

(11) Numéro du brevet d'invention: **87 970**

(12)

BREVET D'INVENTION(45) Date de délivrance du brevet d'invention: **16.12.1991**(51) Int. Cl.: **A61K 37/36, C12P 21/02, C12N 15/06, 15/18**(22) Date de dépôt: **04.07.1991**(86) Date et numéro de dépôt international: **05.01.1990 PCT/US90/00022**(87) Date et numéro de publication internationale: **12.07.1990 WO90/07341**

(54) **Aufgereinigter ziliärer neurotropher Faktor.**

(30) Priorité: **05.01.1989 US 393,851**
08.09.1989 US 404,533
28.12.1989 US 458,564(73) Titulaire: **SYNERGEN, INC.**
1885 33rd Street
Boulder, CO 80301 (US)(72) Inventeur: **Collins, Franklin D.**
582 Locust Place
Boulder, CO 80303 (US)**Lin, Leu-Fen**
1014 Adams Circle, 14
Boulder, CO 80303 (US)**Mismer, Drzislav**
76 Benthaven
Boulder, CO 80303 (US)**Ko, Christine**
3880 Caddo Parkway
Boulder, CO 80303 (US)(74) Mandataire: **Freylinger, Ernest T.**
Meyers, Ernest
c/o Office de Brevets Freylinger & Associés
321, route d'Arlon
Boîte Postale 1
L-8001 Strassen (LU)*A61K*
C12P
C12N

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du modèle de titre~~

En U.S.A.

Du 05.01.1989 - 08.09.1989 - 28.12.1989

Nos 393,851 - 404,533 - 458,564

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de :

SYNERGEN, INC.
1885 33rd Street
BOULDER, CO 80301/ USA

pour : "AUFGEREINIGTER ZILIÄRER NEUROTROPHER FAKTOR"

sur base de: la demande internationale
PCT/US90/00022 du 05.01.1990
(No de publication WO 90/07341
du 12.07.1990)

AUFGEREINIGTER ZILIÄRER NEUROTROPHER FAKTOR

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft neurotrophe Faktoren und insbesondere den ziliären neurotrophen Faktor (CNTF) und ebenso Methoden zur Aufreinigung von CNTF und zur Herstellung von rekombinantem CNTF.

Schwere geistige und körperliche Behinderungen sind eine Folge des Absterbens von Nerven- oder Gliazellen im Nervensystem. Das Absterben von Nerven- oder Gliazellen kann durch die Nerven betreffende Degenerationskrankheiten wie Alzheimer' und Parkinson' Krankheit und multiple Sklerose, durch Ischämie infolge eines Schlaganfalls, durch eine traumatische Verletzung oder durch den natürlichen Alterungsprozeß hervorgerufen werden.

Neurotrophe Faktoren sind eine Molekülklasse, die das Überleben und die funktionale Aktivität von Nerven- oder Gliazellen fördern. Es gibt experimentelle Hinweise, daß neurotrophe Faktoren für die Behandlung zur Verhinderung des Absterbens von Nerven- oder Gliazellen oder Funktionsstörungen infolge der oben aufgelisteten Zustände von Nutzen sein werden. Appel, 1981, Ann. Neurology 10:499.

Der am besten charakterisierte solcher neurotropher Faktoren ist der Nerve Growth Factor (NGF). Es wurde gezeigt, daß NGF ein neurotropher Faktor für die cholinergischen Nervenzellen des Vorderhirns ist, die im Lauf von Alzheimer' Krankheit und mit zunehmendem Alter absterben. Der Verlust dieser Nervenzellen wird im allgemeinen als Ursache vieler Wahrnehmungsstörungen in Verbindung mit Alzheimer' Krankheit und mit hohem Alter angesehen.

Tierversuche zeigen, daß NGF das Absterben von cholinergischen Nervenzellen im Vorderhirn nach einer traumatischen Verletzung verhindert und daß NGF Wahrnehmungsverluste, die mit dem Alter auftreten, rückgängig machen kann. Hefti und Weiner, 1986, Ann. Neurology 20:275; Fischer et al., 1987, Nature, 329:65. Diese Ergebnisse lassen einen potentiellen klinischen Nutzen

dieser neurotrophen Faktoren beim Menschen vermuten, und zwar bei der Behandlung von Wahrnehmungsverlusten infolge des Absterbens von cholinergischen Nervenzellen des Vorderhirns durch Krankheit, Verletzung oder Alter.

5 Die Verwendung von neurotrophen Faktoren wird durch ihre Spezifität für nur solche Subpopulation von Nervenzellen verkompliziert, die die richtigen Membranrezeptoren besitzen. Die meisten Nervenzellen im Körper besitzen keine NGF-Rezeptoren und reagieren
10 anscheinend nicht auf diesen neurotrophen Faktor. Es ist daher von außerordentlicher Bedeutung, neue neurotrophe Faktoren zu entdecken, die das Überleben von anderen Arten von Nerven- oder Gliazellen unterstützen als NGF.

Es wurde nach neuen neurotrophen Faktoren bezüglich
15 ihrer Fähigkeit, das Überleben von Nervenzellen, die nicht auf NGF reagieren, in Kultur zu unterstützen, gesucht. Ein weit verbreiteter Test zum Durchmustern von Proben ist darauf ausgerichtet, Faktoren zu entdecken, die das Überleben von motorischen Neuronen des
20 Ziliarganglions fördern, die die Skelett- oder glatte Muskulatur innervieren. Diese Nervenzellen des Ziliarganglions gehören zum parasympatischen Nervensystem und ihr Überleben wird nicht durch NGF unterstützt.

Das Vorhandensein von Faktoren, die das Überleben
25 von Nervenzellen des Ziliarganglions fördern, sind bezüglich einer Vielzahl von Geweben und Spezies berichtet worden. Viele dieser neurotrophen Aktivitäten bezüglich des Ziliarganglions besitzen die folgenden ähnlichen chemischen und biologischen Eigenschaften: (1)
30 die Aktivität ist in einer hohen Konzentration in Ischiasnerven vorhanden; (2) neurotrophe Aktivität überlebt, dem ionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) und den Reduktionsmitteln beta-Merkaptoethanol (BME) oder Dithiothreitol (DTT) während einer Elektrophorese auf
35 reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen ausgesetzt zu werden; und (3) auf solchen Gelen wandert die Aktivität mit einem apparenten Molekulargewicht zwischen 24 - 28 kD. Collins, 1985, Developmental Biology, 109:255-258; Manthorpe et al., 1986, Brain Research, 367:282-286.

Aufgrund dieser ähnlichen Eigenschaften hat man vorgeschlagen, daß die gleichen oder nahe verwandte Moleküle, die typischerweise als "ziliäre neurotrophe Faktoren" oder "CNTF" bezeichnet werden, für die neuro-

5 trophen Aktivitäten bezüglich des Ziliarganglions verantwortlich sind. Die Bezeichnung CNTF ist also eine Arbeitsdefinition und bezieht sich auf Agenzien mit den obigen Eigenschaften, die das Überleben von Nervenzellen des Ziliarganglions in Kultur fördern. Da nicht genügend

10 Daten vorhanden sind, nachzuweisen, daß die Proteine, die für diese Aktivitäten verantwortlich sind, identisch sind, werden CNTF nach dem Gewebe bzw. der Art, aus der sie stammen, unterschieden. Handelt es sich bei der Art, aus der sie stammen, also um Kaninchen, so ist die

15 Nomenklatur Kaninchenischiasnerv (rabbit sciatic nerve)-CNTF (Kaninchen-SN-CNTF).

Die höchste Konzentration an Ischiasnerv-CNTF wird anscheinend in peripheren Nerven wie dem Ischiasnerv gefunden. Er wird nach einer Verletzung von Zellen im

20 Nerv abgegeben. SN-CNTF unterstützt das Überleben und das Wachstum von allen getesteten Nerven eines peripheren Nervensystems, einschließlich sensorischer, sympathischer und parasympatischer Nervenzellen. Das Spektrum der Zellen, die auf SN-CNTF reagieren war also größer als das

25 auf NGF. Es wurde vor kurzem gezeigt, daß Ratten-SN-CNTF die Bildung von spezifischen Arten von Gliazellen im Zentralnervensystem reguliert (Hughes et al., 1988, Nature 335:70).

Die vernünftigste, auf dem oben zitierten experimentellen Hinweis basierende Hypothese besteht darin, daß

30 Ischiasnerv-CNTF ein Teil der Antwort des Nervensystems auf Verletzungen ist. SN-CNTF, der von Zellen in einem geschädigten Nerv abgegeben wird, würde erwartungsgemäß das Überleben und das Nachwachsen von verletzten Nervenzellen fördern und die funktionelle Aktivierung von

35 Gliazellen regulieren, die zur Regeneration benötigt werden. Diese Überlegungen zeigen, daß SN-CNTF einen therapeutischen Wert für die Verringerung von Schäden am Nervensystem haben würde, die durch Krankheit oder

Verletzung hervorgerufen werden.

Trotz eines weitverbreiteten wissenschaftlichen Interesses am SN-CNTF haben die Schwierigkeit, eine wesentliche Menge aus natürlichen Quellen aufzureinigen, und die Tatsache, daß humaner SN-CNTF nicht zur Verfügung steht, Versuche zunichte gemacht, seinen Wert zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von Nervenzellen bei Krankheiten oder nach Verletzungen zu demonstrieren. Frühe Versuche, einen Ratten-SN-CNTF aufzureinigen, resultierten in einer 800-fachen Anreicherung gegenüber Nervenrohextrakt bezüglich der spezifischen Aktivität. Manthorpe et al., 1986, Brain Research 367:282-286.

Eine 800-fache Steigerung der spezifischen Aktivität reichte jedoch nicht aus, eine einzelne Proteinart herzustellen. Aus diesem Grund ist das nach der von Manthorpe et al. beschriebenen Methode erhaltene Produkt mit erhöhter Aktivität nicht ausreichend, da es eine Vielzahl von Proteinarten enthält. Es wäre wünschenswert, eine solche Aufreinigung von SN-CNTF zu erzielen, daß man eine einzelne Proteinart mit der entsprechenden biologischen Aktivität erhält. Sobald man eine einzelne Proteinart erhalten hat, werden die erhaltenen Sequenzierdaten zuverlässiger sein. Eine "einzelne Proteinart", soweit dieser Begriff im folgenden in dieser Spezifikation und den zugehörigen Ansprüchen verwendet wird, bedeutet ein Polypeptid oder eine Reihe von Polypeptiden mit derselben Aminosäuresequenz über ihre Aktivitätszentren. In anderen Worten, wenn der wirksame Anteil der Aminosäuresequenz für zwei oder mehr Polypeptide derselbe ist, so handelt es sich um "eine einzelne Proteinart" so wie es hier definiert ist, obwohl eine geringe Heterogenität in bezug auf Länge oder Ladung vorhanden ist.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist eine verbesserte Methode zur Aufreinigung von SN-CNTF zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, einen in einem größeren Ausmaß als jemals zuvor aufgereinigten SN-CNTF zur Verfügung zu stellen, so daß man eine einzelne Proteinart erhält.

Noch ein weiteres Ziel dieser vorliegenden Erfindung ist es, Sonden bereitzustellen, die das Durchmustern von cDNA- und Genbanken erleichtern, um die tierischen bzw. humanen Gene, die für SN-CNTF kodieren, zu klonieren.

5 Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, die Nukleinsäure- und die entsprechenden Aminosäuresequenzen für tierischen und humanen CNTF zur Verfügung zu stellen.

10 Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, rekombinante Expressionssysteme bereitzustellen, in denen die Nukleinsäuresequenz für humanen oder tierischen CNTF verwendet werden kann, menschliches oder tierisches CNTF-Protein herzustellen.

15 Diese und andere Ziele werden dadurch erreicht, daß eine Methode zu einer solchen Aufreinigung von SN-CNTF zur Verfügung gestellt wird, daß die spezifische Aktivität vom Rohextrakt zum aufgereinigten SN-CNTF mehr als 25 000-fach erhöht wird. Der mehr als 25 000-fach aufgereinigte SN-CNTF wird auch zur Verfügung gestellt.

20 Gemäß anderen bevorzugten Eigenschaften von bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden SN-CNTF-Sonden zum Durchmustern von cDNA- und Genbibliotheken nach SN-CNTF zur Verfügung gestellt.

25 Gemäß anderen bevorzugten Eigenschaften von bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Kaninchen- und humane Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen für CNTF zur Verfügung gestellt.

30 Gemäß anderen bevorzugten Eigenschaften von bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein rekombinantes Expressionssystem zur Herstellung von biologisch aktivem tierischem oder humanem CNTF zur Verfügung gestellt.

35 Gemäß anderen vorteilhaften Eigenschaften bestimmter bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Aufreinigung von SN-CNTF zur Verfügung gestellt, das die folgenden Schritte beinhaltet: Säurebehandlung, Auftrennung mit Ammoniumsulfat, Chromatofocussing, Laufenlassen des Präparats auf SDS-PAGE-Gel und Reverse-Phase-HPLC.

Gemäß anderer bevorzugter Eigenschaften bestimmter bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden zusätzliche Aufreinigungsschritte zur Verfügung gestellt, in denen unmittelbar vor und nach dem Chromatofocussing hydrophobe Chromatographie benutzt wird.

Es sei darauf hingewiesen, daß sowohl die obige allgemeine Beschreibung als auch die folgende detaillierte Beschreibung beispielhaft sind und nur der Erklärung dienen und die Erfindung, wie beansprucht, nicht einschränken. Die beiliegenden Zeichnungen, die in die Spezifikation mit einbezogen werden und einen Teil dieser darstellen, erläutern verschiedene Ausführungsformen der Erfindung und dienen zusammen mit der Beschreibung dazu, die Grundlagen der Erfindung zu erklären.

Abbildung 1 stellt beispielhafte Ergebnisse der Chromatographie an einer Mono-P-Säule dar;

Abbildung 2 stellt einen beispielhaften Graphen der Verteilung der neurotrophen Aktivität im Eluat jedes der sieben Streifen dar, die nach der Elektrophorese aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten wurden;

Abbildung 3 stellt beispielhafte Ergebnisse einer Reverse-Phase-Chromatographie dar;

Abbildung 4 stellt beispielhafte Ergebnisse eines Laufs mit silbergefärbtem reduzierendem SDS-PAGE-Gel dar mit Fraktionen, die jenen, die dem in Abbildung 3 dargestellten Peak der neurotrophen Aktivität benachbart sind, entsprechen, einschließlich des Peaks;

Abbildung 5 stellt ein Profil von eluierten Peptiden nach Verdauung mit Endoprotease Asp-N dar,; und

Abbildung 6 stellt ein Profil von eluierten Peptiden nach Verdauung mit Endoprotease Lys-C dar.

Abbildung 7 stellt beispielhafte Ergebnisse einer Chromatographie einer Ammoniumsulfatfraktion auf einer Phenyl-Sepharose-HIC-Säule dar.

Abbildung 8 stellt beispielhafte Ergebnisse einer Chromatographie der mit Mono-P-Chromatofocussing aufgetrennten Fraktion auf einer Alkyl-Superose-FPLC-HIC-Säule dar.

Abbildung 9 stellt beispielhafte Ergebnisse einer

Chromatographie der präparativen SDS-PAGE-Fraktion auf einer C8 Reverse-Phase-HPLC-Säule dar. Feld (A) zeigt die Ergebnisse des ursprünglichen Aufreinigungsvorgangs. Feld (B) zeigt die Ergebnisse des gegenwärtigen Aufreinigungsvorgangs nach dem Hinzufügen der beiden HIC-Chromatographieschritte.

Abbildung 10 stellt beispielhafte Ergebnisse der SDS-PAGE und der Western Blotanalyse des Reverse-Phase aufgereinigten SN-CNTF. Bahn 1 in jedem der beiden Felder enthält Molekulargewichtsstandardproteine (SIGMA SDS-7). Bahn 2 enthält aufgereinigten SN-CNTF. Feld (A) zeigt die Ergebnisse der Silberfärbung. Feld (B) zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse mit affinitätsaufgereinigtem Anti-Peptid A-Antikörper.

Abbildung 11 stellt die für Kaninchen-SN-CNTF kodierende Nukleinsäuresequenz dar. Translation dieser Nukleinsäuresequenz ergibt die entsprechende Aminosäuresequenz, die darunter im einbuchstabigen Code abgedruckt ist. Unterstrichene Sequenzen wurden durch die vom SN-CNTF-Protein erhaltene Aminosäuresequenz bestätigt.

Abbildung 12 stellt die Nukleinsäure- und die entsprechende Aminosäuresequenz (dreibuchstabiger Code) für die kodierende Sequenz für humanen CNTF dar. Die Humansequenzen befinden sich zwischen den Linien. Dort, wo die Kaninchennukleinsäure- oder -aminosäuresequenzen von den humanen abweichen, sind diese oberhalb bzw. unterhalb der Linien aufgeführt.

Abbildung 13 stellt die Konstruktion des pCMVXVPL2 Expressionsvektors dar.

Abbildung 14 stellt die zur Konstruktion von CNTF-Syn1/3 zur Expression von CNTF benutzten Methoden dar. Die Zeichnung ist repräsentativ und nicht maßstabsgetreu. Details der Experimente siehe Beispiel 7.

Abbildung 15 stellt die zur Konstruktion von CNTF-Syn2/3 zur Expression von CNTF benutzten Methoden dar. Die Zeichnung ist repräsentativ und nicht maßstabsgetreu. Details der Experimente siehe Beispiel 7.

Abbildung 16 stellt die bei der Konstruktion von CNTF-Syn1/3 und CNTF-Syn2/3 benutzten synthetischen

Oligonukleotide 1 bis 4 dar.

Abbildung 17 stellt die bei der Konstruktion von CNTF-Syn2/3 benutzten synthetischen Oligonukleotide 5 bis 10 dar.

5 Abbildung 18 stellt bestimmte charakteristische Merkmale des bakteriellen Expressionsvektors pT5T dar, der ein zur Expression von CNTF geeignetes DNA-Insert enthält. Die Zeichnung ist repräsentativ und nicht maßstabsgetreu. Details der Experimente siehe Beispiel 7.

10 Abbildung 19 stellt bestimmte charakteristische Merkmale des bakteriellen Expressionsvektors pT3XI-2 dar, der ein zur Expression von CNTF geeignetes DNA-Insert enthält. Die Zeichnung ist repräsentativ und nicht maßstabsgetreu. Details der Experimente siehe Beispiel 7.

15 Abbildung 20 stellt ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel dar, in dem Extrakte von mit verschiedenen Expressionskonstrukten transformierten Zellen Elektrophorese unterzogen und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt wurden.

20 Abbildung 21 stellt ein reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel dar, in dem Extrakte von mit verschiedenen Expressionskonstrukten transformierten Zellen Elektrophorese und Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Anti-CNTF Peptid A-Antikörper unterzogen wurden.

25 Abbildung 22 stellt den Bioassay einer Verdünnungsreihe von Überständen von pT5T:CNTF-Syn1/3 oder pT3XI-2:CNTF-Syn2/3 exprimierenden bakteriellen Zellen dar. Das Nebenbild stellt den Bioassay der extrahierten ausgeschnittenen Stücke aus einem reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel des pT5T:CNTF-Syn1/3 Überstands im Bereich des Gels unmittelbar oberhalb und unterhalb 24 kD dar.

30 Es wird jetzt im Detail auf die gegenwärtigen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung Bezug genommen werden, die, zusammen mit den darauffolgenden Beispielen, dazu dienen, die Grundlagen der Erfindung zu erklären.

35 Wie oben erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung einen SN-CNTF, der mindestens 25 000-fach aus Rohextrakt aufgereinigt wird. Bei diesem SN-CNTF handelt es sich um

eine einzelne Proteinart im Sinne der hier gegebenen Definition. Als eine einzelne Proteinart kann die Aminosäuresequenz des SN-CNTF bestimmt werden und zur Konstruktion von DNA-Sonden zur Gewinnung von genomischen oder cDNA-Klonen zur Verwendung bei der rekombinanten Herstellung von SN-CNTF verwendet werden.

Die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteinart des SN-CNTF wurde teilweise bestimmt. Diese Sequenz lautet:

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

Zusätzlich wurde eine Aminosäuresequenz aus aufgereinigtem Kaninchen-SN-CNTF bestimmt, die im Beispiel 2 angegeben ist. Diese zusätzliche Sequenz erlaubt es, einen Teil der oben angegebenen Aminosäuresequenz innerhalb eines einzelnen großen Peptids zu lokalisieren (Beispiel 2). Diese Sequenz eines einzelnen Peptids wurde dazu verwendet, drei degenerierte Oligonukleotidsonden zu erzeugen (Nr. 1, 13 und 7 in Beispiel 4), die zum Priming der Polymerasekettenreaktion von großem Nutzen sind, da ihre Position für zueinander bekannt ist.

Die Kaninchen- und humanen CNTF kodierenden Nukleinsäuresequenzen (entsprechend mRNA) wurden bestimmt und sind in Abbildung 11 und 12 angegeben.

Ein rekombinantes System zur vorübergehenden Expression von biologisch aktivem CNTF wurde entwickelt und wird in Beispiel 5 beschrieben.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung eine verbesserte Methode zur Aufreinigung von SN-CNTF. Während sich die vorliegende Erfindung auf SN-CNTF aus jeglicher Quelle bezieht, wird sich die folgende Beschreibung dem aus Kaninchen isolierten zuwenden.

Kurz gefaßt beinhaltet eine bevorzugte Ausbildungsform der vorliegenden Methode die Verarbeitung des Materials, Kaninchenischiasnerv, zu Pulver. Der Rohextrakt wird dann zentrifugiert. Der Überstand wird angesäuert und der resultierende Niederschlag wird abzentrifugiert. Der Überstand wird dann mit NaOH titriert und

der resultierende Niederschlag wird wiederum abzentrifugiert.

5 Nach den pH-Fällungen wird gesättigte Ammoniumsulfatlösung zum Überstand gegeben und der Niederschlag wird abzentrifugiert. Die weitere Zugabe von Ammoniumsulfat zum Überstand ergibt einen Niederschlag einer Proteinfraction, die den größten Teil der SN-CNTF-Aktivität enthält.

10 Das obige Präparat wird dann auf eine Mono-P-FPLC-Säule zum Chromatofocussing aufgetragen. Die Säulenfraktionen werden dann gesammelt und auf pH und CNTF-Aktivität untersucht. Die in Abbildung 1 mit einem Balken aufgezeigten Fraktionen mit der größten SN-CNTF-Aktivität werden, wie unten genauer beschrieben, weiterbehandelt.

15 Die focussierten Fraktionen aus mehrfachen Läufen über die Mono-P-Säule werden waagerechter Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel unterzogen und ein Molekulargewichten zwischen 22 und 27 kD entsprechender Bereich des Gels wird über die Breite des Gels in mehrere Streifen geschnitten. Die einzelnen Streifen werden in kleinere Stücke zerschnitten und die Proteine werden elektrophoretisch eluiert. Die eluierten Proteine werden gesammelt und die Fraktion mit der höchsten Aktivität wird unter Verwendung von Reverse-Phase-HPLC weiter aufgereinigt. Dieses Verfahren wird in den Beispielen unten
20
25 genauer beschrieben.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung zusätzliche Schritte, die in den oben angegebenen Aufreinigungsvorgang eingeschoben werden können und eine bequeme
30 Aufarbeitung von mehr Ausgangsmaterials erlauben. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser zusätzlichen Schritte wird hydrophobe Chromatographie auf Phenyl-Sepharose zwischen Ammoniumsulfattrennung und Chromatofocussing eingeschoben, und hydrophobe Chromatographie auf einer FPLC-Alkyl-Superosesäule zwischen Chromatofocussing und präparativer SDS-PAGE (Beispiel 1).
35

Die von der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellte Methode resultiert in SN-CNTF in einer aufgereinigten Form mit einem mehr als 25 000-fachen Anstieg

der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Rohextrakt. Weiterhin handelt es sich bei dem hergestellten Endprodukt um eine einzelne Proteinart. Dies stellt einen mehr als 30-fachen Anstieg gegenüber dem SN-CNTF dar, der
5 mehrere Proteinarten enthält und von dessen Aufreinigung bei Manthorpe et al., wie oben beschrieben, berichtet wird. Da SN-CNTF auf Reverse-Phase-HPLC hin teilweise desaktiviert wird, stellt die Berechnung bei einer mindestens 25 000-fachen Aufreinigung gemäß der vorlie-
10 genden Erfindung eine Minimalaufreinigung dar und die tatsächliche Aufreinigung kann sogar 100 000-fach oder größer sein. Diese gesteigerte Aufreinigung wird die Bestimmung der Aminosäuresequenz von SN-CNTF erleichtern. Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde bereits genügend
15 Aminosäuresequenz erhalten, um Oligonukleotidsonden zu erzeugen, die das Durchmustern von cDNA- und genomischen Bibliotheken erleichtern werden, um die für SN-CNTF kodierenden tierischen bzw. humanen Gene zu klonieren.

Die von der vorliegenden Erfindung zur Verfügung
20 gestellten Methoden resultierten in der Bestimmung der kodierenden Sequenz (entspricht mRNA) für Kaninchen- und humanem CNTF.

Wie unten genauer erläutert werden wird, werden diese Gene ihrerseits die Herstellung von (1) tierischem
25 SN-CNTF, der für Untersuchungen von seiner Fähigkeit zur Behandlung von Tiermodellen von Nervenschäden geeignet ist, und (2) humanem SN-CNTF, der geeignet ist, in pharmazeutischen Formulierungen mitverwendet zu werden, die bei der Behandlung von Schäden am humanen Nerven-
30 system von Nutzen sind, in großem Maßstab möglich machen.

Die von der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellten Methoden resultierten in der Herstellung von biologisch aktivem tierischen CNTF in einem rekombinanten Expressionssystem.

35 Mit diesen aufgereinigten Proteinen kann die Aminosäuresequenz der hervorstehenden Peptide bestimmt werden. Die Proteine werden zunächst mit Endoprotease Asp-N, Endoprotease Lys-C, Endoprotease Glu-C oder Chymotrypsin behandelt. Nach dem Verdau kann die Aminosäuresequenz der

hervorstehenden Peptide mit einem Gasphaseproteinsequenator von Applied Biosystems bestimmt werden.

Antikörper, die mit aufgereinigtem SN-CNTF reagieren, können zum Durchmustern von Expressionsbibliotheken verwendet werden, um das für SN-CNTF kodierende Gen zu erhalten. Man kann unter Verwendung eines automatischen Proteinsynthetisators von Applied Biosystems synthetische Peptide synthetisieren, die Bereichen der Sequenz von SN-CNTF entsprechen. Solche Peptide können zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Antikörper gegen synthetische Peptide wurden hergestellt und es wurde mit Western Blot-Analyse gezeigt, daß sie mit aufgereinigtem CNTF reagieren (Abbildung 10).

Ein Ziel der obigen Arbeit ist es letztlich, das humane SN-CNTF-Gen zu klonieren und zu exprimieren, um zur Verwendung in pharmazeutischen Zubereitungen für den Menschen geeignetes Material herzustellen. Ist die Sequenz des Gens einmal bekannt, können für SN-CNTF kodierende Gene in tierischen oder bakteriellen Zellen exprimiert werden. Die für CNTF kodierenden Kaninchen- und humanen Gensequenzen wurden bestimmt. Ein System für vorübergehende Expression zur Herstellung von biologisch aktivem CNTF wurde entwickelt.

Eine Methode mit rekombinanter DNA zur Herstellung von CNTF wird nun offenbart. In einer Ausführungsform der Erfindung fungiert das aktive Zentrum in einer Weise, die biologisch der des nativen aus dem Menschen isolierten CNTF entspricht. Eine natürliche oder synthetische DNA-Sequenz kann verwendet werden, um die Herstellung des CNTF zu veranlassen. Diese Methode umfaßt

- (a) die Herstellung einer DNA-Sequenz, die eine Wirtszelle dazu veranlassen kann, ein Protein mit CNTF-Aktivität herzustellen;
- (b) die Klonierung der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine Wirtszelle übertragen und dort repliziert werden kann, wobei ein solcher Vektor funktionelle Elemente enthält, die für die Expression der DNA-Sequenz benötigt werden;
- (c) die Übertragung der synthetischen DNA-Sequenz

und funktionelle Elemente enthaltenden Vektors in eine Wirtszelle, die die für CNTF kodierende DNA exprimieren kann;

5 (d) die Kultur der Wirtszellen unter zur Amplifikation des Vektors und Expression von CNTF geeigneten Bedingungen;

(e) das Ernten des CNTF; und

10 (f) ein Schritt, indem man CNTF erlaubt, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er CNTF-Aktivität besitzt.

In einer Ausführungsform kann eine teilweise oder vollständig synthetische DNA-Sequenz, die zur Herstellung von rekombinantem CNTF verwendet wird, andere Nukleotide als die native DNA-Sequenz enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die DNA-Sequenz mit anderen
15 Nukleotiden immer noch für ein Polypeptid mit derselben Primärstruktur wie von tierischen bzw. humanen CNTF-Genen kodierter CNTF. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform kodiert die DNA-Sequenz mit anderen Nukleotiden
20 für ein Polypeptid mit einer Primärstruktur, das natürlichem CNTF nahesteht, und das mindestens eine der hier beschriebenen biologischen Aktivitäten von dem CNTF besitzt.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die native für CNTF kodierende DNA-Sequenz modifiziert, um die Expression in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle zu fördern. Solche Modifikationen können das folgende beinhalten:

30 (a) Falls es sich bei der nativen DNA um genomische DNA handelt, können intervenierende, nicht kodierende Sequenzen (Introns) entfernt werden, wenn eine Expression in Mikroorganismen in Betracht gezogen wird.

35 (b) Eine Veränderung der Nukleinsäuresequenz, um Sequenzen einzuschließen, die von verschiedenen Restriktionsenzymen erkannt werden, um die nachfolgenden Schritte (Ligation, Klonierung und Mutagenese) zu erleichtern.

(c) Eine Veränderung der Nukleinsäuresequenz, um

Codons zu schaffen, die vom Wirtsorganismus bzw. der Wirtszelle, der/die zur Herstellung des rekombinanten Proteins verwendet wird, bevorzugt werden.

5 (d) Eine Verbindung der Nukleinsäuresequenzen mit funktionellen Elementen, die zur Erhaltung und Expression der DNA in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle benötigt werden.

10 In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die zu exprimierende DNA-Sequenz wie oben beschrieben hergestellt und in einen Expressionsvektor eingefügt, der sich in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle einsetzt und die Expression von CNTF auslösen kann. Solche Vektoren besitzen bestimmte bevorzugte charakteristische Merkmale, die der Expression in einem
15 bestimmten Wirtsorganismus oder einer bestimmten Wirtszelle angepaßt sind:

(a) Mikroorganismen, insbesondere E. coli

Die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogenen Vektoren umfassen alle Vektoren, in
20 die eine DNA-Sequenz zusammen mit jeglichen bevorzugten oder erforderlichen funktionellen Elementen, wie oben erläutert, eingefügt werden kann und der Vektor dann anschließend in eine Wirtszelle übertragen und in einer solchen Zelle repliziert werden kann. Vektoren, deren
25 Restriktionsstellen gut dokumentiert sind und die die zur Transkription der DNA-Sequenz bevorzugten oder erforderlichen funktionellen Elemente enthalten, sind bevorzugt. Es werden jedoch auch bestimmte Ausführungen der vorliegenden Erfindung vorgeschlagen, die zur Zeit noch
30 nicht entdeckte Vektoren einsetzen, die eine oder mehrere der hier beschriebenen DNA-Sequenzen enthalten werden. Insbesondere wird bevorzugt, daß alle diese Vektoren einige oder alle der folgenden Eigenschaften aufweisen:
35 (1) eine minimale Anzahl an Wirtsorganismussequenzen besitzen; (2) vom gewünschten Wirt stabil erhalten und vermehrt werden; (3) in einer großen Anzahl an Kopien in dem gewünschten Wirt vorhanden sein können; (4) einen regulierbaren Promotor in einer solchen Position besitzen, daß die Transkription des Gens von Interesse

gefördert wird; (5) wenigstens eine Marker-DNA-Sequenz aufweisen, die für eine selektierbare Eigenschaft kodiert, die auf einem verschiedenen Teil des Plasmids vorhanden ist als dem, wo die DNA-Sequenz eingefügt wird; und (6) eine DNA-Sequenz, die die Transkription terminieren kann.

In verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen enthalten die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthaltenden und zu ihrer Expression befähigten Klonierungsvektoren verschiedene funktionelle Elemente. Diese "funktionellen Elemente", sofern hier darauf eingegangen wird, beziehen mindestens einen Promotor, mindestens eine Shine-Dalgarno-Sequenz und ein Startcodon und mindestens ein Stopcodon ein. Diese "funktionellen Elemente" können vorzugsweise auch ein oder mehrere der folgenden mit einbeziehen: mindestens einen Operator, mindestens eine Leader-Sequenz für Proteine, die aus dem Intrazellularraum ausgeschleust werden sollen, mindestens ein Gen für ein Regulatorprotein und alle anderen DNA-Sequenzen, die für eine entsprechende Transkription und nachfolgende Translation der Vektor-DNA nötig oder bevorzugt sind.

Manche dieser funktionellen Elemente können auf jedem der bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung vorhanden sein. Es wird in Betracht gezogen, daß alle zusätzlichen funktionellen Elemente, die erforderlich sein können, in diese Vektoren mit dem Durchschnittsfachmann bekannten Methoden, insbesondere in Anbetracht der Lehren hier, eingesetzt werden können.

In der Praxis ist es möglich, jeden dieser Vektoren so zu konstruieren, daß er leicht isoliert, aufgebaut und ausgetauscht werden kann. Dies erleichtert den Aufbau einer Vielzahl funktioneller Gene aus Kombinationen dieser Elemente mit dem kodierenden Bereich der DNA-Sequenzen. Weiterhin werden viele dieser Elemente in mehr als einem Wirt verwendbar sein. Es wird zusätzlich in Betracht gezogen, daß die Vektoren in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen DNA-Sequenzen, die als Regulatoren ("Operatoren") fungieren können, und andere DNA-Sequenzen, die für Regulatorproteine kodieren können,

enthalten.

(i) Regulatoren

In einer Ausführungsform dienen diese Regulatoren dazu, die Expression der DNA-Sequenz bei bestimmten Umweltbedingungen zu verhindern, und erlauben unter anderen Umweltbedingungen die Transkription und anschließende Expression des Proteins, für das die DNA-Sequenz kodiert. Insbesondere wird bevorzugt, daß regulatorische Abschnitte in den Vektor so eingefügt werden, daß die Expression der DNA-Sequenz in der Abwesenheit von zum Beispiel Isopropylthio-beta-D-galactosid (IPTG) nicht oder nur in einem stark reduzierten Ausmaß erfolgen wird. Bei diesen Gegebenheiten können die die DNA-Sequenz enthaltenden, transformierten Mikroorganismen vor der Auslösung der Expression von CNTF bis zu einer gewünschten Dichte angezüchtet werden. In dieser Ausführungsform wird die Expression des gewünschten Proteins durch die Zugabe einer Substanz in die mikrobielle Umwelt induziert, die, nachdem die gewünschte Dichte erreicht worden ist, die Expression der DNA-Sequenz hervorrufen kann.

(ii) Promotoren

Die Expressionsvektoren müssen Promotoren enthalten, die vom Wirtsorganismus zur Expression seiner eigenen Proteine benutzt werden können. Während das Lactosepromotorensystem in weiten Kreisen Verwendung findet, sind andere mikrobielle Promotoren isoliert und charakterisiert worden, was einen Fachmann dazu befähigt, diese zur Expression des rekombinanten CNTF zu verwenden.

(iii) Transkriptionsterminator

Die hier in Betracht gezogenen Transkriptionsterminatoren dienen der Stabilisierung des Vektors. Insbesondere die von Rosenberg, M. und Court, D., in Ann. Rev. Genet. 13:319-353 (1979), beschriebenen und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogenen Sequenzen werden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen.

(iv) Nicht translatierte Sequenz

Es wird darauf hingewiesen, daß es in der bevor-

zugten Ausführungsform auch wünschenswert sein kann, das 3'- oder 5'-Ende des kodierenden Bereichs zu konstruieren, um zu ermöglichen, daß die nicht translatierte Sequenz am 3'- oder 5'-Ende in das transkribierte Gen mit einbezogen wird. Bei diesen nicht translatierten Sequenzen sind diejenigen mit eingeschlossen, die die mRNA stabilisieren, wie sie von Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. und Court, D. in J. Mol. Biol. 176:39-53 (1984), identifiziert werden und die hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen werden.

(v) Ribosombindungsstellen

Die mikrobielle Expression von Fremdproteinen erfordert bestimmte funktionelle Elemente, die Ribosombindungsstellen mit einschließen, jedoch nicht darauf beschränkt sind. Eine Ribosombindungsstelle ist eine Sequenz, die von einem Ribosom erkannt wird und die es bindet, um die Proteinsynthese zu starten, wie von Gold, L., et al., Ann. Rev. Microbio. 35:557-580; oder Marquis, D.M., et al., Gene 42:175-183 (1986) dargelegt wird, die beide hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen werden. Eine bevorzugte Ribosombindungsstelle ist GAGGCGCAAAAA(ATG).

(vi) Leader-Sequenz und Translationskoppler

Zusätzlich wird es bevorzugt, daß eine DNA, die für eine entsprechende sekretorische Leader-(Signal-) Sequenz kodiert, am 5'-Ende der DNA-Sequenz vorhanden ist, wie von Watson, M.E., in Nucleic Acids Res. 12:5145-5163, dargelegt und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen, falls das Protein aus dem Cytoplasma ausgeschieden werden soll. Die DNA für die Leader-Sequenz muß sich in einer Position befinden, die die Herstellung eines Fusionsproteins erlaubt, in dem die Leader-Sequenz dem CNTF unmittelbar benachbart und kovalent an diesen gebunden ist, d.h. zwischen den beiden kodierenden DNA-Sequenzen darf es keine Transkriptions- oder Translationssignale geben. Das Vorhandensein der Leader-Sequenz wird zum Teil aus einem oder mehreren der folgenden Gründe gewünscht. Erstens kann das Vorhandensein der Leader-Sequenz die Prozessierung von

CNTF durch den Wirt erleichtern. Insbesondere kann die Leader-Sequenz die Spaltung des ersten Translationsprodukts durch eine Leader-Peptidase steuern, um die Leader-Sequenz zu entfernen und ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die potentielle Proteinaktivität besitzt, zu ergeben. Zweitens kann das Vorhandensein der Leader-Sequenz die Aufreinigung von CNTF erleichtern, indem sie das Protein aus dem Cytoplasma der Zelle steuert. In einigen Spezies von Wirtsmikroorganismen erlaubt das Vorhandensein einer geeigneten Leader-Sequenz den Transport des vollständigen Proteins in den periplasmatischen Raum, wie dies bei einigen E. coli der Fall ist. Bei bestimmten E. coli, Saccharomyces und Bacillus- und Pseudomonas-Stämmen erlaubt die geeignete Leader-Sequenz den Transport des Proteins durch die Zellmembran und in das extrazelluläre Medium. Bei diesen Gegebenheiten kann das Protein aus extrazellulärem Protein aufgereinigt werden. Drittens kann bei einigen der nach der vorliegenden Erfindung hergestellten Proteine die Gegenwart der Leader-Sequenz nötig sein, um das vollständige Protein in einem Umfeld zu plazieren, wo es sich zu seiner aktiven Struktur falten kann, die die entsprechende Proteinaktivität besitzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine zusätzliche DNA-Sequenz unmittelbar vor die DNA-Sequenz plaziert, die für CNTF kodiert. Die zusätzliche DNA-Sequenz kann als Translationskoppler fungieren, d.h., es handelt sich um eine DNA-Sequenz, die für eine RNA kodiert, die dazu dient, Ribosomen unmittelbar benachbart zur Ribosombindungsstelle der Inhibitoren-RNA zu positionieren, an die sie unmittelbar angrenzt. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der Translationskoppler unter Verwendung der DNA-Sequenz TAACGAGGCGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATCTTGGAGGATGATTAAATG und durch bei Durchschnittsfachleuten zur Zeit bekannten Methoden, die sich auf Translationskoppler beziehen, hergeleitet werden.

(vii) Translationsterminator

Die hier in Betracht gezogenen Translations-

terminatoren dienen dazu, die Translation von mRNA zu stoppen. Sie können entweder, wie von Kohli, J., Mol. Gen. Genet. 182:430-439, beschrieben, natürlich oder, wie von Pettersson, R.F. Gene 24:15-27 (1983) beschrieben, synthetisch sein, wobei beide Literaturstellen hier spezifisch durch Bezugnahme miteinbezogen werden.

(viii) Selektionsmarker

Außerdem wird es bevorzugt, daß der Klonierungsvektor einen Selektionsmarker enthält, wie einen Drogenresistenzmarker oder einen anderen Marker, der die Expression einer Eigenschaft des Wirtsmikroorganismus hervorruft, nach der selektioniert werden kann. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Gen für Ampicillinresistenz in den Vektor eingebaut, während bei anderen Plasmiden das Gen für Tetracyclinresistenz oder das Gen für Chloramphenicolresistenz eingebaut wird.

Ein solcher Drogenresistenz- oder anderer Selektionsmarker soll zum Teil die Selektion der Transformanten erleichtern. Außerdem kann das Vorhandensein eines solchen Selektionsmarkers im Klonierungsvektor dafür von Nutzen sein, die Vermehrung von kontaminierenden Mikroorganismen im Kulturmedium zu verhindern. In dieser Ausführungsform würde man eine reine Kultur der transformierten Wirtsmikroorganismen dadurch erhalten, daß die Mikroorganismen unter Bedingungen in Kultur gehalten werden, die den induzierten Phänotyp zum Überleben erfordern.

Die hier erörterten funktionellen Elemente werden im Hinblick auf bisher veröffentlichte Literatur und den hierin enthaltenen Lehren routinemäßig vom Durchschnittsfachmann ausgewählt. Allgemeine Beispiele dieser funktionellen Elemente werden bei B. Lewin, Genes, Wiley & Sons, New York (1983) dargelegt, was hier speziell durch Bezugnahme einbezogen wird. Verschiedene Beispiele geeigneter funktioneller Elemente können auf den oben erwähnten Vektoren und durch die Inspektion der grundsätzlichen Eigenschaften der vorgenannten Vektoren erläuternden Publikationen gefunden werden.

Nach der Synthese und Isolierung aller notwendi-

gen und gewünschten Bestandteile des oben erläuterten Vektors wird der Vektor mit dem Durchschnittsfachmann im allgemeinen bekannten Methoden zusammengebaut. Der Zusammenbau solcher Vektoren wird als Teil der Pflichten und Aufgaben von Durchschnittsfachleuten angesehen und kann, als solches, ohne übermäßiges Experimentieren ausgeführt werden. Zum Beispiel wurden ähnliche DNA-Sequenzen in entsprechende Klonierungsvektoren ligiert, wie dies von Maniatis et al. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1984) dargelegt ist, das hier spezifisch durch Bezugnahme einbezogen wird.

Bei der Konstruktion der Klonierungsvektoren der vorliegenden Erfindung sollte zusätzlich darauf hingewiesen werden, daß mehrfache Kopien der DNA-Sequenzen und der dazugehörigen funktionellen Elemente in jeden Vektor eingebaut werden können. In einer solchen Ausführungsform würde der Wirtsorganismus größere Mengen an gewünschtem CNTF pro Vektor produzieren. Die Anzahl an Mehrfachkopien der DNA-Sequenz, die in den Vektor eingebaut werden kann, wird nur von der von der Größe abhängigen Fähigkeit des resultierenden Vektors begrenzt, in eine geeignete Wirtszelle übertragen zu werden, um dort repliziert und transkribiert zu werden.

(b) Andere Mikroorganismen

Vektoren, die zur Verwendung in anderen Mikroorganismen als E. coli geeignet sind, werden auch für diese Erfindung in Betracht gezogen. Solche Vektoren werden in Tabelle 1 beschrieben. Außerdem werden bestimmte bevorzugte Vektoren unten erörtert.

1. Backman, K., Ptashne, M. und Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).
2. de Boer, H.A., Comstock, L.J., und Vasser, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25 (1983).
3. Shimatake, H. und Rosenberg, M. Nature 292, 128-132 (1981).
4. Derom, C., Ghysen, D. und Fiers, W. Gene 17, 45-54 (1982).
5. Hallewell, R.A. und Entage, S. Gene 9, 27-47 (1980).
6. Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. und Noller, H.F. J. Mol. Biol. 148 107-127 (1981).
7. Normanly, J., Ogden, R.C., Horvath, S.J. und Abelson, J. Nature 321, 213-219 (1986).
8. Belasco, J.G., Nilsson, G., von Gabain, A. und Cohen, S.N. Cell 46, 245-251 (1986).
9. Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg M. und Court, D. J. Mol. Biol. 17, 39-53 (1984).
10. Mott, J.E., Galloway, J.L. und Platt, T. EMBO J. 4, 1887-1891 (1985).
11. Koshland, D. und Botstein, D. Cell 20, 749-760 (1980).
12. Morva, N.R., Kakamura, K. und Inouye, M. J. Mol. Biol. 143, 317-328 (1980).

13. Surin, B.P., Jans, D.A., Fimmel, A.L., Shaw, D.C., Cox, G.B. und Rosenberg, H. J. Bacteriol. 157, 772-778 (1984).
14. Sutcliffe, J.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741 (1978).
15. Peden, K.W.C. Gene 22, 277-280 (1983).
16. Alton, N.K. und Vapnek, D. Nature 282, 864-869 (1979).
17. Yang, M., Galizzi, A., und Henner, D. Nuc. Acids Res. 11(2), 237-248 (1983).
18. Wong, S.-L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., und Doi, R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).
19. Wang, P.-Z., und Doi, R.H. J. Biol. Chem. 251, 8619-8623, (1984).
20. Lin, C.-K., Quinn, L.A. Rodriguez, R.L. J. Cell Biochem. Suppl. (9B), p. 198 (1985).
21. Vasantha, N., Thompson, L.F., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., und Filpula, D. J. Bact. 159(3), 881-819 (1984).
22. Palva, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibarkov, M., und Kaariainen, L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5582-5586 (1982).
23. Wong, S.-L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., und Doi, R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1184-1188 (1984).

24. Sullivan, M.A., Yasbin, R.E., und Young, F.E. *Gene* 29, 21-46 (1984).
25. Vasantha, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C. Nagle, J., und Filula, D. J. *Bact.* 159(3), 811-819 (1984).
26. Yansura, D.G. und Henner, D.J. *PNAS* 81, 439-443 (1984).
27. Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones, A.J.S., Seeburg, P.H. und Heyneker, H.L. *Biotechnology*, 161-165 (1984).
28. Lory, S., und Tai, P.C. *Gene* 22, 95-101 (1983).
29. Liu, P.V. J. *Infect. Dis.* 130 (Suppl), 594-599 (1974).
30. Wood, D.G., Hollinger, M.F., und Tindol, M.B. J. *Bact.* 145, 1448-1451 (1981).
31. St. John, T.P. und Davis, R.W. J. *Mol. Biol.* 152, 285-315 (1981).
32. Hopper, J.E., und Rowe, L.J. J. *Biol. Chem.* 253, 7566-7569 (1978).
33. Denis, C.L., Ferguson, J. und Young, E.T. J. *Biol. Chem.* 258, 1165-1171 (1983).
34. Lutsdorf, L. und Megnet, R. *Archs. Biochem. Biophys.* 126, 933-944 (1968).
35. Meyhack, B., Bajwa, N., Rudolph, H. und Hinnen, A. *EMBO. J.* 6, 675-680 (1982).

36. Watson, M.E. *Nucleic Acid Research* 12, 5145-5164 (1984).
37. Gerband, C. und Guerineau, M. *Curr. Genet.* 1, 219-228 (1980).
38. Hinne, A., Hicks, J.B. und Fink, G.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1929-1933 (1978).
39. Jabbar, M.A., Sivasubramanian, N. und Nayak, D.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2019-2023 (1985).

(i) Pseudomonas-Vektoren

Mehrere Vektorplasmide, die sich in einer Vielfalt von gram-negativen Bakterien replizieren, werden für die Verwendung als Klonierungsvehikel in Wirten der Gattung Pseudomonas bevorzugt. Bestimmte dieser Plasmide werden von Tait, R.C., Close, T.J., Lundquist, R.C., Hagiya, M., Rodriguez, R.L. und Kado, C.I. in *Biotechnology*, Mai, 1983, S. 269-275; Panopoulos, N.J. in Genetic Engineering in the Plant Sciences, Praeger Publishers, New York, New York, S. 163-185 (1981); und Sakaguchi, K. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96:31-45 (1982) beschrieben, die alle hier spezifisch durch Bezugnahme einbezogen werden.

Eine besonders bevorzugte Konstruktion würde das Plasmid RSF1010 und Derivate davon einsetzen, wie von Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Coleman, S. und Timmis, K.N. in Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, Timmis, K.N. und Puhler, A. Hrsg. Elsevier/ North Holland Biomedical Press (1979) beschrieben und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen. RSF1010 hat die Vorteile, daß es ein relativ kleines Plasmid mit einer hohen Anzahl von Kopien ist, das leicht sowohl in E. coli als auch Pseudomonas-Arten

transformiert wird und dort stabil erhalten wird. In diesem System würde bevorzugt das Tac-Expressionssystem verwendet, wie es für Escherichia beschrieben ist, da es scheint, daß der E. coli trp-Promotor von Pseudomonas RNA-Polymerase leicht erkannt wird, wie von Sakagucki, K. in Current Topics in Microbiology and Immunology 96:31-45 (1982) und Gray, G.L., McKeown, K.A., Jones, A.J.S., Seeburg, P.H. und Heyneker, H.L. in Biotechnology, Feb. 1984, S.161-165 dargelegt, die beide hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen werden. Die Transkriptionsaktivität kann weiter maximiert werden, indem der Austausch des Promotors durch z.B. ein E. coli oder P. aeruginosa trp-Promotor vorausgesetzt wird. Zusätzlich würde auch das lacI-Gen von E. coli mit ins Plasmid eingebaut zum Zwecke der Regulation.

Die Translation kann bei allen Pseudomonas-Proteinen mit dem Translationsstart gekoppelt sein und ebenso in den Startpunkten für alle stark exprimierten Proteine des zum Hervorrufen der intrazellulären Expression des Inhibitors ausgewählten Typs.

In den Fällen, in denen in bezug auf die Restriktion negative Stämme einer als Wirt fungierenden Pseudomonas-Art nicht zur Verfügung stehen, ist die Effizienz der Transformation mit aus E. coli isolierten Plasmidkonstrukten gering. Deshalb ist die Passage des Pseudomonas-Klonierungsvektors durch einen r- m⁺-Stamm einer anderen Art vor der Transformation des gewünschten Wirts erwünscht, wie in Bagdasarian, M., et al., Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, S. 411-422, Timmis and Puhler Hrsg., Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979) dargelegt und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen wird.

(ii) Bacillus-Vektoren

Überdies schließt ein bevorzugtes Expressionssystem in Wirten der Gattung Bacillus die Verwendung des Plasmids pUB110 als das Klonierungsvehikel mit ein. Wie in anderen Wirt-Vektor-Systemen ist es in Bacillus möglich, den CNTF der vorliegenden Erfindung entweder als intrazelluläres oder als sekretiertes Protein zu

exprimieren. Die vorliegenden Ausführungsformen umfassen beide Systeme. Shuttle-Vektoren, die sich sowohl in Bacillus als auch E. coli replizieren, stehen zur Konstruktion und zum Testen verschiedener Gene zur Verfügung, wie von Dubnau, D., Gryczan, T., Contente, S. und Shivakumar, A.G. in Genetic Engineering, Bd. 2, Setlow und Hollander Hrsg., Plenum Press, New York, New York, S. 115-131 (1980) beschrieben und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen. Zur Expression und Sekretion des CNTF von B. subtilis wird die Signalsequenz von alpha-Amylase bevorzugt an die für das Protein kodierende Region angekoppelt. Zur Synthese von intrazellulärem CNTF wird die transportierbare DNA-Sequenz über die Translation an die Ribosomenbindungsstelle der alpha-Amylase-Leader-Sequenz gekoppelt.

Die Transkription dieser beiden Konstrukte wird vorzugsweise vom alpha-Amylasepromotor oder einem Derivat davon gesteuert. Dieses Derivat enthält die Erkennungssequenz des nativen alpha-Amylasepromotors für die RNA-Polymerase, beinhaltet aber auch die lac-Operatorregion. Es wurde gezeigt, daß ähnliche aus dem Penicillinasegenpromotor und dem lac-Operator konstruierte Hybridpromotoren in Bacillus-Wirten in einer regulierbaren Weise funktionieren, wie von Yansura, D.G. und Henner in Genetics and Biotechnology of Bacilli, Ganesan, A.T. und Hoch, J.A. Hrsg., Academic Press, S. 249-263 (1984) dargelegt und durch Bezugnahme spezifisch mit einbezogen. Das lacI-Gen von E. coli würde ebenfalls zum Zwecke der Regulation in das Plasmid mit eingebaut werden.

(iii) Clostridium-Vektoren

Eine bevorzugte Konstruktion zur Expression in Clostridium besteht in Plasmid pJU12, beschrieben bei Squires, C.H. et al., in J. Bacteriol. 159:465-471 (1984) und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen, transformiert in C. perfringens nach der Methode von Heefner, D.L. et al., wie in J. Bacteriol. 159:460-464 (1984) beschrieben und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen. Die Transkription wird durch den Promotor des Gens für Tetracyclinresistenz gesteuert. Die Trans-

lation ist mit der Shine-Dalgarno-Sequenz ebendieses tet^r-Gens in einer strikt analogen Weise zu der Vorgehensweise, die oben in bezug auf für die Verwendung in anderen Wirten geeignete Vektoren umrissen ist, gekoppelt.

(iv) Hefevektoren

Das Erhalten von in Hefe eingeführter Fremd-DNA kann auf verschiedene Arten ausgeführt werden, wie beschrieben bei Botstein, D. und Davis, R.W. in The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Cold Spring Harbor Laboratory, Strather, Jones and Broach Hrsg., S.607-636 (1982), und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen. Ein bevorzugtes Expressionssystem zur Verwendung mit Wirtsorganismen der Gattung Saccharomyces beherbergt das CNTF-Gen auf dem 2-Mikron-Plasmid. Die Vorteile des 2-Mikron-Rings schließen eine relativ hohe Anzahl an Kopien und Stabilität bei Einführen in cir'-Stämme ein. Diese Vektoren beinhalten vorzugsweise den Origin der Replikation und mindestens einen Antibiotika-Resistenzmarker aus pBR322, um die Replikation und Selektion in E. coli zu erlauben. Außerdem weist das Plasmid bevorzugt die Zwei-Mikron-Sequenz und das Hefe-LEU2-Gen auf, die denselben Zwecken in LEU2-Hefemangelmutanten dienen.

Falls in Betracht gezogen wird, den rekombinanten CNTF letztlich in Hefe zu exprimieren, wird der Klonierungsvektor vorzugsweise zunächst in Escherichia coli übertragen, wo man den Vektor sich replizieren lassen würde und aus dem der Vektor nach der Amplifikation gewonnen und aufgereinigt würde. Der Vektor würde dann für die endgültige Expression des CNTF in die Hefe übertragen.

(c) Säugerzellen

Die für CNTF kodierende cDNA oder genomische DNA dient als das Gen zur Expression von CNTF in Säugerzellen. Es sollte eine Sequenz aufweisen, die effizient Ribosomen bindet, wie die von Kozak in Nucleic Acids Research 15:8125-8132 (1987) beschriebene, hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen. Das DNA-Restrik-

tionsfragment, das die für CNTF kodierende DNA-Sequenz trägt, kann in einen Expressionsvektor eingefügt werden, der einen Transkriptionspromotor und einen Transkriptionshancer aufweist, wie beschrieben von Guarente, L. in
5 Cell 52:303-305 (1988) und Kadonaga, J.T. et al., in Cell 51:1079-1090 (1987), die beide hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen sind. Der Promotor kann wie im Plasmid pMSG (Pharmacia Cat. Nr. 27450601) regulierbar sein, falls die konstitutive Expression des Inhibitors
10 dem Zellwachstum schadet. Der Vektor sollte ein vollständiges Polyadenylierungssignal aufweisen, wie von Ausubel, F.M. et al. in Current Protocols in Molecular Biology, Wiley (1987) beschrieben und hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen, so daß die von diesem Vektor
15 transkribierte mRNA richtig prozessiert wird. Schließlich hat der Vektor einen Replikationsorigin und mindestens einen Antibiotika-Resistenzmarker aus pBR322, um die Replikation und Selektion in E. coli zu erlauben.

Zur Selektion einer stabilen CNTF produzierenden
20 Zelllinie kann der Expressionsvektor das Gen für einen selektionierbaren Marker tragen, wie einen Drogenresistenzmarker, oder ein komplementäres Gen für eine Zelllinie mit einem Mangel tragen, wie ein Dihydrofolatreduktase(dhfr)-Gen zum Transformieren einer dhfr⁻
25 Zelllinie, wie, von Ausubel et al., siehe oben beschrieben. Alternativ kann ein getrenntes Plasmid, das den selektionierbaren Marker trägt, mit dem Expressionsvektor kotransformiert werden.

Wirtszellen/Transformation

30 Der so erhaltene Vektor wird in eine geeignete Wirtszelle übertragen. Diese Wirtszellen können Mikroorganismen oder Säugerzellen sein.

(a) Mikroorganismen

35 Es wird angenommen, daß jeder Mikroorganismus mit der Fähigkeit, exogene DNA aufzunehmen und diese Gene und zugehörige funktionelle Elemente zu exprimieren, gewählt werden kann. Nachdem ein Wirtsorganismus ausgewählt wurde, wird der Vektor mit dem Durchschnittsfachmann bekannten Methoden in den Wirtsorganismus übertragen.

Beispiele solcher Methoden können in Advanced Bacterial Genetics von R.W. Davis et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1980), gefunden werden, welches hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen ist. In einer Ausführungsform findet die Transformation vorzugsweise bei niedrigen Temperaturen statt, da eine Temperaturregulierung als Mittel zur Regulierung der Genexpression über die Verwendung von funktionellen Elementen wie oben dargelegt in Betracht gezogen wird. In einer anderen Ausführungsform, falls osmotische Regulatoren in den Vektor eingefügt worden sind, ist eine Regulierung der Salzkonzentrationen während der Transformation erforderlich, um eine angemessene Kontrolle der Fremdgene zu gewährleisten.

Der Wirtsmikroorganismus ist vorzugsweise fakultativ anaerob oder aerob. Bestimmte Wirte, die für diese Methode bevorzugt verwendet werden können, schließen Hefen und Bakterien ein. Spezielle Hefen schließen jene der Gattung Saccharomyces, und insbesondere Saccharomyces cerevisiae ein. Spezielle Bakterien schließen diejenigen der Gattung Bacillus, Escherichia und Pseudomonas, insbesondere Bacillus subtilis und Escherichia coli ein. Weitere Wirtszellen sind oben in Tabelle I aufgelistet.

(b) Säugerzellen

Der Vektor kann in Säugerzellen in Kultur mit verschiedenen Methoden wie Calciumphosphat/DNA-Kopräzipitation, Elektroporierung oder Protoplastenfusion eingeführt werden. Kopräzipitation mit Calciumphosphat wie von Ausubel et al., siehe oben, beschrieben, wird als Methode bevorzugt.

Es gibt viele stabile Zelltypen, die transformierbar sind und die die DNA-Sequenz transkribieren, prozessieren und translatieren und CNTF-Protein produzieren können. Zelltypen können jedoch in bezug auf Glykosilierung von Proteinen und die post-translationale Modifikation von Aminosäureresten, falls vorhanden, variieren. Die idealen Zelltypen sind also solche, die einen mit dem natürlichen Molekül identischen rekombinanten CNTF produzieren.

Die Wirtszellen werden unter für die Expression von CNTF geeigneten Bedingungen kultiviert. Diese Bedingungen sind im allgemeinen spezifisch für die Wirtszelle und können vom Durchschnittsfachmann im Hinblick auf die veröffentlichte Literatur bezüglich der Wachstumsbedingungen für solche Zellen und die hier enthaltenen Lehren leicht bestimmt werden. Zum Beispiel enthält Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Ausgabe, Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland, das hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen ist, Informationen über die Bedingungen zur Bakterienkultur. Ähnliche Informationen über Hefe- bzw. Säugerzellkulturen können Pollack, R. Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratories (1975), das hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen ist, entnommen werden.

Alle Bedingungen, die zur Regulation der Expression der DNA-Sequenz nötig sind, abhängig von jeglichem funktionellen Element, das in den Vektor eingefügt wurde oder in ihm vorhanden ist, wären während der Transformations- und Kulturschritte in Kraft. In einer Ausführungsform werden die Zellen bis zu einer hohen Dichte in der Gegenwart von geeigneten regulatorischen Bedingungen gezüchtet, die die Expression der DNA-Sequenz inhibieren. Dann, wenn man sich der optimalen Zelldichte nähert, werden die Umweltbedingungen zu den zur Expression der DNA-Sequenz geeigneten verändert. Es wird also in Betracht gezogen, daß die Produktion von CNTF in einer Zeitspanne anschließend an das Wachstum der Wirtszellen fast bis zur optimalen Dichte stattfindet und daß das Ergebnis einige Zeit nach der Einführung der zu seiner Expression nötigen regulatorischen Bedingungen geerntet wird.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der rekombinante CNTF nach der Expression in einer Wirtszelle oder einem Wirtsorganismus aufgereinigt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird der rekombinante CNTF nach der Expression in einem Mikroorganismus, insbesondere E. coli, aufgereinigt. In einer bevorzugten Ausführungsweise der vorliegenden Erfindung liegt CNTF

nach der Gewinnung aus den bakteriellen Kulturen in seiner biologisch aktiven Form vor. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform läßt man den CNTF in einem bestimmten Schritt während des Aufreinigungsvorgangs sich
5 wieder falten, um seine aktive Struktur anzunehmen.

Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wird vorzugsweise eine beliebige Kombination der folgenden Schritte verwendet: Anionenaustauschchromatographie (Mono-Q, Mono-S und/oder DEAE-Sephharose), Gelfiltrations-
10 chromatographie (Superose), Chromatofocussing (Mono-P) und hydrophobe Chromatographie (Octyl- und/oder Phenyl-Sephharose).

Es sei klargestellt, daß ein Durchschnittsfachmann im Hinblick auf die hier enthaltenen Lehren die Fähigkeit zur Anwendung der Lehren der vorliegenden Erfindung auf ein spezifisches Problem oder eine spezi-
15 fische Umwelt hat.

Die folgenden Beispiele dienen dazu, bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung zu erläutern und schränken die beanspruchte Erfindung
20 nicht ein. Alle in diesen Beispielen angegebenen Literaturstellen sind hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen.

Beispiel 1

Proteingewinnung

Materialien

Ischiasnerven erwachsener Kaninchen wurden von
5 Pel-Freez Biologicals, Rogers, Arkansas erhalten. Ultra-
reines Ammoniumsulfat wurde von Schwartz/Mann Biotech,
Cleveland, Ohio erworben. Phenylmethylsulfonylfluorid
(PMSF), epsilon-Aminocapronsäure, Benzamidin, Pepstatin,
10 Dithiothreitol (DTT), poly-L-Ornithin (P3655) und 3-[4,5-
Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolbromid (MTT)
wurden von Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri,
erhalten. Mono-P-FPLC-Säulen zum Chromatofocussing wurden
von Pharmacia, Inc., Piscataway, New Jersey, erhalten.
15 C8-HPLC-Säulen für Reverse-Phase-Chromatographie wurden
von Synchrom, Inc., Lafayette, Indiana, erhalten.
Acetonitril wurde von J.T. Baker Chemical Co., Phillips-
burg, New Jersey, erworben. Trifluoressigsäure wurde von
Pierce Chemicals, Rockford, Illinois erhalten. Endo-
proteasen Asp-N und Lys-C wurden von Boehringer Mannheim
20 Biochemicals, Indianapolis, Indiana, erhalten. Foetales
Kälberserum wurde von Hyclone Laboratories, Logan, Utah,
erworben. Kulturmedium und Salzlösungen wurden von Irvine
Scientific, Santa Ana, California, erhalten. Kulturschal-
len wurden Costar, Cambridge, Massachusetts, erhalten.
25 Pathogenfreie fruchtbare Eier von Gebräuchsgrad mit
Hühnerembryonen wurden von Spafas, Roanoke, Illinois,
erhalten.

B. Assay für SN-CNTF

Kulturen aus primären Ziliärganglien von Hühner-
30 embryonen wurden wie bereits beschrieben hergestellt
(Collins, 1978, Develop. Biol. 65:50; Manthorpe et al.,
1986, Develop. Brain Res. 25:191). Im kurzen wurden
Ziliärganglien aus fruchtbaren, pathogenfreien Hühner-
eiern entfernt, die in einer Feuchtatmosphäre 9-10 Tage
35 bei 38°C inkubiert worden waren. Die Ganglien wurden
chemisch getrennt, indem sie zunächst Hanks' Balanced
Salt Solution ohne zweiwertige Kationen, die 10mM HEPES-
Puffer, pH 7,2, enthielt, 10 min bei 37°C und dann einer
Lösung aus 0,125% Bactotrypsin 1:250 (Difco, Detroit,

Michigan) in Hanks' Balanced Salt Solution, die wie oben modifiziert worden war, 12 min bei 37°C ausgesetzt wurden. Die Trypsinbehandlung wurde durch Zugabe von foetalem Kälberserum bei einer Endkonzentration von 10% gestoppt.

Nach dieser Behandlung wurden die Ganglien in eine Lösung übertragen, die Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem hohen Glukosegehalt ohne Hydrogencarbonat mit 10% foetalem Kälberserum und 10mM HEPES, pH 7,2, enthielt, übertragen und mechanisch durch ungefähr 10maliges Zerreiben durch eine Pasteurpipette aus Glas getrennt, deren Öffnung mit einer Flamme poliert und auf solch einen Durchmesser verengt wurde, daß es 2 Sekunden dauerte, die Pipette zu füllen.

Die getrennten Ganglien wurden dann in Gewebeskulturschalen mit 100 mm Durchmesser (40 getrennte Ganglien pro Schale) drei Stunden in Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium ergänzt durch 10% foetales Kälberserum, 4 mM Glutamin, 60 mg/l Penicillin-G, 25 mM HEPES, pH 7,2) ausplattiert. Diese vorbereitende Ausplattieren wurde durchgeführt, um nicht neuronale Zellen, die an der Schale haften, von Nervenzellen zu trennen, die nicht an der Schale haften. Nach drei Stunden wurden die nicht adhärenen Nervenzellen durch Zentrifugation geerntet, im Kulturmedium resuspendiert und mit 50 µl pro Well auf eine 96-Well Mikrotiter-Gewebeskulturplatte mit halber Oberfläche bei einer Dichte 1500 Nervenzellen pro Well ausgebracht. Die Mikrotiterwells waren vorher einer 1 mg/ml Lösung aus poly-L-Ornithin in 10mM Natriumborat, pH 8,4, über Nacht ausgesetzt gewesen, mit destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet worden.

Zehn µl einer Verdünnungsreihe der auf neurotrophe Aktivität zu untersuchenden Probe wurden zu jedem Well gegeben und die Schalen wurden 20 Stunden bei 37°C in einer Feuchtatmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Nach 18 Stunden wurden 15 µl pro Well einer 1,5 mg/ml Lösung aus dem Tetrazolfarbstoff MTT in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem hohen Glukosegehalt ohne Hydrogencarbonat mit 10mM HEPES, pH 7,2, zugegeben und die

Kulturen für 4 Stunden in den 37°C warmen Brutschrank zurückgestellt. Dann wurden 75 µl einer Lösung aus 6,7 ml 12M HCl pro Liter Isopropanol zugegeben und der Inhalt jedes Wells 30mal trituriert, um die Zellen aufzuschließen und den Farbstoff zu suspendieren. Die Absorption bei 570nm wurde unter Verwendung eines automatischen Mikrotiterplattenmeßgeräts (Dynatech, Chantilly, Virginia) für jeden Well in bezug auf seinen Referenzwert bei 690nm bestimmt. Die Absorption der Wells, die kein neurotrophes Mittel erhalten hatten (Negativkontrollen), wurde von der Absorption der Wells mit Proben abgezogen. Die resultierende Absorption ist der Anzahl an lebenden Zellen in jedem Well proportional, die als diejenigen Nervenzellen definiert sind, die den Farbstoff reduzieren können. Die Anzahl der Trophic Units (trophischen Einheiten) an neurotropher Aktivität wurde als Reziprokwert der Verdünnung definiert, die 50% maximales Überleben der Nervenzellen ergab. Die Konzentration an trophischer Aktivität in Trophic Units pro ml wurde durch Division der gesamten Trophic Units durch das Volumen des Assays (60µl) erhalten. Die spezifische Aktivität wurde durch Division der Anzahl an Trophic Units durch die in der Probe vorhandene Proteinmenge bestimmt.

C. Aufreinigung von SN-CNTF

Am Ende jedes der folgenden Schritte wurde das Präparat entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C bis zu einer Woche bis zur Verwendung aufbewahrt.

Schritt 1. Herstellung von Rohextrakt

Einhundert Gramm (Naßgewicht) Kaninchenischiasnerv (circa 300 Nerven) wurde aufgetaut und in einem Polytron-Rotorhomogenisator (Kinematica, Schweiz) 1 Minute in 10 Volumen (W/V) Wasser mit 10mM EDTA, 1 mM epsilon-Aminocapronsäure, 1 mM Benzamidin und 0,1 mM PMSF pulverisiert und 30 Minuten bei 4°C und 140 000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle gefiltert, um schwimmendes Lipid zu entfernen.

Schritt 2. Säurebehandlung und Auftrennung mit Ammoniumsulfat

Die unten erwähnten Zentrifugationsschritte

wurden 20 Minuten lang bei 17 000xg und alle Schritte bei 4°C ausgeführt, falls nichts anderes angegeben ist. Der Rohextrakt wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde auf pH 3,6 mit 5N HCl angesäuert und der resultierende Niederschlag wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1N NaOH auf pH 6,3 titriert und der resultierende Niederschlag wurde wiederum abzentrifugiert. Zum obigen Überstand wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung zu 30%iger Sättigung gegeben und der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Weitere Zugabe von Ammoniumsulfat zum Überstand bis zu 60%iger Sättigung resultierte im Niederschlag einer Proteinfraction, die den größten Teil der SN-CNTF-Aktivität enthielt. Der Niederschlag wurde in 20 mM Natrium, pH 6,7, mit 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,1 µM Pepstatin gelöst, so daß eine Proteinkonzentration von 8-13 mg/ml erhalten wurde.

Schritt 3. Chromatofocussing

Das obige Präparat wurde über Nacht gegen ein 500mal größeres Volumen von 10mM Natriumphosphat, pH 6,7, unter einem Pufferwechsel dialysiert und bei 140 000xg 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Nylonfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm gegeben und 3mal mit einem Einspritzvolumen von jeweils 2 ml auf eine Mono-P-FPLC-Säule (Volumen des Gelbetts 4 ml) für Chromatofocussing aufgetragen, die mit 25 mM bis-Tris-HCl-Puffer, pH 5,8, äquilibriert war. Die Säule wurde mit demselben Puffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm des ablaufenden Puffers zur Basislinie zurückgekehrt war. Die Probe wurde dann mit Polypuffer, pH 4,0 (1:10 Verdünnung von PB74 von Pharmacia) chromatographiert.

Die Säulenfraktionen wurden gesammelt und auf pH und CNTF-Aktivität untersucht. Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Chromatographie auf Mono-P. Das Profil der eluierten Proteine ist als die optische Dichte (O.D.) bei 280 nm aufgetragen. Darüber sind die Graphen des pH und der SN-CNTF-Aktivität, die in jeder Fraktion gemessen wurden, aufgetragen. Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen mit der höchsten SN-CNTF-Aktivität

(circa pH 5) wurden vereinigt und mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer 95%igen Sättigung versetzt und das Pellet wurde durch Zentrifugation gesammelt, in gesättigter Ammoniumsulfatlösung resuspendiert und wiederum zentrifugiert, um den Polypuffer zu entfernen. Der Niederschlag wurde in ausreichend 10mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,7, gelöst, so daß eine Proteinendkonzentration von 3-5 mg/ml erhalten wurde (als die "fokussierte Fraktion" bezeichnet). Typischerweise wurde 1 Liter des ursprünglichen Rohextrakts in 8 verschiedenen Läufen auf der Mono-P-Säule verarbeitet.

Schritt 4. Präparative Natriumdodecylsulfat(SDS)-Gelelektrophorese

Die fokussierten Fraktionen aus mehreren Läufen über die Mono-P-Säule wurden vereinigt und gegen ein 100mal größeres Volumen von 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,7, 8 Stunden lang unter einem Pufferwechsel dialysiert und dann auf einem 15%igen reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel für waagerechte Elektrophorese gemäß der Methode von Laemmli, 1970, laufengelassen. Jedes Trenngel war 0,3 cm dick, 14 cm hoch und 11,5 cm breit. 5,5 mg Protein wurde auf jedes Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 15°C und 40 mA/Gel durchgeführt, bis der vorgefärbte 20 kD-Molekulargewichtsstandard eben den unteren Rand des Trenngels erreichte.

Um die Krümmung der einzelnen Proteinbanden über die Breite des waagerechten Gels aufzudecken, wurde auf das Gel ein Blatt Nitrozellulose (in Rollen, mit einer Porengröße von 0,45 µm, erhalten von Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts), das vorher mit Wasser angefeuchtet worden war, 2 Blätter vorher angefeuchtetes und 2 Blätter trockenes Chromatographiepapier (3 MM Chr erhalten von Whatman, Hillsboro, Oregon) und eine Glasplatte gelegt, auf die eine 500 ml Glasflasche als Gewicht gestellt wurde. Nach 30-45 Minuten wurden die Umrisse des Gels auf das Nitrozellulosepapier mit einem wasserunlöslichen Stift kopiert. Das Papier wurde 3mal mit 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, mit 0,15

[?] NaCl und 0,3% Detergens NP-40 gewaschen und dann 15-30 Minuten mit einer 1:1000 Verdünnung von Kohinuor Rapidograph Ink (erhältlich in Schreibwarenläden) im obigen Puffer gefärbt.

5 Das Originalgel wurde auf eine Glasplatte gelegt und mit seinem Umriß an das gefärbte Nitrozellulosepapier unter dem Glas angelegt. Der Bereich des Gels, der Molekulargewichten zwischen 22-27 kD entsprach, wurde durch Vergleich mit den vorgefärbten Molekulargewichtsstandards
10 (BRL, Bethesda, MD), die in schmalen Bahnen an beiden Enden jedes Gels laufengelassen worden waren, lokalisiert. Dieser Bereich wurde über die Breite des Gels in sieben 2,5 mm breite parallele Streifen geschnitten, wobei die durch das gefärbte Nitrozellulosepapier aufgedeckte Krümmung der Banden verwendet wurde. Jeder
15 einzelne Gelstreifen wurde in kleinere Stücke (2,5x2 mm) geschnitten und die Proteine wurden elektrophoretisch 6 Stunden in einer 1:1 Verdünnung von dem Laufpuffer nach Laemmli mit einer elektrophoretischen Anreicherungsanlage
20 (ISCO, Lincoln, Nebraska) eluiert. Die eluierten Proteine wurden in einem Volumen von 0,2 ml gesammelt. In Abbildung 2 ist die Verteilung der neurotrophen Aktivität im Eluat aus jedem der sieben Streifen (mit a-g nach abnehmendem Molekulargewicht) aufgetragen. Die Fraktion mit
25 der höchsten Aktivität (Streifen d) wurde mit Reverse-Phase-HPLC weiter aufgereinigt.

Schritt 5. Reverse-Phase-HPLC

Zum Eluat aus dem Gel wurden Dithiothreitol (DTT) und 10%ige Trifluoressigsäure (TFA) bis zur Endkonzentration von 2% bzw. 0,3% zugegeben. Die Probe wurde durch
30 einen 0,22 µm Nylonfilter gefiltert, auf eine C8-HPLC-Säule für Reverse-Phase-Chromatographie aufgetragen und mit einem H₂O/0,1% TFA:Acetonitril/0,1% TFA-Gradienten eluiert. Die Fraktionen wurden in 5 µl 0,4%iges Detergens
35 Tween 20 enthaltenden, mit Silikon behandelten Reagenzgläsern gesammelt. Aliquots jeder Fraktion wurden auf den Gehalt an neurotropher Aktivität hin untersucht. Die Proteinkonzentration ist als Absorption bei 215nm gezeigt und die Verteilung der neurotrophen Aktivität ist darüber

aufgetragen. Die Fraktionen mit der höchsten SN-CNTF-Aktivität (Fraktionen 37-40, Abb. 3) wurden für die in Beispiel 2 beschriebene Sequenzierung gesammelt. In einer getrennten Zubereitung wurden auch die Fraktionen, die der höchsten CNTF-Aktivität benachbart waren und die diese einschlossen, entsprechend Fraktionen 36-44 in Abb. 3, mit silbergefärbter reduzierender SDS-PAGE analysiert (Abb. 4).

Es wurden auch zwei zusätzliche Chromatographieschritte ausgeführt. Diese Schritte bestätigten die Reinheit des obigen CNTF-Präparats.

In den beiden zusätzlichen Chromatographieschritten wird das Prinzip der hydrophoben Chromatographie (HIC) verwendet. Der erste HIC-Schritt ist ein nach Schritt 2 (pH- und Ammoniumsulfatauftrennung) eingeschobener gewöhnlicher Säulenchromatographieprozeß. Das nach der Ammoniumsulfatfällung gelöste Material wurde weiter mit 10mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,7 (Puffer B), weiterverdünnt, bis die Ionenstärke (mit einem Leitfähigkeitsmesser gemessen) der von Puffer B mit 0.3 M Ammoniumsulfat und 5% Isopropanol (Puffer A) gleich war. Dann wurde Isopropanol bis zu einer Endkonzentration von 5% zu der verdünnten Probe gegeben und die Mischung wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Phenyl-Sepharose-CL4B-Säule (Pharmacia, Inc., Piscataway, New Jersey) aufgetragen. Es wurden nicht mehr als 3 mg Testprotein pro ml Säulenbettvolumen aufgetragen. Üblicherweise ergab 1 Liter Ischiasnervrohextrakt 50 ml wieder aufgelöstes Ammoniumsulfatpellet, das dann auf 70-100 ml, wie oben, verdünnt wurde und auf eine 110 ml Phenyl-Sepharosesäule aufgetragen wurde. Die Säule wurde schrittweise eluiert, wobei mit einem 3fachen Gelbettvolumen an Puffer A begonnen wurde, gefolgt von einem 3fachen Gelbettvolumen an Puffer B, gefolgt von einem 2fachen Gelbettvolumen an Puffer B mit 50% Ethylenglykol (Puffer C), und dann mit einem 5fachen Gelbettvolumen an Wasser gewaschen wurde. Das eluierte Material wurde in 18-ml-Fraktionen gesammelt.

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse eines solchen

Chromatographielaufs. Das Profil der eluierten Proteine wurde ununterbrochen bei O.D. 280 (durchgezogene Linie) überwacht. Über dem O.D.-Verlauf ist das Profil der eluierten SN-CNTF-Bioaktivität in jeder Fraktion aufgetragen (x-verbindende Linie), wie sie in dem auf dem Überlebensassay von Ziliärganglien basierenden, der in der ursprünglichen Patentanmeldung beschrieben ist, gemessen wurde. SN-CNTF-Bioaktivität wurde aus der Säule während der Elution mit Puffer C erhalten. Die Säulenfraktionen, die den größten Anteil an Bioaktivität (in Abbildung 7 mit einem Balken gezeigt) enthielten, wurden vereinigt und durch Dialyse unter Druck mit einer Amicon-YM-10-Membran (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Danvers, MA) auf ungefähr 1/10 des ursprünglichen Volumens eingeeengt, was typischerweise in einer Proteinendkonzentration von 2,5-3,0 mg/ml resultierte. Das Konzentrat wurde insgesamt 6 h lang unter 3fachem Wechsel gegen ein 55mal größeres Volumen von B dialysiert. Das dialysierte Material wurde durch einen Acrodiscfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 μ m (Gelman Sciences, Inc., Ann Arbor, MI) gegeben, durch mehrfaches Einspritzen von jeweils 2 ml auf eine Mono-P-Säule zum Chromatofocussing aufgetragen, wie in der ursprünglichen Patentanmeldung beschrieben.

Ohne diesen HIC-Säulenschritt benötigte 1 Liter Ischiasnervrohextrakt 8 getrennte Läufe auf der Mono-P-Säule zum Chromatofocussing, wie in der ursprünglichen Patentanmeldung beschrieben, wegen der begrenzten Proteinauftragskapazität der Säule. Mit der Einführung des HIC-Säulen-Schritts konnte 1 Liter Rohextrakt in einem einzigen Chromatofocussing-Lauf verarbeitet werden.

Der zweite HIC-Schritt wurde nach dem ursprünglichen Schritt 3 (Chromatofocussing auf Mono-P) eingeschoben. Zu jedem 1 ml des dem Chromatofocussing unterzogenen Materials (bei 3-5 mg/ml Protein) wurden 2 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, mit 15 M Ammoniumsulfat (Puffer D) gegeben. Die Mischung wurde dann durch ein Acrodiscfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 μ m gegeben und durch mehrfaches Einspritzen von jeweils 2 ml

auf eine Alkyl-Superose-HR10/10-FPLC-Säule (Pharmacia) aufgetragen, die mit Puffer D äquilibriert war. Die Säule wurde mit Puffer D gewaschen, bis die Absorption des Ablaufs bei O.D. 280 zur Basislinie zurückgekehrt war.
5 Die Säule wurde dann mit einem linearen Gradienten über 60 ml eluiert, der von Puffer D in Puffer E (50 mM Phosphatpuffer, pH 6,7) überging, und 1 ml-Fractionen wurden gesammelt.

Abbildung 8 erläutert die Ergebnisse eines
10 solchen FPLC-Laufs mit einer HIC-Säule. Die durchgezogene Linie stellt das bei O.D. 280 gemessene Profil des eluierten Proteins dar. Darüber ist ein Graph der SN-CNTF-Bioaktivität in jeder Gradientenfraction aufgetragen. Die Bioaktivität enthaltenden Fractionen (in
15 Abbildung 8 mit einem Balken gezeigt) wurden vereinigt und in einem Centricon-10 Anreicherungsapparat (Amicon) auf 0,5 ml eingeengt. Die Probe wurde durch Zugabe von 2 ml Puffer B zum oberen Reservoir verdünnt und durch Zentrifugation erneut auf ein Endvolumen von 0,5 ml
20 eingeengt. Der Verdünnungs- bzw. Wiedereinengungsschritt wurde noch 2mal wiederholt und die endgültige konzentrierte Probe wurde auf einem präparativen reduzierenden SDS-Gel für waagerechte Elektrophorese mit 15% Polyacrylamid wie oben beschrieben laufengelassen, außer daß
25 eine vorhergehende Dialyse nicht notwendig war.

In Abbildung 9 werden der endgültige Aufreinigungsschritt auf Reverse-Phase-HPLC in dem ursprünglichen Aufreinigungsvorgang (oberes Feld) und in dem Aufreinigungsvorgang nach dem Einfügen der beiden HIC-Schritte
30 (unteres Feld) verglichen. In jedem Feld ist das Profil der eluierten Proteine (durchgezogene Linie bei O.D. 280) und die darüber aufgetragene SN-CNTF-Bioaktivität (x-verbindende Linie) gezeigt. Aus der Abbildung ist offensichtlich, daß in der Reverse-Phase-HPLC unterzogenen
35 Probe in dem neuen Aufreinigungsvorgang wesentlich weniger verunreinigendes Protein vorhanden ist. Es ist bedeutsam, anzumerken, daß die spezifische Aktivität des mit dem neuen Vorgang hergestellten CNTF innerhalb des experimentellen Fehlers mit der spezifischen Aktivität

des mit dem vorhergehenden Vorgang hergestellten CNTF identisch ist (Tabelle 1), was zeigt, daß der durch den oben beschriebenen ursprünglichen Vorgang hergestellte CNTF bis zur Homogenität aufgereinigt war. Der Vorteil
5 des neuen Aufreinigungsvorganges ist, daß 8 Liter Ausgangsmaterial nun so bequem wie 1 Liter mit dem ursprünglichen Vorgang verarbeitet werden können.

Beispiel 2

Sequenzierung des aufgereinigten neurotrophen Faktors

10 Die Fraktionen mit der höchsten SN-CNTF-Aktivität (Nr. 37-40, Abb. 3) wurden vereinigt und auf 50 µl in einer Verdampfungszentrifuge unter Vakuum eingeeengt. Die eingeeengte Probe enthielt 0,14% Tween 20. Sie wurde mit 1%igem Ammoniumhydrogencarbonat auf ein Endvolumen von
15 350 µl verdünnt und mit Endoprotease Asp-N oder Endoprotease Lys-C über Nacht bei 37°C behandelt. Die Mischung wurde auf ungefähr 50-100 µl in einer Verdampfungszentrifuge unter Vakuum eingeeengt und mit einer 1 ml-Proben-
20 schleife auf eine Agapore RP-300 C8-Säule für Reverse-Phase-HPLC mit dünner Bohrung (Brownlee Labs), 2,1x220 mm, aufgetragen und mit einem H₂O/0,1% TFA:Acetonitril/ 0,1% TFA-Gradienten eluiert. Peptidhaltige Fraktionen wurden von Hand in Eppendor-
25 fröhrchen, basierend auf der Absorption bei 215 nm, gesammelt. Abbildung 5 zeigt das Profil der eluierten Peptide nach Verdau mit Endoprotease Asp-N, wie über die Absorption bei 215nm bestimmt. Abbildung 6 zeigt das Profil der eluierten Peptide nach Verdau mit Endoprotease Lys-C, gefolgt von Reduktion und Carboxymethylierung. Die
30 Aminosäuresequenz der hervorstehenden Peptide wurde unter Verwendung eines Applied Biosystems Gasphaseproteinsequenators bestimmt.

Zusätzliche Aminosäuresequenz wurde mit den Spaltenden Enzymen Chymotrypsin und Endoprotease Glu-C
35 (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) erhalten. Diese zusätzliche Proteinsequenz erlaubte es, einige der oben erwähnten Aminosäuresequenzen in größere Peptide aus überlappenden Aminosäureabschnitten zusammenzusetzen. Die neuen Aminosäuresequenzen und diejenigen,

die mit den vorhergehenden Sequenzen verbunden wurden,
sind unten angegeben:

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

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

5 D-S-V-D-G-V-P-M-A

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

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

D-L-R-V-I

Beispiel 3

10 Herstellung von Antikörpern gegen den neurotrophen Faktor

Antikörper, die mit aufgereinigtem Kaninchen-SN-CNTF reagieren, werden zum Durchmustern von Expressionsbibliotheken nützlich sein, um das Gen, das für Kaninchen-SN-CNTF kodiert, zu erhalten. Zusätzlich werden
15 Antikörper, die seine biologische Aktivität neutralisieren, in gesunden Tieren verwendet werden, um die biologische Rolle dieses neurotrophen Faktors zu bestimmen.

Zur Herstellung solcher Antikörper werden mit einem automatischen Proteinsynthesizer von Applied Biosystems synthetische Peptide synthetisiert, die
20 Bereichen aus der Sequenz von SN-CNTF entsprechen. Solche synthetischen Peptide werden kovalent an das Trägerprotein Keyhole Limpet Haemocyanin gebunden. Das konjugierte Peptid wird in Meerschweinchen in komplettem Freundschem
25 Adjuvan injiziert, wobei nach 3 und 6 Wochen in unkomplettem Adjuvans "geboostert" wird. Jedem Meerschweinchen werden Serumproben entnommen werden und in einem Western-Blot gegen aufgereinigten SN-CNTF verwendet werden, um zu bestimmen, ob Antikörper im Serum mit dem aufgereinigten
30 Protein reagiert. Im Western-Blot-Assay positive Seren werden weiter auf ihre Fähigkeit, die neurotrophe Aktivität in dem zur Aufreinigung verwendeten Bioassay zu neutralisieren, getestet. Seren, die entweder in dem Western-Blot-Assay oder in dem Neutralisierungsassay
35 positiv sind, werden wie folgt weiter aufgereinigt:
(1) die Seren werden mit dem Trägerprotein Keyhole Limpet Haemocyanin absorbiert, um gegen dieses Protein gerichtete Antikörper zu entfernen, dann werden die Seren erneut in den obigen Assays getestet; (2) die IgG-Anti-

körperfraktion wird aus dem Serum mit Standardmethoden aufgereinigt und erneut in den obigen Assays getestet. Diese beiden Schritte werden zu einem polyklonalen Antikörper führen, der rein genug ist, um zum Durch-

5 mustern von Expressionsbibliotheken verwendet zu werden, um die Messenger-RNA und das Gen für SN-CNTF zu klonieren.

In Kaninchen wurden Antikörper gegen ein synthetisches Peptid "A" erzeugt, das einem Teil der Aminosäuresequenz des in Beispiel 2 angegebenen Kaninchen-SN-CNTF (E-S-Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N) entspricht. Die Methoden

10 sind weiter unten in diesem Beispiel im Detail angegeben. Affinitätsaufgereinigte Antikörper gegen synthetisches Peptid A (Anti-Peptid-A-Antikörper) wurden hergestellt,

15 indem Antiserum immunisierter Kaninchen über eine Affinitätssäule mit kovalent gebundenem synthetischem Peptid A laufengelassen wurde und dann die gebundenen Antikörper eluiert wurden. Das nicht fraktionierte Immunantiserum ergab einen Titer von ca. 10^5 in einem

20 ELISA mit Peptid A-beschichteten Wells; es wurde in einer Endverdünnung von 1:50 zur Western-Blot-Analyse verwendet. Der wie oben beschrieben hergestellte affinitätsaufgereinigte Anti-Peptid A-Antikörper wurde in der Western-Blot-Analyse mit einer Endkonzentration von

25 80 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

Es wurde durch Western-Blot-Analyse von reduzierender SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) von aufgereinigtem CNTF gezeigt, daß sowohl das Anti-Peptid-A-Antiserum und die affinitätsaufgereinigten

30 Antikörper mit aufgereinigtem Kaninchen-SN-CNTF in Wechselwirkung treten. Serum aus dem gleichen Kaninchen von vor der Immunisierung trat unter diesen Bedingungen nicht mit SN-CNTF in Wechselwirkung. Aliquots der Peakfraktion von CNTF aus dem letzten Reverse-Phase-HPLC-

35 Aufreinigungsschritt (Fraktion Nr.46, Abb. 9, Feld B) wurden in zwei verschiedenen Bahnen in reduzierender SDS-PAGE laufengelassen. Benachbart jeder Bahn mit aufgereinigtem CNTF war eine Bahn, die Molekulargewichtsmarkerproteine enthielt. Das Gel wurde in zwei Teile zerschnit-

ten, von denen jeder eine Bahn mit aufgereinigtem CNTF und eine benachbarte Bahn mit Markerproteinen enthielt. Eines der Stücke wurde silbergefärbt, um die Proteine zu lokalisieren (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), das
5 andere wurde mit Western-Blot-Analyse (Towbin, et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 76:4350) auf Proteine untersucht, die mit den affinitätsaufgereinigten Anti-Peptid-A-Antikörpern reagieren.

Das linke Feld mit Bahnen in Abbildung 10 zeigt,
10 daß die Peakfraktion des mit Reverse-Phase-Chromatographie aufgereinigten CNTF zwei nahe beieinanderliegende Proteinbanden enthält, die in reduzierender SDS-PAGE bei ungefähr 25 000 Daltons zu finden sind und ungefähr 500 Daltons voneinander entfernt liegen. Wenn silber-
15 gefärbte Gele mit aufgereinigtem CNTF überladen werden, ist es oft nicht möglich, die beiden Banden wie in Abb. 4 aufzulösen.

Das rechte Feld mit Bahnen in Abbildung 10 zeigt, daß alle beide dieser Banden erkannt werden und mit
20 affinitätsaufgereinigten Anti-Peptid-A-Antikörpern gefärbt werden. Dieses Erkennen ist spezifisch, da die irrelevanten Markerproteine in der äußersten linken Bahn des rechten Paares nicht von den Anti-Peptid-A-Antikörpern erkannt werden, obwohl sie in einer ebenso hohen Konzen-
25 tration vorhanden sind, wie in den silbergefärbten Bahnen auf der linken Seite gezeigt wird (Abb. 10). Das Serum aus demselben Kaninchen von vor der Immunisierung erkennt die beiden Banden an aufgereinigtem CNTF ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß es mindestens
30 zwei verschiedene Formen von CNTF gibt, deren Molekulargewicht sich bei reduzierender SDS-PAGE um ca. 500 Daltons unterscheidet.

Um Anti-Peptid-A-Antikörper herzustellen, wurde
35 synthetisches Peptid A mit Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) konjugiert, um seine Antigenität zu verstärken. Zur Konjugation wurden 1 mg Peptid A und 1 mg KLH (Calbiochem, La Jolla, CA) in 50% Glycerin in 0,5 ml PBS (20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,15 M NaCl) gelöst. 10%iger Glutaraldehyd wurde tropfenweise unter

Mischen bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht unter Mischen bei Raumtemperatur stehengelassen und dann auf 5 ml mit PBS verdünnt. Die Konjugationsmischung wurde 1:2 mit
5 komplettem Freundschens Adjuvans emulgiert und subkutan an mehreren dorsalen Stellen in zwei New Zealand White Rabbits mit ca. 100 µg Peptid A pro Kaninchen injiziert. Drei Wochen später wurde jedes Kaninchen mit 50 µg konjugiertem Peptid A in unkomplettem Freundschens Adjuvans "geboostert".
10 Danach wurden ähnliche Boosterinjektionen in 2wöchigen Abständen gegeben, bis das Antiserum in einem ELISA (Tainer, et al., 1984 Nature 312:127) unter Verwendung von mit Peptid A beschichteten Wells einen Titer von mindestens 100 000 ergab. 5 Wochen nach
15 der ersten Injektion und danach zweiwöchentlich wurden Seren aus der Ohrvene entnommenem Blut hergestellt. Die Seren wurden bei -70°C gelagert.

Zur Herstellung einer Peptid-Affinitätssäule wurde Peptid A kovalent an eine Chromatographiesäulenmatrix wie folgt gebunden: Zu 8 mg in 0,4 ml PBS mit 4 M Guanidinhydrochlorid gelöstem Peptid A wurden 4,5 ml
20 0,1 M NaHCO₃, pH 8,0, und 0,5 M NaCl gegeben. Ein Gramm gefriergetrocknete aktivierte CH-Sepharose 4B (Pharmacia) wurde gewaschen und in 200 ml 1 mM HCl quellen gelassen und sofort in die Peptid-A-Lösung gegeben. Die Mischung
25 wurde über Nacht bei 4°C geschwenkt. Dann wurde das Gel in einer klinischen Zentrifuge sedimentiert und der Überstand zur Bestimmung der Menge an Peptid A, die an die Matrix gekoppelt wurde, aufgehoben. Fünfzehn ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,0, wurden zu dem Gelpellet gegeben und
30 bei Raumtemperatur 2 h lang inkubiert, um Kopplungsgruppen auf der Gelmatrix, die nicht reagiert hatten, zu blockieren. Das Gel wurde dann in eine Säule gepackt (Bett 3 ml) und dreimal mit der folgenden Abfolge von Puffern gewaschen: (1) das 10fache Volumen des Gelbetts an 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,0, mit 0,5 M NaCl; (2) 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,0, mit 0,5 M NaCl. Schließlich wurde
35 die Säule mit PBS mit 0,02% Natriumazid äquilibriert. Der Unterschied in der Konzentration an freien Aminogruppen

wurde mit Fluorescamin (Chen, et al., 1978, Arch. Biochem. Biophys., 189:241; Nowicki, 1979, Anal. Letters 12:1019) in der ursprünglichen Peptid-A-Lösung und in dem Überstand nach der Konjugation bestimmt. Diese Analyse zeigte, daß 92-95% des Peptids nicht mehr in der Lösung waren und mit der Sepharosegelmatrix konjugiert wurden.

Vor der Affinitätsaufreinigung des Anti-Peptid-A-Antikörpers wurden 8 ml Serum von immunisierten Kaninchen über Nacht gegen 2 Liter PBS dialysiert. Die Peptid-A-Sepharosesäule wurde nacheinander mit den 10fachen Gelbettvolumen der folgenden Lösungen gewaschen: 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5; PBS; 0,1 M Triethylamin, pH 11,5; und dann PBS. Das dialysierte Serum wurde dreimal durch die Säule laufen gelassen, um eine vollständige Bindung der Anti-Peptid-A-Antikörper zu gewährleisten. Die Säule wurde mit dem 20fachen Gelbettvolumen an PBS gewaschen und dann nacheinander mit jeweils dem 4fachen Gelbettvolumen der folgenden Lösungen eluiert: 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5; PBS; 0,1 M Triethylamin, pH 11,5; und dann PBS. Ein ml-Fraktionen wurden gesammelt. Die Eluate aus den Waschschritten mit Glycin und Triethylamin wurden sofort mit 1 M Tris, pH 9 bzw. 7, neutralisiert, und Aliquots wurden mit einem ELISA unter Verwendung von mit Peptid A beschichteten Wells auf Anti-Peptid-A-Antikörper untersucht. Die Fraktionen mit dem höchsten Titer (typischerweise in 3 Gelbettvolumen am Anfang der Eluation mit Glycin bzw. Triethylamin) wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Nachdem Partikel durch kurze Zentrifugation entfernt worden waren, wurde der Überstand mit affinitätsaufgereinigtem Anti-Peptid-A-Antikörper bei -70°C aufbewahrt.

Beispiel 4

Klonierung der Gene für SN-CNTF

Das endgültige Ziel der im folgenden beschriebenen Arbeit ist es, das humane Gen für SN-CNTF zu klonieren und zu exprimieren, um zur Verwendung in humanen pharmazeutischen Zubereitungen geeignetes Material herzustellen. Da es sich bei den erhaltenen Peptidsequenzen um solche für Kaninchen-SN-CNTF handelt und die

Kaninchen- bzw. Humansequenzen nicht identisch sein könnten, ist es sinnvoll, zunächst über Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden, die auf der Proteinsequenz basieren, Klone des Kaninchengens zu gewinnen und
5 die Kaninchenklone als Hybridisierungssonden beim Durchmustern nach dem humanen Gen einzusetzen.

Sowohl die genomische als auch Messenger-RNA (mRNA)-Sequenzen, die für Kaninchen- und humanen SN-CNTF kodieren, werden gewonnen. Die mRNA-Sequenz wird für die
10 Expression des Proteins von Nutzen sein, während die genomische Sequenz für das Verständnis der Struktur und der Regulation des Gens für SN-CNTF von essentieller Bedeutung sein wird. Um diese Sequenzen zu erhalten, werden genomische Bibliotheken sowohl vom Kaninchen als
15 auch vom Menschen und cDNA-Bibliotheken sowohl vom Kaninchen als auch vom Menschen auf aus Ischiasnerven isolierte mRNA durchgemustert. Während dieses Vorgangs, um das der Sequenz von Kaninchen- oder humanem SN-CNTF entsprechende Gen zu erhalten, kann man auch auf struk-
20 turell nahe verwandte Gene testen, die zusätzliche Mitglieder dieser Familie von neurotrophen Faktoren darstellen könnten.

A. Das SN-CNTF-Gen

Zur Isolierung der für SN-CNTF kodierenden
25 genanischen Kaninchensequenzen wird eine genomische Kaninchenbibliothek (Clontech) auf den Bakterienstamm E. coli nm538 aufgebracht und es werden ungefähr 1 000 000 rekombinante Klone durchgemustert. Bereiche der Proteinsequenz von Kaninchen-SN-CNTF, die von der ge-
30 ringsten Anzahl an Codons repräsentiert werden können, werden revers-translatiert und entsprechende degenerierte Oligonukleotidsonden synthetisiert. Die Kaninchenoligonukleotide werden mit Kinase nach dem Standardprotokoll von Maniatis, et al. (1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) markiert. Die
35 DNA-Kinase wird von US Biochemical Corp. und das mit Gammastrahlung markierte ATP wird von ICN erhalten. Die Oligonukleotide werden bis zu einer spezifischen Aktivität von mindestens 1 000 000 cmp pro Picomol

markiert.

Auf das Ausbringen der genomischen Bibliothek hin werden circa 1 Million Plaques auf Duplikate von Nitrocellulosefiltern übertragen. Die Filter werden dann nach
5 den Methoden von Maniatis et al. (1982, a.a.O.) weiterverarbeitet und über Nacht mit radioaktiv markierter Oligonukleotidsonde hybridisiert. Der Hybridisierungscocktail wird u.a. 6x SSCP, 2x Denhardt's, 0,05% Natrium-
pyrophosphat, 1mM EDTA, 0,1% SDS, 100 µg Hefe-tRNA
10 (Sigma), bei pH 8,0 enthalten. Die Hybridisierungstemperatur wird einige Grade unter der berechneten T_m des Oligonukleotids liegen. Klone, die mit mehreren, auf verschiedenen Bereichen der Proteinsequenz basierenden Sonden hybridisieren, werden über Plaques aufgereinigt
15 und die Hybridisierungsbereiche werden mit der Dideoxymethode (Sanger, et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463) unter Verwendung von Sequenase (US Biochemicals Corp.) sequenziert, um diejenigen Klone zu identifizieren, die für die SN-CNTF-Proteinsequenz kodieren.

20 B. SN-CNTF-mRNA-Sequenzen

Zelluläre Gesamt-RNA wird aus Kaninchen- und humanen Ischiasnerven erhalten. Das Gewebe wird in einer Guanidinthiocyanat/beta-Mercaptoethanol-Lösung homogenisiert und die RNA wird durch Sedimentation in einem
25 Caesiumchloridgradienten aufgereinigt (Glison, et al., 1974, Biochemistry 13:2633). Es wird für polyadenylierte RNA durch Chromatographie auf Oligo(dT)zellulose selektioniert (Avid und Leder, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. 69:408). Quantitative Analyse der RNA im Hybridisierungs-
30 blot wird mit "Antisense"-Oligonukleotidsonden durchgeführt, um das Vorherrschen von SN-CNTF-Sequenzen in jedem RNA-Präparat abzuschätzen und dadurch die Anzahl der unabhängigen Klone abzuschätzen, die man zum Durchmustern benötigen würde, um mit mindestens 99%iger Wahrscheinlichkeit CNTF-Klone zu erhalten. Eine ausreichende Menge
35 an doppelsträngiger komplementärer DNA wird, wie von Gubler und Hoffman, 1983, Gene 25:263 beschrieben, synthetisiert und in den Lambda-gem2-Vektor (Promega Biotech) nach Palazzolo und Meyerowitz, 1987, Gene 52:197 eingefügt.

Für Kaninchen-SN-CNTF kodierende Klone werden durch Hybridisierung von rekombinanten Phagenplaques, wie oben beschrieben, identifiziert. Die Identität der Klone wird durch Bestimmung der Nukleotidsequenzen verifiziert, um zu bestimmen, in wie weit sie der gesamten bekannten Proteinsequenz entsprechen. Durchmustern der humanen Ischiasnerv-cDNA-Sonden (Feinberg und Vogelstein, 1983, Anal. Biochem. 132:6), was eine verlässlichere Vorgehensweise zum Nachweis von Kreuzhybridisierung zwischen verschiedenen Arten ist als die Verwendung der kleineren Oligonukleotide, die zum durchmustern der Kaninchen-cDNA-Bibliotheken verwendet wurden.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki, et al., 1988, Science 239:487) wurde zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten verwendet, die Kaninchen-CNTF-Aminosäuresequenzen entsprechen. Solche DNA-Fragmente wurden aus genomischer humaner und Kaninchen-DNA und aus Kaninchenischiasnerv- und sympathischer Ganglion-cDNA amplifiziert. Von den amplifizierten DNA-Fragmenten wurden Subklone hergestellt und die Fragmente wurden mit Standardmethoden sequenziert (Maniatis, et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York).

Die mit PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden auch als Sonden zum Durchmustern einer Kaninchenischiasnerv-cDNA-Bibliothek und einer humanen genomischen DNA-Bibliothek verwendet. Ein positiver Kaninchen-cDNA-Klon und positive humane genomische Klone wurden aufgereinigt und teilweise sequenziert. Die Sequenz des der kodierenden (entspricht mRNA) Sequenz für Kaninchen- oder humanem CNTF entsprechenden offenen Leserahmens bestätigte die Sequenz der DNA-Fragmente des kodierenden Bereichs, der mit PCR erhalten wurde. Die erhaltenen kodierenden Sequenzen für Kaninchen- und humanen CNTF sind in Abbildung 11 bzw. 12 angegeben.

Teile der aus Kaninchen-SN-CNTF erhaltenen Aminosäuresequenz wurden revers in die degenerierten Oligonukleotide Nr. 1, 13, 7 und 12 und ihre Komplementärnukleotide Nr. 3, 14, 8 und 17 translatiert. Die Aminosäure-

sequenz (ganz oben) und der Ort und die Nummerierung der entsprechenden degenerierten Sense- und Antisense-Oligonukleotide (unterhalb) ist unten angegeben:

Z-V-K-H-Q-G-L-N-K-N-I-N-L-D-S-V-D-G-V-P-M-A

5 (5') ****1***** ****13***** *****7***** (3')

(3') ****3***** ****14***** *****8***** (5')

K-L-W-G-L-K-V-L-Q-E-L-S

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

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

10 Die Nukleotidsequenz der Sense-Version jedes der degenerierten Oligonukleotide ist unten angegeben (N entspricht hier einem beliebigen Nukleotid):

Nr.1 5'-TA(T/C) GTN AA (A/G) CA(T/C) CA(A/G) GG -3'

Nr.13 5'-AA(T/C) AA(A/G) AA(T/C) AT(A/T/C) AA (T/C)

15 (C/T)T-3'

Nr.7 5'-GA(T/C) GGN GTN CCN ATG GC-3'

Nr.12A 5'-AA(A/G) TT(A/G)TGG GGN TT(A/G) AA-3'

Nr.12B 5'-AA(A/G) TT(A/G) TGG GGN CTN AA-3'

Nr.12C 5'-AA(A/G) CTN TGG GGN TT(A/G) AA-3'

20 Nr.12D 5'-AA(A/G) CTN TGG GGN CTN AA-3'

Getrennte Polymerasekettenreaktionen wurden mit genomischer DNA entweder vom Menschen oder vom Kaninchen als Matrize und den Oligonukleotiden Nr. 1 und 8 oder Nr. 1 und 17 als Primern durchgeführt, um die entsprechenden Bereiche der humanen bzw. Kaninchen-CNTF-Gene zu amplifizieren. Southern Blots der Reaktionsprodukte (mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid Nr. 13 als Sonde) zeigten, daß markierte Banden mit einer Größe von ca. 66 Basenpaaren (Nr. 1 und 8) und ca. 366 Basenpaaren (Nr. 1 und 17) existieren.

30 Die gleichen, oben beschriebenen PCR-Reaktionen wurden mit aus Kaninchenischiasnerv oder sympathischer Kaninchenganglion-mRNA hergestellter cDNA durchgeführt. RNA wurde aus Kaninchenischiasnerven oder sympathischen Ganglien hergestellt und durch eine Oligo-dT-Säule laufen gelassen, um für Messenger-RNA (mRNA), wie oben beschrieben, zu selektionieren. Komplementäre DNA (cDNA) wurde mit reverser Transkriptase unter Verwendung der mRNA als Matrize und Oligo-dT als Primer hergestellt. Bei

der Durchführung von PCR mit einer der cDNAs als Matrize und einem der Oligonukleotide Nr. 1 und 8 oder Nr. 1 und 17 als Primer wurden Fragmente amplifiziert, die die gleiche Sequenz wie jene hatten, die aus der genomischen Kaninchen-DNA amplifiziert worden waren (Abbildung 11). Dies zeigt, daß in dem für Protein kodierenden Bereich des CNTF-Gens zwischen Oligonukleotiden Nr. 1 und 17 keine intervenierenden Sequenzen (Introns) vorhanden sind.

Eine weitere Strategie wurde verwendet, um mehr der für Kaninchen-CNTF kodierenden (entspricht Messenger-RNA) Sequenz zu erhalten: Doppelsträngige cDNA wurde unter Verwendung von Kaninchenischiasnerv-mRNA als Matrize und einem Oligo-dT/Not I-Linker-Adapter als Primer hergestellt. Anschließend wurde ein EcoRI/XmnI-Linker-Adapter (5'-AATTCGAACCCCTTCG-3') an das 5'-Ende der doppelsträngigen cDNA durch Ligieren der stumpfen Enden (Maniatis, et al., a.a.O.) angefügt. Die Polymerasekettenreaktion wurde unter Verwendung dieser cDNA als Matrize und den Oligonukleotiden Nr. 8 und EcoRI/XmnI-Linker-Adapter als Primer durchgeführt. Ein Southern Blot der Reaktionsprodukte (mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid Nr. 13 als Sonde) zeigte, daß eine markierte Bande mit einer Größe von ungefähr 200 Basenpaaren vorhanden ist.

Um cDNA-Klone für Kaninchen-CNTF zu erhalten, wurde eine cDNA-Bibliothek auf Poly(A)⁺mRNA aus Kaninchenischiasnerv mit den oben beschriebenen Methoden hergestellt, außer daß ein Lambda-gt10-Vektor (Stratagen) anstelle von Lambda-gem2 verwendet wurde. Ungefähr 4×10^6 Plaques dieser Bibliothek wurden unter Verwendung einer Sonde durchgemustert, die durch willkürliches Markieren eines M13-Subklons eines PCR-Fragments hergestellt worden war, das aus sympathischer Kaninchen ganglion-cDNA als Matrize und Oligos Nr. 8 und EcoRI/XmnI-Linker-Adapter als Primer (siehe oben) erhalten worden war. Das einzige primär positive Ergebnis war ein über dreifaches Durchmustern gereinigter Plaque. Auf Verdau mit EcoRI ergab die DNA aus diesem Klon drei Fragmente zusätzlich zu den

Lambda-Armen: ca. 2,0, 1,5 und 0,6 kb lang. Durch Southern-Blot-Analyse wurde gezeigt, daß das 1,5 kb-Fragment mit anderen, oben erwähnten, für CNTF spezifischen Oligonukleotiden und PCR-Fragmenten hybridisiert. Die DNA-Sequenz dieses 1,5 kb-cDNA-Fragments bestätigte, daß es die gesamte kodierende Sequenz für Kaninchen-CNTF enthielt (Abb. 11).

Um genomische DNA-Klone für humanen CNTF zu erhalten, wurden ungefähr 3×10^6 Plaques einer humanen genomischen DNA-Bibliothek mit dem Vektor Lambda EMBL3 mit einer Probe durchgemustert, die durch willkürliches Markieren eines M13-Subklons eines PCR-Fragments hergestellt worden war, das aus humaner genomischer DNA als Matrize und Oligos Nr. 1 und Nr. 17 als Primer (siehe oben) erhalten worden war. Sechs der primär positiven Klone wurden über Plaques durch anschließendes Durchmustern aufgereinigt, und es wurde gefunden, daß diese mit zusätzlichen für CNTF spezifischen Oligonukleotiden und PCR-Fragmenten hybridisieren. Aus einem 0,6 kb langen Bam HI-Restriktionsfragment aus einem der mit Oligo Nr. 13 hybridisierenden Klone wurden Subklone in mit Bam HI geschnittenem M13mp19 hergestellt und das Fragment wurde sequenziert.

Die DNA-Sequenzen der Fragmente, die durch PCR aus Kaninchenmaterial aus dem Kaninchen-cDNA-Klon erhalten wurden, wurden auf der Basis von Bereichen mit überlappender Sequenz zusammengesetzt zur Klonierungs-(entspricht mRNA)sequenz für Kaninchen-SN-CNTF, die in Abb. 11 dargestellt ist. Die DNA-Sequenzen der Fragmente, die durch PCR aus humaner genomischer DNA und aus humanen genomischen Klonen erhalten worden waren, wurden auf der Basis von Bereichen mit überlappender Sequenz zu der kodierenden Sequenz für humanen SN-CNTF zusammengesetzt, die in Abb. 12 dargestellt ist. Die Kaninchen- und humanen Nukleinsäuresequenzen für CNTF sind zu ca. 89% identisch (Abb. 12), was darauf hinweist, daß die Kaninchen- und humanen Sequenzen aus für CNTF kodierenden homologen Genen stammen. Wie in Abb. 11 gezeigt ist, werden Teile der Nukleinsäuresequenzen für Kaninchen-CNTF

durch die Aminosäuresequenzen, die aus aufgereinigtem SN-CNTF erhalten wurden und in früheren Beispielen erwähnt wurden, bestätigt.

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit den oben
5 beschriebenen Matrizen und Primern ausgeführt. Das Schema
für die Reaktionen war wie folgt: Denaturierungszyklus,
1 min bei 95°C; Verschmelzungszyklus, 1,5 min bei 40°C;
und Verlängerungszyklus, 4 min bei 72°C. Die Reaktion
wurde 30 Zyklen lang durchgeführt. Die Reaktionsprodukte
10 wurden Elektrophorese auf 2%igen Agarosegelen unterworfen
und auf Zeta-Bind-Membranen (BioRad, Richmond, CA) zum
Southern Blot übertragen. Um die amplifizierten Anteile
der für CNTF kodierenden Sequenz zu identifizieren, wurde
in den Southern Blots ein radioaktiv markiertes Oligonu-
15 kleotid Nr. 13 verwendet, von dem von der CNTF-Protein-
sequenz bekannt war, daß es zwischen den Oligonukleoti-
den, die in der Reaktion als Primer verwendet worden
waren, liegt. Die nach dem Southern Blot erhaltenen
markierten Banden wurden aus den Originalgelen ausge-
20 schnitten und zum Klonieren durch Auffüllen der Enden mit
dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase (New England
Biolabs, Beverly, MA) in der Gegenwart aller vier dNTPs
und durch Behandlung der DNA mit T4-Polynukleotidkinase
(US Biochemical Corp., Cleveland, OH) und ATP vorbe-
25 reitet. Aus den geeigneten DNA-Stücken wurden dann
Subklone in mit SmaI-geschnittenem M13mp10 Vektor herge-
stellt (dephosphoryliert; erhältlich von Amersham Corp.,
Arlington Heights, IL). Die das Fragment von Interesse
enthaltenden rekombinanten Phagen wurden mit der Vor-
30 gehensweise zum Durchmustern nach Benton & Davis (1977,
Science 196:180) unter Verwendung des radioaktiv markier-
ten Oligonukleotids Nr. 13 als Sonde identifiziert. Diese
rekombinanten Klone wurden angezüchtet, um genügende
Mengen an einzelsträngiger DNA zur Sequenzierung zu
35 erhalten und wurden dann mit der Dideoxymethode sequen-
ziert (Sanger, et al., a.a.O.).

Die Hybridisierungsbedingungen bei langen, will-
kürlich markierten DNA-Sonden waren 5x SSCP,
2x Denhardt's, 2mM EDTA, 0,05% Natriumpyrophosphat,

0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 250 µg/ml Heringssperma-DNA (unspezifischer Konkurrent), pH 8,0. Die Hybridisierung wurde bei 65°C durchgeführt und die Blots bzw. Filter wurden bei 65°C in 0,1x SSCP und 0,1% SDS gewaschen. Die Hybridisierungsbedingungen für kürzere Oligonukleotidsonden waren 6X SSCP, 2X Denhardt's, 2mM EDTA, 0,05% Natriumpyrophosphat, 0,1% SDS, 100 µg/ml Hefe-tRNA (unspezifischer Konkurrent), pH 8,0. Die Temperatur der Hybridisierung und die Bedingungen für das Waschen der Blots und der Filter wurden individuell an den GC-Gehalt des jeweiligen Oligonukleotids angepaßt (Maniatis et al., a.a.O.).

Beispiel 5

Expression der für SN-CNTF kodierenden Gene in tierischen Zellen

Die folgenden Schritte sind für die Expression von SN-CNTF in tierischen Zellen erforderlich:

- a. Konstruktion eines Expressionsvektors;
- b. Auswahl einer Wirtszelllinie;
- c. Einführung des Expressionsvektors in Wirtszellen;

und

- d. Manipulation der rekombinanten Wirtszellen, um das Expressionsniveau von SN-CNTF zu erhöhen.

(a) SN-CNTF Expressionsvektoren, die für die Verwendung in tierischen Zellen konstruiert wurden, können mehreren Typen angehören, einschließlich Konstrukte mit starker konstitutiver Expression, Konstrukte mit induzierbaren Genen und auch solche Vektoren, die zur Expression in bestimmten Zelltypen konstruiert wurden. In allen Fällen werden Promotoren und andere genregulierende Regionen wie Enhancer (gegebenenfalls induzierbar) und Polyadenylierungssignale an der geeigneten Stelle in bezug auf die cDNA-Sequenzen in Vektoren auf Plasmidbasis platziert. Es folgen zwei Beispiele solcher Konstrukte:

(1) Ein Konstrukt mit einem starken konstitutiven Promotorbereich sollte unter Verwendung der genetischen Kontrollsignale des Simian Virus 40 (SV40) in einer

Anordnung hergestellt werden, wie sie in dem von Gorman et al. in Mol. Cel. Biol. 2:1044-1051, 1982, was hier spezifisch durch Bezugnahme mit einbezogen ist, beschriebenen Plasmid pSV2CAT zu finden ist. Dieses Plasmid sollte in einer solchen Weise manipuliert werden, daß die für Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) kodierenden Sequenzen durch die SN-CNTF-cDNA unter Verwendung von molekularbiologischen Standardmethoden (Maniatis et al., siehe oben) ersetzt werden. (2) Ein induzierbares Genkonstrukt sollte unter Verwendung des Plasmids PMK hergestellt werden, das den Promotorbereich für Maus-Metallothionein (MT-1) enthält (Brinster et al., Cell 27:228-231, 1981). Dieses Plasmid kann als Ausgangsmaterial verwendet werden und sollte so manipuliert werden, daß man ein mit Metall induzierbares Genkonstrukt erhält.

(b) Eine Anzahl von tierischen Zelllinien sollte für die Expression von SN-CNTF unter Verwendung der oben beschriebenen Vektoren verwendet werden, um aktives Protein zu produzieren. Zwei potentielle Zelllinien, die in bezug auf ihre Fähigkeit, die Expression von Fremdgengen zu fördern, gut charakterisiert wurden, sind Maus-Ltk⁻-Zellen und Chinese Hamster Ovary (CHO)-dhfr⁻-Zellen, wobei jedoch die Expression von SN-CNTF nicht auf diese Zelllinien beschränkt ist.

Tierische Zelllinien, die außer den oben erwähnten zur Expression verwendet werden können, schließen die Affennierenzelle COS-7, die zur vorübergehenden Expression von Nutzen ist, und die humane embryonale Nierenzelle 293 mit ein.

(c) Vektoren-DNA sollte in diese Zelllinien unter Verwendung einer Anzahl von Genübertragungsmethoden eingeführt werden. Die hier eingesetzte Methode verwendet u.a. die Calciumphosphat-DNA-Fällungsmethode, die von S.L. Graham und A.S. van der Eb (Virology 52:456-467, 1973) beschrieben wurde und bei der der Expressionsvektor für SN-CNTF zusammen mit einem zweiten Expressionsvektor, der einen selektionierbaren Marker kodiert, ausgefällt wird. Im Falle der Transfektion von Ltk⁻-Zellen ist der

selektionierbare Marker ein Thymidinkinasegen und die Selektion findet wie bei Wigler et al. in Cell 16:L777-785, 1979 beschrieben statt, und im Fall von CHO-dhfr⁻-Zellen ist der selektionierbare Marker Dihydrofolatreduktase (DHFR), dessen Selektion, wie bei Ringold et al. in J. Mol. Appl. Genet. 1:165-175, 1981 beschrieben, stattfindet.

(d) Zellen, die die SN-CNTF-Genkonstrukte exprimieren, sollten dann unter Bedingungen gezüchtet werden, die das Niveau der SN-CNTF-Produktion erhöhen. Zellen, die die Konstrukte mit Metallothionein-Promotor tragen, können nun in der Gegenwart von Schwermetallen wie Cadmium gezüchtet werden, was zu einer 5fach erhöhten Verwendung des MT-1-Promotors führen wird (Mayo et al., Cell 29:99-108), was anschließend zu einem vergleichbaren Anstieg des SN-CNTF-Proteinniveaus führt. Zellen, die SN-CNTF-Expressionsvektoren (basierend entweder auf SV40 oder MT-1) zusammen mit einem DHFR-Expressionsvektor enthalten, können dem von Ringold et al. in J. Mol. Appl. Genet. 1:165-175, 1981 beschriebenen Genamplifikationsprotokoll unter Verwendung von Methotrexat, einem kompetitiven Antagonisten von DHFR, unterzogen werden. Dies führt zu mehr Kopien der in den Zellen vorhandenen DHFR-Gene und gleichzeitig zu vermehrten Kopien der SN-CNTF-Gene, was seinerseits dazu führen kann, daß von den Zellen mehr SN-CNTF-Protein produziert wird.

Ein zusätzlicher Expressionsvektor, pCMVXVPL2, wurde zur vorübergehenden Expression der für Kaninchen-CNTF kodierenden Sequenz in COS-7-Zellen verwendet. Dieser Plasmidvektor enthält den ganz frühen Promotor und Enhancer des Cytomegalovirus (CMV), wie von Boshart et al. (Cell 41:521-530, 1985) beschrieben. Dieses Plasmid kann, wie in Abbildung 13 gezeigt, konstruiert werden. Das Polyadenylierungssignal wird von Simian Virus 40 (SV40)-Sequenzen (Kartenkoordinaten 2589-2452; siehe Reddy et al., Science 200:494-502, 1978) zur Verfügung gestellt. Der Origin der Replikation von SV40 ist in dieses Plasmid mit eingebaut, um seine Verwendung in COS-Zellen für Assays der vorübergehenden Expression

zu erleichtern.

Kaninchen-SN-CNTF wurde in COS-7-Zellen wie folgt vorübergehend exprimiert: Von dem 1,5 kb langen Eco RI-Restriktionsfragment eines cDNA-Klons aus Kaninchen-
5 ischiasnerv, das die gesamte für Kaninchen-SN-CNTF kodierende Region enthielt (Beispiel 4) wurden Subklone in dem mit Eco RI geschnittenen Vektor pCMVXVPL2 hergestellt. Ein einziger Klon wurde selektioniert, bei dem nach Verdau mit Sac I und Bam HI Restriktionsfragmente
10 erhalten wurden, die die für das Einfügen des 1,5 kb langen Fragments in den Vektor in der richtigen Orientierung zur CNTF-Expression vorausgesagte Größe hatten. Plasmid-DNA aus diesem Konstrukt wurde mit der Methode der alkalischen Lyse mit nachfolgender CsCl-Dichtezentrifugation (Maniatis et al., a.a.O.) präpariert. Diese DNA
15 wurde in COS-7-Zellen mit der Methode von Sompayrac und Danna (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 78:7575-7578, 1981) übertragen. Zur Kontrolle wurden entsprechende COS-Zellkulturen mit Plasmidvektor-DNA ohne Insert
20 transfiziert.

Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden das überstehende Medium und die Zellpellets geerntet. Die Zellpellets wurden durch eine kurze Ultraschallbehandlung auf Eis in 20 mM Natriumphosphat,
25 pH 6,7, mit 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 0,1 μ M Pepstatin extrahiert. Verdünnungsreihen sowohl des Zellextrakts als auch des überstehenden Mediums aus jeder Kultur wurden auf Aktivität im Überlebensassay des Ziliarganglions untersucht.

Die Zellextrakte aus Kulturen, die mit Vektor mit dem CNTF-cDNA-Fragment transfiziert worden waren, hatten einen Titer von ca. 15 000 TU/ml in dem Bioassay und ungefähr 50 ng/ml an CNTF, wie durch Western-Blot-Analyse
30 bestimmt wurde. Weder die Zellextrakte aus lediglich mit Vektor transfizierten Kulturen noch das überstehende
35 Medium aus jeglicher Kultur zeigte irgendeine nachweisbare Bioaktivität oder CNTF-Protein in einer Western-Blot-Analyse. Dieses Ergebnis zeigt klar, daß die von uns klonierte CNTF-cDNA für ein Protein mit der erwarteten

Bioaktivität des authentischen SN-CNTF kodiert.

Beispiel 6

Aufreinigung von SN-CNTF aus rekombinanten tierischen Zellen

5 Da von SN-CNTF erwartet wird, daß er von Zellen wie das natürliche Material synthetisiert wird, wird es erwartet, daß die oben beschriebenen Methoden zur Aufreinigung des natürlichen Proteins eine ähnliche Aufreinigung und Charakterisierung des rekombinanten Proteins
10 erlauben werden.

Es ist für Fachleute offensichtlich, daß verschiedene Modifikationen und Veränderungen bei den Verfahren und Produkten der vorliegenden Erfindung gemacht werden können. Die vorliegende Erfindung soll
15 daher die erfindungsgemäßen Modifikationen und Veränderungen mit einbeziehen, vorausgesetzt, daß sie in den Schutzbereich der beigefügten bzw. gleichwertiger Ansprüche fallen. Außerdem soll der Begriff SN-CNTF die Herkunft von jeglichen Spezies umfassen, außer der
20 Bezeichnung ist eine spezifische Artsherkunft unmittelbar vorangestellt.

Beispiel 7

Herstellung von rekombinantem humanem CNTF

Als eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde ein System zur Herstellung von rekombinantem
25 humanem CNTF in dem Bakterium Escherichia coli etabliert. Zwei alternative Methoden für die Konstruktion der zu exprimierenden DNA und zwei verschiedene Expressionsvektoren wurden verwendet. Alle diese Expressionssystemvarianten produzieren lösliches CNTF-Protein in
30 einer hohen Ausbeute, das in dem Bakterienzellextrakt biologisch aktiv ist. Die Methoden zur Etablierung dieser Produktionssysteme sind unten beschrieben. Wir bitten, im folgenden zu beachten, daß die in Klammern angegebene
35 Position eines charakteristischen Merkmals (z.B. [233]) sich auf die Anzahl von Basen bezieht, bei der das charakteristische Merkmal downstream des A [1] in dem ATG-Startkodon in der humanen kodierenden Sequenz für CNTF beginnt (Abb. 12).

1. Herstellung von DNA zur Expression von CNTF;
Strategie 1 zur Konstruktion des 5'-Endes (Abb. 14): Der humane genomische DNA-Klon für CNTF im Phagen Lambda EMBL3 aus Beispiel 4 wurde mit den Restriktionsenzymen Sal I und Hind III verdaut und ein 4,3 kb langes Fragment, das die für CNTF kodierenden Sequenzen upstream der Hind III-Stelle [233] enthält, wurde über ein Gel aufgereinigt. Dieses 4,3 kb lange Fragment enthält ebenso ein einzelnes, ungefähr 1,3 kb langes Intron [114-115] in der kodierenden Sequenz. Um eine Expression in Bakterienzellen zu erlauben, wurde das Intron durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung eines synthetischen Oligonukleotids in vitro wie von J.A. McClary, F. Whitney, J. Geisselsoder (1989) Biotechniques 7:282-289 beschrieben, entfernt.

A. Deletion des Introns durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung eines Phagemidvektors und genetischer Selektion

Ortsspezifische Mutagenese wurde zur Deletion des ca. 1,3 kb langen Introns in dem 4,3 kb langen Sal I/Hind III-DNA-Fragments, von dem in einem Phagemidvektor, Bluescript SK M13(-) (Stratagen), Subklone hergestellt worden waren, durchgeführt. Dieser Vektor wurde gewählt, da er das große (ca. 4,3 kb) Sal I/Hind III-Insert aufnehmen kann. Phagemidvektoren sind Plasmidvektoren, die die Intergenregion aus Bakteriophage ϕ 1 enthalten, die es erlaubt, einzelsträngige DNA zu gewinnen. Zusätzlich haben Phagemidvektoren eine Anzahl von Vorteilen gegenüber einzelsträngigen M13-Bakteriophagenvektoren. Da die Phagemids weniger als halb so groß wie M13-Vektoren sind, die weniger als ca. 2,3 kb große Inserts vorziehen, können Subklone von größeren Inserts leichter in Phagemids hergestellt werden und die Wahrscheinlichkeit spontaner Deletion ist verringert. Ein anderer Vorteil von Phagemids ist es, daß die Inserts direkt von doppelsträngiger Supercoil-DNA sequenziert werden können, wodurch ihre Charakterisierung vereinfacht wird.

Die Mutagenese wurde mit dem Muta-Gene in Vitro Mutagenesis Kit von BioRad ausgeführt. Die Wirtszelle zur

Herstellung der Matrize für die Mutagenese ist der E. coli-Stamm CJ236 (Genotyp: dut, ung, thi, rel A1, pCJ105 [cap^r]). CJ236 trägt einen mit Chloramphenicol selektierbaren F'-Faktor, und macht es so möglich, 5 einzelsträngige Phagemid-DNA mit einem geeigneten Helferphagen zu gewinnen, wobei R408 in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die gewonnene einzelsträngige Phagemid-DNA ist teilweise mit Uracil substituiert, was auf die dut (dUTPase)- und ung (Uracil-N-Glycosylase)-Mutation in 10 CJ236 zurückzuführen ist. Mit Uracil substituierte und zur Mutagenese verwendete Matrizen-DNA wird selektiv zerstört, wenn sie in Wirtszellen transformiert wird, die Wildtyp ung-Loci enthalten, wie in diesem Fall DH5 α , und erlaubt so die bevorzugte Replikation der neu synthetisierten, mutierten DNA. 15

Um die Mutagenese auszuführen, wurde das über ein Gel aufgereinigte 4,3 kb lange Sal I/Hind III-Fragment in mit Sal I/Hind III verdauten und über ein Gel aufgereinigten Bluescript SK M13(-) ligiert. Die ligierte DNA 20 wurde in CJ236 eingeführt, der nach der in J. Mol. Biol. 166:557 (1983) beschriebenen Methode von Hanahan kompetent gemacht worden war. Auf Platten mit 50 μ g/ml Ampicillin (um für das Phagemid zu selektionieren) und 30 μ g/ml Chloramphenicol (um für den erhaltenen F'-Faktor 25 zu selektionieren) wurde für Transformanten selektioniert. Die Transformanten wurden auf das Vorhandensein des richtigen Inserts durch Restriktionsenzymanalyse der transformierten DNAs untersucht. Eine Transformante, die das richtige Insert trug (pSHM-D19), wurde im darauffolgenden Mutageneseexperiment verwendet. 30

Einzelsträngige Matrize aus pSHM-D19 wurde mit dem Phagen R408 als Helferphagen gewonnen. pSHM-D19 enthaltender CJ236 wurde in Luria-Broth mit Ampicillin (50 μ g/ml) und Chloramphenicol (30 μ g/ml) bis zu einer 35 A₆₀₀ von ca. 0,3 angezüchtet. Die Zellen wurden mit dem Helferphagen R408 bei einer Multiplizität der Infektion von 20 infiziert und dann 8-14 Stunden bei 37°C geschüttelt. Einzelsträngige Matrize wurde aus den gewonnenen Phagemids extrahiert.

Ortsspezifische Mutagenese durch Introndeletion wurde mit einem 71 Basen langen Oligonukleotid (Oligonukleotid 1 in Abbildung 16) durchgeführt. Die Basen 1-30 von Oligonukleotid 1 sind unmittelbar downstream des aus der genomischen CNTF-DNA zu deletierenden Introns (3') komplementär zum kodierenden Strang und die Basen 31-71 unmittelbar upstream (5'). Zur Verwendung in Mutagenesereaktionen wurde das Oligonukleotid mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die Mutagenesereaktionen unter Verwendung des BioRad MutaGene Kits wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, außer daß die DNA von den Mutagenesereaktionen zur Transformation von *E. coli* Stamm DH5 α verwendet wurde. Deletionsmutanten wurden durch Restriktionsenzymkartierung der DNAs und DNA-Sequenzierung von doppelsträngigen DNAs aus Mutanten mit den entsprechenden Restriktionskarten charakterisiert. pMCN-21 war eine korrekt deletierte Mutante ohne Intron in dem Bluescript-Phagemid.

B. Rekonstruktion des 5'-Endes des CNTF-Gens zur Expression

Das 5'-Ende der für CNTF kodierenden Sequenz wurde rekonstruiert, um einige Veränderungen vorzunehmen, die die Aminosäuresequenz, die kodiert wird, nicht verändern, aber die wahrscheinlich die Effizienz der Expression in Bakterien steigern. Die teilweise überlappenden komplementären Oligonukleotide 2 und 3 (Abb. 16) wurden synthetisiert, über ein Gel aufgereinigt und miteinander verschmolzen. Oligonukleotid 2 kodiert für die im humanen CNTF upstream der Nhe I-Stelle [66] vorhandenen Aminosäuren. Die kodierende Sequenz von Oligonukleotid 2 enthält mehrere Basen, die sich von den im humanen Gen vorhandenen unterscheiden (vergleiche Abb. 12 und 16). Diese Veränderungen wurden entweder deshalb vorgenommen, um die humane Verwendung von Kodons zu der von vorzugsweise *E. coli* verwendeten zu ändern (nach deBoer und Kastelein in From Gene to Protein: Steps Dictating the Maximal Level of Gene Expression (1986) Davis und Reznikoff, Hrsg., S. 225-238, Butterworths, NY) oder um eine Bgl II-Stelle zu erzeugen (Abb. 16), die in

die Sequenz eingefügt wurde, um anschließende genetische Manipulationen zu erleichtern. Oligonukleotid 2 kodiert auch für einen Translationskoppler zum 5'-Ende hin (Abb. 16), um eine effektive Translation zu fördern. Die verschmolzenen Oligonukleotide 2 und 3 haben einen Bam HI-Überhang am 5'-Ende und einen Nhe I-Überhang am 3'-Ende, um das nachfolgende Ligieren und Klonieren zu erleichtern (Abb. 14 & 16). Eine Analyse der DNA-Sequenz des humanen CNTF-Gens mit Restriktionsenzymen zeigte eine einzelne Nhe I-Erkennungssequenz [66] (Abb. 12). Daher wurden die Oligonukleotide 2 und 3 mit einem Nhe I-Überhang konstruiert, um zu erlauben, daß sie mit dem verbleibenden 3'-Fragment des Gens, nach Verdau mit Nhe I, verbunden werden.

15 C. Verbinden der Oligonukleotide 2 und 3 mit den von Introns befreiten kodierenden Sequenzen

Die Oligonukleotide 2 und 3, die das wiederhergestellte Aminoende des CNTF-Gens enthielten, wurden miteinander verschmolzen und mit mit Nhe I geschnittenem pMCN-2a ligiert. Ligierte DNA wurde dann mit Bam HI und Hind III verdaut, um das als CNTF-Syn1 bezeichnete DNA-Fragment freizugeben, das zur Expression in E. coli geeignete DNA-Sequenzen enthält, die für humanen CNTF upstream der Hind II-Stelle [233] kodieren.

25 Strategie 2 zur Konstruktion des 5'-Endes (Abb. 15): eine alternative Strategie wurde durchgeführt, bei der das Intron nicht durch ortsspezifische Mutagenese entfernt wurde, sondern dafür eine insgesamt synthetische DNA-Sequenz, die für CNTF upstream der Hind III-Stelle [233] kodiert, hergestellt wurde, jedoch ohne das Intron. Um dieses synthetische DNA-Konstrukt zu bilden, wurden die Oligonukleotide 5 bis 10 in Abb. 17 synthetisiert. Die folgenden Oligonukleotide wurden als teilweise überlappende, doppelsträngige Paare konstruiert: 5&6, 7&8, 9&10. Jedes doppelsträngige Paar enthält einzelsträngige Überhänge, die so konstruiert sind, daß sie erlauben, daß 5&6-7&8-9&10 in dieser Ordnung miteinander ligiert werden. Die Oligonukleotide wurden über ein Gel

aufgereinigt, verschmolzen und miteinander zu einem einzigen, 261 Basenpaar langen, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid ligiert, das als CNTF-Syn2 bezeichnet wird. Diese synthetische DNA enthielt außerdem:

- 5 (1) geänderte Kodons, um der bevorzugten Verwendung von Kodons durch E. coli Genüge zu tun (vergleiche Abb. 12 und 17); (2) den oben verwendeten 5'-Translationskoppler (Abb. 16 und 17); und (3) einen 5'-Bam HI-Überhang und einen 3' Hind III-Überhang, um das Ligieren und Klonieren
10 zu erleichtern (Abb. 17).

Herstellung des 3'-Endes des Expressionskon-
strukts (Abb. 14 oder 15): Der CNTF-Klon mit humaner genomischer DNA im Phagen Lambda EMBL3 aus Beispiel 4 wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten und
15 ein 2,1 kb langes Fragment, das die für CNTF kodierenden Sequenzen downstream der Hind III-Stelle [233] enthält, wurde über ein Gel aufgereinigt. Dieses 2,1 kb lange Fragment wurde in das mit Hind III geschnittene Plasmid pEMBL8 (Dente et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:1645)
20 kloniert. Eine Spe I-Stelle [613] wurde in die 2,1 kb lange Insert-DNA durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese 13 Basenpaare downstream des Stopkodons, das die CNTF-Sequenz beendet, unter Verwendung des synthetischen Oligonukleotids 4 eingefügt (Abb. 16). Das mutierte
25 Plasmid wurde mit Hind III und Spe I geschnitten, um das kodierende downstream-Fragment freizugeben, das im Gel aufgereinigt wurde und als CNTF-Syn3 bezeichnet wird (enthält die kodierenden Sequenzen für humanen CNTF downstream der Hind III-Stelle [233]).

30 Herstellung des vollständigen Expressionskon-
strukts: CNTF-Syn1 wurde mit CNTF-Syn3 zu CNTF-Syn1/3 ligiert (Abb. 14) und CNTF-Syn2 wurde mit CNTF-Syn3 zu CNTF-Syn2/3 ligiert (Abb. 15), um zwei alternative DNA-Fragmente zu konstruieren, von denen jedes für humanen
35 CNTF kodiert und geeignete Modifikationen der DNA-Sequenz besitzt, um eine effiziente Expression in E. coli zu fördern. Diese DNA-Fragmente wurden dann in E. coli exprimiert, nachdem in: (A) einem bakteriellen Expressionsvektor pT5T, basierend auf dem T7-Phagenpromotor;

oder (B) einem bakteriellen Expressionsvektor, pT3XI-2, basierend auf einem Hybridpromotor aus dem Lactose- und Tryptophanoperon ('Tac'), Subklone hergestellt worden waren.

- 5 2. Expression von CNTF unter Verwendung eines auf dem "T7-Promotor"-System basierenden Expressionsvektors (Die charakteristischen Merkmale des Vektors sind Abb. 17 zu entnehmen):

10 A. Beschreibung von pT5T

Der auf T7-Promotor basierende Expressionsvektor pT5T ist im wesentlichen der gleiche wie pJU1003, der von Squires et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:16297-16302 beschrieben wird, außer daß zwischen der einzigen Bgl II-Stelle 5' vom T7-Promotor und der Cla I-Stelle im Tetracyclinresistenzgen ein kurzes Stück DNA vorhanden ist. Die Sequenz dieser DNA ist:

ATCGATGATA AGCTGCAAA CATGAGAATT GAGTCCCCG GAGATCCTTA
GCGAAGCTA

20 Cla I

AGGATTTTTT TTAGATCT

Bgl II

B. Konstruktion des vollständigen Expressionsvektors

25 Der über ein Gel aufgereinigte Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Spe I linearisiert. CNTF-Syn1/3 wurde mit dem linearisierten Vektor vermischt und zum Expressionskonstrukt pT5T:CNTF-Syn1/3 ligiert. (Allgemeiner Abriß der Vektorkonstruktion, siehe Abb. 14).

30 C. Expression von rekombinantem humanem CNTF in E. coli

pT5T:CNTF-Syn1/3 wurde in den E. coli Stamm BL21 (DE3) zur Expression transformiert. Dieser Stamm, der bei Studier und Moffat J. Mol. Biol. (1986) 189:113-130 beschrieben ist, enthält das T7-RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des durch IPTG induzierbaren lac-Promotors auf einem nicht ausschneidbaren lysogenen Lambda-Bakteriophagen. Unter 10 durchgemusterten Transformanten wurden

2 Klone gefunden, die ein durch IPTG induzierbares Protein exprimierten, das mit einem Molekulargewicht im CNTF entsprechenden Bereich wandert (ca. 24 kD). Diese beiden Klone wurden als pT5T:CNTF-Syn1/3-5a und 5c bezeichnet. Die Sequenzierung der DNA von pT5T:CNTF-Syn1/3-5a und 5c bestätigte, daß die Sequenzen der Rekombinanten korrekt waren.

Ein hohes Expressionsniveau an rekombinantem CNTF wurde dadurch erzielt, daß man die Zellen in Luria-Broth mit 15 µg/ml Tetracyclin bis zu einer Zelldichte wachsen ließ, die einer A₆₀₀ von 0,5-0,8 entsprach. Die Zellen wurden 1,5-4 Stunden entweder ohne IPTG ("uninduziert") oder mit Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1,0 mM ("induziert") wachsen gelassen. IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) ist ein Induktor des lac-Operons, dessen Gegenwart zu einer indirekten Aktivierung der T7-Polymerase des Expressionsvektors und einem erhöhten Niveau der CNTF-Expression führen sollte.

D. Analyse exprimierten Proteins durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit nachfolgender Färbung mit Coomassie-Farbstoff oder Immunoblot

Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation geerntet und direkt in Probenpuffer für das SDS-Polyacrylamidgel (0,025% Bromphenol blau, 10% Glycerin, 1% β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8) gelöst und 2 min lang gekocht (Abb. 20 und Abb. 21). Bei mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformierten und mit IPTG 2 Stunden induzierten Zellen (Bahn 5, Abb. 20) ist eine mit Coomassie-Farbstoff dunkel angefärbte Bande vorhanden, die in der für CNTF erwarteten Position (ca. 24 kD) verläuft. Läßt man die Zellen ohne IPTG wachsen, (Bahn 4, Abb. 20), ist viel weniger dieser Bande vorhanden, wie dies für ein Protein zu erwarten ist, dessen Expression unter der Kontrolle des lac-Operons steht. Mit dem Vektor pT5T ohne ein CNTF-Insert transformierte Zellen zeigen diese Bande nicht, weder induziert (Bahn 3, Abb. 20) noch uninduziert (Bahn 2, Abb. 20). Bahn 1 enthält Molekulargewichtsstandards.

Ein identisches SDS-Polyacrylamidgel wurde auf Nitrocellulose übertragen und einem Immunoblot mit affinitätsaufgereinigten Antikörpern gegen CNTF-Peptid A (E-S-Y-V-K-H-Q-G-L-N-K-N) unterzogen. Bei mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformierten und mit IPTG 2 Stunden induzierten Zellen (Bahn 5, Abb. 21) ist eine dichte, von affinitätsaufgereinigten Antikörpern gegen CNTF-Peptid A erkannte Bande vorhanden, die an der für CNTF erwarteten Stelle verläuft (ca. 24 kD). Läßt man die Zellen ohne IPTG wachsen, (Bahn 4, Abb. 21), ist viel weniger dieser Bande vorhanden. Mit dem Vektor pT5T ohne ein CNTF-Insert transformierte Zellen zeigen diese Bande nicht, weder induziert (Bahn 3, Abb. 20) noch uninduziert (Bahn 2, Abb. 20). Bahn 1 enthält Molekulargewichtsstandards.

Außerdem wurden die mit pT5T:CNTF-Syn1/3-5a transformierten und mit IPTG 2 Stunden induzierten Zellen durch dreifachen Durchgang durch eine French-Druckzelle aufgeschlossen. Ein Aliquot des Zellrohlysats wurde durch Zentrifugation bei 20 000 UpM in einem JA-20-Rotor (Beckman) für 15 min in die Überstands- bzw. Pelletfraktion aufgetrennt. Aliquots des Rohlysats, der Überstands- und der Pelletfraktion, die der gleichen Menge an Ausgangssuspension der Zellen entsprachen, wurden auch auf demselben SDS-Polyacrylamidgel laufengelassen, auf Nitrocellulose übertragen und einem Immunoblot mit affinitätsaufgereinigten Anti-Peptid A-Antikörpern unterzogen. Der Überstand des Lysats (Bahn 8, Abb. 21) enthielt viel mehr immunreaktiven CNTF als das Pellet des Lysats (Bahn 9, Abb. 21). Das CNTF-Niveau im Überstand war dem im nicht fraktionierten Lysat vergleichbar (Bahn 7, Abb. 21).

E. Bioaktivität von exprimiertem CNTF

Durch kurze Zentrifugation geerntete Zellen wurden in 20mM Tris-HCl, pH 8,2, mit 1/35 des ursprünglichen Volumens der Zellsuspension resuspendiert, durch einen dreifachen Durchgang durch eine French-Druckzelle aufgeschlossen und das Zellrohlysate in Überstands- bzw. Pelletfraktion durch Zentrifugation bei 20 000 UpM im JA-20-Rotor (Beckman) für 15 min aufgetrennt. Eine Verdün-

nungsreihe der Überstandsfraction der Zellen wurde auf ihre Fähigkeit getestet, das Überleben von Nervenzellen des Ziliärganglions zu fördern (wie in Beispiel 1 beschrieben). Der Überstand zeigte eine signifikante Bioaktivität bis zu einer Verdünnung von 1:1 000 000 (Abb. 22). Die spezifische Aktivität von rekombinantem humanem CNTF wurde auf ungefähr 275/TU/ng geschätzt, basierend auf der Bioaktivität und der von Immunoblots geschätzten Länge an CNTF-Protein. Diese spezifische Aktivität ist ungefähr doppelt so groß wie die spezifische Aktivität des aufgereinigten Kaninchen-CNTF-Proteins, was darauf hinweist, daß der rekombinante CNTF im bakteriellen Zellextrakt biologisch aktiv ist. Lysate von mit pT5T ohne ein CNTF-Insert transformierten Zellen zeigten keine nachweisbare Bioaktivität.

Der Überstand wurde auch auf einem reduzierenden, 15%igen Polyacrylamid-SDS-Gel Elektrophorese unterzogen und in 1 mm breite Streifen geschnitten, die über Nacht in Zellkulturmedium bei 4°C unter Schwenken extrahiert wurden und einem Bioassay, wie in Beispiel 1 beschrieben, unterzogen wurden. Das Nebenbild in Abbildung 22 zeigt, daß bei Fraktionen, die, wie für CNTF erwartet, 24 kD entsprechen, ein Peak der Bioaktivität vorhanden ist.

25 F. Aminosäuresequenz von exprimiertem CNTF

Der Bereich um 24 kD wurde aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, das dem für Abb. 20 laufen gelassenen ähnlich war, jedoch ohne Coomassie-Färbung. Dieses Material wurde durch Edman-Abbau in einem Protein-Sequenator von Applied Biosystems sequenziert (wie in Beispiel 2 beschrieben). Die folgende Aminosäuresequenz wurde erhalten:

35 AFTEHSPLTPHRRDL[?]S... . Das Fragezeichen entspricht einem C in der humanen Sequenz (Abb. 12), das mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden kann. Diese Sequenz entspricht der für humanen CNTF erwarteten (Abb. 12) und ist ein zusätzlicher Beweis dafür, daß CNTF richtig exprimiert wird. Sie weist auch darauf hin, daß das amino-terminale Methionin während der Expression entfernt

wird, wobei Alanin als die amino-terminale Aminosäure in dem exprimierten Protein verbleibt.

Das obige Ergebnis zeigt, daß immunologisch kreuzreaktiver CNTF mit einem hohen Niveau in einer biologisch aktiven Form exprimiert wurde, die größtenteils nach Lyse der bakteriellen Zellen löslich ist.

3. Expression von CNTF unter Verwendung eines Expressionsvektors, der auf einem Hybrid-promotor-('Tac')-System aus dem Lactose- und dem Tryptophan-Operon basiert (charakteristische Merkmale des Vektors, siehe Abb. 19)

A. Beschreibung von pT3XI-2 (Modifikation von pKK223-3)

Das Ausgangsplasmid für diese Konstruktion war das von Pharmacia erworbene Plasmid pKK223-3. Das Plasmid pKK223-3 trägt einen Teil des Gens für Tetracyclinresistenz. Dieses nicht funktionierende Gen wurde durch ein vollständiges Tetracyclinresistenzgen ersetzt, das von dem Plasmid pBR322 getragen wird. Das Plasmid pKK223-3 wurde mit Sph I vollständig verdaut, und teilweise mit Bam HI. Ein 4,4 Kilobasenpaar langes Fragment wurde im Gel aufgereinigt und mit einem synthetischen Adapter mit der Sequenz:

```
5'      GATCTAGAATTGTCATGTTTGACAGCTTATCAT   3'
3'      ATCTTAACAGTACAAACTGTCGAATAGTAGC     5'
```

und einem 539 Basenpaare langen Fragment DNA aus einem Cla I, Sph I-Verdau des Tetracyclinresistenzgens aus pBR322 (PL Biochemicals, 27-4891-01) verbunden. Das resultierende Plasmid wurde als pCJ1 bezeichnet.

Als nächstes wurde ein von New England Biolabs erworbener Xho I-Linker in die Pvu II-Stelle des Plasmids pCJ1 eingefügt, so daß das Plasmid pCJX-1 gebildet wurde. Dieses eingeschobene Stück unterbricht das rop-Gen, das die Kopienzahl des Plasmids steuert. Ein Eco RI-Fragment, das das lac I-Gen enthält, wurde aus dem Plasmid pMC9 [Calos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80:3015-3019] aufgereinigt und dann in die Xho I-Stelle eingefügt mit Adaptern (Xho I zu Eco RI) mit der Sequenz:

5' TCGAGTCTAGA . . . 3'
3' CAGATCTTTAA 5'

Die Polylinker-Sequenz zwischen den Eco RI- und Pst I-Stellen im Plasmid pKK223-3 wurde als nächstes mit der hier gezeigten Polylinker-Sequenz ersetzt:

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

Der so erhaltene Plasmidvektor wird als pCJXI-1 bezeichnet.

Schließlich wurde das Tetracyclinresistenzgen durch ein ähnliches Gen ersetzt, in dem die Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme Hind III, Bam HI und Sal I durch Mutagenese mit Bisulfit zerstört worden waren. Die folgende Vorgehensweise wurde verwendet, um das Tetracyclinresistenzgen von pBR322 zu mutieren. Das Plasmid pBR322 wurde mit Hind III geschnitten und dann einer Mutagenese mit Natriumbisulfit unterzogen [Shortle und Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 5:2170-2174].

Die durch Mutagenese veränderte DNA wurde zu einer ringförmigen DNA ligiert und dann mit Hind III geschnitten, um alle Plasmide zu linearisieren, die der Mutagenese entgingen. E. coli JM109 [Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 33:103-119] wurde mit dem Plasmid transformiert und dann auf Selektivmedien ausplattiert. Aus tetracyclinresistenten Kolonien wurden Plasmide isoliert und auf den Verlust der Hind III-Stelle im Tetracyclinresistenzgen überprüft. Das erfolgreich mutierte Plasmid wurde mit pT1 bezeichnet. Zur Mutagenese der Bam HI-Stelle in pT1 wurde ein ähnliches Verfahren verwendet, was das Plasmid pT2 ergab. Das Plasmid pT2 wurde seinerseits einer Mutagenese unterzogen, um die Sal I-Stelle zu entfernen, wobei das Plasmid pT3 gebildet wird. Ein das mutierte Tetracyclinresistenzgen tragendes Cla I/Bam I-Fragment von pT3 wurde isoliert und dazu verwendet, das homologe Fragment von pCJXI-1 zu ersetzen, um pT3XI-2 zu bilden. Das mutierte Tetracyclinresistenzgen kodiert immer noch für ein funktionierendes Protein.

C. Bildung von pT3XI-2- ϕ 10TC3FGFsyn (Herstellung des Vektors mit tac-Promotor für CNTF)

5 Zunächst wurde ein "Gen" für basischen Fibro-
blastenwuchsfaktor (bFGF) synthetisiert. Dieses "Gen"
kodiert für die gleiche Sequenz, wie die von Sommer
et al., (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 141:67) für
10 FGF berichtete, aber verwendet Kodons, die man vorzugs-
weise in stark exprimierten Genen bei E. coli findet. Die
Struktur dieses Gens ist solchermaßen, daß dem kodieren-
den Anteil [?] vorangestellt ist (siehe Squires et al.,
1988, a.a.O.), um einen effizienten Translationsstart zu
10 gewährleisten.

Das synthetische FGF-Gen wurde zunächst in
M13mp18 zwischen den Eco RI- und Hind III-Stellen einge-
fügt und sequenziert. Die Struktur dieses Gens ist:

AATTCAGGA TCCGATCGTG GAGGATGATT AAATGGGTAC CATGGCTGCT
GGCTCCATCA

GTCCT AGGCTAGCAC CTCCTACTAA TTTACCCATG GTACCGACGA
CCGAGGTAGT

EcoRI BamHI RBS FCFstart

Translationskoppler 3

CTACCCGTGCC GGCACGTCCG GAAGACGGTG GCTCCGGTGC TTTCCTGCCG
GGCCACTTCA

GATGGGACGG CCGTGACGGC CTTCTGCCAC CGAGGCCACG AAAGGGCGGC
CCGGTGAAGT

AAGACCCGAA ACGTCTGTAC TGTA AAAACG GTGGCTTCTT CCTGCGTATC
CACCCGGATG

TTCTGGGCTT TGCAGACATG ACATTTTTC CACCGAAGAA GGACGCATAG
GTGGGCCTAC

GTCGTGTCTGA CGGCGTACGT GAAAAAAGCG ACCCGCACA TCAAACGTCA
GCTGCAGGCTG

CAGCACAGCT TGCCGCATGC ACTTTTTTCC TGGGCGTGT AGTTTGACGT
CGACGTCCGAC

AAGAACGTG GTGTTGTATC TATCAAAGGC GTTTGCGCAA ACCGTTACCT
GGCTATGAAAG

TTCTTGAC CACAACATAG ATAGTTTCCG CAAACGCGTT TGGCAATGGA
CCGATACTTTC

AAGACGGTC GTCTGCTGGC TAGCAAATGT GTAACGACG AATGTTTCTT
CTTCGAACGTC
TTCTGCCAG CAGACGACCG ATCGTTTACA CATTGACTGC TTACAAAGAA
GAAGCTTGCGAG

TGGAAAGCA ACAACTACAA CACCTACCGT TCTCGTAAAT ACACTTCTTG
GTACGTTGCTC
ACCTTTCGT TGTGATGTT GTGGATGGCA AGAGCATTTA TGTGAAGAAC
CATGCAACGAG

TGAAACGTA CCGGCCAGTA CAAACTGGGT TCCAAACTG GCCCGGGTCA
GAAAGCAATCC
ACTTTGCAT GGCCGGTCAT GTTGACCCA AGGTTTGTGAC CGGGCCCAGT
CTTTCGTTAGG

TGTTCTGTC CGATGAGCGC TAAATCTTAA ACTAGTA
ACAAGGACG GCTACTCGCG ATTTAGAATT TGATCATTCGA

FGFstop HindIII

Relevante Charakteristika des Gens sind hervorgehoben.

5 Es wurde dann durch Verdau mit Bam HI und
Hind III isoliert und in mit Bam HI/Hind III geschnit-
tenen pJU1003 (Squires et al., 1988, a.a.O.) eingefügt,
wobei man pJU1001003-synFGF erhielt. Dieses Plasmid wurde
mit Xba I und Hind III geschnitten und das Xba I/
Hind III-Fragment mit dem FGF-Gen wurde isoliert. Dieses
Fragment wurde in den mit Eco RI und Hind III geschnit-
tenen pT3XI-2 ligiert, wobei ein Eco RI-Xba I-Linker
10 verwendet wurde:

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

Das neue Plasmid wird als pT3XI-2- ϕ 10TC3FGFsyn be-
zeichnet.

D. Einfügen von CNTF-Expressionskonstrukten in den Vektor mit Tac-Promotor

15 pT3XI-2- ϕ 10TC3FGFsyn wurde mit Bam HI und Spe I
geschnitten, was in der Linearisierung des 7,4 kb langen
Expressionsvektors und der Freisetzung des ca. 0,5 kb
langen FGF-DNA-Fragments resultierte. In getrennten
Reaktionen wurden CNTF-Syn1/3 und CNTF-Syn2/3 in das über
20 ein Gel aufgereinigte, mit Bam HI/Spe I geschnittene

DNA-Fragment des Vektors ligiert, was in den Plasmiden pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 und pT3XI-2:CNTF-Syn2/3 resultierte.

E. Expression in E. coli

5 pT3XI-2:CNTF-Syn1/3 wurde in einem phagenresistenten E. coli K-Stamm, JM107, transformiert. Vierzehn Transformanten wurden angezüchtet und mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Färben mit Coomassie Brilliant Blue auf CNTF-Expression untersucht. Vier Transformanten zeigten eine dunkel gefärbte Bande an der ungefähren
10 Position von CNTF. Eine Expression von rekombinantem CNTF auf hohem Niveau wurde durch Anzüchten der Zellen in Luria-Broth mit 15 µg/ml Tetracyclin bis zu einer Zelldichte, die einer A_{600} von 0,8 entsprach, erzielt. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 1,0mM zugegeben
15 und die Zellen wurden 2 Stunden wachsen gelassen. Diese vier Transformanten zeigten alle ungefähr die gleiche Dichte sowohl in mit Coomassie angefärbten Gelen als auch in einem Immunoblot unterzogenen Gelen. Das apparente Niveau der CNTF-Expression in diesen Transformanten war,
20 basierend auf diesen Gelen, ungefähr ein Viertel dessen, das wie vorher mit Tetracyclin angezüchtetes pT5T:CNTF-Syn1/3-5a zeigte. Sieben ml dieser Zellsuspension pro 50 ml Luria-Broth wird in große Kolben gegeben und bei 37°C unter Schütteln angezüchtet, bis die A_{600} ungefähr 0,5
25 erreicht. Dann wird IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben, um die Expression von CNTF zu induzieren, und es wird weitergezüchtet, bis die A_{600} ungefähr 1,2 erreicht, was typischerweise 4-6 Stunden dauert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (JA-20-Rotor) für
30 5 min bei 7 000 UpM und 4°C geerntet und noch einmal durch Zentrifugation in 50 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 (Puffer A) bei 4°C gewaschen. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet wird als Paste bei -20°C eingefroren.

Die Zellpaste wird in Puffer B [Puffer A mit 1 mM
35 EGTA (Ethylenglykol-bis (-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) und 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)] bei 0,5 g Paste pro ml Puffer und 4°C suspendiert und dreimal durch eine French-Druckzelle geschickt, um die Bakterien aufzuschließen. Polyethylenimin (PEI) wird

zu einer Endkonzentration von 0,25% zugegeben und es wird 30 min bei 4°C geschüttelt. Der Niederschlag wird in einer Microfuge 15 min bei Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Dieser Schritt verringert typischerweise den Nukleinsäuregehalt, gemessen als Verhältnis von A_{260}/A_{280} von ungefähr 25% auf weniger als 5%.

Die Probe wird dann auf eine mit Puffer B äquili-
brierte Q-Sepharose-Säule (Pharmacia) aufgetragen. CNTF
ist ein so überwiegender Bestandteil des Zellysats der
French-Presse, daß er während der Chromatographie durch
mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Polyacrylamid-
gele von Säulenfraktionen verfolgt werden kann. CNTF ist
eine stärkere mit Coomassie angefärbte Bande bei ungefähr
24 kD. Unter Verwendung dieses Assays läuft CNTF durch
die Q-Sepharose-Säule in Puffer B.

Die Durchlauffractionen, die den größten Anteil
des CNTF-Proteins enthalten, werden vereinigt, gegen
Puffer C (5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0, mit 1 mM EGTA und
1 mM EDTA) dialysiert und auf eine mit Puffer C äquili-
brierte Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wird mit
Puffer C gewaschen, bis die A_{280} zur Basislinie zurück-
kehrt, was darauf hinweist, daß nicht adhärente Proteine
durch die Säule hindurchgewaschen wurden. In Puffer C
bindet CNTF an die Q-Sepharose-Säule und wird dann mit
einem 0-0,1 M NaCl-Gradienten in Puffer C eluiert. CNTF
verläßt die Säule bei ungefähr 40 mM NaCl und besitzt,
nach mit Coomassie angefärbten SDS-Polyacrylamidgelen der
CNTF-Peakfraktionen zu urteilen, eine Reinheit von mehr
als 90%.

ANSPRÜCHE:

1. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF), der eine mehr als 25 000-fach größere spezifische Aktivität aufweist als die spezifische Aktivität des natürlichen Ischiasnervextrakts.
2. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF), der eine Aktivität von mehr als 2×10^8 TU/mg aufweist.
3. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF) vom Kaninchen.
4. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF) vom Menschen.
5. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF), der ein durch das folgende charakterisiertes Protein umfaßt:
 - (a) ein Molekulargewicht von ungefähr 25 000 bei SDS-PAGE;
 - (b) eine spezifische Aktivität von mehr als 2×10^8 Trophic Units (trophische Einheiten) pro mg;
 - (c) Resistenz der biologischen Aktivität gegenüber SDS und Reduktionsmitteln.
6. Wesentlich aufgereinigter ziliärer neurotropher Proteinfaktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF), der aus einer einzelnen Proteinart besteht.
7. Methode zur Aufreinigung von ziliärem neurotrophem Faktor aus Ischiasnerv (SN-CNTF) aus Ischiasnervextrakt, die umfaßt,
 - daß man die Nervenextraktpräparation einer Säurebehandlung und einer Auftrennung mit Ammoniumsulfat unterzieht;
 - daß man die säurebehandelte und mit Ammoniumsulfat aufgetrennte Präparation Chromatofocussing unterwirft;
 - daß man die Präparation auf SDS-PAGE-Gel laufen läßt; und
 - daß man Reverse-Phase-HPLC durchführt.
8. Methode nach Anspruch 7, die vor den besagten

Schritten, in denen man die Präparation auf ein SDS-PAGE-Gel laufen läßt, zusätzliche Aufreinigungsschritte einschließt, die

hydrophobe Chromatographie zwischen Auftrennung mit Ammoniumsulfat und Chromatofocussing und

hydrophobe Chromatographie mit FPLC zwischen Chromatofocussing und präparativer SDS-PAGE umfassen.

9. Für Kaninchen-SN-CNTF kodierende Nukleinsäuresequenz, wie in Abb. 11 dargelegt.

10. Aminosäuresequenz von Kaninchen-SN-CNTF, wie in Abb. 11 dargelegt.

11. Für humanen CNTF kodierende Nukleinsäuresequenz, wie in Abb. 12 dargestellt.

12. Aminosäuresequenz von humanem CNTF, wie in Abb. 12 dargestellt.

13. Rekombinantes Expressionssystem mit tierischen Zellen zur Herstellung von biologisch aktivem CNTF.

14. Expressionssystem mit bakteriellen Zellen zur Herstellung von biologisch aktivem CNTF.

15. CNTF nach Anspruch 4, wobei besagter CNTF mit Methoden mit rekombinanter DNA hergestellt ist.

16. Methode mit rekombinanter DNA zur Herstellung von CNTF, die folgende Schritte umfaßt

(a) die Herstellung einer DNA-Sequenz, die eine Wirtszelle dazu veranlassen kann, ein Protein mit CNTF-Aktivität herzustellen;

(b) die Klonierung der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine Wirtszelle übertragen und dort repliziert werden kann, wobei ein solcher Vektor funktionelle Elemente enthält, die für die Expression der DNA-Sequenz benötigt werden;

(c) die Übertragung des die synthetische DNA-Sequenz und funktionellen Elemente enthaltenden Vektors in eine Wirtszelle, die die für CNTF kodierende DNA exprimieren kann;

(d) die Kultur der Wirtszellen unter zur Amplifikation des Vektors und Expression von CNTF geeigneten Bedingungen;

(e) das Ernten des CNTF; und
(f) ein Schritt, in dem man CNTF erlaubt, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er CNTF-Aktivität besitzt.

17. Methode nach Anspruch 16, bei der die besagte DNA für die Aminosäuresequenz von humanem CNTF kodiert.

18. Methode nach Anspruch 17, bei der die besagte DNA-Sequenz die in CNTF-Syn1/3 vorhandenen Nukleinsäuren mit einschließt.

19. Methode nach Anspruch 17, bei der die besagte DNA-Sequenz die in CNTF-Syn2/3 vorhandenen Nukleinsäuren mit einschließt.

20. Methode nach Anspruch 16, bei der die besagte DNA-Sequenz für einen physiologisch funktionellen CNTF kodiert, der eine DNA-Sequenz umfaßt, die für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz kodiert, die CNTF ausreichend ähnlich ist, um das Vorhandensein von mindestens einer der biologischen Eigenschaften von CNTF zu erlauben.

21. Methode nach Anspruch 16, bei der die besagte Wirtszelle ein Mikroorganismus ist.

22. Methode nach Anspruch 12, bei der der besagte Mikroorganismus E. coli ist.

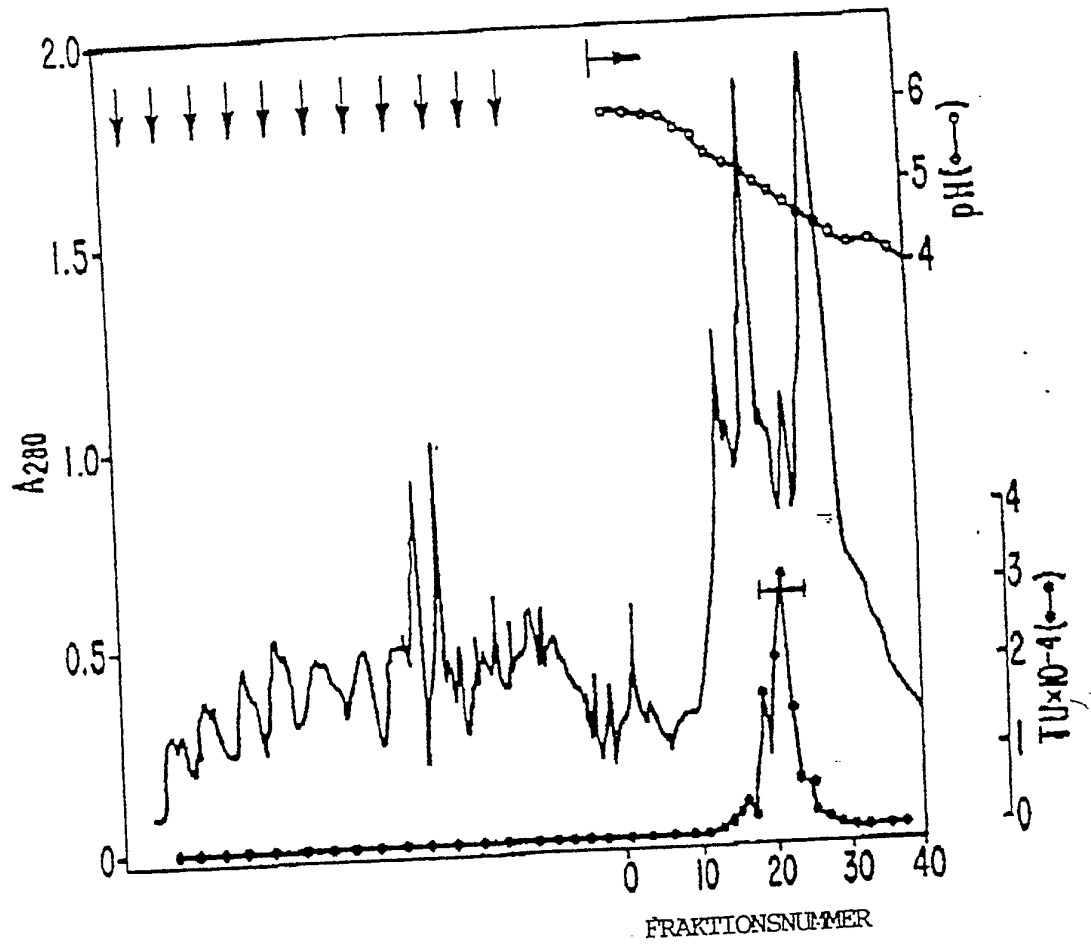
23. Methode nach Anspruch 16, bei der besagte Wirtszellen Säugerzellen sind.

24. Methode nach Anspruch 23, bei der besagte Säugerzellen Chinese Hamster Ovary-Zellen sind.

25. Wesentlich aufgereinigter rekombinanter CNTF.

1/22

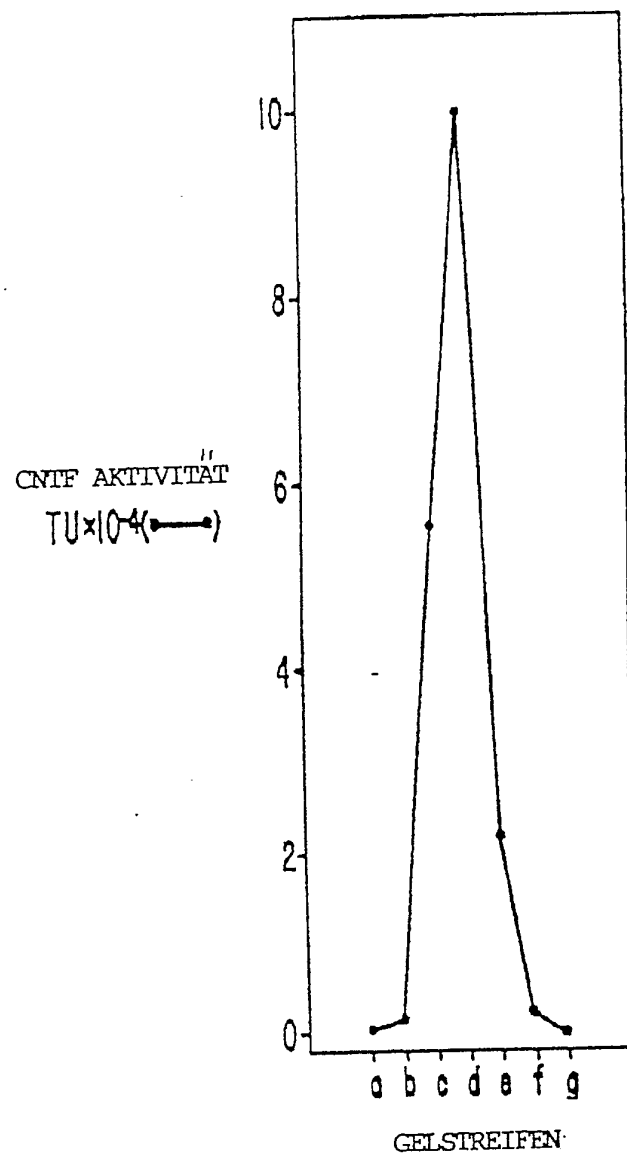
ABB. 1



- ↓ PROBENAUFTRAG
- ELUATIONSSTART MIT POLYPUFFER
- ABSORPTION BEI 280 nm
- pH
- CNTF AKTIVITÄT IN TU
- FRAKTIONEN ZUR WEITEREN ANALYSE VEREINIGT

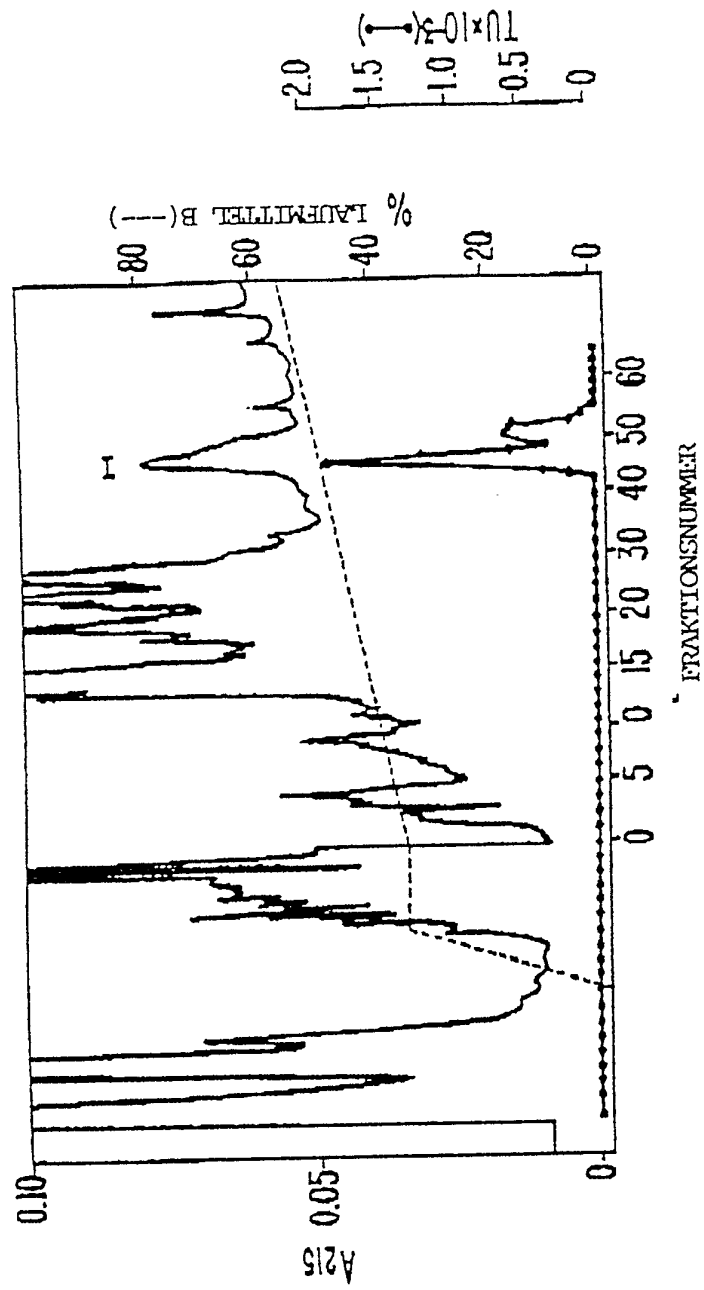
2/22

ABB. 2



3/22

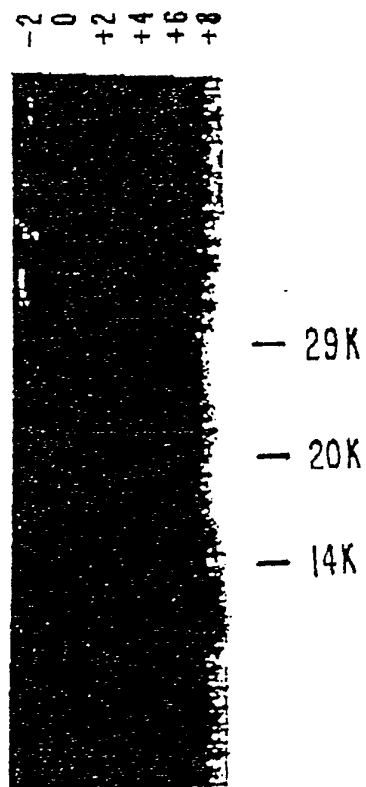
ABB. 3



- ABSORPTION BEI 215nm
- CNTF AKTIVITÄT IN TU
- FRAKTIONEN ZUR WEITEREN ANALYSE VEREINIGT

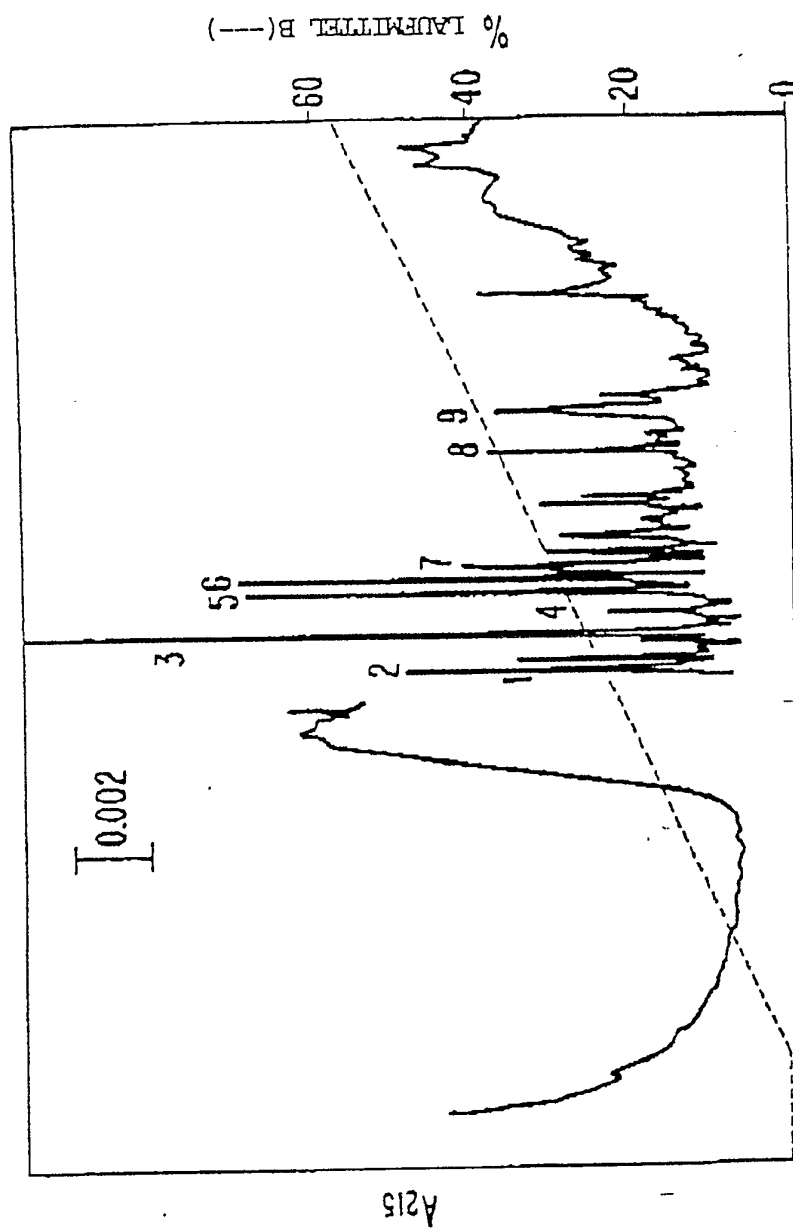
4/22

ABB. 4



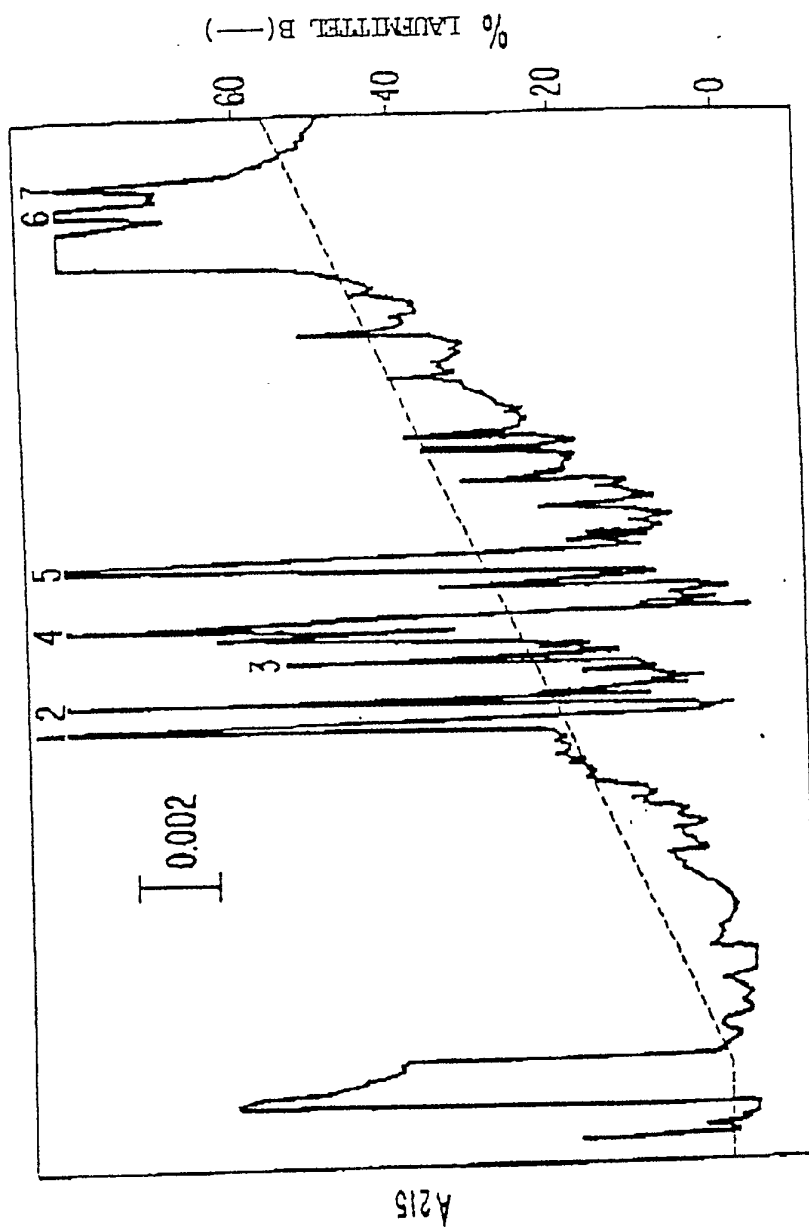
5 / 22

ABD. 5



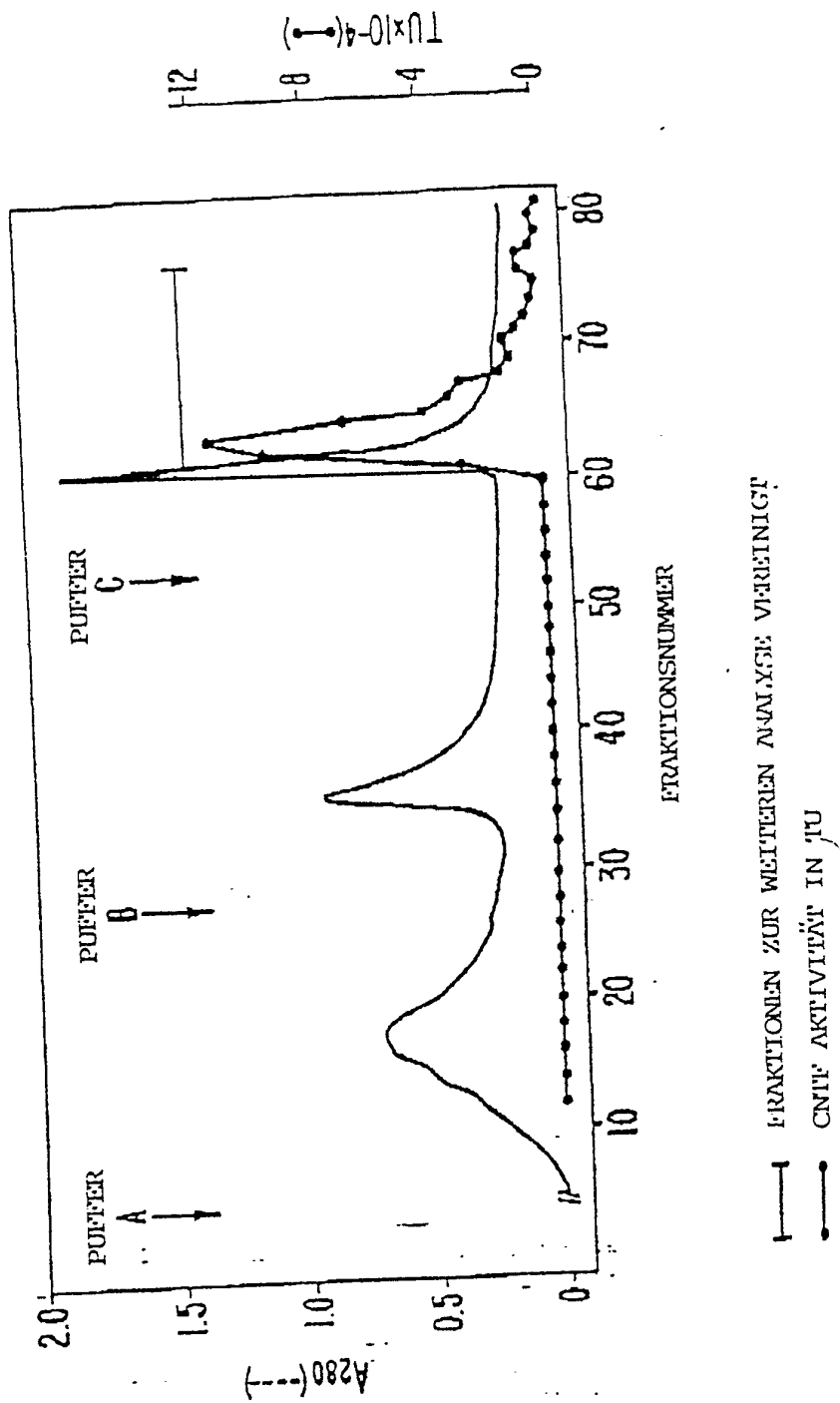
6 / 22

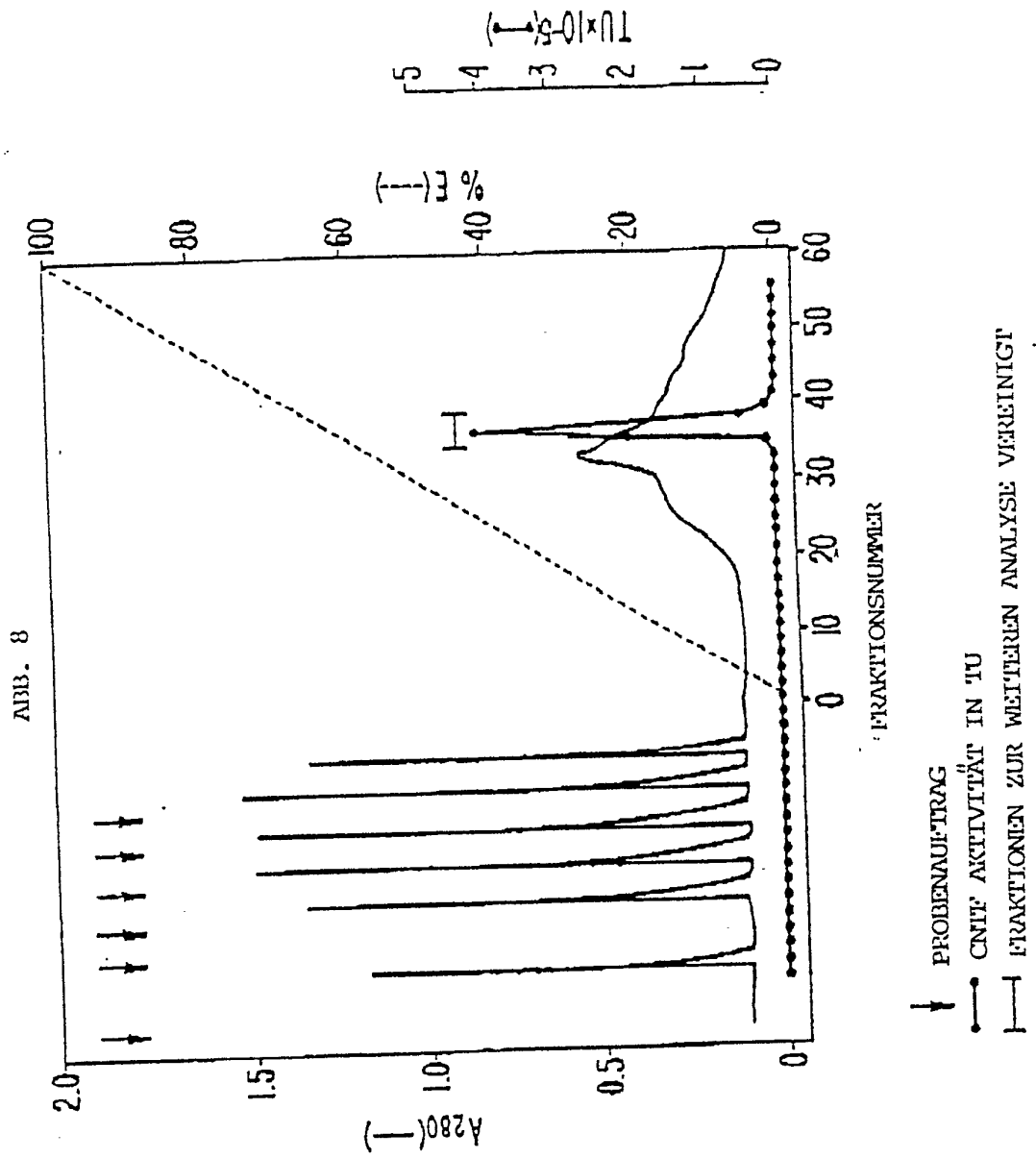
ABB. 6



7/22

ABB. 7





9 / 22

ABB. 9A

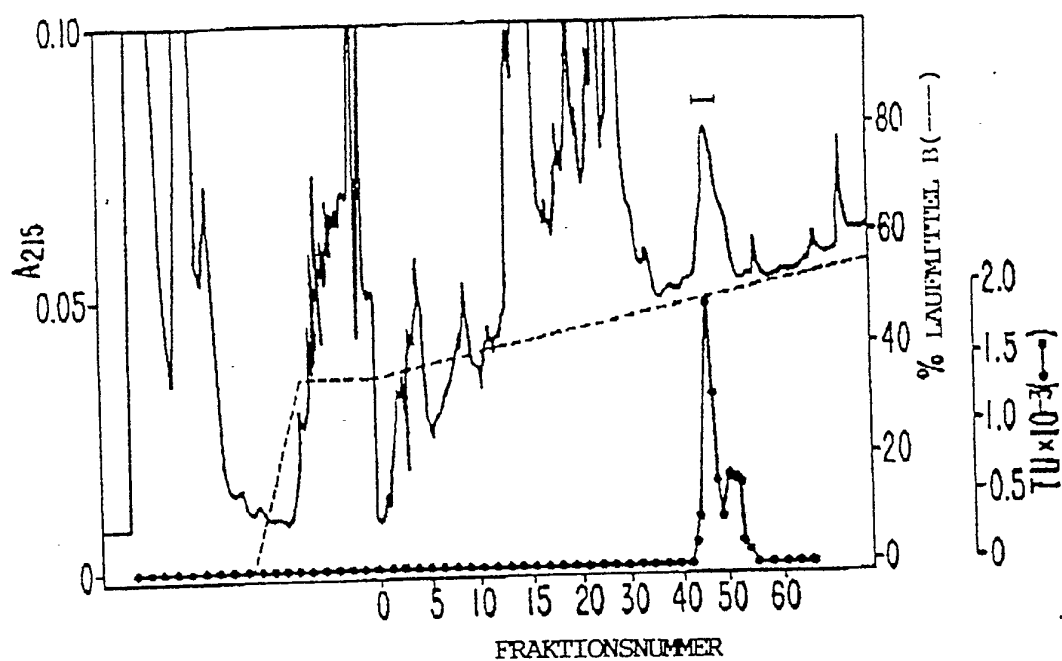
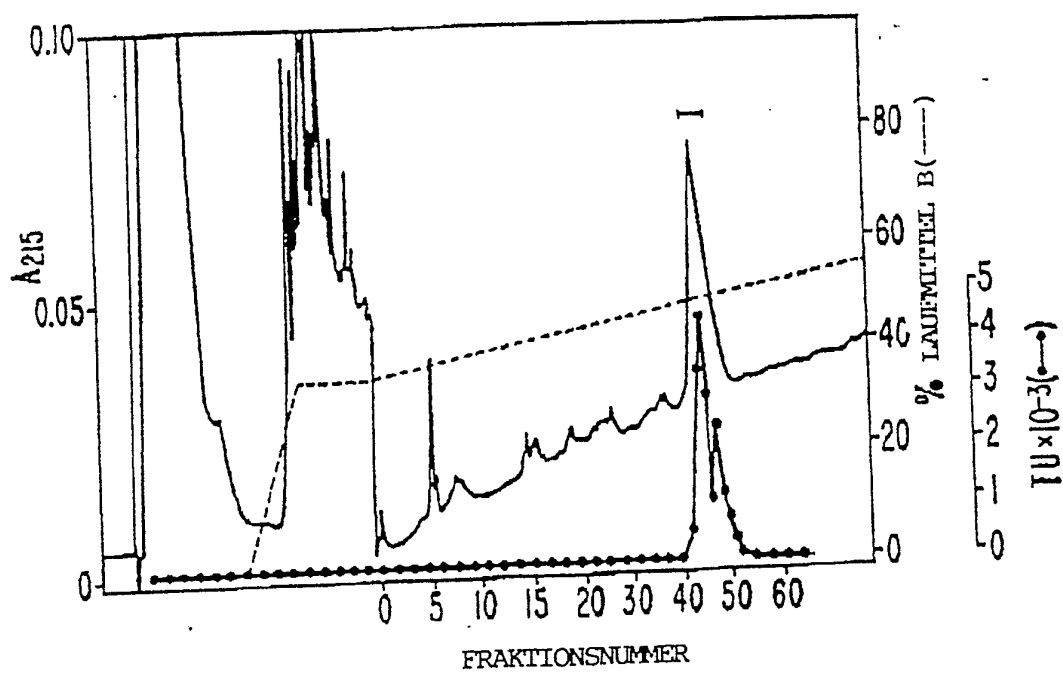


ABB. 9B



10/ 22

ABB. 10A

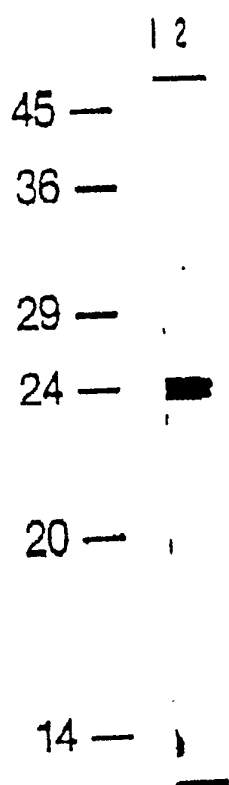
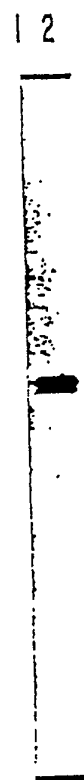


ABB. 10B



11 / 22

ABB. 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AAC GAC AAG GAA ATG TAG
N D K E M

ABB. 12

G
TC
TAA GGG ATG GCT TTC ACA GAG
met ala phe thr glu
met

G A C G T A C
 CAT TCA CCG CTG ACC CCT CAC CGT CGG GAC CTC TGT AGC CGC TCT ATC TGG
 his ser pro leu thr pro his arg arg asp leu cys ser arg ser ile trp

CTA GCA AGG AAG ATT CGT TCA GAC CTG ACT GGT CTT ACG GAA TCC TAT GTG
leu ala arg lys ile arg ser asp leu thr ala leu thr glu ser tyr val

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

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

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

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

T A			T			C T										
GCT	ATA	CAT	ACC	GTT	GTT	CTC	CAA	GTC	GCT	GCC	TTT	GCA	TAC	CAG	ATA	GAG
ala	ile	his	thr	leu	leu	leu	gin	val	ala	ala	phe	ala	tyr	gin	ile	glu

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

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

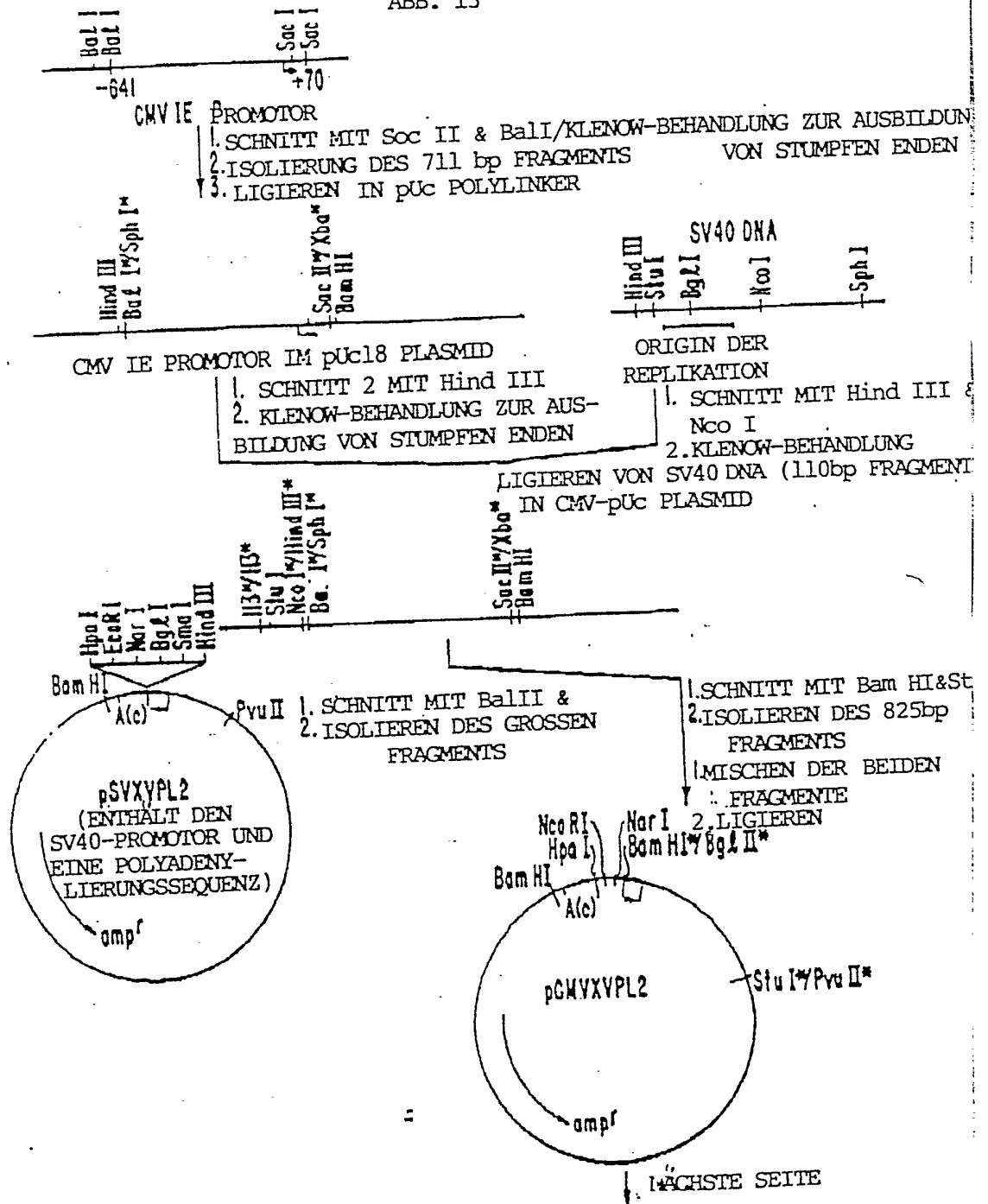
G	val	...	ile	gly	asp				G	A	T					
			A	A		C										
CTA	AAG	GTG	CTG	CAG	GAG	CTT	TCA	CAG	TGG	ACA	GTA	AGG	TCC	ATC	CAT	GAC
leu	lys	val	leu	gin	glu	leu	ser	gin	trp	thr	val	arg	ser	ile	his	asp

	G	A	his	A	A											
C TT CGT TTC ATT TCT TCT CAT CAG ACT GGG ATC CCA GCA CGT GGG AAG CAT																
leu arg phe ile ser ser his gln thr gly ile pro ala arg gly ser his																
val	cys											his				

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

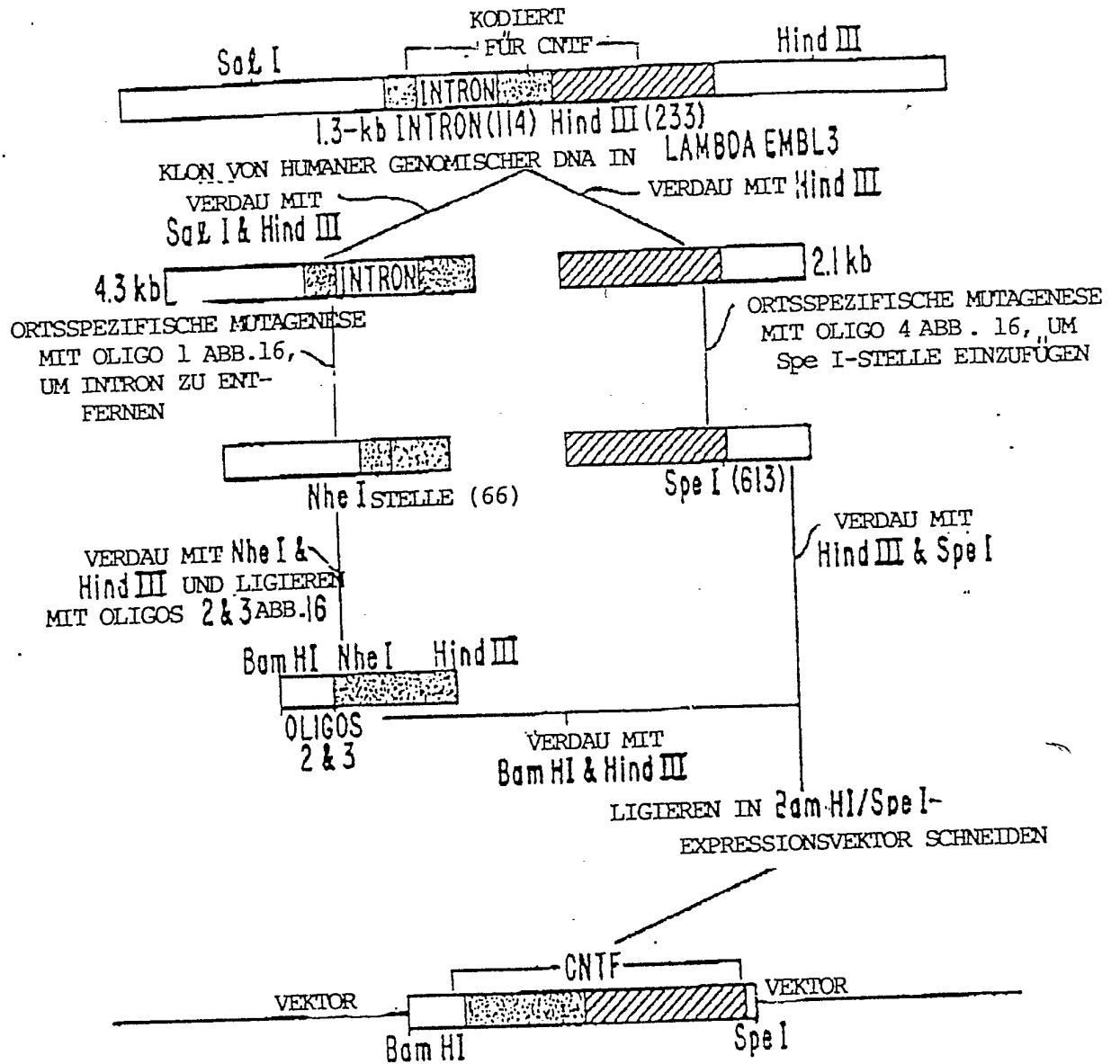
13/22

ABB. 13



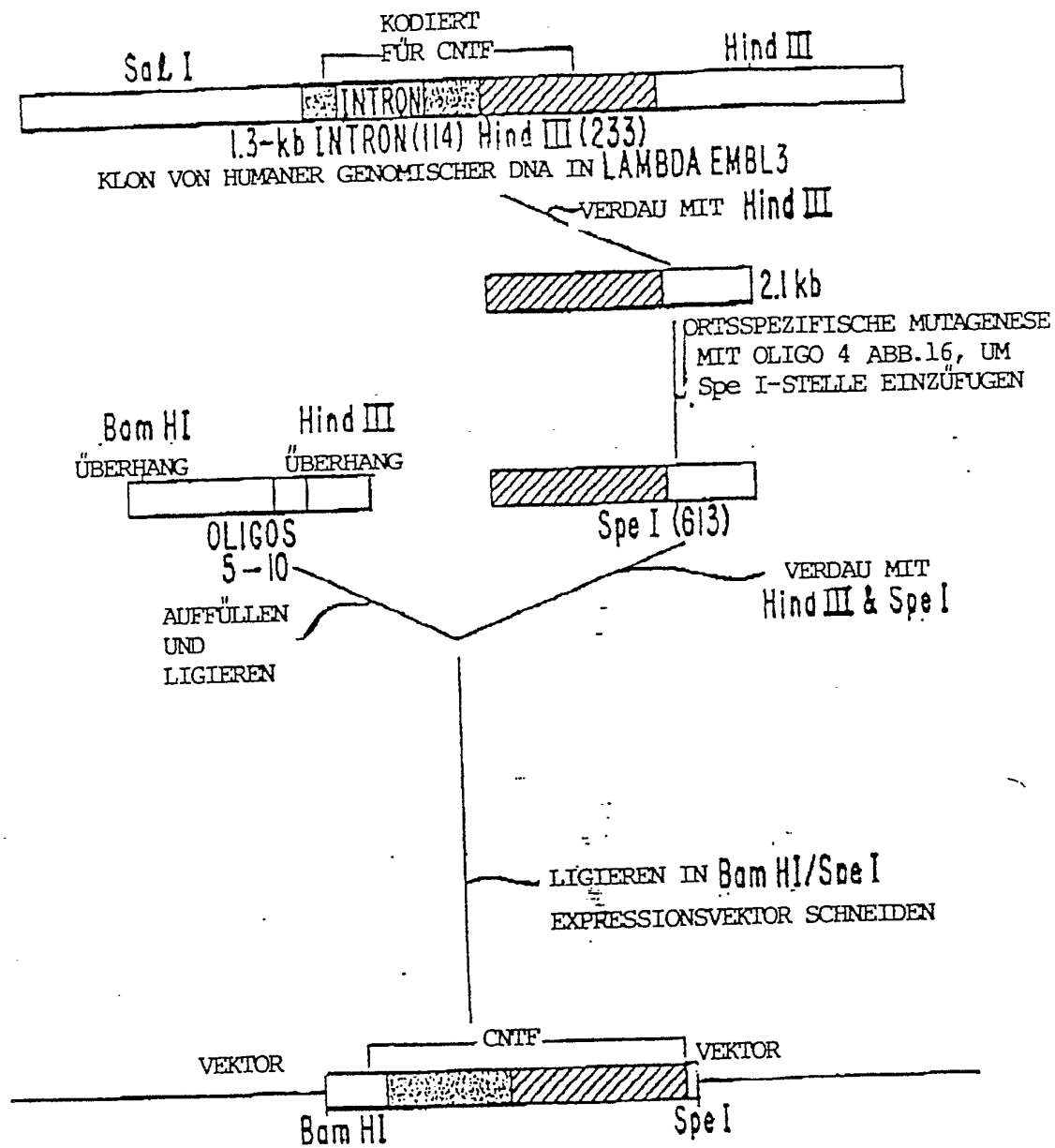
14/22

ABB. 14



15/22

ABB. 15



16/22

ABB. 16

Oligonukleotid 1
(ZUM ENTFERNEN DES INTRONS)

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

(OBERE ZEILE KOMPLEMENTÄR ZUR 3'-SEITE DES INTRONS)
(UNTERE ZEILE KOMPLEMENTÄR ZUR 5'-SEITE DES INTRONS)

Oligonukleotide 2 & 3
(ZUR REKONSTRUKTION DES 5'-ENDES DER EXPRIMIERTEN DNA)

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

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

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

Oligonukleotid 4
(ZUM EINFÜGEN DER Spe I.-STELLE)

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

17/ 22

ADB. 17

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

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

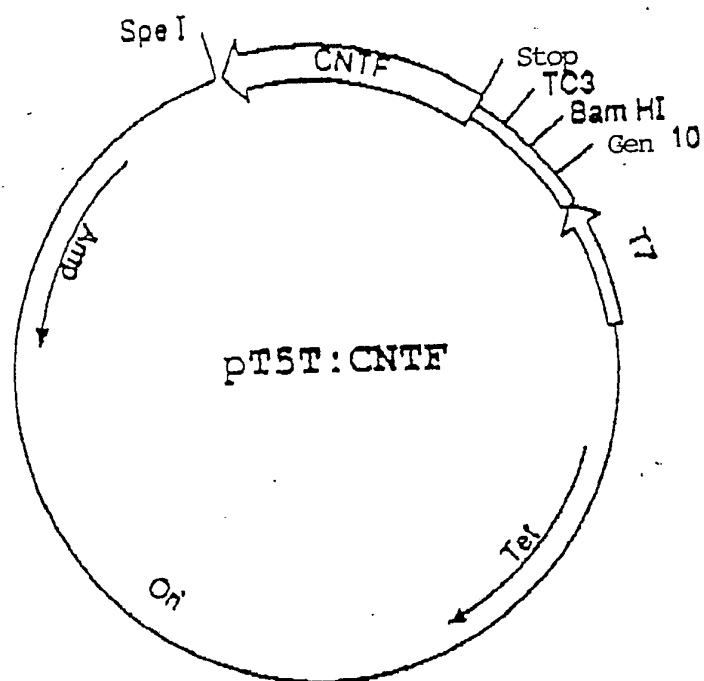
01160-7 5'- C GTA AAA TCC GTT CCG ACC TGA CCG CTC TGA CCG AAT
 01160-8 3'-GGT AGA CCG ACC GAG CAT TTT AGG CAA GGC TGG ACT GGC GAG ACT GGC TTA
 CCT ACG TTA AAC ACC AGG GTC TGA ACA AAA ACA TCA ACC TGG ACT CC-3'01160-7
 GGA TGC AAT TTG TGG TCC CAG ACT TGT TTT TGT AGT T -5'01160-8

01160-9 5'- G CTG ACG GTA TGC CCG TTG CTT CCA CCG ACC AGT GGT CCG
 01160-10 3'-GG ACC TGA GGC GAC TGC CAT ACG GCC AAC GAA GGT GGC TGG TCA CCA GGC

AAC TGA CCG AAG CTG AAC GTC TGC AGG AAA ACC TGC A -3'01160-9
 TTG ACT GGC TTC GAC TTG CAG ACG TCC TTT TGG ACG TTCTGA -5'01160-10
 Hind III

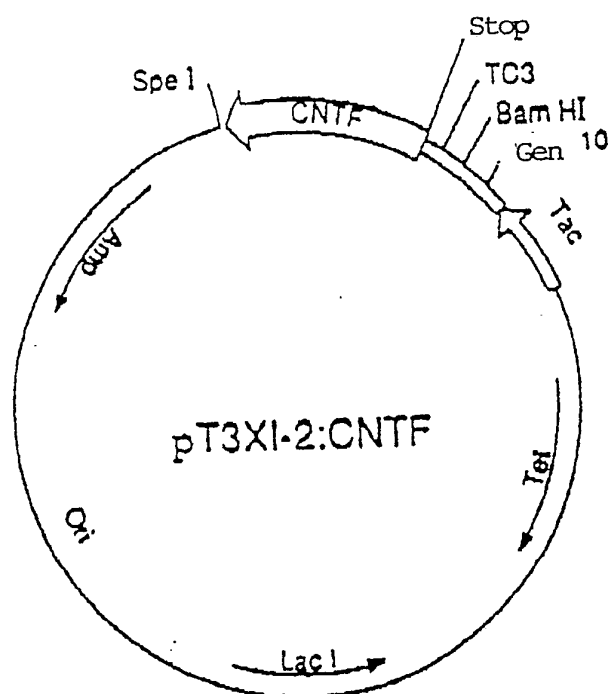
18/22

ABB. 18



19 / 22

ABB. 19



20 / 22

ABB. 20



21 / 22

ABB. 21

RAINBOW MG-STANDARDS:

NICHT INDUZIERTER VEKTOR pT5T OHNE INSERT

INDUZIERTER VEKTOR pT5T OHNE INSERT

NICHT INDUZIERTER pT5T : CNTF - Syn1/3-5a

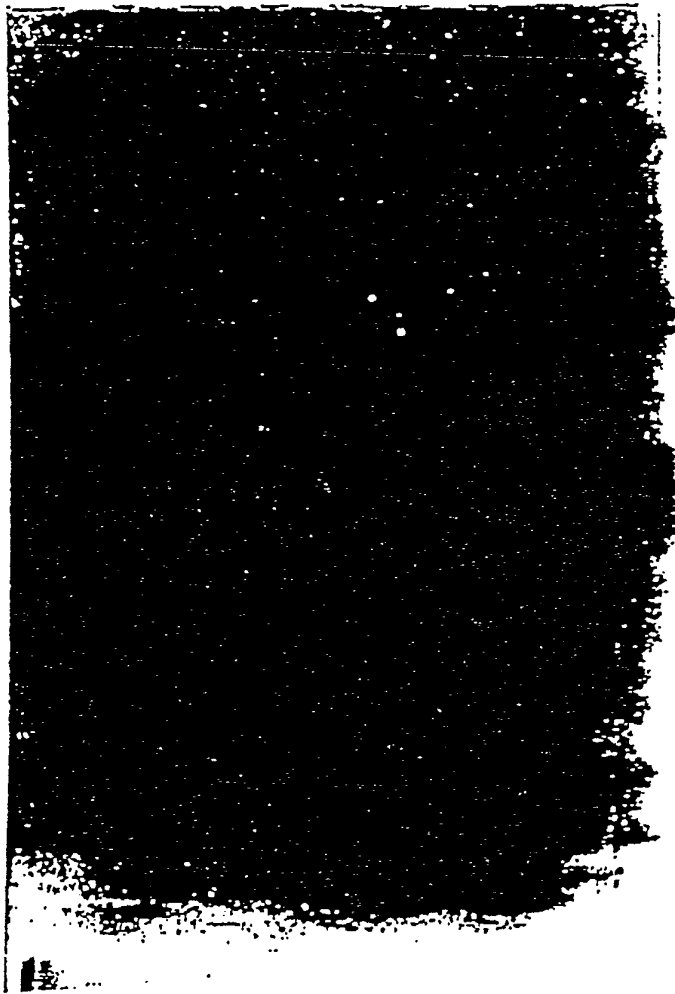
INDUZIERTER pT5T : CNTF - Syn1/3-5a

LEER

AUFGESCHLOSSENER GEMISCHTER ZIELSTAND
(GEMISCHTER ZIELSTAND)

AUFGESCHLOSSENER ZIELSTAND
(GEMISCHTER ZIELSTAND)

AUFGESCHLOSSENER ZIELSTAND
(GEMISCHTER ZIELSTAND)



22/22

