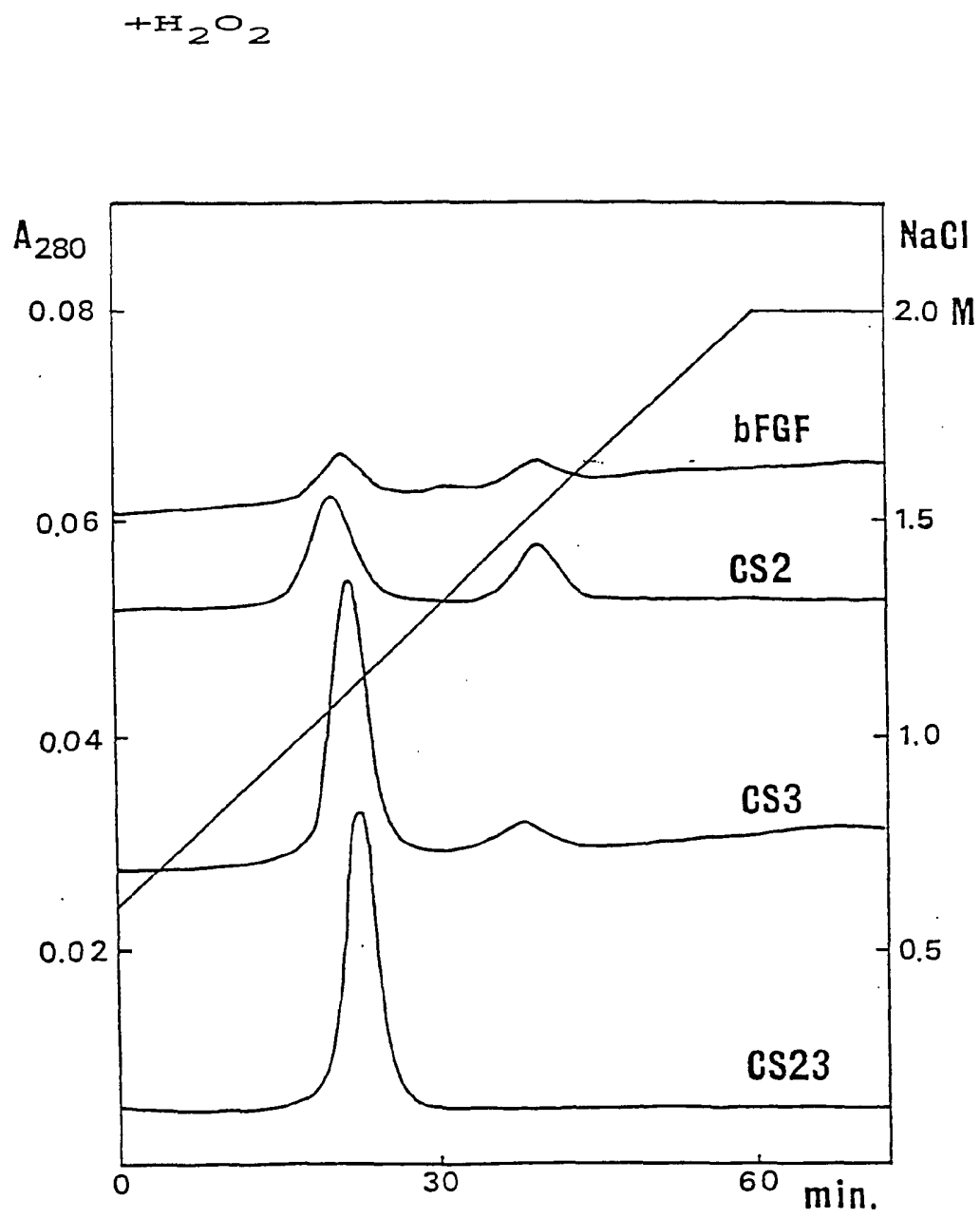
180305

Figure 35



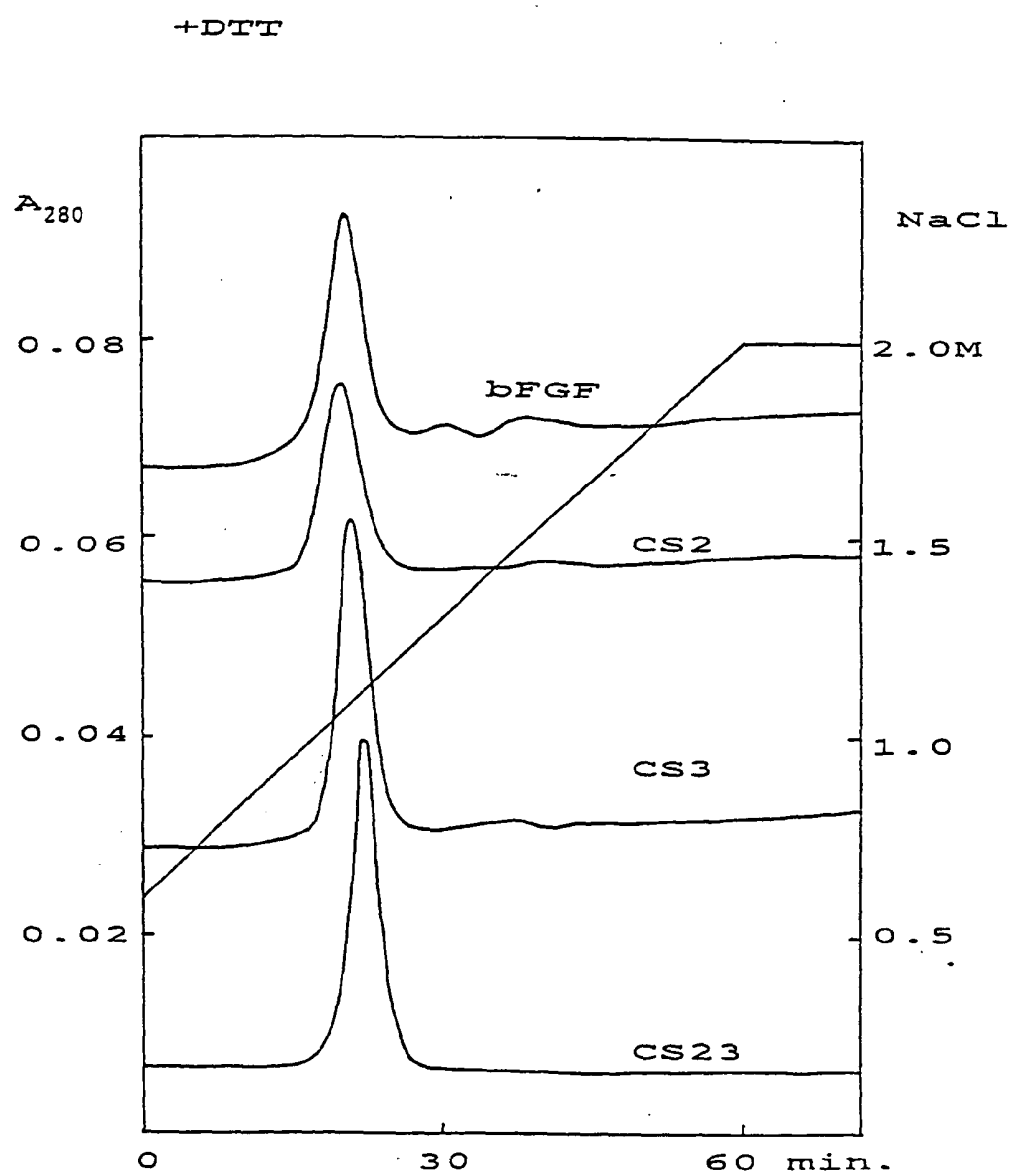
180305

Figure 36



180305

Figur 37



Figur 38

- (1) 5'-CGCCCATGGTGCCATCCTC-3'
Met Thr
NcoI
- (2) 5'-CGGGCATGAATTCGCCGCT-3'
Met
EcoRI
- (3) 5'-TAACACCTTAAGAAGCCAG-3'
trm
AflIII
- (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

MetProAlaLeuProGluAspGlyThrMetGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCAACCATGGGGCCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCCGTGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTCTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAGCTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

180305

Figure 40

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	7
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	27
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnAlaGluGlu	27
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	87
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	47
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	147
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	67
GGAAAGATTACTGGCTTCTATAATGTGTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAACGATTGGAA	207
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	87
TCTAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCGTTGGTATGTGGCAGTAAA	267
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	107
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCGCAGAAAGCTATACTTT	327
LeuProMetSerAlaLysSertrn	127
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	387
	134
	411

180305

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGAGCGGCGCTTCCCGCCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCTCGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSer ^{trm}	86
GGAAGATTACTGGCTTCTTAA	300
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAATAACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAA	360
CGAACTGGGCAGTATAA	420
CTTCCAATGCTGCTAAGAGCTGA	444

180305

Figur 42

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGAGCGGCGCTTCCCGCCGCTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCTGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAsnGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTAACGGAGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCCAATGTCGTAGAGCTGA	444

180305

Figur. 43

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGAGCGGCCCTTCCCGCCGCTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGTCAAAACGCGGGCTTCTTCCGTGCGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValGlnGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTGACGGAGTCCAGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACACTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACACAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATATAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSert ^{rm}	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

180305

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGACAGCGGCCCTTCCCGCCGCTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCCGTGGCATCCACCCCGACGGCCGA	120
ValArgGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu	60
GTTAGAGGAGTCCGGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAAAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

180305

180305

Figur 45

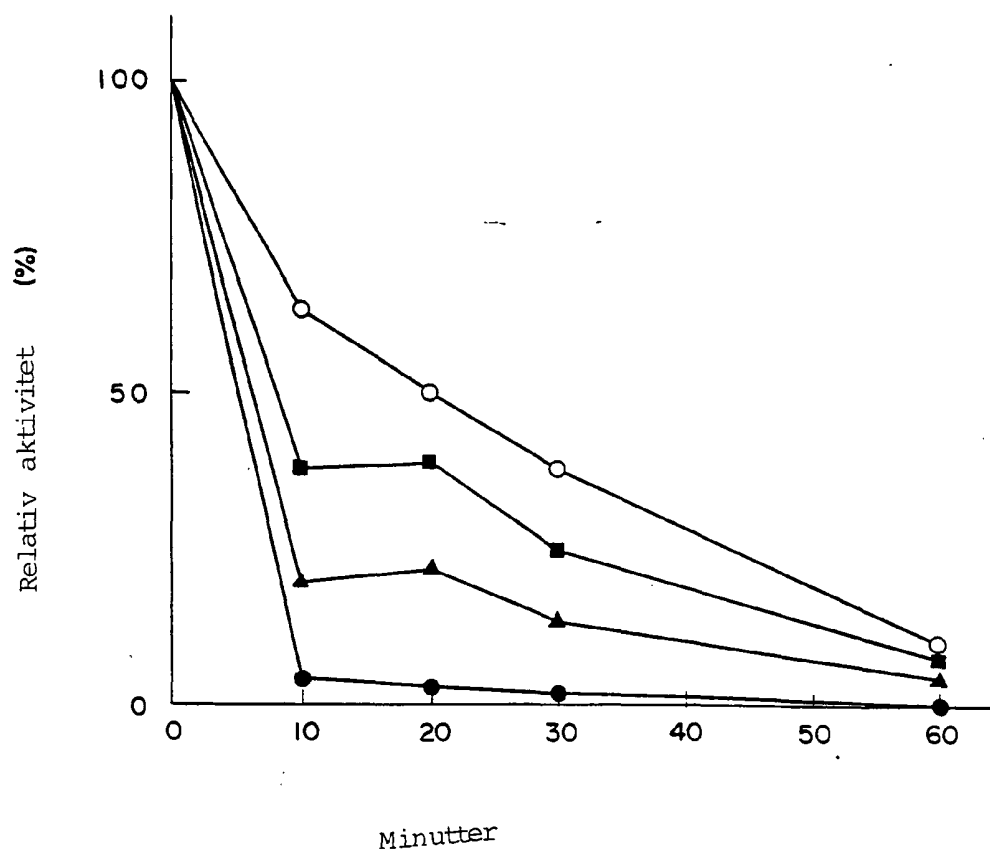
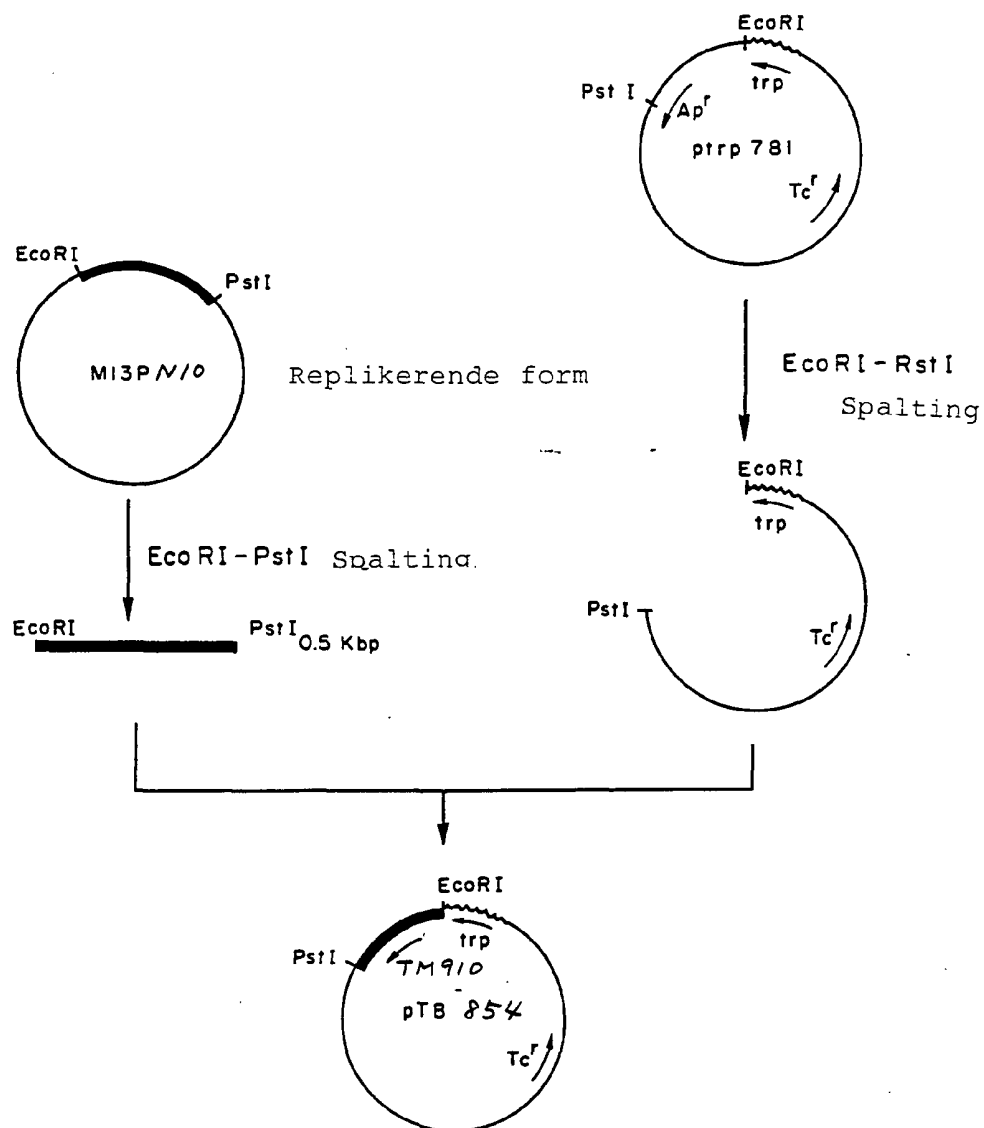
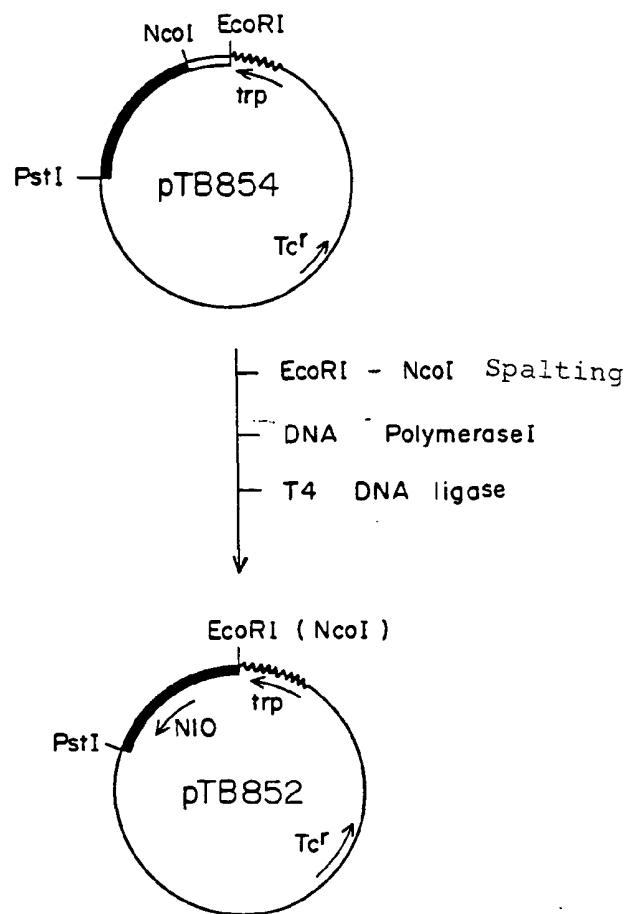


Figure 46



180305

Figur 47



Met Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp
G A A T T C A T G G G C G C C T T C C C G C C C G C C A C T T C A A G G A C

Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg
C C C A A G C G G C T G T A C T G C A A A A C G G G C T T C T C T G C G C A T C C A C C C G A C G G C C G A

Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Glu Ile Ala Glu Glu
G T T G A C G G G T C C G G A G A G A G C C C T C A C A T C A G C T A C A C T T C A A G C A G A A G A G

Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp
A G A G A G T T G T G T C T A T C A A A G G A G T G T G T A C C G T T A C C T G G C T A T G A A G G A A G A T

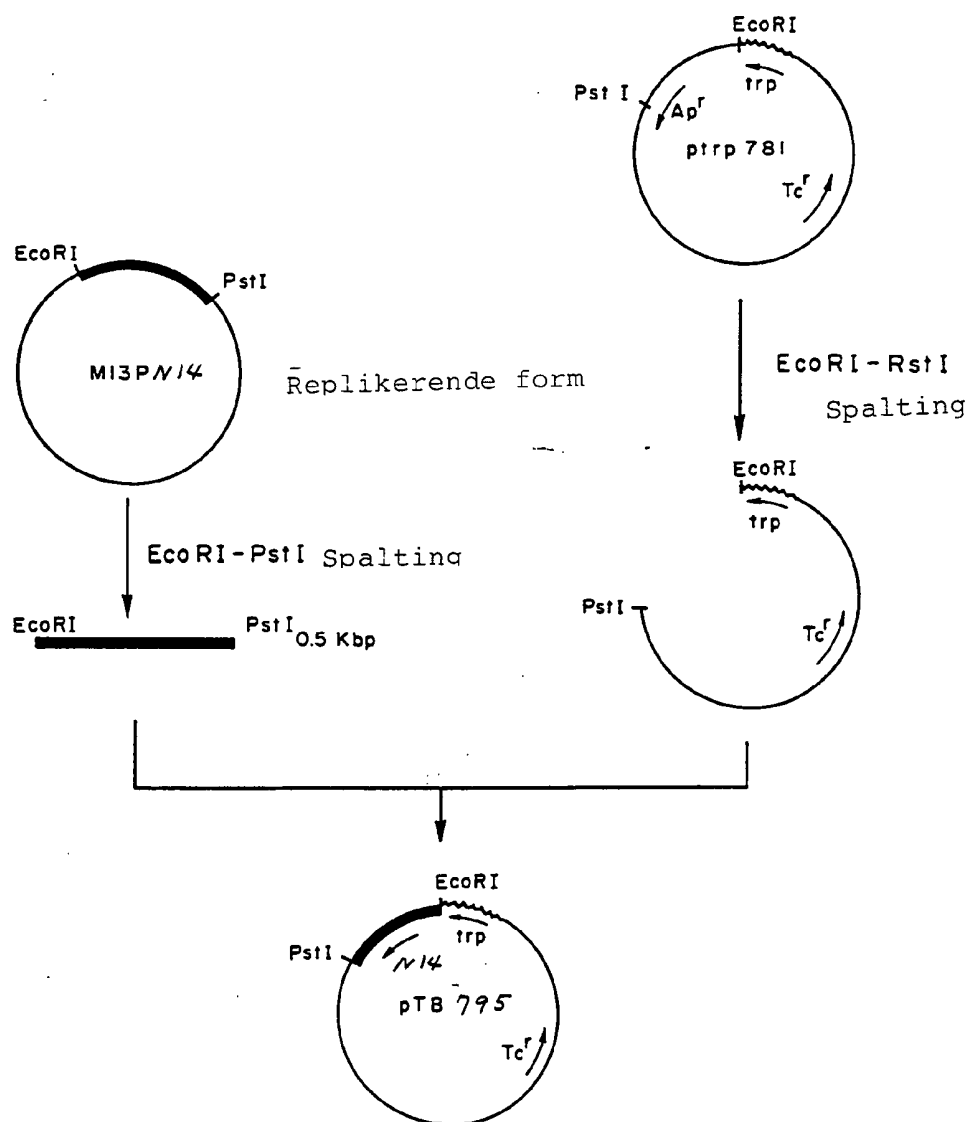
Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Glu Arg Leu Glu
G G A A G A T T A C T G G C T T C T A A A T G T G T T A C G G A T G A G T G T T C T T T T T G A A C G A T T G G A A

Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys
T C T A A T A A C T A C A A T A C T T A C C G G T C A A G G A A A T A C A C C A G T T G G T A T G T G C A C T G A A A

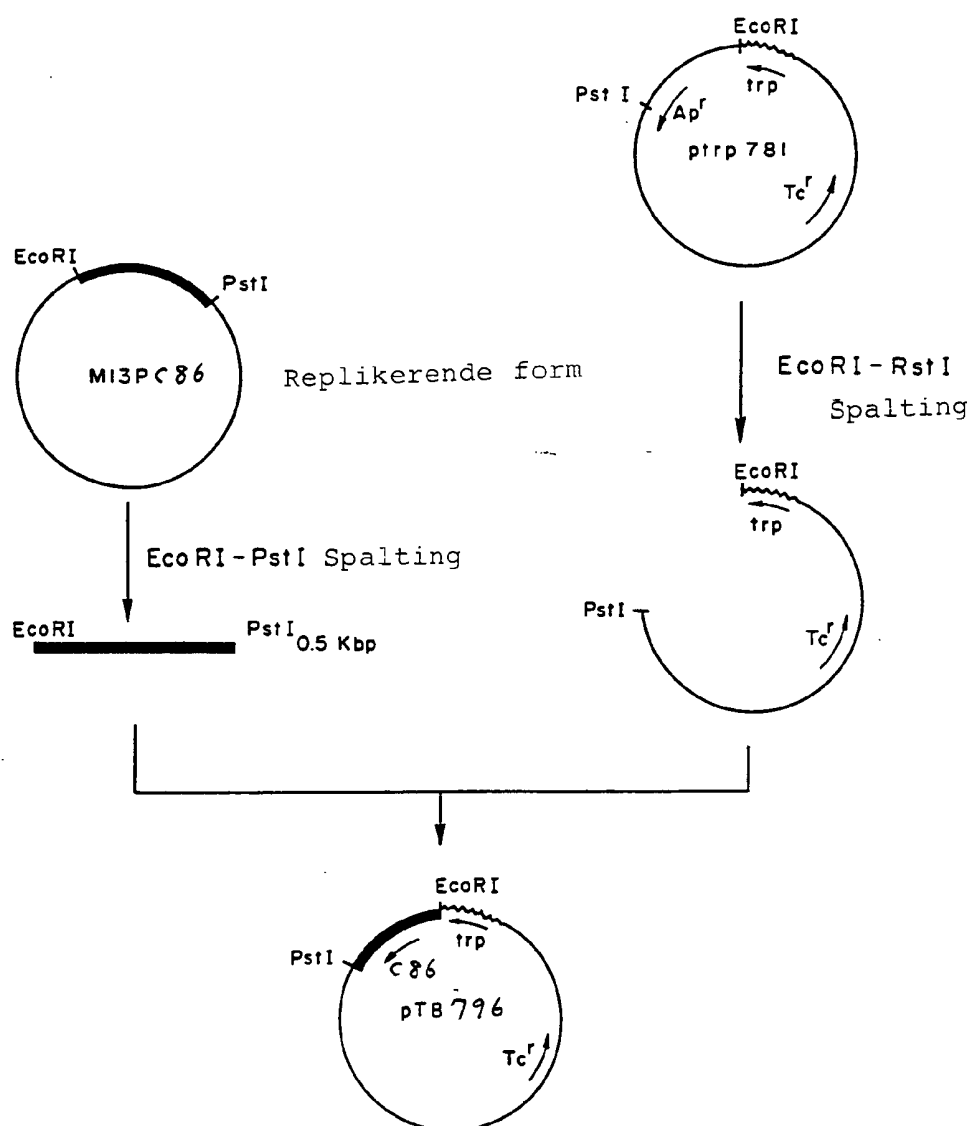
Arg Thr Gly Glu Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Glu Lys Ala Ile Leu Phe
C G A A C T G G C A G T A A A C T T G G A T C C A A A C A G A C C T G G C A G A A G C T A T A C T T T T T

Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser trm
C T T C C A A T G T C T G C T A A G A G C T G A

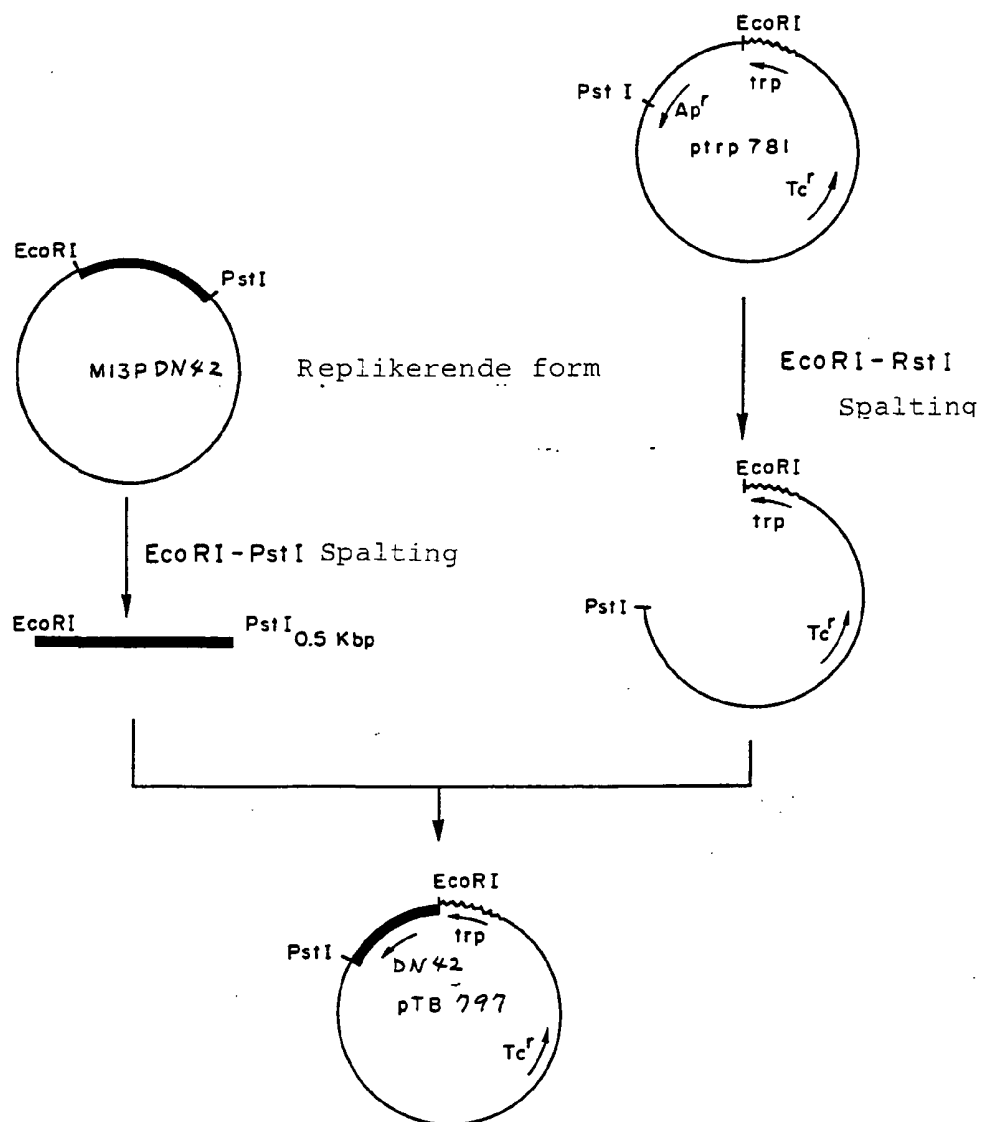
Figur 49



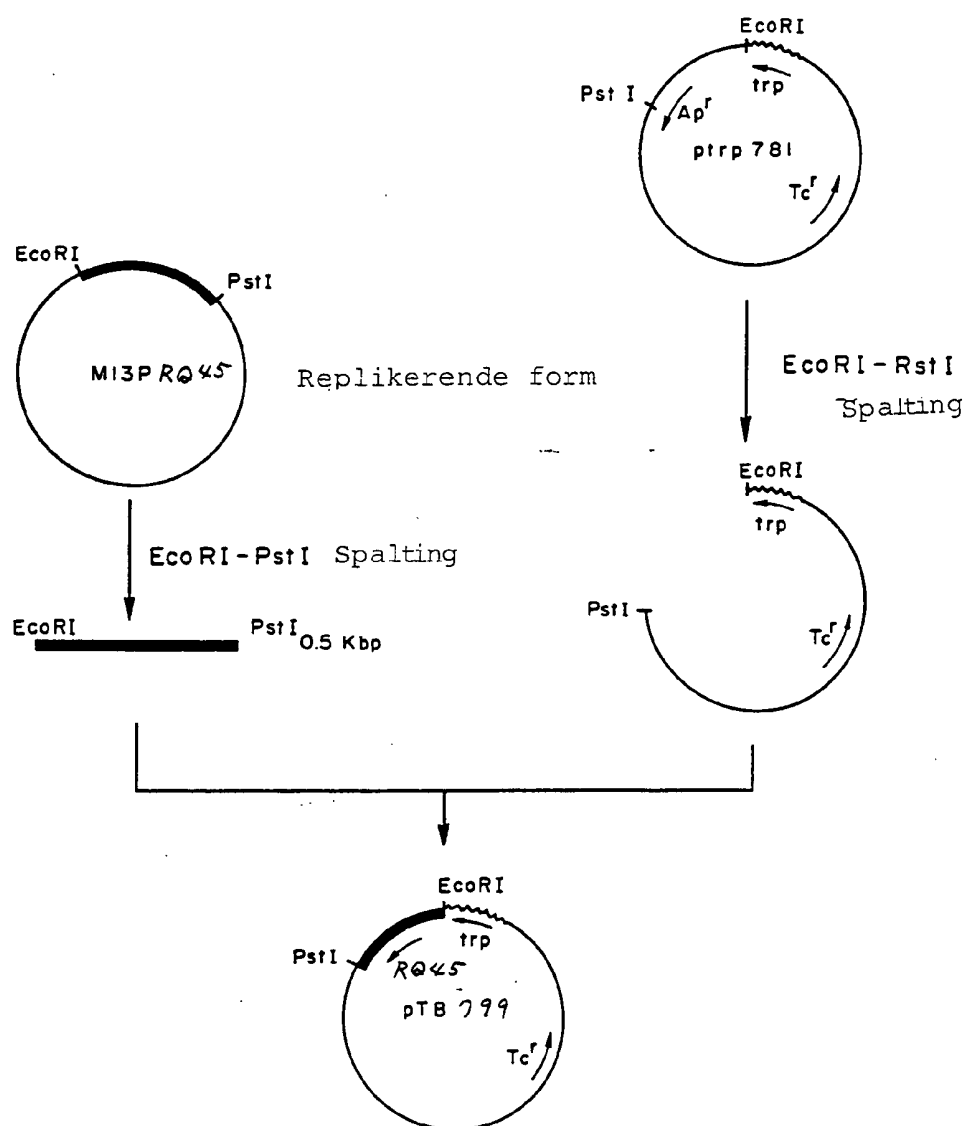
Figur 50



Figur 51



Figur 52



Figur 53

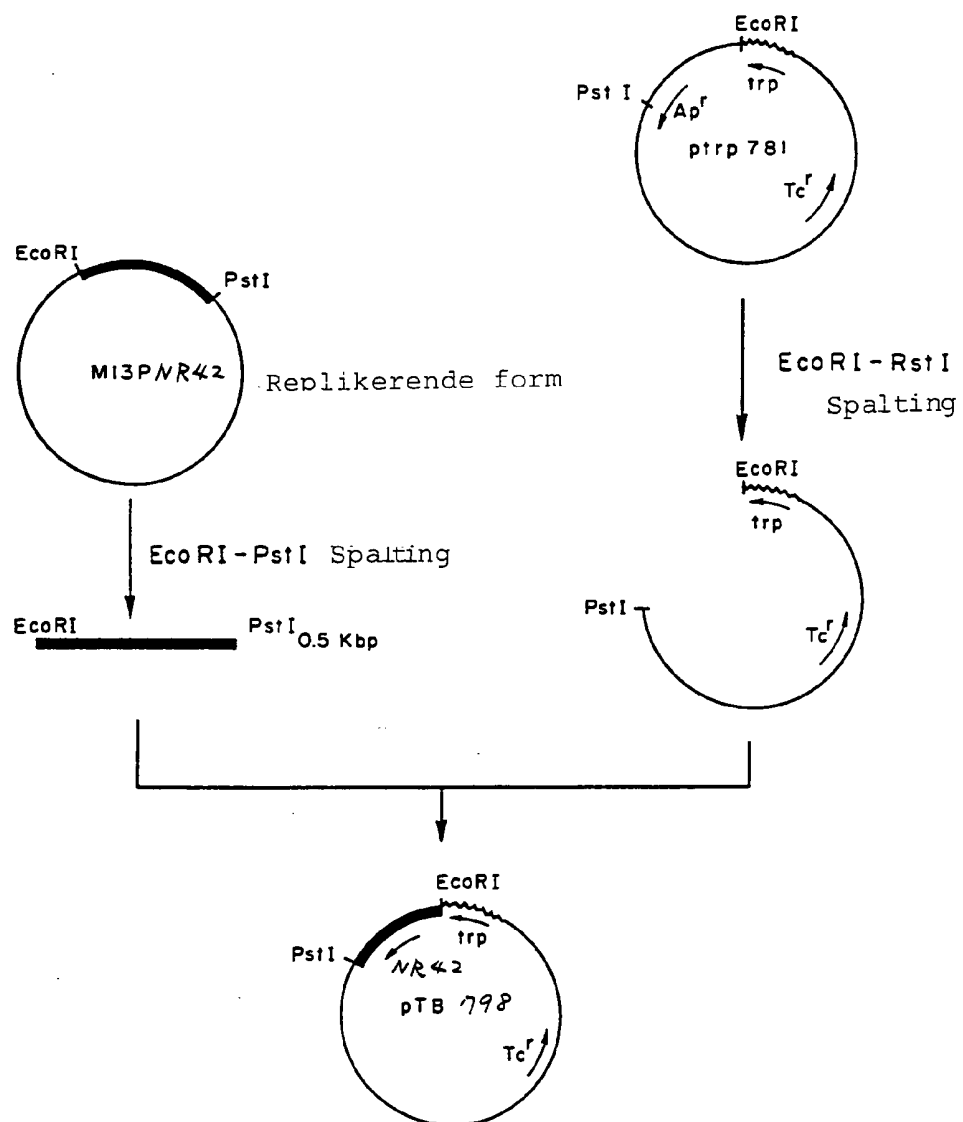


Figure 54

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGCTTCTTCCTGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAsnGlySerLeuGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTAACGGATCCCTGGAGAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTCTTTTGTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCCAGTTGGTATGTGGCAGTAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe	140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT	420
LeuProMetSerAlaLysSertrm	147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA	444

180305

Figur 55

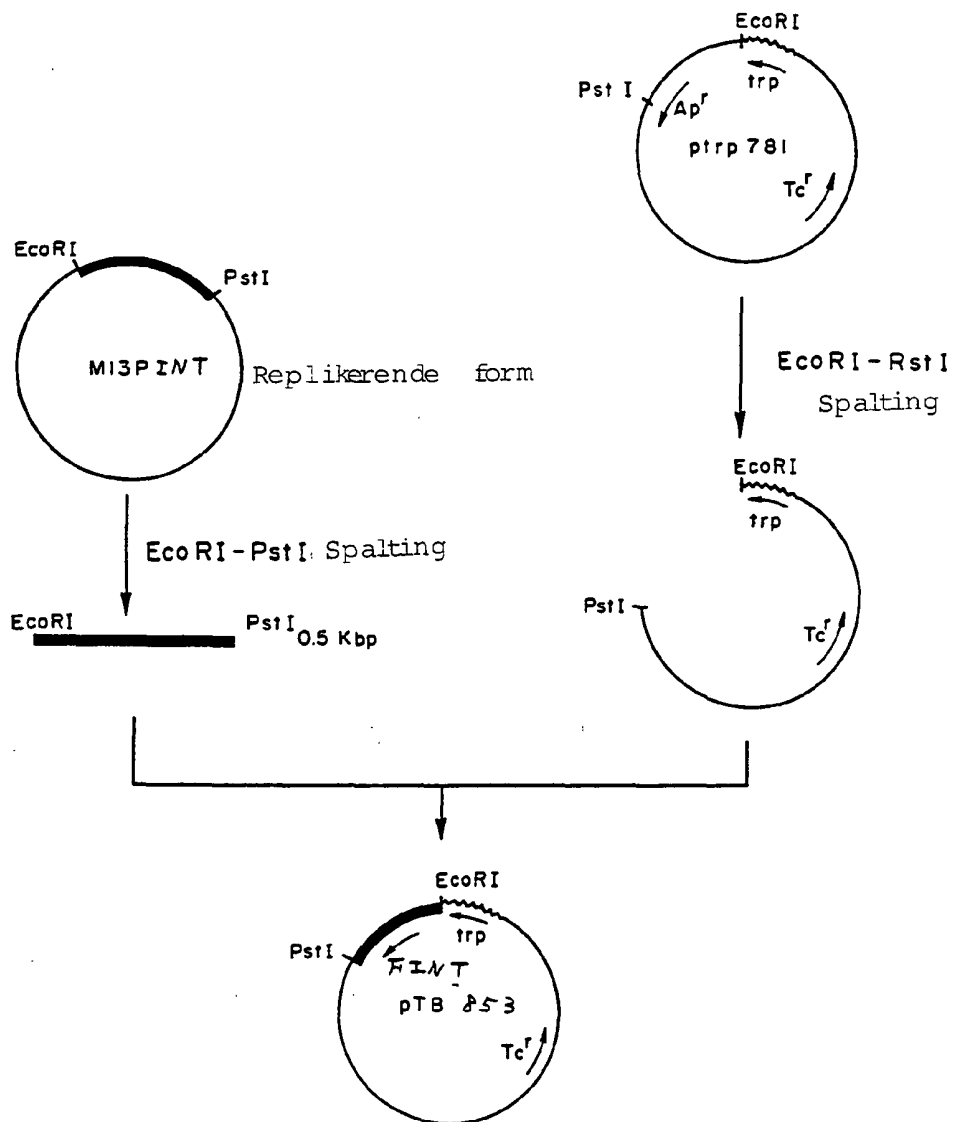
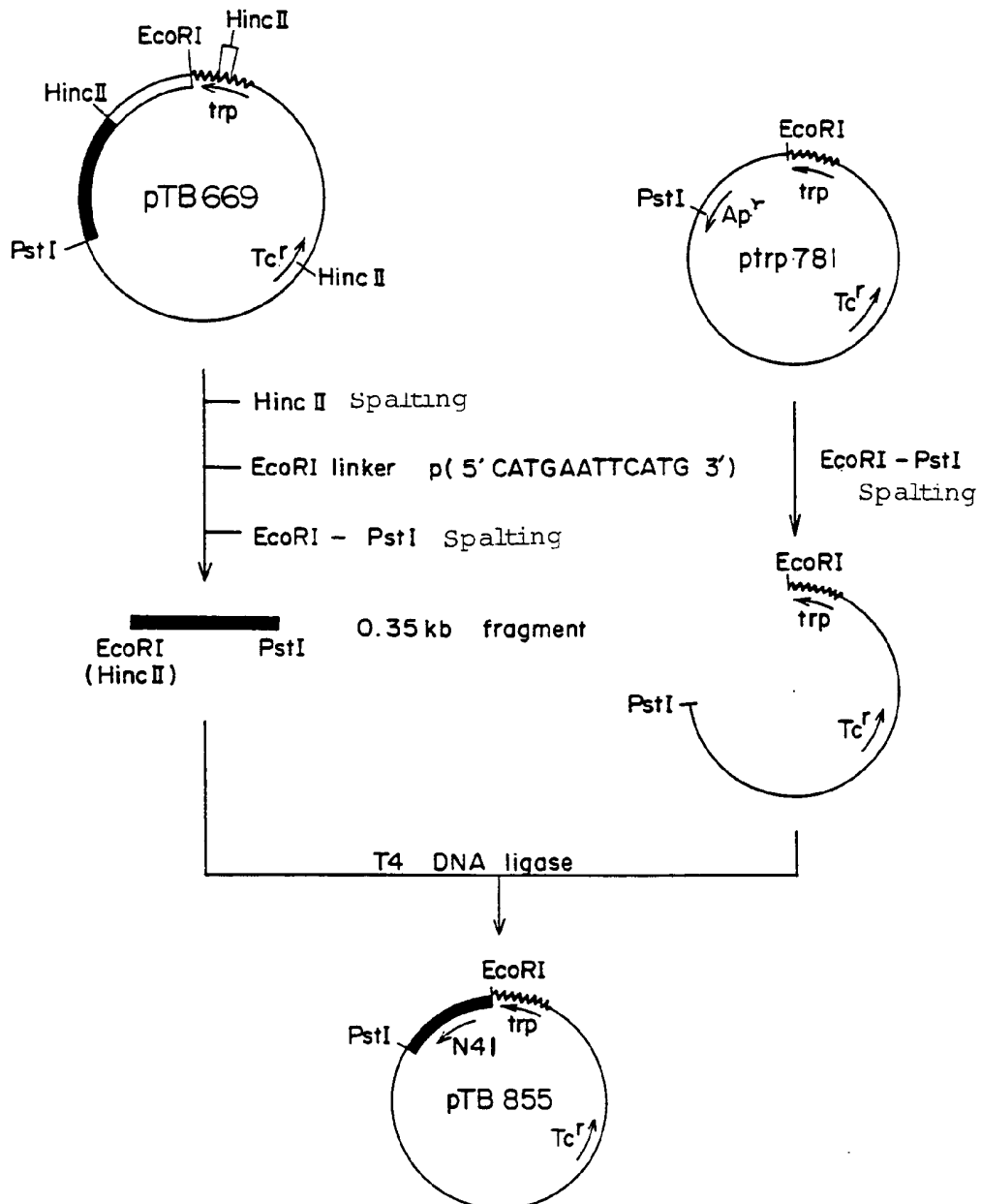


Figure 56



GAA TTC

Met AspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu
ATGACGGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAGAG

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCTTTTGTGAACGATTGGAA

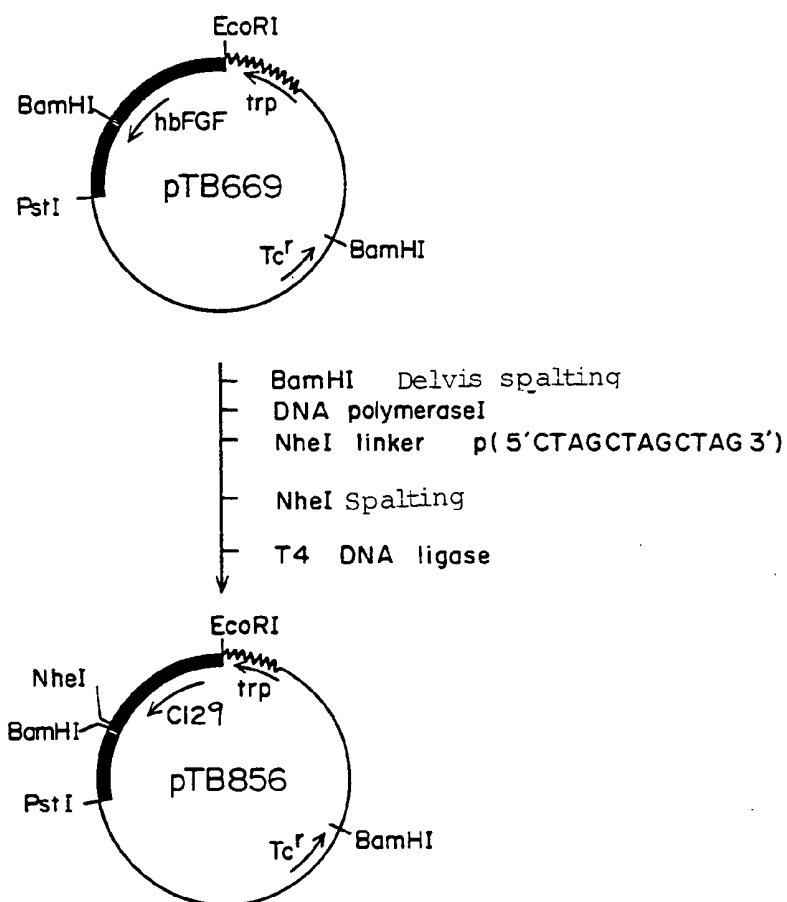
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT

LeuProMetSerAlaLysSertrm
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA

180305

Figure 58



Figur: 59

MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp	20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCCCTTCCCGCCGCCACTTCAAGGAC	60
ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg	40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCCTGGGCATCCACCCGACGGCCGA	120
ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuAlaGluGlu	60
GTTGACGGGTCCGGGAGAGAGCGACCTCACATCAAGCTACAACCTTCAAGCAGAGAG	180
ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp	80
AGAGGAGTTGTGCTATCAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT	240
GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeuGlu	100
GGAAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTGTACGGATGAGTGTTCTTTTGAACGATTGGAA	300
SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys	120
TCTAATACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA	360
ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySer ^{trm}	129
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCC	390

180305

Figure 60

