PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :
C12N 15/12, 15/10, C07K 13/00
A61K 37/02, 39/395, G01N 33/53

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/13948

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. August 1992 (20.08.92)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/00127

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Januar 1992 (22.01.92)

(30) Prioritätsdaten:
P 41 04 240.9 12. Februar 1991 (12.02.91) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* GEORG-SPEYER-HAUS CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Straße 42-44, D-6000 Frankfurt/Main 70 (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US) :* HOLTRICH, Uwe [DE/DE]; Parkstraße 4, D-6233 Kelkheim (DE). BRÄUNINGER, Andreas [DE/DE]; Marcobrunnerstraße 6, D-6200 Wiesbaden (DE). STREBHARDT, Klaus [DE/DE]; Biedenkopfer Weg 24, D-6000 Frankfurt a.M. (DE). RÜBSAMEN-WAIGMANN, Helga [DE/DE]; Königssteinerstraße 113, D-6232 Bad Soden (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, Heinrich, Fincke, K. usw. ; Kopernikusstr. 9, D-8000 München 80 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: CLONING OF A NEW MEMBER OF THE FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF) RECEPTOR FAMILY

(54) Bezeichnung: KLONIERUNG EINES NEUEN MITGLIEDES DER FAMILIE DER FIBROBLASTEN-WACHSTUMSFAKTOREN (FGF)-REZEPTOREN

(57) Abstract

The invention relates to a TKF receptor protein comprising (a) the amino acid sequence illustrated in SEQ ID NO: 1 or (b) variants of the sequence of (a). The invention also relates to a novel PCR process for detecting protein tyrosine kinasegene by means of PCR.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein TKF-Rezeptor Protein, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz oder b) Varianten der Sequenz aus (a) umfaßt. Weiterhin betrifft die Erfindung ein neues PCR-Verfahren zum Nachweis von Protein-Tyrosin-Kinasegenen mittels PCR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	**FI**	Finnland	**MN**	Mongolei
AU	Australien	**FR**	Frankreich	**MR**	Mauritanien
BB	Barbados	**GA**	Gabon	**MW**	Malawi
BE	Belgien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GN**	Guinea	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**GR**	Griechenland	**PL**	Polen
BJ	Benin	**HU**	Ungarn	**RO**	Rumänien
BR	Brasilien	**IE**	Irland	**RU**	Russische Föderation
CA	Kanada	**IT**	Italien	**SD**	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**JP**	Japan	**SE**	Schweden
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SN**	Senegal
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SU**	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**TD**	Tschad
CM	Kamerun	**LK**	Sri Lanka	**TG**	Togo
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	**MC**	Monaco		
DK	Dänemark	**MG**	Madagaskar		
ES	Spanien	**ML**	Mali		

Klonierung eines neuen Mitgliedes der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)-Rezeptoren

B e s c h r e i b u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Protein-Tyrosin-Kinase, das dafür kodierende Gen sowie ein Verfahren zum Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion.

Die Annahme genetischer Schäden als Ursache der Entstehung von Tumoren wurde durch die Entdeckung von zellulären Genen, "Proto-Onkogene" genannt, bestätigt, die in genetisch modifizierter Weise als sogenannte "Onkogene" das neoplastische Wachstum bedingen. Trotz genetischer Vielfalt der Proto-Onkogene können ihre biochemischen Wirkungsmechanismen in 4 Kategorien zusammengefaßt werden:

1. Phosphorylierung von Proteinen (an den Aminosäuren Threonin, Serin und Tyrosin)
2. Metabolische Regulation
3. Kontrolle der Genexpression
4. Beeinflussung der DNA-Replikation.

Ungefähr ein Drittel aller bisher bekannten Onkogene kodiert für Kinasen, die in Proteinen die Aminosäure Tyrosin phosphorylieren und die daher als Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) bezeichnet werden. Viele Onkogene, die für Tyrosin-Kinasen kodieren, wurden zuerst im Genom von onkogenen Retroviren entdeckt. So stellt beispielsweise das im Rous-Sarkoma-Virus vorkommende transformierende v-src-Gen eine Modifikation des zellulären Proto-Onkogens c-src dar. Gene, die zu den PTK-

Genen homolog sind, wurden daneben auch bei Insekten (z.B. Drosophila melanogaster) und in Hefe (Saccharomyces cerevisiae) gefunden. Der urzeitliche evolutionäre Ursprung und der hohe Grad an Konservierung der PTK-Gene über lange phylogenetische Zeiträume deutet an, daß die Phosphorylierung von Tyrosin eine wichtige Rolle in der zellulären Physiologie von Eukaryonten spielt.

PTK-Gene normaler (nicht transformierter) Zellen können in zwei Kategorien unterteilt werden. Die erste Gruppe kodiert für Oberflächenrezeptoren, die Signale für die Proliferation der Zelle vermitteln. Die Liganden für die folgenden Rezeptoren sind bekannt:

- Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor
  (Cohen, S. et al., 1980, J.Biol.Chem. 225, 4834)

- Insulin-Rezeptor
  (Ganguli, S. et al., 1985, Curr.Top.Cell.Regulat. 27, 38)

- Colony Stimulating Factor 1(CSF-1)-Rezeptor
  (Ullrich, A. et al., 1984, Nature 309, 418; Sherr, C.J. et al., 1985, Cell 41, 665)

- Fibroblast Growth Factor (FGF)-Rezeptor
  (Lee, P.L., 1989, Science 245, 57)

Für zwei weitere Mitglieder, die strukturell zu dieser Familie gehören, sind die Liganden unbekannt: neu (Slamon, DJ. et al., 1987, Science 235, 117) und trk (Bargman, C.J. et al., 1986, Nature 319, 226).

Die zweite Gruppe von PTKs kodiert für Proteine, die zwar mit der Zellmembran assoziiert sind, jedoch keine transmembrane

Domäne besitzen: z.B. abl, fgr, src und lck (Hunter, T. and Cooper, J.A., 1985, Ann.Rev.Biochem. 54, 897).

Die PTK-Onkogene wurden ursprünglich entweder als Komponenten von akut transformierenden Retroviren oder durch Transformation von Fibroblasten via Transfektion von DNA aus Tumorzellen identifiziert. Die Produkte folgender retroviraler Onkogene haben PTK-Aktivität: v-src, v-yes, v-fgr, v-fps, v-abl, v-ros, v-fms und v-fes.

Die Gene v-src, v-yes, v-fps, v-ros und v-fms sind onkogene Bestandteile von Hühner-Sarkoma-Viren, v-fgr und v-fes von Katzen-Sarkoma-Viren und v-abl ist ein Onkogen eines Maus-Lymphom-Virus. Eine Analyse der verschiedenen Protein-Tyrosin-Kinasen zeigt eine enge Verwandtschaft über einen Bereich von 260 Aminosäuren, der die katalytische Region umfaßt. In Bereichen, die außerhalb der katalytischen Region liegen, sind die PTKs beträchtlich divergent. Die einzelnen Bereiche entsprechen Domänen, welche die Spezifität der PTKs für ihre Zielproteine bestimmen.

Die Produkte von v-src, v-yes, v-fgr, v-fps, v-fes, v-abl und v-ros zeigen ihre PTK-Aktivität, indem sie in Immunopräzipitat-Reaktionen die schwere Kette des assoziierten Antikörpers und/oder sogar sich selbst phosphorylieren (Autophosphorylierung). In transformierten Zellen liegen diese viralen Proteine nur in geringen Mengen vor, was deren Isolierung und die anschließende Analyse der PTK-Aktivität sehr erschwert.

Im folgenden soll die Bedeutung von Protein-Tyrosin-Kinasen für menschliche Erkrankungen an drei bekannten Protein-Tyrosin-Kinasegenen ausgeführt werden. Das humane HCK-Gen wird in hämatopoietischen Zellen exprimiert. Weiterhin wurde das HCK-Gen der Bande q11-12 des menschlichen Chromosoms 20 zugeordnet. Anomalien in diesem Bereich, dem langen Arm von Chromosom 20, wurden bei zahlreichen Patienten mit hämatologischen

Krankheiten beobachtet. So wurden Deletionen, die das HCK-Gen umfassen, bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, myelodysplastischen Syndromen oder myeloproliferativen Störungen häufig diagnostiziert (Quintrell et al. (1987), Mol. Cell.Biol. 7, 2267). Der chromosomale Lokus von HCK macht es daher wahrscheinlich, daß dieses Gen an der Pathogenese von einigen humanen hämatologischen Krankheiten beteiligt ist.

Das zelluläre Gen, das für den Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor kodiert, ist mit dem Onkogen des Avian Erythroblastose-Virus (v-erb B) eng verwandt. In Mammakarzinomen beim Menschen wurde eine DNA-Sequenz identifiziert, die zwar homolog zu v-erb B ist, aber im Vergleich zum EGF-Rezeptor-Gen in amplifizierter Form vorliegt. Die molekulare Analyse zeigte, daß es sich um eine Sequenz handelt, die sehr eng mit dem EGF-Rezeptor verwandt ist. Dieses Onkogen wird ERB B2 bzw. HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) genannt. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein neues Mitglied der Gruppe der Protein-Tyrosin-Kinasen. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Amplifizierung von HER2 oft mit aggressiven Mammakarzinomen des Menschen assoziiert ist (Slamon et al. (1987), Science 235, 177). In dieser Studie wurde festgestellt, daß für die Beurteilung der Überlebensrate und die Wahrscheinlichkeit des Rückfalls dieser Patienten mit Brustkrebs die Amplifikationsrate des Oberflächenrezeptors von HER2 ein wesentlicher Prognoseparameter ist. Diese Ergebnisse zeigen, daß das HER2-Gen bei der Pathogenese von Brustkrebs bedeutsam ist.

Die Fibroblast Growth Factor (FGF)-Familie besteht aus mehreren Wachstumsfaktoren, die untereinander homolog sind, Heparin-Bindungseigenschaften besitzen, die Angiogenese fördern und die ein mitogenes Potential gegenüber Zellen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs besitzen. Die aberrante Expression von FGFs führt durch einen autokrinen Mechanismus zur Zelltransformation. Darüber hinaus können

FGFs das Tumorwachstum und dessen invasives Verhalten beschleunigen, indem der Tumor verstärkt mit Blutgefäßen versorgt wird. FGFs sind auch in der Lage, die Produktion von Proteasen, wie z.B. des Plasminogen-Aktivators zu induzieren.

Beispiele für Mitglieder der FGF-Familie sind das int-2-Genprodukt, das hst-Genprodukt (Kaposi sarcoma-FGF) und der Keratinozyten-Wachstumsfaktor. Die Wirkung der verschiedenen Wachstumsfaktoren wird durch Bindung an einen Oberflächenrezeptor vermittelt, wodurch sich die intrinsische Kinase-Aktivität des Rezeptors erhöht.

Von der immensen klinischen Bedeutung von FGFs und deren Rezeptoren seien hier nur zwei Beispiele herausgegriffen:

Beim Herpes simplex Virus Typ I konnte gezeigt werden, daß der FGF-Rezeptor an der viralen Bindung und Aufnahme in Vertebratenzellen beteiligt ist (Kaner, R.J. et al. (1990), Science 248, 1410).

Auch bei der Entstehung von rheumatischer Arthritis spielt der FGF-Rezeptor eine Rolle. So wurde nachgewiesen, daß Synovialzellen das bFGF-Gen und das bFGF-Rezeptorgen exprimieren und dadurch auf autokrine Weise zur rheumatischen Arthritis stimuliert werden (Melnyk, V. et al. (1990), Arthritis and Rheumatism 33, 493). Weiterhin wurde ein ähnlicher Mechanismus der autokrinen Stimulation über den FGF-Rezeptor auch bei humanen Glioma-Zellinien entdeckt (Morrison, R.S. et al. (1990), Cancer Research 50, 2524).

Augrund der enormen klinischen Bedeutung von Protein-Tyrosin-Kinasen, insbesondere von Protein-Tyrosin-Kinasen aus der FGF-Rezeptorfamilie, bestand somit ein Bedürfnis, neue Protein-Tyrosin-Kinasen sowie Verfahren zu ihrem Nachweis bereitzustellen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein neues TKF (mit dem FGF-Rezeptor verwandte Tyrosin-Kinase)-Rezeptor-Protein, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es
(a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz oder
(b) Varianten der Sequenz aus (a) umfaßt.
Ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein neues Protein, das Teile der in SEQ ID NO:1 dargestellten Aminosäuresequenz umfaßt. Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein TKF-Rezeptor-Protein, welches die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz enthält, es kann jedoch auch Varianten dieser Sequenz enthalten. Unter dem Begriff "Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Sequenzen zu verstehen, die durch Substitution, Deletion oder/und Insertion einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte sich von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz unterscheiden. Unter den Begriff "Variante" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen des TKF-Rezeptor-Proteins, sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere durch in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen oder/und immunologischen Aktivität dem in SEQ ID NO:1 gezeigten Protein entsprechen.

Erfindungsgemäße Proteine zeichnen sich vorzugsweise dadurch aus, daß auf Aminosäureebene eine Homologie von mindestens 85 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % und am meisten bevorzugt mindestens 95 % gegenüber der in SEQ ID NO:1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweisen.

Bevorzugte Beispiele für Varianten des TKF-Rezeptors sind solche Proteine, die sich von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz durch eine oder mehrere Veränderungen wie folgt unterscheiden:

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
440	T → C	136	Leu → Pro
872	G → A	280	Arg → His
896	C → T	288	Ala → Val
923	A → T	297	Asp → Val
949	G → A	306	Glu → Lys

Die folgenden Mutationen (Nukleotide 1178 und 1232) betreffen die transmembrane Domäne des TKF-Rezeptors. Punktmutationen in diesem Bereich (Nukleotide 1141-1203) können zu onkogenen Veränderungen führen, wie es am Beispiel des neu-Rezeptors gezeigt wurde (Bergmann, C.B. et al. (1986), Cell 45, 649).

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
1178	C → T	382	Ala → Val
1232	C → A	400	Pro → His

Folgende Mutationen (1276 und 1360) betreffen die Aminosäure Threonin in Positionen, die bei anderen Mitgliedern der FGF-Rezeptor-Familie regulatorische Bedeutung innehaben sollen.

Nukleotid	Austausch	Aminosäure	Austausch
1276	G → A	415	Ala → Thr
1360	C → A	443	Pro → Thr

Die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz stellt das gesamte TKF-Rezeptor-Protein dar. Dieses Protein weist 813 Aminosäuren auf. Das TKF-Rezeptorgen-Gen oder Varianten davon können routinemäßig in einem Vektor kloniert werden, so daß dieser Vektor in einer geeigneten Wirtszelle zur Expression gebracht wird, wobei das erfindungsgemäße Protein entsteht. Bevorzugte Wirtszellen sind Mikroorganismen wie E.coli oder Hefe, aber auch höhere Zellen (z.B. Säuger- oder Insektenzellen). Bevorzugte Expressionsvektoren sind z.B. Plasmide, Bakteriophage Lambda für Prokaryonten, Hefevektoren oder virale Vektoren für höhere Zellen (z.B. SV40, Vaccinia, Baculovi-

ren). Bezüglich der Expression des TKF-Gens soll insbesondere auf die bei Sambrook et al. (A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) genannten Methoden verwiesen werden.

Ein Vergleich der TKF-Rezeptor-Sequenz mit der EMBL-Datenbank ergibt ein hohes Maß an Homologie mit der Familie der Protein-Tyrosin-Kinasen, wobei die engste Verwandtschaft zum humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGF-Rezeptor) besteht. Das erfindungsgemäße Protein wird daher als TKF (Tyrosine-Kinase related to FGF-Receptor)-Rezeptor bezeichnet.

Es treten folgende Protein-Tyrosin-Kinase spezifische Sequenzcharakteristika auf:

1. Das ATP-Bindungsmotiv:
   GlyGluGlyCysPheGly .....(24 Aminosäuren) .... Lys
   (Aminosäuren 474 - 503)

2. Drei in der katalytischen Domäne von Protein-Tyrosin-Kinasen liegende Aminosäure-Motive, die bei allen Protein-Tyrosin-Kinasen der Rezeptorklasse hinsichtlich der Aminosäuresequenz und des Abstandes der Motive zueinander hoch konserviert sind:

HisArgAspLeuAlaAla	(AS 610 - 615)
AspPheGly	(AS 630 - 632)
ProValLysTrpMetAla	(AS 652 - 657)

Neben der Homologie über die gesamte Sequenz weisen zwei weitere Merkmale der TKF-Rezeptor-Sequenz auf die enge Verwandtschaft zu den FGF-Rezeptoren hin:

1. Die zwischen den Glycinen der ATP-Bindungsregion liegenden Aminosäuren sind bei allen bislang beschriebenen FGF-Rezeptoren gleich und verschieden von denen anderer Protein-Tyrosin-Kinasen.

2. Eine Untergruppe von Rezeptor Protein-Tyrosin-Kinasen unterscheidet sich von anderen Protein-Tyrosin-Kinasen durch ein Aminosäureinsert in der Kinasedomäne. Innerhalb dieser Untergruppe variieren die Längen der Inserts stark. Bei allen bekannten FGF-Rezeptoren ist die Insertlänge jedoch konstant und entspricht mit 19 Aminosäuren der des TKF-Rezeptors.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes TKF-Rezeptor-Protein oder Teile davon kodiert. Diese Nukleinsäure kann z.B. genomische DNA oder RNA sein. Vorzugsweise handelt es sich dabei jedoch um ein rekombinantes DNA-Molekül.

Weiterhin ein Gegenstand der Erfindung ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, welche

(a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte kodierende Sequenz,

(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleinsäuresequenz oder

(c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisierende Sequenz enthält.

Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z.B. 0,2 x SSC) noch auftritt (siehe auch Sambrook, J. et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einen Teil davon enthält. Der Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann ein in das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor (z.B. Bacteriophage Lambda) oder ein Vektor

sein, der extrachromosomal vorliegt (z.B. ein Plasmid). Der erfindungsgemäße Vektor kann durch Subklonierung des TKF-Gens in einen Basisvektor erhalten werden. Derartige Basisvektoren, insbesondere Vektoren mit den zur Proteinexpression erforderlichen Elementen sind einem Fachmann geläufig.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Verfahren zur Transformation von Zellen sind allgemeiner Stand der Technik und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren für den Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eignet sich besonders für Untersuchungen von Wachstumsfaktor-Rezeptor-Genen und Onkogenen, da deren Expression mit gängigen Techniken (Northern Blot) in verschiedenen Fällen unter der Nachweisgrenze liegt. Dies ist bei Protein-Tyrosin-Kinasen häufig der Fall, so daß die PCR speziell für die Suche nach neuen Mitgliedern dieser Gruppe optimiert wurde.

Diese Technik basiert auf der enzymatischen Amplifikation von Sequenzen, die von 2 Oligonukleotidprimern, als 5'- und 3'-Begrenzung fungierend, begrenzt werden. Nach 25 PCR-Zyklen erreicht man einen Amplifikationsgrad von 10^5-10^6. Dies verdeutlicht, daß auch äußerst selten vorkommende Transkripte so stark vermehrt werden können, daß man sie anschließend erfolgreich einer Blot Analyse oder der Klonierung zuführen kann.

In einer Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft von Protein-Tyrosin-Kinasen konnten die konservierten Bereiche der katalytischen Domänen dieser Enzyme ermittelt werden (Hanks, S. et al., 1988, Science, 241, 42). Aufgrund dieser computeranalytischen Vergleiche können die PTKs im wesentlichen in zwei Kategorien eingeteilt werden: die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Kinasen ohne extrazelluläre Domäne.

Auf dieser Basis wurden dann entsprechende Primer eingesetzt, um bestimmte Gruppen von Protein-Tyrosin-Kinasen zu untersuchen. Durch Verwendung dieser Primer aus konservierten Regionen wird gewährleistet, daß im Rahmen des PCR-Experiments PTKs der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie amplifiziert werden können.

Ein Nachteil des bekannten Verfahrens ist jedoch, daß zwei unterschiedliche Primer eingesetzt werden müssen, die zu bekannten Protein-Tyrosin-Kinasegenen homolog sind. Dadurch können Gene, die nur eine Homologie zu einem Primer besitzen, durch eine solche PCR-Reaktion nicht amplifiziert werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren für den Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion, durch welches die Nachteile des Standes der Technik beseitigt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) aus dem Ausgangsmaterial mRNA nach an sich bekannten Methoden gewinnt,
(b) die mRNA aus Schritt (a) mittels reverser Transkription in cDNA umschreibt,
(c) die cDNA aus Schritt (b) durch terminale Transferase an ihrem 3'-Ende mit einem poly dG-Schwanz versieht,
(d) das aus Schritt (c) resultierende Produkt mittels einer PCR-Reaktion in Anwesenheit von 2 Primern amplifiziert, wobei der erste Primer Sequenzen enthält, die zu hoch-

konservierten Regionen bekannter Protein-Tyrosin-Kinasegene homolog sind, und der zweite Primer ein oligo dC-Nukleotid ist, und

(e) die resultierenden PCR-Produkte analysiert und charakterisiert.

Dieses Verfahren unterscheidet sich von den bekannten Verfahren dadurch, daß man die zu amplifizierende cDNA durch terminale Transferase an ihrem 3'-Ende mit einem Poly dG-Schwanz versieht, so daß bei der PCR-Reaktion als ein Primer ein Oligo dC-Nukleotid verwendet werden kann, das vorzugsweise eine Länge von 19 bis 25 Nukleotiden besitzt. Somit wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nur ein Primer (der erste Primer) verwendet, welcher zu hochkonservierten Regionen bekannter Protein-Tyrosin-Kinasegene homologe Sequenzen enthält. Auf diese Weise gelingt es, im Gegensatz zu den Verfahren des Standes der Technik, mittels der PCR-Reaktion Gene zu amplifizieren, bei denen nur ein homologer Primer zur Verfügung steht.

Vorzugsweise verwendet man bei diesem erfindungsgemäßen Verfahren einen ersten Primer, der zu Sequenzen von Protein-Tyrosin-Kinasegenen aus der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren homolog ist. Aufgrund der geringen Konzentration der Protein-Tyrosin-Kinasegen-mRNA im Ausgangsmaterial wird die PCR vorzugsweise in mindestens 20 Zyklen, besonders bevorzugt in etwa 25 Zyklen durchgeführt. Der bei diesem Verfahren verwendete erste Primer (der aus einer hochkonservierten Region bekannter Protein-Tyrosin-Kinasegene stammt) ist vorzugsweise 19 bis 25 Nukleotide lang und enthält besonders bevorzugt einen Bereich aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz oder einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz, wobei dieser Bereich aus den folgenden Sequenzabschnitten ausgewählt ist:

(a) Nukleotid 1453 - 1470,
(b) Nukleotid 1861 - 1878,
(c) Nukleotid 1921 - 1929,
(d) Nukleotid 1987 - 2004, oder
(e) Nukleotid 2041 - 2058.

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des TKF-Rezeptorproteins oder des dafür codierenden Gens im Rahmen der Tumordiagnostik. So haben Vorversuche gezeigt, daß die Expression des TKF-Rezeptorgens in Tumoren und korrespondierenden Referenzgeweben unterschiedlich ist. Es besteht daher die Möglichkeit, aus der Expressionshöhe des Gens bzw. des Proteins auf die Zellentartung zu schließen.

Weiterhin ist auch eine therapeutische Anwendung mit monoklonalen Antikörpern gegen den Rezeptor möglich. So könnten beispielsweise radioaktive Antikörper oder mit einem Zellgift gekoppelte Antikörper gegen Krebszellen eingesetzt werden, die den TKF-Rezeptor tragen. Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den TKF-Rezeptor ist anhand der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz des TKF-Rezptorproteins ohne Schwierigkeiten nach bekannten Verfahren möglich. Als Immunogen können das gesamte TKF-Rezeptorprotein oder auch nur kurze (≥ 6 Aminosäuren) Peptidsequenzen daraus verwendet werden.

Schließlich betrifft die Erfindung ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel auf Basis eines TKF-Rezeptorproteins, eines dagegen gerichteten Antikörpers oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure. Ein derartiges Mittel kann gegebenenfalls bekannte pharmazeutische Verdünnungs-, Füll-, Träger- und Hilfsmittel enthalten.

Die Erfindung soll weiter durch die Sequenzprotokolle SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:6 zusammen mit den folgenden Beispielen

erläutert werden, ohne daß dabei der Umfang der Erfindung beschränkt werden soll.

Es zeigt:

SEQ ID NO:1 eine 2966 bp lange Nukleinsäuresequenz, die die für das TKF-Rezeptorgen kodierende genetische Information und die 802 AS lange Aminosäuresequenz des TKF-Rezeptorproteins enthält,

SEQ ID NO:2 die Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotidprimers P6(2)

SEQ ID NO:3 die Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotidprimers P5(1),

SEQ ID NO:4 die Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotidprimers P12

SEQ ID NO:5 die Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotidprimers TKF1 und

SEQ ID NO:6 die Nukleinsäuresequenz des Oligonukleotidprimers T1.

Beispiel 1

Isolierung einer Teilsequenz des TKF-Gens

1.1 Es wurde gemäß dem Verfahren von Chirgwin et al. (Biochemistry 18 (1979), 5294) RNA aus humanem Lungengewebe isoliert. Mit dieser RNA wurde eine PTK-spezifische cDNA-Synthese durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

50 mmol/l Tris/HCl, pH 8,3 (22°C)
75 mmol/l KCl
10 mmol/l Dithiotreitol (DTT)
3 mmol/l $MgCl_2$
500 µmol/l dNTP-Lösung
0,2 µmol/l Oligonukleotid-Primer P6(2) mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Nukleinsäuresequenz (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 2044 bis 2063 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).
3,0 µg Gesamt-RNA
100 µg/ml Rinderserumalbumin
10 Einheiten Reverse Transkriptase (aus Moloney - Murine Leukemia virus)

Das obige Reaktionsgemisch wurde in 20 µl Reaktionsvolumen eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.

1.2 Die Amplifizierung der cDNA aus 1.1 erfolgte mit zwei zu hoch konservierten Regionen von PTK-Genen komplementären Primern (P6(2) und P5(1)). Die Nukleinsäuresequenz des Primers P6(2) ist bereits oben angegeben. Die Sequenz von P5(1) ist in SEQ ID NO:3 dargestellt (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 1855 bis 1874 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).

Reaktionsbedingungen:
8,3 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
41,7 mmol/l KCl
1,25 mmol/l $MgCl_2$
0,01 % Gelatine
166,7 µmol/l dNTP-Lösung
0,2 µmol/l Primer P6(2) und P5(1)
5 Einheiten Taq-Polymerase
10 µl cDNA-Syntheseansatz (aus der PTK-spezifischen cDNA-Synthese)

Das Reaktionsvolumen war 60 µl. Die Bedingungen für einen PCR-Zyklus waren wie folgt:
96°C Denaturierung für 1 Minute,
40°C Hybridisierung für 2 Minuten,
70°C Elongation für 3 Minuten.
Es wurden insgesamt 25 Zyklen durchgeführt.

Auf diese Weise wurde ein 208 bp langes DNA-Fragment erhalten, das nach üblichen Methoden kloniert und sequenziert wurde (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989). Die Nukleinsäuresequenz dieses DNA-Fragments entspricht den Nukleotiden 1855 bis 2063 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz.

Beispiel 2

Isolierung einer längeren Teilsequenz des TKF-Rezeptorgens mit Hilfe der Anker-PCR

2.1 Es wurde ein homopolymerisches G-Tailing von cDNA zur 5'-terminalen Verlängerung des in Beispiel 1 erhaltenen PCR-Produkts durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:
1 µl cDNA (0,5 bis 100 pg aus Beispiel 1)
100 mmol/l Kaliumkakodylat pH 7,1 (22°C)
1 mmol/l $CoCl_2$
0,1 mmol/l DTT
50 µg/ml Rinderserumalbumin
50 Einheiten terminale Transferase
25 mmol/l Tris/HCl, pH 7,1 (22°C)
100 µmol/l dGTP

Die Durchführung erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde bis zum Reaktionsbeginn auf Eis ge-

halten. Die cDNA für die Tailing-Reation wurde wie folgt hergestellt:
Zunächst erfolgte eine Entfernung der restlichen, nicht eingebauten dNTPs aus dem cDNA-Syntheseansatz durch Ultrafiltration mit Millipore UFC3 LGC 25-Filtern. Vor der Reaktion wurde die cDNA 3 Minuten lang in kochendem Wasser denaturiert, dann auf Eis abgekühlt und zum Reaktionsansatz pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen für 5 Minuten auf 65°C wurde die Reaktion abgestoppt.

2.2 Als nächster Schritt wurde eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt, wovon der eine mit einer zum poly dG-Schwanz komplementären Oligo-dC-Sequenz versehen war. Eine derartige PCR wird als Anker-PCR-bezeichnet. Der zweite Primer (P6(2)) war zu konservierten Regionen in Protein-Tyrosin-Kinasen komplementär.

Als Oligo-dC-Primer wude das Oligonukleotid P12 verwendet, dessen Nukleinsäuresequenz in SEQ ID NO:4 dargestellt ist.

Die Polymerasekettenreaktion wurde in zwei Amplifikationsrunden durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der ersten Amplifikationsrunden waren wie folgt:

10 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
50 mmol/l KCl
1,5 mmol/l $MgCl_2$
0,01 % Gelatine
200 µmol/l dNTP-Lösung
0,2 µmol/l der Primer P6(2) und P12
5 Einheiten Taq-Polymerase
10 µl Tailing-Reaktionsprodukt (0,5 bis 100 pg)

Das Reaktionsvolumen war 50 µl. Die Bedingungen bei einem Zyklus der PCR-Reaktion waren wie folgt:
Denaturierung bei 96°C für 1 Minute,
Hybridisierung bei 40°C für 2 Minuten und
Elongation bei 70°C für 3 Minuten.
Insgesamt wurden 25 Zyklen durchgeführt.

Für die zweite Amplifikationsrunde wurde 1 µl PCR-Reaktionsprodukt aus der ersten Runde in einen frischen PCR-Ansatz gegeben und unter den gleichen Bedingungen wie oben nochmals in 25 Zyklen amplifiziert. Zur Erhöhung der Spezifität wird ein Primerwechsel von P6(2)/P12 auf TKF1/P12 vorgenommen. Die Nukleinsäuresequenz des Primers TKF1 ist in SEQ ID NO:5 dargestellt (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 1875 bis 1902 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).

Bei der oben beschriebenen Prozedur wurde bei der Anker-PCR neben der Teilsequenz des TKF-Gens eine neue Protein-Tyrosin-Kinase-Sequenz gefunden, die bisher noch nicht charakterisiert wurde.

Beispiel 3

Isolierung einer TKF-Rezeptor-cDNA

Es wurde eine cDNA-Bank aus poly A^+ RNA von humanem Lungengewebe mit $1,8 \times 10^6$ rekombinanten Klonen etabliert. Die Isolierung der mRNA erfolgte gemäß Aviv und Leder (Proc.Natl. Acad.Sci. USA 69 (1972), 1408). Die cDNA-Klonierung erfolgte gemäß Gubler und Hoffman (Gene 25 (1983), 263). Diese Genbank wurde mittels einer DNA-Sonde durchmustert. Die DNA-Sonde wurde durch PCR hergestellt. Als Primer für die PCR wurden die Oligonukleotide P6(2) und T1 verwendet. Die Nukleinsäuresequenz für T1 ist in SEQ ID NO:6 dargestellt (diese Sequenz entspricht den Nukleotiden 1846 bis 1866 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz).

Reaktionsbedingungen:
1 ng TKF-Rezeptor Insert (aus Beispiel 2)
10 mmol/l Tris/HCl, pH 8,8 (22°C)
50 mmol/l KCl
1,5 mmol/l $MgCl_2$
0,01 % Gelatine
0,8 µmol/l α^{32}P-dCTP (6000 Ci/mmol)
0,8 µmol/l dATP/dGTP/dTTP
0,2 µmol/l der Primer P6(2) und T1
2,5 Einheiten Taq-Polymerase

Das Reaktionsvolumen war 25 µl. Die Durchführung der Reaktion erfolgte in 20 Zyklen bei den oben (in Beispiel 2) genannten PCR-Bedingungen.

Zum Nachweis eines positiven Klons wurde cDNA aus der Genbank auf Filtern immobilisiert und an die radioaktiv markierte DNA-Sonde (1 x 10^6 dpm/ml Lösung bei einer spezifischen Sondenaktivität von 5 x 10^9 dpm/µg DNA) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur war 42°C.

Hybridisierungslösung:
5 x SSC
0,02 mol/l Tris/HCl, pH 7,6 (22°C)
1 x Denhardt-Lösung
10 % Dextransulfat
0,1 % SDS
100 µg/ml Heringssperma DNA
50 % Formamid

Als Waschlösung wurde 2 x SSC, 0,1 % SDS bei einer Waschtemperatur von 42°C eingesetzt.

Es wurde ein positiver Klon gefunden und charakterisiert. Er enthielt die in SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleinsäuresequenz.

```
                                                30                                                  60
CCA GCT TGG GTC CCT GAG AGC TGT GAG AAG GAG ATG CGG CTG CTG CTG GCC CTG TTG GGG
                                                                Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly

                                                90                                                 120
GTC CTG CTG AGT GTG CCT GGG CCT CCA GTC TTG TCC CTG GAG GCC TCT GAG GAA GTG GAG
Val Leu Leu Ser Val Pro Gly Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu

                                               150                                                 180
CTT GAG CCC TGC CTG GCT CCC AGC CTG GAG CAG CAA GAG CAG GAG CTG ACA GTA GCC CTT
Leu Glu Pro Cys Leu Ala Pro Ser Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala Leu

                                               210                                                 240
GGG CAG CCT GTG CGT CTG TGC TGT GGG CGG GCT GAG CGT GGT GGC CAC TGG TAC AAG GAG
Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly His Trp Tyr Lys Glu

                                               270                                                 300
GGC AGT CGC CTG GCA CCT GCT GGC CGT GTA CGG GGC TGG AGG GGC CGC CTA GAG ATT GCC
Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala

                                               330                                                 360
AGC TTC CTA CCT GAG GAT GCT GGC CGC TAC CTC TGC CTG GCA CGA GGC TCC ATG ATC GTC
Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val

                                               390                                                 420
CTG CAG AAT CTC ACC TTG ATT ACA GGT GAC TCC TTG ACC TCC AGC AAC GAT GAT GAG GAC
Leu Gln Asn Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu Asp

                                               450                                                 480
CCC AAG TCC CAT AGG GAC CTC TCG AAT AGG CAC AGT TAC CCC CAG CAA GCA CCC TAC TGG
Pro Lys Ser His Arg Asp Leu Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln Gln Ala Pro Tyr Trp

                                               510                                                 540
ACA CAC CCC CAG CGC ATG GAG AAG AAA CTG CAT GCA GTA CCT GCG GGG AAC ACC GTC AAG
Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys

                                               570                                                 600
TTC CGC TGT CCA GCT GCA GGC AAC CCC ACG CCC ACC ATC CGC TGG CTT AAG GAT GGA CAG
Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln

                                               630                                                 660
GCC TTT CAT GGG GAG AAC CGC ATT GGA GGC ATT CGG CTG CGC CAT CAG CAC TGG AGT CTC
Ala Phe His Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser Leu
```

690 720
GTG ATG GAG AGC GTG GTG CCC TCG GAC CGC GGC ACA TAC ACC TGC CTG GTA GAG AAC GCT
Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Ala

750 780
GTG GGC AGC ATC CGT TAT AAC TAC CTG CTA GAT GTG CTG GAA CGG TCA CCG CAC CGG CCC
Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro

810 840
ATC CTG CAG GCC GGG CTC CCG GCC AAC ACC ACA GCC GTG GTG GGC AGC GAC GTG GAG CTG
Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu

870 900
CTG TGC AAG GTG TAC AGC GAT GCC CAG CCC CGC ATC CAG TGG CTG AAG CAC ATC GCC ATC
Leu Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro Arg Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Ala Ile

930 960
AAC GGC AGC AGC TTC GGA GCC GAC GGT TTC CCC TAT GTG CAA GTC CTA GAG ACT GCA GAC
Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val Leu Glu Thr Ala Asp

990 1020
ATC AAT AGC TCA GAG GTG GAG GTC CTG TAC CTG CGG AAC GTG TCA GCC GAG GAC GCA GGC
Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu Arg Asn Val Ser Ala Glu Asp Ala Gly

1050 1080
GAG TAC ACC TGC CTC GCA GGC AAT TCC ATC GGC CTC TCC TAC CAG TCT GCC TGG CTC ACG
Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr

1110 1140
GTG CTG CCA GAG GAG GAC CCC ACA TGG ACC GCA GCA GCG CCC GAG GCC AGG TAT ACG GAC
Val Leu Pro Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr Asp

1170 1200
ATC ATC CTG TAC GCG TCG GGC TCC CTG GCC TTG GCT GCG CTC CTG CTG CTG GCC GGG CTG
Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu

1230 1260
TAT CGA GGG CAG GCG CTC CAC GGC CGG CAC CCC CGC CCG CCC GCC ACT GTG CAG AAG CTC
Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro Arg Pro Pro Ala Thr Val Gln Lys Leu

1290 1320
TCC CGC TTC CCT CTG GCC CGA CAG TTC TCC CTG GAG TCA GGC TCT TCC GGC AAG TCA AGC
Ser Arg Phe Pro Leu Ala Arg Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser

1350 1380

TCA TCC CTG GTA CGA GGC GTG CGT CTC TCC TCC AGC GGC CCC GCC TTG CTC GCC GGC CTC
Ser Ser Leu Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly Leu

1410 1440

GTG AGT CTA GAT CTA CCT CTC GAC CCA CTA TGG GAG TTC CCC CGG GAC AGG CTG GTG CTT
Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu

1470 1500

GGG AAG CCC CTA GGC GAG GGC TGC TTT GGC CAG GTA GTA CGT GCA GAG GCC TTT GGC ATG
Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met

1530 1560

GAC CCT GCC CGG CCT GAC CAA GCC AGC ACT GTG GCC GTC AAG ATG CTC AAA GAC AAC GCC
Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala

1590 1620

TCT GAC AAG GAC CTG GCC GAC CTG GTC TCG GAG ATG GAG GTG ATG AAG CTG ATC GGC CGA
Ser Asp Lys Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly Arg

1650 1680

CAC AAG AAC ATC ATC AAC CTG CTT GGT GTC TGC ACC CAG GAA GGG CCC CTG TAC GTG ATC
His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly Pro Leu Tyr Val Ile

1710 1740

GTG GAG TGC GCC GCC AAG GGA AAC CTG CGG GAG TTC CTG CGG GCC CGG CGC CCC CCA GGC
Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly

1770 1800

CCC GAC CTC AGC CCC GAC GGT CCT CGG AGC AGT GAG GGG CCG CTC TCC TTC CCA GTC CTG
Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu

1830 1860

GTC TCC TGC GCC TAC CAG GTG GCC CGA GGC ATG CAG TAT CTG GAG TCC CGG AAG TGT ATC
Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys Ile

1890 1920

CAC CGG GAC CTG GCT GCC CGC AAT GTG CTG GTG ACT GAG GAC AAT GTG ATG AAG ATT GCT
His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala

1950 1980

GAC TTT GGG CTG GCC CGC GGC GTC CAC CAC ATT GAC TAC TAT AAG AAA ACC AGC AAC GGC
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly

2010 2040

CGC CTG CCT GTG AAG TGG ATG GCG CCC GAG GCC TTG TTT GAC CGG GTG TAC ACA CAC CAG
Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln

2070 2100

AGT GAC GTG TGG TCT TTT GGG ATC CTG CTA TGG GAG ATC TTC ACC CTC GGG GGC TCC CCG
Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro

2130 2160

TAT CCT GGC ATC CCG GTG GAG GAG CTG TTC TCG CTG CTG CGG GAG GGA CAT CGG ATG GAC
Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu Gly His Arg Met Asp

2190 2220

CGA CCC CCA CAC TGC CCC CCA GAG CTG TAC GGG CTG ATG CGT GAG TGC TGG CAC GCA GCG
Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala

2250 2280

CCC TCC CAG AGG CCT ACC TTC AAG CAG CTG GTG GAG GCG CTG GAC AAG GTC CTG CTG GCC
Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala

2310 2340

GTC TCT GAG GAG TAC CTC GAC CTC CGC CTG ACC TTC GGA CCC TAT TCC CCC TCT GGT GGG
Val Ser Glu Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly Gly

2370 2400

GAC GCC AGC AGC ACC TGC TCC TCC AGC GAT TCT GTC TTC AGC CAC GAC CCC CTG CCA TTG
Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His Asp Pro Leu Pro Leu

2430 2460

GGA TCC AGC TCC TTC CCC TTC GGG TCT GGG GTG CAG ACA TGA GCA AGG CTC AAG GCT GTG
Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val Gln Thr End

2490 2520

CAG GCA CAT AGG CTG GTG GCC TTG GGC TTG GGG CTC AGC CAC AGC CTG ACA CAG TGC TCG

2550 2580

ACC TTG ATA GCA TGG GGC CCC TGG CAG AGT TGC TGT GCC GTG TCC AAG GCC GTG CCC TTG

2610 2640
CCC TTG GAG CTG CCG TGC CTG TGT CCT GAT GGC CCA AAT GTC AGG GTT CTG CTC GGC TTC

2670 2700
TTG GAC CTT GGC GCT TAG TCC CCA TCC CGG GTT TGG CTG AGC CTG GCT GGA GAG CTG CTA

2730 2760
TGC TAA ACC TCC TGC CTC CCA ATA CCA GCA GGA GGT TCT GGG CCT CTG AAC CCC CTT TCC

2790 2820
CCA CAC CTC CCC CTG CTG CTG CTG CCC CAG CGT CTT GAC GGG AGC ATT GGC CCC TGA GCC

2850 2880
CAG AGA AGC TGG AAG CCT GCC GAA AAC AGG AGC AAA TGG CGT TTT ATA AAT TAT TTT TTT

2910 2940
GAA ATA AAG CTC TGT GTG CCT GGG TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

SEQ ID NO:2
ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz
NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
P6(2)
LÄNGE: 20 Nukleotide

ATCCCATAAC ACCACACGTC

SEQ ID NO:3
ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz
NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
P5(1)
LÄNGE: 20 Nukleotide

TTTGTCCACC GAGACCTGGC

SEQ ID NO:4
ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz
NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
P12
LÄNGE: 33 Nukleotide

GATTTCAGAG AACTAAACCC CCCCCCCCCC CCC

SEQ ID NO:5
ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz
NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
TKF1
LÄNGE: 28 Nukleotide

GTCCTCAGTC ACCAGCACAT TGCGGGCA

SEQ ID NO:6
ART DER SEQUENZ: Nukleinsäuresequenz
NAME UND HERKUNFT: Synthetischer Oligonukleotidprimer
T1
LÄNGE: 21 Nukleotide

TCCCGGAAGT GTATCCACCG G

Patentansprüche

1. TKF-Rezeptor Protein,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es
(a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Aminosäuresequenz oder
(b) Varianten der Sequenz aus (a) umfaßt.

2. TKF-Rezeptor-Protein nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

Leu (136)	→	Pro;
Arg (280)	→	His;
Ala (288)	→	Val;
Asp (297)	→	Val und
Glu (306)	→	Lys.

3. TKF-Rezeptor-Protein nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

Ala (382)	→	Val und
Pro (400)	→	His.

4. TKF-Rezeptor-Protein nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

Ala (415)	→	Thr und
Pro (443)	→	Thr.

5. Nukleinsäure,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie für ein TKF-Rezeptor Protein und seine Varianten nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.

6. Nukleinsäure nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie ein rekombinantes DNA-Molekül ist.

7. Nukleinsäure nach Anspruch 5 oder 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sie
(a) die in SEQ ID NO: 1 dargestellte kodierende Sequenz,
(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleinsäuresequenz oder
(c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisierende Sequenz enthält.

8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

T (440) → C;
G (872) → A;
C (896) → T;
A (923) → T und
G (949) → A.

9. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

C (1178) → T und
C (1232) → A.

10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß es eine oder mehrere der folgenden Veränderungen gegenüber der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist:

G (1276) → A und
C (1360) → A.

11. Vektor, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 10 oder einen Teil davon enthält.

12. Zelle, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß sie mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 10 oder einem Vektor nach Anspruch 11 transformiert ist.

13. Verfahren für den Nachweis neuer Protein-Tyrosin-Kinasegene mittels einer PCR-Reaktion, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man

(a) aus dem Ausgangsmaterial mRNA nach an sich bekannten Methoden gewinnt,
(b) die mRNA aus Schritt (a) mittels reverser Transkription in cDNA umschreibt,

(c) die cDNA aus Schritt (b) durch terminale Transferase an ihrem 3'-Ende mit einem poly dG-Schwanz versieht,

(d) das aus Schritt (c) resultierende Produkt mittels einer PCR-Reaktion in Anwesenheit von 2 Primern amplifiziert, wobei der erste Primer Sequenzen enthält, die zu hochkonservierten Regionen bekannter Protein-Tyrosin-Kinasegene homolog sind, und der zweite Primer ein oligo dC-Nukleotid ist, und

(e) die resultierenden PCR-Produkte analysiert und charakterisiert.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man einen ersten Primer verwendet, der zu Protein-Tyrosin-Kinasegenen aus der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren homologe Sequenzen aufweist.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man die PCR in mindestens 20 Zyklen durchführt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man einen oligo dC-Primer mit 10 bis 25 Nukleotiden Länge verwendet.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man einen ersten Primer verwendet, der einen Bereich aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz oder einer dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleinsäuresequenz enthält, ausgewählt aus dem folgenden Sequenzabschnitt:

(a) Nukleotid 1453 - 1470,
(b) Nukleotid 1861 - 1878,
(c) Nukleotid 1921 - 1929,
(d) Nukleotid 1987 - 2004, oder
(e) Nukleotid 2041 - 2058.

18. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 10 zur Tumordiagnostik.

19. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Antikörpers gegen ein solches Protein zur Tumortherapie.

20. Diagnostisches Mittel,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es als aktiven Bestandteil ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Antikörper gegen ein solches Protein oder eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 10 umfaßt.

21. Arzneimittel,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es als aktiven Bestandteil ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen gegen ein solches Protein gerichteten Antikörper, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Träger-, Füll- und Verdünnungsmitteln umfaßt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 92/00127

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.[5] C 12 N 15/12 C 12 N 15/10 C 07 K 13/00
A 61 K 37/02 A 61 K 39/395 G 01 N 33/53

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl.[5]	C 12 N C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category [10]	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
P,X	The EMBO Journal, vol. 10, No. 6, June 1991, J. PARTANEN et al.: "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern", pages 1347-1354, see the whole document	1-21
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, vol. 87, No. 22, November 1990, J. PARTANEN et al.: "Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells", pages 8913-8917, see the whole document, especially figure 1, "Conclusion"	1-21
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, vol. 86, March 1989, A.F. WILKS: "Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction", pages 1603-1607, see the whole document, especially "Strategy", figure 1	13-17

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
16 April 1992 (16.04.92)	21 May 1992 (21.05.92)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
EUROPEAN PATENT OFFICE	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. [X] OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE [1]

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. [X] Claim numbers 19, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim 19 relates to a process for treating the human/animal body (applied to a human/animal), the research was carried out and based on the declared effects of the compound/composition.

2. [ ] Claim numbers....., because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claim numbers....., because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. [ ] OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING [2]

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 92/00127

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Cl.5 C 12 N 15/12 C 12 N 15/10 C 07 K 13/00
A 61 K 37/02 A 61 K 39/395 G 01 N 33/53

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff [7]

Klassifikationssytem	Klassifikationssymbole
Int.Cl.5	C 12 N C 07 K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen [8]

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN [9]

Art.°	Kennzeichnung der Veröffentlichung[11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile[12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
P,X	The EMBO Journal, Band 10, Nr. 6, Juni 1991, J. PARTANEN et al.: "FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern", Seiten 1347-1354, siehe das ganze Dokument ---	1-21
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Band 87, Nr. 22, November 1990, J. PARTANEN et al.: "Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells", Seiten 8913-8917, siehe das ganze Dokument, besonders Figur 1, "Conclusion" --- -/-	1-21

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen [10]:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16-04-1992	21. 05. 92

Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT	Natalie Weinberg

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Proceedings of the National Academy of Science of the USA, Band 86, März 1989, A.F. WILKS: "Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction", Seiten 1603-1607, siehe das ganze Dokument, besonders "Strategy", Figur 1	13-17

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

V. ☒ BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN [1]

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgende Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☒ **Ansprüche Nr** 19 **weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich:**

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 19 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers,(das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird) beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/ Zusammensetzung

2. ☐ **Ansprüche Nr** **weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich:**

3. ☐ **Ansprüche Nr** **weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4(a) PCT abgefaßt sind.**

VI. ☐ BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG [2]

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ **Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.**

2. ☐ **Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich**

3. ☐ **Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebührennicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:**

4. ☐ **Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.**

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ **Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.**

☐ **Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.**