(19) DANMARK

(11) **DK 175412 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl[7].: **C 07 K 14/435** **C 12 N 15/16** **C 12 N 15/85**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1986 01277**

(22) Indleveringsdag: **1986-03-20**

(24) Løbedag: **1986-03-20**

(41) Alm. tilgængelig: **1986-09-23**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2004-09-27**

(30) Prioritet: **1985-03-22 US 715142**

(73) Patenthaver: **Genentech Inc., 460 Point San Bruno Blvd., South San Francisco, California 94080, USA**

(72) Opfinder: **Rik Michel Andre Derynck, 2346 Hale Drive, Burlingame, CA 94010, USA**
David Vannorman Goeddel, 2115 Forestview, Hillborough, California 94010, USA

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

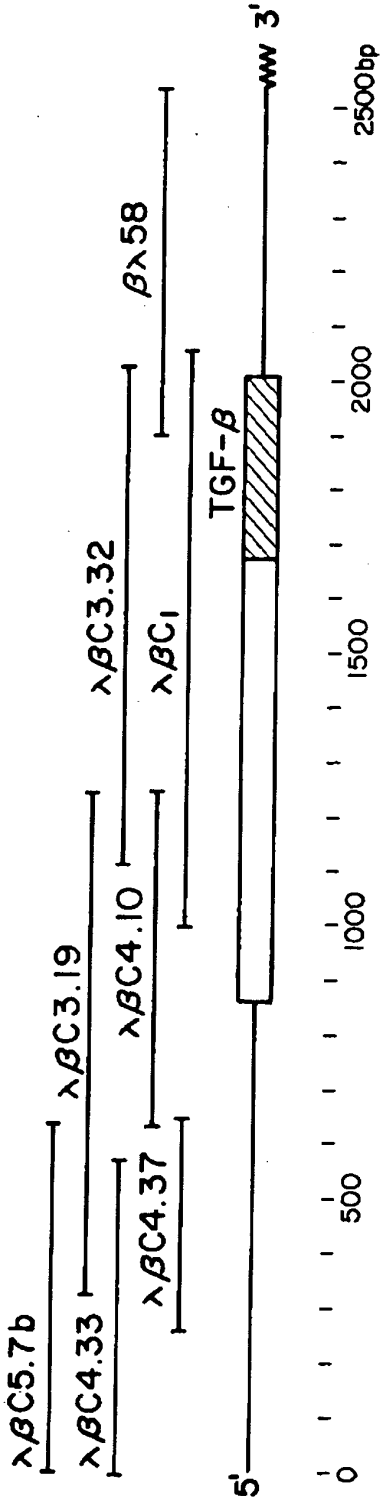
(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af TGF-beta, DNA og mRNA, som koder for TGF-beta, samt replicerbare vektorer omfattende DNA'en og værtsceller indeholdende vektorerne**

(57) Sammendrag:

Nucleinsyre, som koder for TGF-β, er blevet isoleret og klonet i vektorer, som repliceres i bakterier og udtrykkes i eukaryotiske celler. TGF-β udvindes fra transformerede kulturer til anvendelse ved kendte terapeutiske behandlingsmåder. Den mærkede nucleinsyre er nyttig ved diagnose.

fortsættes

Fig. 1a.


λβC5.7b
λβC4.33
λβC3.19
λβC4.37
λβC4.10
λβC1
λβC3.32
βλ58
TGF-β
5'
3'
0
500
1000
1500
2000
2500bp

Peptider, som kan inducere den reversible fænotypiske omdannelse af pattedyrceller i kultur, er blevet givet navnet transformerende vækstfaktor (TGF)[1,2]. Type-α-TGF konkurrerer med epidermal vækstfaktor (EGF) om binding til den samme celleoverfladereceptor[3]. En TGF-α-art på 50 aminosyrer er blevet renset og vist at have sekvenshomologi med EGF[4]. TGF-α syntetiseres af forskellige transformerede cellelinier, men dens syntese er endnu ikke blevet påvist i normalt væv af ikke-embryonisk oprindelse[3,5,6]. TGF-α-arten på 50 aminosyrer syntetiseres fra begyndelsen som del af et forstadiemolekyle på 160 aminosyrer, som undergår N- og C-terminal proteolytisk forarbejdning til dannelse af det modne peptid[7,8]. Detektionen af TGF-α-arter med øjensynligt højere molekylvægte[1,2,9] kan skyldes variabel forarbejdning af forstadiet på 160 aminosyrer.

Type β TGF-aktivitet er blevet isoleret fra tumorceller såvel som mange normale væv[10,11], herunder nyre[12], placenta[13] og blodplader[14,15]. TGF-β er til stede i blodplader, som også indeholder plade-afledt vækstfaktor (PDGF) og et EGF-lignende peptid[16]. Okse-TGF-β er blevet påvist at accelerere sårheling hos rotter[17]. Behandling af NRK-fibroblaster med TGF-β resulterer imidlertid i en forøgelse i antallet af membranreceptorer for EGF[20]. Denne iagttagelse er i overensstemmelse med den kendte evne hos TGF-β til i høj grad at forstærke aktiviteten af EGF og TGF-α på disse celler[10,11]. Endvidere kan TGF-β alene inducere AKR-2B-fibroblaster til at danne kolonier i blød agar[21]. De forhøjede niveauer af TGF-β, som secerneres af nogle transformerede celler[22], antyder at denne vækstregulator kunne spille en rolle ved malign omdannelse.

Foruden dens evne til at stimulere celleformering er TGF-β for nyligt blevet påvist at inhibere den forankrings-

afhængige vækst af en række forskellige humane cancercellelinier[13]. Det menes nu, at TGF-β kan være identisk eller meget lig med en vækstinhibitor isoleret fra celler fra den afrikanske grønne abe (BSC-1)[24]. Om TGF-α har den virkning at stimulere eller inhibere væksten af en bestemt type cellelinie synes at afhænge af mange variable, herunder cellens fysiologiske tilstand og tilstedeværelsen af yderligere vækstfaktorer.

Okse-TGF-β er blevet renset til sekvensbestemmelig renhed. De første 15 aminoterminale rester i det modne protein fandtes at være Ala-Leu-Asp-Thr-Asn-Tyr-CMC-Phe-Ser-Ser-Thr-Gly-Lys-Asn-CMC-, hvor CMC er S-carboxymethylcystein repræsenterende cystein- eller halv-cystin-rester.

Human TGF-β fra human placenta og blodplader er blevet renset til den samme grad. Placenta-TGF-β blev rapporteret at have den følgende aminoterminale sekvens: Ala-Leu-Asp-Thr-Asn-Tyr-CMC-Phe-(Ser-Ser)-Thr-Glu-Lys-Asn-CMC-Val-X-Gln-Leu-Tyr-Ile-Asp-Phe-X-(Lys)-Asp-Leu-Gly-, hvori X var ubestemt, og CMC har den ovenstående betydning. Blodplade-TGF-β blev rapporteret at have den aminoterminale sekvens: Ala-Leu-Asp-Thr-Asn-Tyr-X-Phe-Ser-, hvor CMC og X har den ovenstående betydning.

Human TGF-β blev rapporteret at være sammensat af to polypeptidkæder med meget ens molekylvægt (M_r = 12500), som holdes i kovalent forbindelse af disulfidbindinger. Det blev betragtet som sandsynligt, at disulfidbindingerne spiller en vigtig rolle ved at give struktur til TGF-β-molekylet.

Der er behov for en fremgangsmåde til fremstilling af TGF-β, som afskaffer behovet for biologiske materialer fra mennesker som udgangsmateriale. Dette vil medvirke væsentligt til sikkerheder for, at ingen infektiøse

kontaminanter, f.eks. HTLV-III- eller hepatitis-virus, er i stand til at komme ind i produktfremstillingsstrømmen. Rekombinant syntese af TGF-β ville opfylde dette formål. For at kunne gøre dette kræves imidlertid nucleinsyre, som koder for TGF-β, til fremstilling af vektorer, som skal anvendes ved en sådan rekombinant syntese af TGF-β. En sådan nucleinsyre er også nødvendig for diagnosen af TGF-β mRNA og genomisk DNA i vævsprøver.

Sammenfatning af opfindelsen

De ovennævnte formål opnås ifølge opfindelsen ved en fremgangsmåde, som er ejendommelig ved, at (a) der konstrueres en vektor, som inkluderer nucleinsyre, der koder for TGF-β, (b) en heterolog eukaryotisk værtscelle transformeres med vektoren, (c) den transformerede celle dyrkes, og (d) der udvindes TGF-β fra kulturen.

Nucleinsyre, som koder for TGF-β, er tilvejebragt ifølge denne beskrivelse. Den er nyttig ved konstruktionen af de ovennævnte vektorer. Denne nucleinsyre eller en nucleinsyre, som er i stand til at hybridisere dermed, mærkes også og anvendes ved diagnostiske prøvninger for DNA eller mRNA, som koder for TGF-β eller beslægtede proteiner.

Fremstillingen af TGF-β-derivater ved rekombinante fremgangsmåder muliggøres af kendskabet til den TGF-β-kodende sekvens, som er angivet i denne beskrivelse. Disse derivater inkluderer tavse og udtrykte mutanter i nucleinsyren, som koder for TGF-β.

Tavse mutanter involverer udskiftningen af en degenereret codon med en anden, hvor begge codoner koder for den samme aminosyre, men hvor udskiftningen kunne udøve en gavnlig virkning på TGF-β-udbyttet i rekombinant

kultur, f.eks. ved modificering i den sekundære struktur af TGF-β-mRNA, og den gavnlige udskiftning identificeres ved sigtning af TGF-β-udbytter fra transformanter.

Udtrykte TGF-β-mutanter falder inden for en eller flere af tre klasser: deletioner, udskiftninger eller indsætninger. Deletioner er karakteriseret ved fjernelsen af aminosyrerester uden indsætning af en erstatningsrest. Deletionsmuteret TGF-β-DNA er nyttig ved fremstilling af TGF-β-fragmenter, f.eks. hvor det ønskes at deletere en immunepitop.

Udskiftningsmutationer er sådanne, hvorved én aminosyrerest er blevet erstattet med en anden. Sådanne mutationer er yderst vanskelige at udføre ved andre fremgangsmåder end rekombinant syntese, især udskiftninger rettet mod mål i det indre af den primære aminosyresekvens. De er nyttige ved modificering af den biologiske aktivitet af TGF-β.

Indsætningsmutanter er sådanne, hvori en eller flere rester er anbragt inde i eller ved en af enderne af TGF-β-nucleinsyren. Fusioner er typisk arter af indsætningsmutanter, hvori indsætningen sker ved de carboxyl- eller aminoterminale rester af TGF-β. TGF-β-fusioner med bakterielle eller andre immunogene proteiner er nyttige til frembringelse af antistoffer over for TGF-β eller dets forud fastlagte fragmenter.

Kort beskrivelse af tegningerne

Fig. 1a er et skematisk diagram af TGF-β-mRNA'en, som viser den indrammede kodesekvens. TGF-β-arten på 112 aminosyrer (skraveret) er indkodet af kodesekvensens 3'-ende. De sekvensbestemte cDNA-indsætninger λβC1, 3.19, 3.32, 4.10, 4.33, 4.37 og 5.7b (beskrevet nedenfor)

og den genomiske DNA-sekvens for det 3'-utranslaterede område er anbragt på linie over diagrammet.

Fig. 1b gengiver sekvensen og den afledte aminosyresekvens af præTGF-β-cDNA'en bestemt ud fra de flere overlappende cDNA'er og det genomiske 3'-område. Det 5'-terminale område, som kunne foldes til stabile hårnåleløkker, er understreget. PræTGF-β-cDNA'en koder for et protein på 390 eller 354 aminosyrer, hvoraf de C-terminale 112 aminosyrer (indrammet) koder for moden TGF-β. Et Arg-Arg dipeptid med en fed streg oven over går forud for det proteolytiske spaltningscenter til frigørelse af TGF-β. Tre potentielle N-glycosyleringscentre i præTGF-β er vist med en streg oven over. Stopcodonen efterfølges af den understregede G-C-rige sekvens og en efterfølgende TATA-lignende sekvens. AATAAA polyadenyleringssignalet og TTCAGGCC sekvensen forud for det formodede polyadenyleringscenter er også understreget.

Fig. 2 gengiver et genomisk fragment, som koder for en TGF-β-exon, og dets afledte aminosyresekvens. Pile viser mRNA-forarbejdningscentrene (intron-exon-samlinger). Antallet af rester svarer til fig. 1b.

Detailbeskrivelse

TGF-β har vist sig at være yderst vanskelig at syntetisere i rekombinant cellekultur under bevarelse af dens vækstfremmende aktivitet. Som det kan ses af fig. 1b, indeholder aminosyresekvensen af den modne TGF-β et stort antal cysteinrester (9), hvoraf mindst nogle øjensynligt er involveret i mellemkæde-tværbinding under dannelse af den homodimere TGF-β, som udvindes fra naturlige kilder. Endvidere udtrykkes TGF-β som et forstadiemolekyle med et stort aminoterminalt område, som ikke indeholder den genkendelige aminoterminale signalpeptidsekvens, som er typisk for de fleste secernerede prote-

iner, selv om TGF-β normalt forekommer i nogen grad i det ekstracellulære medium. Uden at begrænse forklaringen heri til nogen bestemt teori kan det tænkes, at dette aminoterminale område indeholder et større antal transmembranområder. Imidlertid har vi været i stand til at transformere eukaryotiske celler til at udtrykke heterolog TGF-β, uanset den forventede vanskelighed ved at forarbejde det primære translationsprodukt rigtigt i rekombinant kultur.

Denne opfindelse er rettet mod rekombinant syntese af TGF-β, der defineres som inkluderende biologisk aktiv præTGF-β med den i fig. 1b viste sekvens, moden TGF-β, polypeptidfragmenter deraf og indsætnings-, udskiftnings- og/eller deletionsmutanter af sådan præTGF-β, moden TGF-β eller polypeptidfragmenter.

Biologisk aktiv TGF-β defineres som værende i stand til at inducere EGF-forstærket forankringsuafhængig vækst af målcellelinier[81] og/eller vækstinhibering af neoplastiske cellelinier[23]. Forankringsuafhængig vækst henfører til evnen hos TGF-β- og EGF-behandlede ikke-neoplastiske målceller til at danne kolonier i blodagar, en egenskab, som tilskrives transformation af cellerne (deraf navnet transformerende vækstfaktor). Dette skal ikke betyde, at TGF-β vil "fremkalde" cancer, fordi det nu vides, at mange normale celler udtrykker TGF-β. Paradoksalt er TGF-β også kendt for at inhibere væksten af visse neoplastiske celler, såsom A549.

Biologisk aktivitet i den her beskrevne forstand inkluderer almindeligvis også evnen til at krydsreagere med antisera frembragt over for nativ TGF-β. Nativ TGF-β er den, som opnås fra blodplader eller andre naturlige kilder. Immunologisk krydsreaktivitet er et mål for en enkelt aktiv epitop og ikke nødvendigvis aktive TGF-β-

domæner involveret i fremkaldelse af forankringsuafhængig vækst eller målceller. Imidlertid er immunologisk krydsreaktive proteiner i sig selv ikke biologisk aktive som defineret her, med mindre de også udøver vækstpåvirkende aktivitet. Selvfølgelig vil TGF-β, som er i stand til at fremkalde forankringsuafhængig vækst, hyppigt også udvise immunologisk krydsreaktivitet med antisera frembragt over for det native molekyle som en naturlig følge af opretholdelsen af den rette konformation.

Nucleotidsekvensen i fig. 16 blev opnået ved en analyse af flere overlappende cDNA'er og genfragmenter, hvilket førte til bestemmelsen af en kontinuert sekvens på 2537 basepar svarende til TGF-β-forstadie-mRNA'en. Ifølge fig. 1b er en ATG-startcodon lokaliseret 841 nucleotider fra 5'-enden og etablerer en kodesekvens på 1696 nucleotider, hvorved den koder for et 390 aminosyrer langt polypeptid. Flere områder i cDNA-sekvensen har et yderst højt G-C-indhold. ATG-startcodonen flankeres af to G-C-rige områder på omkring 200 bp hver. Desuden har flere områder af cDNA'en, især i 5'-enden, mere end 80 % G-C-indhold. Lokaliseringen af disse G-C-rige områder falder sammen med de områder, hvori de mange cDNA-kloningskunstprodukter forekom, og hvor der blev opnået cDNA'er af delvis længde.

Flere strukturelle træk favoriserer udpegningen af ATG-codonen i position 953 som startcodonen for præTGF-β fremfor codonen i position 842 som vist i fig. 1b. For det første er sekvenssammenhængen i denne position i rimelig overensstemmelse med den foreslåede startcodon-konsensussekvens G/A CCATGG[35]. For det andet kan der, selv om der forud for denne ATG går en åben aflæsningsramme på omkring 850 bp kun findes én anden ATG i den samme aflæsningsramme. For det tredje viser ud-

regning af den mest sandsynligt anvendte aflæsningsramme, baseret på purin-pyrimidin-fordelingen som beskrevet af Shepherd[36], at kodesekvensen startende fra start-ATG-codonen faktisk er den mest sandsynlige aflæsningsramme, medens der forud for denne ATG må vælges en anden aflæsningsramme som den mest sandsynlige. For det fjerde er denne ATG lokaliseret i et område på 40 nucleotider med relativt lavt G-C-indhold (ca. 50 %), hvilket kunne favorisere tilgængeligheden for ribosomet, især da det er lokaliseret i et større G-C-rigt område. Der er kun en enkelt anden potentiel startcodon i den 5'-utranslaterede sekvens (position 842). Imidlertid er denne ATG placeret i en anden læseramme, er efterfulgt efter 19 tripletter af en stopkode og er lokaliseret i et meget G-C-rigt område.

Det 5'-utranslaterede område af TGF-β-mRNA'en er mindst 952 nucleotider langt (under den antagelse at ATG-startcodonen er lokaliseret ved nucleotid 953) og indeholder en 61 nucleotider lang sekvens (192 - 252) bestående næsten udelukkende af puriner. Den biologiske relevans af dette exceptionelt lange 5'-utranslaterede område med højt G-C-indhold er ukendt, men det minder om den strukturelle organisation af c-myc-mRNA. Imidlertid er der ingen slående sekvenshomologi mellem disse to sekvenser. Det lange 5'-utranslaterede område i c-myc er blevet hypotetiseret at have en funktionel betydning[37]. Den G-C-rige 5'-proximale del af den 5'-utranslaterede sekvens i human c-myc-mRNA har flere områder, som kunne danne stabile hårnåleløkker. Ligeledes kan de første 120 bp af den utranslaterede præTGF-β-cDNA teoretisk foldes til hårnåleløkkestrukturer med en udregnet stabilitet på -91 kcal. Den lange 5'-utranslaterede sekvens og de potentielt stabile hårnåleløkkestrukturer kunne spille en rolle i mRNA-stabilitet eller i reguleringen af transcription. I overensstemmelse hermed kan dette område deleteres og erstattes med andre 5'-utranslaterede sekvenser, f.eks. fra virale proteiner, for at identifi-

cere strukturer, som kan forbedre TGF-β-udbytter fra rekombinant cellekultur.

Stopcodonen forud for rest 2015 efterfølges umiddelbart af en bemærkelsesværdig G-C-rig sekvens på 75 nucleotider (fig. 1b). Denne sekvens består af mange gentagelser af CCGCC og ender med GGGGGC. Den særegne natur af denne sekvens er sandsynligvis ansvarlig for, at den 3'-utranslaterede ende af mRNA'en ikke kunne klones som en cDNA-sekvens, måske på grund af den manglende evne hos E. coli DNA-polymerase I til at anvende denne sekvens som skabelon for anden-strengs-cDNA-syntesen. Gentagelsessekvenser af lignende art er blevet fundet i promotorområderne af generne for human dihydrofolatreductase, human transferrinreceptor, human adenosindeaminase og Herpesvirus-thymidinkinase[40]. I det sidstnævnte tilfælde har McKnight et al.[40] vist, at disse strukturelle elementer er af største vigtighed for transcriptionseffektiviteten. Desuden er det blevet vist, at den promotorspecifikke transcriptionsfaktor Spl bindes til sådanne sekvenser i det tidlige promotorområde i SV40 og i en beslægtet abepromotor[41,42]. I alle disse tilfælde efterfølges de G-C-rige gentagelser nært af Goldberg-Hogness-TATA-sekvensen. I præTGF-β er disse sekvenser imidlertid lokaliseret i genets 3'-utranslaterede område, men efterfølges interessant nok også af en TATA-lignende sekvens. Der er ingen tegn på at dette område kunne fungere som promotorsekvens. præTGF-β-gensekvensen har hexanucleotidet AATAAA omkring 500 nucleotider nedad fra stopcodonen. Denne sekvens, som sædvanligvis kommer 11 - 30 baser forud for polyadenyleringscentret[32], fungerer sandsynligvis som præTGF-β-mRNA-polyadenyleringssignalet, da dette ville være i overensstemmelse med størrelsen af præTGF-β-mRNA bedømt ud fra Northern-hybridiseringer, og eftersom 3'-utranslaterede områder sjældent indeholder mellemliggende

sekvenser. Benoist et al.[43] har foreslået en konsensussekvens TTCACTGC, som følger tæt på AATAAA-sekvensen og kommer umiddelbart før polyA-halen. En lignende sekvens, TTCAGGCC, følger efter AATAAA-sekvensen i det 3'-utranslaterede område af præTGF-β-mRNA'en, hvilket giver yderligere støtte til antagelsen af polyadenyleringscentret ved position 2530 (fig. 1b).

PræTGF-β er et polypeptid på 354 aminosyrer (eller 390 aminosyrer som vist i fig. 1b). Sammenligning af denne sekvens med den tidligere beskrevne NH_2-terminus af moden TGF-β viser, at TGF-β udgør de C-terminale 112 aminosyrer af præTGF-β. Den modne TGF-β-monomer spaltes fra forstadiet ved Arg-Arg-dipeptidet, som kommer umiddelbart før den modne TGF-β's NH_2-terminus. Lignende proteolytiske spaltningscentre er blevet fundet i flere andre polypeptidforstadiesekvenser, herunder præproenkephalin[44,45], calcitoninforstadiet[46] og corticotropin-β-lipotropin-forstadiet[47]. Bestemmelse af hydrophobicitetsprofilen ved den metode, som er beskrevet Kyte og Doolittle[48] forudsiger, at denne Arg-Arg-sekvens er lokaliseret i et hydrophilt område, som ville gøre den tilgængelig for en trypsinlignende peptidase. Efter-translations-spaltning af forstadiet giver den modne TGF-β-monomer. Hvad der bliver af præsekvensen, vides ikke, men den kan give anledning til andre biologisk aktive peptider. TGF-β-forstadiet indeholder flere par af basiske rester (fig. 1b), som også kunne undergå efter-translations-spaltning og give anledning til separate polypeptidenheder. Imidlertid indeholder moden TGF-β to Arg-Lys-dipeptider, som øjensynligt ikke spaltes. Som vist i fig. 1b, indeholder præTGF-β-forstadiet tre potentielle N-glycosyleringscentre, Asn-X-Ser eller Thr (fig. 1b). Intet af disse er lokaliseret i moden TGF-β. I overensstemmelse hermed tilvejebringes en fremgangsmåde, hvorved moden TGF-β renses fri for glyco-

proteiner ved adsorption af glycoproteinerne på immobiliserede lectiner og eluering af TGF-β med den uadsorberede fraktion.

Sekvensen for human TGF-β blev bestemt ved direkte aminosyresekvensanalyse og ved deduktion ud fra TGF-β-cDNA'en. Sekvensen af de forskellige TGF-β-peptider opnået ved clostripain-nedbrydning er i overensstemmelse med cDNA-sekvensen med undtagelse af nogle få rester, som antageligvis skyldes ukorrekt aminosyretildeling ved sekvensbestemmelsen. TGF-β-sekvensen på 112 aminosyrer indeholder 9 cysteinrester, medens resten af forstadiet kun indeholder to (fig. 1b). Tidligere undersøgelser har vist, at reduktion af TGF-β-dimeren på 25 kd resulterer i skabelsen af to polypeptidkæder på 12,5 kd[15]. Sekvensanalyse af TGF-β-aminoterminus og af de opnåede TGF-β-peptider efter clostripain-nedbrydning tyder stærkt på, at TGF-β-dimeren består af to identiske polypeptider. Denne homodimere natur understøttes også af tilstedeværelsen af kun et enkelt hybridiserende DNA-fragment efter Southern-hybridisering af human genomisk DNA med en TGF-β-exon-sonde. Chou-Fasman-analyse[50] af den sekundære struktur viser, at TGF-β-polypeptidet har en udstrakt β-ark-karakter med kun lidt, om overhovedet nogen, α-helicitet. Området umidelbart forud for basisk-dipeptid-spaltningscentret er sandsynligt i en α-helical konfiguration.

Et bemærkelsesværdigt træk ved TGF-β-forstadiet er, at det ikke indeholder en genkendelig aminoterminal signalpeptidsekvens, som er typisk for de fleste secernerede proteiner. Den mekanisme, hvorved TGF-β viser sig i det ekstracellulære medium, er ukendt, men kan være relativt ineffektiv, da moden TGF-β sædvanligvis også kan findes forbundet med cellerne hos gnavere eller mennesker. Det forstås heller ikke, hvordan TGF-β op-

lagres inden i blodplader. Fornylig er cDNA-sekvenser, som koder for interleukin-1[51,52] og tumornecrosefaktor[53], blevet bestemt. Selv om begge viser sig i det ekstracellulære medium, indeholder ingen af dem et typisk aminoterminalt signalpeptid.

En mulig mekanisme for TGF-β-frigivelse til det ekstracellulære medium er ved spaltning fra forstadiet forankret i membranen med NH_2-terminus i cytoplasmaet og TGF-β-sekvensen på den udvendige side. De fleste proteiner, som strækker sig tværs over membraner en enkelt gang, synes at have et transmembranområde på 20 - 23 uladede, hovedsageligt hydrofobe rester. Den eneste kendte undtagelse er T3-underenheden af T-celle-receptoren[54], som indeholder en Asp-rest i transmembranområdet. Et lignende hydrofobt domæne kan ikke forudsiges ud fra den afledte aminosyresekvens af TGF-β-forstadiet, hvilket gør det usandsynligt, at dette protein har et enkelt transmembrandomæne.

Det er imidlertid tænkeligt, at TGF-β-forstadiet er et protein med flere transmembranområder. Sådanne proteiner, f.eks. rhodopsin[55], den elektriske åls natriumkanalprotein[56] og det overvejende indre protein i linsegab-junctions[57] har deres NH_2-termini i cytoplasmaet og indeholder flere transmembrandomæner, som faktisk indeholder flere ladede rester. Det er muligt, at nogle af disse ladninger neutraliseres på grund af den fysiske nærhed af rester med modsatte ladninger lokaliseret i nabo-transmembran-områder. I de fleste tilfælde er transmembrandomænerne flankeret af ladede rester, som ofte er positive på cytoplasmasiden og negative på den ekstracellulære side. Sammenligning af disse træk med TGF-β-sekvensen tyder på, at TGF-β-forstadiet kan høre til denne klasse af membranproteiner, da det indeholder flere potentielle transmembranområder og

flere klynger af ladede rester. Vi foreslår, at de NH_2-terminale 21 aminosyrer, som er rige på positivt ladede rester, er lokaliseret på cytoplasmasiden af det første transmembranområde, som muligvis er lokaliseret mellem resterne 59 og 80. Dette domæne efterfølges ved den udvendige side af to Arg-rester og en klynge på 5 negativt ladede glutaminsyrerester (aminosyrerne 91 - 100). Et andet transmembranområde kunne være lokaliseret mellem resterne 127 og 151 og ligger forud for en klynge af basiske rester (aminosyrerne 156 - 165) lokaliseret på cytoplasmasiden. Et tredie membranoverspændende område kunne findes mellem resterne 248 og 270 efter Arg-Arg-dipeptidet ved position 245. Det sidstnævnte område ville indeholde to positive ladninger, som kunne neutralisere de to negativt ladede rester, som findes i det første eller andet transmembranområde. Som resultat af denne konfiguration ville TGF-β-polypeptidet og dets forudgående Arg-Arg-rester være lokaliseret på den udvendige side af membranen. Dette ville muliggøre spaltning ved hjælp af en dibasisk peptidase lokaliseret ved den side af cellemembranen[58,59] og ville igen resultere i frigivelsen af TGF-β i det ekstracellulære miljø. Denne postulerede struktur af TGF-β-forstadiet indebærer sandsynligvis, ligesom i humant rhodopsin[55] og det overvejende indre protein i linsefibermembranen[57], at ikke alle potentielle N-glycosyleringscentre bærer carbonhydratdele. Det bør indses, at den ovenstående model er hypotetisk og på ingen måde skal betragtes som begrænsende for opfindelsens omfang.

Til de heri angivne formål defineres præTGF-β som det normale TGF-β-forstadium afbildet i fig. 1 såvel som andre forstadieformer af TGF-β, hvori præsekvensen ikke er den, der normalt er forbundet med TGF-β. Disse sidstnævnte former skal betragtes som indsætningsmutanter af DNA, som koder for moden TGF-β. Disse mutanter omfat-

ter almindeligvis en præsekvens, som er heterolog for TGF-β, i form af en fusion med moden TGF-β. De heterologe præsekvenser, som fortrinsvis opnås fra andre secernerede proteiner, f.eks. prævæksthormon, præproinsulin, virale hylsterproteiner, interferoner og gær- eller bakterielle præsekvenser, som genkendes af pattedyrværtsceller. Sekvenserne for disse sekretoriske ledere er kendte ligesom egnede kilder til DNA, som koder for disse, hvis man ikke ønsker at syntetisere DNA'en in vitro. De forbindes med DNA, som koder for moden TGF-β, ved restriktionsenzymnedbrydning af DNA'en indeholdende det ønskede signal og præTGF-β-DNA'en. Der fremstilles syntetiske oligonucleotider for at indføre unikke restriktionscentre (linkere) og, om nødvendigt, DNA-fragmenter, som behøves til at fuldende en præsekvens og kodeområder for moden TGF-β fjernet under restriktionsenzymnedbrydningen. De syntetiserede linkere og/eller fragmenter ligeres derpå til restriktionsenzymnedbrydningsfragmenterne indeholdende erstatningssignalet og TGF-β-kodeområdet, indsættes i en kloningsvektor, og vektoren anvendes til at transformere bakterielle værter. Mutantpræsekvensen klones derefter ind i en udtrykkelsesvektor og anvendes til at transformere værtsceller. Et belysende eksempel under anvendelse af en virushylsterprotein-præsekvens er beskrevet nedenfor.

Optimalt forbindes den komplette heterologe præsekvens med den første codon i TGF-β-DNA'en, selv om det er inden for opfindelsens omfang at forbinde kodesekvensen for moden TGF-β med den komplette heterologe præsekvens plus en kort portion, f.eks. 21 - 45 basepar, som stammer fra DNA'en, der koder for det modne heterologe protein. Formålet med disse konstruktioner er at indføre et højeffektivt sekretorisk system i stedet for det postulerede system for præTGF-β. Imidlertid er det på ingen måde nødvendigt at sercernere TGF-β

for at producere det i rekombinant kultur.

Andre deletions-indsætnings-mutanter kan fremstilles ved at forbinde modne TGF-β-arter med virale proteiner udtrykt i store intracellulære mængder, f.eks. retrovirale kærneproteiner, stort T-antigen fra SV40 og lignende, eller med immunogene bakterielle proteiner eller polypeptider, såsom kemotaktiske polypeptider, især det kraftigt kemotaktiske tripeptid Met-Leu-Phe-.

Udtrykte mutanter af præTGF-β, moden TGF-β eller fragmenter deraf vil udvise aminosyresekvenser, som gradvis afviger fra sekvensen i fig. 1, efterhånden som antallet og omfanget af indsætninger, deletioner og udskiftninger forøges. Denne afvigelse måles som en reduktion i homologi mellem præTGF-β og mutanten. Alle proteiner eller polypeptider, som udviser den for TGF-β karakteristiske forankringsuafhængige vækstfremmende biologiske aktivitet, er omfattet af denne opfindelse, uanset den grad af homologi, som de viser med proteinet i fig. 1. Grunden hertil er, at nogle områder af præTGF-β, f.eks. præsekvensen, let muteres eller endog fuldstændig deleteres, som i tilfældet af moden TGF-β, og denne biologiske aktivitet vil blive bevaret. På den anden side vil deletion af de ni cysteinrester (og ledsagende disulfidbindinger) i det modne TGF-β-molekyle have en væsentlig skadelig virkning på denne biologiske aktivitet, og ville efter al sandsynlighed fuldstændigt ophæve biologisk aktivitet. Desuden kan en udskiftningsmutant udvise fuld vækstfremmende TGF-β-aktivitet og alligevel være mindre homolog, hvis der udskiftes rester indeholdende funktionelt ens aminosyrekæder. Funktionelt ens henfører til dominante egenskaber af sidekæderne, såsom hydrofob, basisk, neutral eller sur, eller forekomst eller fravær af sterisk masse. Således er den grad af homologi, som et givet polypeptid har med præTGF-β,

ikke hovedmålestokken for dets identitet som TGF-β. Imidlertid skal som almen vejledning proteiner eller polypeptider, som har i det mindste nogen fælles biologisk aktivitet med moden TGF-β fra naturlige kilder, og som er i det væsentlige homologe med sekvensen i fig. 1b, f.eks. fra omkring 40 til omkring 100% homolog med præTGF-β eller ethvert fragment deraf på over ca. 20 rester, betragtes som faldende inden for omfanget af betegnelsen TGF-β. Med hensyn til neoplastisk cellevækstinhiberende aktivitet er polypeptider, som tidligere er kendte for at udøve sådan vækstinhiberende aktivitet, f.eks. interferoner, tumornecrosefaktor og lymfotoxin, men som ellers ikke nødvendigvis behøver at have homologe områder med sekvenserne i fig. 1b, udelukket fra betegnelsen TGF-β.

Mere snævre og specifikke faktorer til at fastslå identiteten af et polypeptid som TGF-β er (a) evnen hos antisera, som er i stand til i det væsentlige at neutralisere den vækstinhiberende eller forankringsuafhængige vækstfremmende aktivitet af moden TGF-β, til også i det væsentlige at neutralisere aktiviteten af det pågældende polypeptid, eller (b) evnen hos det pågældende polypeptid til at konkurrere med TGF-β om TGF-β-celleoverfladereceptoren. Imidlertid vil det indses, at immunologisk identitet og vækstfremmende identitet ikke nødvendigvis har samme omfang. Et neutraliserende antistof for moden TGF-β i fig. 1b behøver ikke at binde et kandidatprotein, fordi det neutraliserende antistof eventuelt ikke er rettet mod et center på TGF-β, som er kritisk for dens vækstfremmende aktivitet. I stedet kan antistoffet binde et uskadeligt område og udøve dets neutraliserende virkning ved sterisk hindring. Derfor behøver et kandidatprotein, som er muteret i dette uskadelige område, ikke længere at binde det neutraliserende antistof, men det ville ikke desto mindre

være TGF-β, hvad angår væsentlig homologi og biologisk aktivitet.

Det er vigtigt at bemærke, at egenskaber som molekylvægt og lignende for den native eller vild-type modne TGF-β i fig. 1b opnået ud fra placenta eller blodplader kun er beskrivende for de native arter af TGF-β. De heri omhandlede mutanter kan variere betydeligt fra egenskaberne af nativ TGF-β, og dette kan faktisk være formålet med mutagenesen, som nærmere beskrevet nedenfor. Selv om TGF-β som defineret her inkluderer nativ TGF-β, vil andre beslægtede biologisk aktive polypeptider falde inden for definitionen. TGF-β-arter, som de oven for beskrevne indsætningsmutanter, deletionsmutanter eller fusionsproteiner vil bringe mutanten uden for den molekylvægt, som er fastslået for nativ TGF-β. For eksempel ville fusionsproteiner med moden TGF-β eller præTGF-β selv have en større molekylvægt end nativ, moden TGF-β, medens deletionsmutanter af moden TGF-β vil have en lavere molekylvægt. På lignende måde behandles TGF-β for at indføre glycosyleringscentre, hvilket resulterer i glycosyleret TGF-β, eller for at indføre serin i stedet for cystein ved centre, som ikke er kritiske for biologisk aktivitet. Endelig kan efter-translations-forarbejdning af human præTGF-β i cellelinjer afledt fra ikke-primat-pattedyr frembringe mikroheterogenitet i det aminoterminale område af moden TGF-β, således at alanin ikke længere vil være den aminoterminale aminosyre.

Bemærk at sprogbrugen "i stand til" at inducere forankringsuafhængig vækst i definitionen af biologisk aktivitet betyder, at præTGF-β eller fragmenter deraf inkluderer polypeptider, som kan omdannes, f.eks. ved enzymatisk nedbrydning, til et polypeptidfragment, som udviser den ønskede biologiske aktivitet. Typisk vil inaktive forstadier være fusionsproteiner, hvori moden

TGF-β ved hjælp af en peptidbinding ved dens carboxylterminus er forbundet med et uopløseligt eller gelatinøst protein. Sekvensen ved eller inden for området af denne peptidbinding vælges således, at den er modtagelig for proteolytisk hydrolyse, hvorved TGF-β frigives, enten in vivo til frembringelse in situ eller, som del af en fremstillingsforskrift, in vitro.

Selv om TGF-β almindeligvis betyder human TGF-β, er TGF-β fra kilder som mus, svin, heste eller kvæg, inkluderet i definitionen af TGF-β, så længe den iøvrigt opfylder de oven for beskrevne standarder for biologisk aktivitet. TGF-β er ikke artsspecifik, f.eks. er både muse- og human TGF-β effektive til fremkaldelse af forankringsuafhængig vækst af den samme cellelinje. Derfor kan TGF-β fra én art anvendes til behandling af en anden art. DNA, som koder for TGF-β'en fra andre arter, opnås ved sondering af cDNA- eller genomiske biblioteker fra sådanne arter med mærket human præTGF-β-cDNA.

Derivater af TGF-β er omfattet af denne opfindelse. Derivater inkluderer glycosylerede og kovalente eller aggregative konjugater med andre TGF-β-molekyler, dimere eller ubeslægtede kemiske dele. Kovalente derivater fremstilles ved sammenknytning af funktionelle grupper med grupper, som findes i TGF-β-aminosyrekæderne eller ved N- eller C-termini, ved kendte metoder inden for faget. Disse derivater kan f.eks. inkludere: alifatiske estere eller amider af carboxylterminus; alkylaminer eller rester indeholdende carboxylsidekæder, f.eks. konjugater til alkylaminer ved asparaginsyrerester; O-acylderivater af hydroxygruppeholdige rester og N-acylderivater af den aminoterminale aminosyre eller aminogruppeholdige rester, f.eks. konjugater med fMet-Leu-Phe eller immunogene proteiner. Derivater af acyl-

grupperne vælges blandt alkyldele (herunder n-alkyl med 3 - 10 carbonatomer), hvorved der dannes alkanoyl-derivater, og carbocycliske eller heterocycliske dele, hvorved der dannes aroylderivater. De reaktive grupper er fortrinsvis difunktionelle forbindelser, som i sig selv er kendte til anvendelse ved tværbinding af proteiner til uopløselige matricer via reaktive sidegrupper.

Kovalente eller aggregative derivater er nyttige som reagenser ved immunoprøvning eller til affinitetsrensningsprocedurer. For eksempel insolubiliseres TGF-β ved kovalent binding til cyanbromid-aktiveret "Sepharose"® ved i sig selv kendte metoder eller ved adsorption til polyalkenoverflader (med eller uden glutaraldehyd-tværbinding) til anvendelse ved prøvning eller rensning af anti-TGF-β-antistoffer eller celleoverfladereceptorer. TGF-β mærkes også med en detekterbar gruppe, idet den f.eks. kan radioioderes ved chloramin-T-proceduren, bindes kovalent til sjælden-jordart-chelater eller konjugeres til en anden fluorescerende del til anvendelse ved diagnostiske prøvninger, især til diagnose af TGF-β-niveauer i biologiske prøver ved immunoprøvninger af konkurrencetypen.

Mutant-TGF-β fremstilles almindeligvis ved de forudbestemte, dvs. stedspecifikke metoder. Formålet med mutagenese er at konstruere DNA, som koder for TGF-β som defineret ovenfor, dvs. TGF-β, som udviser biologisk aktivitet.

Selv om mutationsstedet er forudbestemt, er det ikke nødvendigt, at mutationen i sig selv er forudbestemt. For at optimere mutanternes funktion i en given position gennemføres for eksempel tilfældig mutagenese ved målcodonen, og de udtrykte TGF-β-mutanter sigtes for optimal aktivitet. Teknikker til en frembringelse af udskift-

ningsmutationer ved forudbestemte steder i DNA med en kendt sekvens er velkendte, f.eks. M13 startkædemutagenese.

TGF-β-mutagenese gennemføres ved foretagelse af aminosyreindsætninger, sædvanligvis af størrelsesordenen 1 - 5 aminosyrerester, eller deletioner af størrelsesordenen 1 - 10 rester. Udskiftninger, deletioner, indsætninger eller enhver underkombination kan kombineres til opnåelse af en endelig konstruktion. Som bemærket ovenfor inkluderer indsætninger amino- eller carboxylterminale fusioner, f.eks. med et hydrofobt eller immunogent protein. Mutationerne i DNA'en, som koder for sådanne mutationer, må ikke til sidst bringe sekvensen ud af aflæsningsramme i en udtrykkelsesvektor, hvorved det resulterende protein ikke vil blive biologisk aktiv TGF-β. Mutationerne må fortrinsvis heller ikke skabe komplementære områder, som kunne frembringe translationsundertrykkende sekundær mRNA-struktur.

DNA, som koder for TGF-β, opnås ved kemisk syntese, ved sigtning af reverse transkripter af mRNA fra placenta eller andre celler eller ved sigtning af genomiske biblioteker fra eukaryotiske celler. Denne DNA behøver ikke at anvende de codoner, som er angivet i fig. 1b, så længe værtscellen genkender de codoner, som anvendes. DNA af denne art fremstilles let in vitro som DNA'en i fig. 1b. Nyttige herved er også nucleinsyrer, enten RNA eller DNA, som ikke koder for TGF-β som defineret her, men som ikke desto mindre er i stand til at hybridisere med sådan DNA eller RNA. Ikke-kodende, men hybridiserende nucleinsyre er, selv om den ikke anvendes ved den rekombinante syntese af TGF-β, nyttig som mellemprodukt til fremstilling af mærkede sonder ved diagnostiske prøvninger for TGF-β-mRNA eller genomisk DNA i prøveceller.

Diagnostisk nucleinsyre mærkes kovalent med et detekterbart stof, såsom en fluorescerende gruppe, et radioaktivt atom eller en kemiluminescensgruppe ved i sig selv kendte metoder. Den anvendes derpå ved konventionelle Southern- eller Northern-hybridiseringsprøvninger. Sådanne prøvninger anvendes til identifikation af TGF-β-vektorer og transformanter som beskrevet i de nedenstående eksempler, eller til in vitro diagnose, såsom detektion af TGF-β-mRNA i væv som et mål for mitogen aktivitet.

TGF-β syntetiseres ifølge denne beskrivelse i værtsceller transformeret med vektorer indeholdende DNA, som koder for TGF-β. En vektor er en replicerbar nucleinsyrekonstruktion. Vektorer anvendes enten til at formere og/eller til at udtrykke DNA, som koder for TGF-β, eller til at formere DNA, som hybridiserer med DNA eller RNA, som koder for TGF-β. En udtrykkelsesvektor er en replicerbar DNA-konstruktion, hvori en DNA-sekvens, som koder for TGF-β er operabelt forbundet med egnede styresekvenser, som er i stand til at frembringe udtrykkelsen af TGF-β i en egnet vært. Sådanne styresekvenser inkluderer en transkriptionspromotor, en eventuel operatorsekvens til at styre transkriptionen, en sekvens, som koder for egnede mRNA-ribosom-bindingscentre, og sekvenser, som styrer afslutningen af transkription og translation. Til udtrykkelse af TGF-β i eukaryotiske celler bør vektoren også inkludere DNA, som koder for et selektionsgen. Imidlertid kan selektionsgenet leveres af et uforbundet plasmid i cotransformation.

Vektorer omfatter plasmider, virus (herunder fager) og integrerbare DNA-fragmenter, dvs. fragmenter, som kan integreres i værtsgenomet ved rekombination. I den foreliggende beskrivelse er vektoren et plasmid i den forstand, at den klones i bakterieceller, men den inte-

greres i værtscellegenomet efter cotransformation. Imidlertid er alle andre former for vektorer, som har en ækvivalent funktion, og som er eller vil blive kendte inden for faget, egnede til anvendelse ifølge denne beskrivelse. Egnede vektorer vil indeholde replicon og styresekvenser, som er afledt fra arter, der er kompatible med den påtænkte udtrykkelsesvært.

DNA-områder er operabelt forbundne, når de står i funktionelt forhold til hinanden. For eksempel er DNA for en præsekvens eller sekretorisk leder operabelt forbundet med DNA for et polypeptid, hvis den udtrykkes som et præprotein, der deltager i sekretionen af polypeptidet; en promotor er operabelt forbundet med en kodesekvens, hvis den styrer transkriptionen af sekvensen; eller et ribosombindingscenter er operabelt forbundet med en kodesekvens, hvis det er anbragt således, at det tillader translation. Almindeligvis betyder "operabelt forbundet" ud i ét og, i tilfælde af sekretoriske ledere, ud i ét og i aflæsningsfase.

Kulturer af celler afledt fra flercellede organismer er de foretrukne værtsceller i denne beskrivelse. I princippet er enhver højere eukaryotisk cellekultur brugbar, hvad enten den er fra hvirveldyr- eller ikke-hvirveldyr-kultur. Imidlertid har interessen været størst for hvirveldyrceller, og formering af hvirveldyrceller i kultur er blevet en rutineprocedure i de seneste år [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)]. Eksempler på nyttige værtscellelinjer er VERO- og HeLa-celler, kinesisk-hamster-ovarie- (CHO)-cellelinjer og WI38-, COS-7- og MDCK-cellelinjer.

Mange eukaryotiske celler vides at syntetisere endogen TGF-β. Således syntetiserer mange potentielle værtsceller TGF-β af værtsarten. Denne TGF-β er derfor til stede

i den TGF-β, som produceres ved transkription og translation af den transformerede DNA. F.eks. er hamster-TGF-β til stede i human-TGF-β-transformerede CHO-celler, og er således til stede i celleekstrakter indeholdende human TGF-β indhøstet fra sådanne celler. Selv om dette ikke nødvendigvis er en ulempe, fordi dyre- og human-TGF-β er aktive krydsningsarter, ville det være ønskeligt at producere human TGF-β, der indeholder så lidt af dyrematerialet som muligt. Dette gennemføres ved (a) at vælge værtsdyrcellelinjer, der syntetiserer så lidt af dyre-TGF-β'en som muligt, (b) at transformere dyrecellelinjen med en vektor for højeffektiv TGF-β-sekretion (beskrevet ovenfor) og udvinde human TGF-β fra dyrkningsmediet eller (c) at transformere en human cellelinje, hvorved enhver endogen hTGF-β vil være et tilskud snarere end en forurening.

Udtrykkelsesvektorer for sådanne celler inkluderer almindeligvis et repliceringsorigin (til ekstrakromosomal formering), en promotor lokaliseret oven for TGF-β-kodesekvenserne, sammen med et ribosombindingscenter, RNA-splejsningscenter (hvis der anvendes intronholdig TGF-β-kodende genomisk DNA), et polyadenyleringscenter og en transkriptionsafslutningssekvens.

Transkriptions- og translations-styresekvenserne i udtrykkelsesvektorer, som skal anvendes til transformation af hvirveldyrceller, tilvejebringes fortrinsvis fra virale kilder. For eksempel afledes almindeligt anvendte promotorer fra polyoma, Adenovirus 2 og, mest foretrukkent, abevirus 40 (SV40). Den tidlige og den sene promotor fra SV40 er særligt nyttige, fordi begge opnås nemt fra viruset som et fragment, der også indeholder det SV40-virale repliceringsorigin (Fiers et al., 1978, "Nature", 273: 113). Mindre eller større

SV-fragmenter kan også anvendes, forudsat at sekvensen på omkring 250 bp, som strækker sig fra HindIII-centret hen imod BglI-centret i det virale repliceringsorigin, også er inkluderet. Endvidere er det også muligt at udnytte de humane TGF-β-genomiske promotor-, styre- og/eller signalsekvenser, der normalt er forbundet med TGF-β, forudsat at sådanne styresekvenser er kompatible med og genkendes af værtscellen.

Et repliceringsorigin kan enten tilvejebringes ved konstruktion af vektoren, så den inkluderer et exogent origin, som f.eks. kan afledes fra SV40 eller en anden viral (f.eks. Polyoma, Adenovirus, VSV eller BPV) kilde, eller det kan tilvejebringes af værtscellens kromosomale repliceringsmekanisme. Hvis vektoren integreres i værtscellekromosomet, er det sidstnævnte ofte tilstrækkeligt.

Fremfor at anvende vektorer, som indeholder virale repliceringsoriginer, kan man anvende cotransformation af pattedyrceller med en selekterbar markør og TGF-β-DNA'en. Et eksempel på en egnet selekterbar markør er dihydrofolatreductase (DHFR) eller thymidinkinase. Sådanne markører er proteiner, almindeligvis enzymer, som muliggør identifikation af transformante celler, dvs. celler, som havde været kompetente til at optage exogen DNA. Almindeligvis sker identifikationen ved overlevelse af transformanter i et dyrkningsmedium, som er toksisk, eller hvorfra cellerne ikke kan opnå kritisk næring, hvis ikke de har optaget markørproteinet. Ved udvælgelse af en foretrukken værtspattedyrcelle til transkription med vektorer, som omfatter DNA-sekvenser, der koder for både TGF-β og DHFR, er det passende at vælge værten ifølge den anvendte type DHFR-protein. Hvis der anvendes vild-type-DHFR-protein, må det

foretrækkes at vælge en værtscelle, som er deficient med hensyn til DHFR, hvilket muliggør anvendelsen af DHFR-kodesekvensen som markør for heldig transfektion i et selektivt medium, der mangler hypoxanthin, glycin og thymidin. En passende værtscelle i dette tilfælde er den m.h.t. DHFR-aktivitet deficiente kinesisk-hamster-ovarie-(CHO)-cellelinje, der fremstilles og formeres som beskrevet af Urlaub and Chasin, 1980, "Proc. Natl. Acad. Sci." (USA) 77: 4216.

Hvis der på den anden side anvendes DNA, som koder for DHFR-protein med lav bindingsaffinitet til methotrexat (MTX), som den styrende sekvens, er det ikke nødvendigt at anvende DHFR-resistente celler. Da den mutante DHFR er resistent over for MTX, kan MTX-holdige medier anvendes som middel til selektion, forudsat at værtscellerne selv er MTX-sensitive. De fleste eukaryotiske celler, som er i stand til at absorbere MTX, synes at være methotrexatsensitive. En sådan nyttig cellelinje er en CHO- linje, CHO-K1 (ATCC No. CCL 61).

Andre metoder, som kan tilpasses syntesen af TGF-β i rekombinant hvirveldyrcellekultur, er beskrevet i M-J. Gething et al., "Nature" 293: 620-625 (1981); N. Mantei et al., "Nature" 281: 40-46; A. Levinson et al., EP 117 060 A og 117 058 A.

TGF-β udvindes fra lyserede, transformerede celler, og uopløselige cellerester skilles fra ved centrifugering. Alternativt skilles kultursupernatanter fra transformerede celler, der secernerer TGF-β, simpelthen fra cellerne ved centrifugering. Derpå renses TGF-β almindeligvis ved kendte metoder[15,16,17] under anvendelse af gelfiltrering i nærvær af syre efterfulgt af HPLC og eluering på en acetonitrilgradient. Sådanne

metoder er ikke nødvendigvis af samme omfang som den rensning, der kræves for et terapeutisk produkt. Som et yderligere eller alternativt rensningstrin opvarmes cellelysater eller supernatanter i et tidsrum og til en temperatur, som er tilstrækkelig til at denaturere og udfælde forurenende proteiner, men ikke TGF-β; TGF-β er et bemærkelsesværdigt varmestabilt protein, måske som resultat af udstrakt dannelse af disulfidbindinger. Som følge heraf bør opvarmningen gennemføres i et medium, der indeholder lave mængder af disulfidreagenser, såsom dithiotreitol eller lignende. Opvarmningen kombineres også med syrning, da TGF-β vides at være stabil over for 1 M eddikesyre.

Moden nativ TGF-β er ikke glycosyleret. Derfor adskilles den fra eventuelle resterende forurenende varme- og syrestabile glycoproteiner ved adsorption af glycoproteinerne på lectinsøjler, såsom linselectinforbundet "Sepharose"®. Dette trin kan, mindre ønskeligt, gå forud for varme- og syrebehandlingen. TGF-β vil elueres med den uadsorberede fraktion.

Hvis der ønskes højrent produkt, underkastes den rå eller delvis rensede blanding derefter chromatofokusering.

TGF-β præpareres til indgivning ved blanding af TGF-β i den ønskede renhedsgrad med fysiologisk acceptable bærere, dvs. bærere, som er ikke-toxiske for recipienter i de anvendte doseringer og koncentrationer. Almindeligvis vil dette indebære kombination af TGF-β med puffere, antioxidanter, såsom ascorbinsyre, polypeptider med lav molekylvægt (mindre end ca. 10 rester), proteiner, aminosyrer, carbonhydrater, herunder glucose eller dextriner, chelateringsmidler, såsom EDTA,

og andre excipienter. TGF-β til anvendelse ved terapeutisk indgivning må være steril. Dette opnås let ved filtrering igennem sterilfiltreringsmembraner (0,2 µm). TGF-β vil almindeligvis blive opbevaret som en vandig opløsning, da den er højstabil over for termisk og oxidativ denaturering.

Der er blevet overvejet to typer anvendelser af TGF-β-præparater.

Den første og foretrukne anvendelse er topisk til fremme af overfladesårheling. Der er ingen begrænsninger med hensyn til typen af sår eller andet trauma, som kan behandles, og disse inkluderer (men er ikke begrænset til): første, anden og tredje grads forbrændinger (især anden og tredje grads); epidermale og interne kirurgiske snit, herunder sådanne ved kosmetisk kirurgi; sår, herunder rifter, snit og stik; og overfladeulcera, herunder decubitale (liggesår), diabetiske, dentale, hæmophiliale og varikøse.

TGF-β-præparater påføres forbrændinger i form af et sterilt irrigabile, fortrinsvis i kombination med en fysiologisk saltopløsning, eller i form af salver eller suspensioner, fortrinsvis i kombination med renset collagen. Præparaterne kan også være imprægneret i transdermale lapper, plastere og bandager, fortrinsvis i flydende eller halvflydende form. Antimikrobielle midler, såsom sølvsulfadiazin, bør inkluderes i sådanne genstande eller præparater. Debridementsmidler, såsom proteolytiske enzymer, kan også inkluderes, hvis de ikke hydrolyserer TGF-β, eller der anvendes en hydrolyseresistent TGF-β-mutant.

Den anden anvendelse er systemisk indgivning til heling

af indre sår og lignende traumer. En sådan anvendelse er nyttig, forudsat at der er ingen eller kun begrænsede uønskelige bivirkninger, såsom stimulering af neoplastisk cellevækst hos patienter med cancer. TGF-β-præparater til systemisk indgivning sammensættes fortrinsvis som sterile isotoniske parenterale injektioner eller infusioner.

TGF-β kombineres eventuelt med aktiveringsmidler, såsom TGF-α, EGF eller andre vækstfaktorer. Mængden af aktiveringsmiddel afhænger direkte af den mængde TGF-β, som er til stede i de aktiverede præparater, som indgives til modtageren.

Den mængde aktiveret præparat, som skal anvendes, vil variere med de valgte vækstfaktorer og patientens kliniske tilstand.

Imidlertid kan det almindeligvis fastslås, at TGF-β fortrinsvis bør være til stede i en mængde på mindst ca. 1,0 ng/ml kombineret præparat, mere foretrukkent i en mængde på op til ca. 1,0 mg/ml. Da TGF-β-præparater både provokerer og opretholder celleregeneration, indiceres en kontinuert indgivning eller periodisk genindgivning.

For at simplificere eksemplerne vil visse hyppigt forekommende procedurer blive angivet ved korte betegnelser.

Plasmider betegnes med et lille p med store bogstaver og/eller tal før eller efter. De i denne beskrivelse angivne udgangsplasmider er kommercielt tilgængelige eller er offentligt tilgængelige uden restriktioner eller kan konstrueres ud fra sådanne tilgængelige plasmider i overensstemmelse med publicerede procedurer. Desuden kendes andre ækvivalente plasmider inden for

faget og vil være nærliggende for den almindelige fagmand.

"Nedbrydning" af DNA henfører til katalytisk spaltning af DNA'en med et enzym, som kun virker på visse lokaliteter i DNA'en. Sådanne enzymer kaldes restriktionsenzymer, og de centre, for hvilke hvert enzym er specifikt, kaldes restriktionscentre. De forskellige restriktionsenzymer, der er anvendt ifølge denne beskrivelse, er kommercielt tilgængelige, og der anvendtes de reaktionsbetingelser, cofaktorer og andre krav, som var fastlagt af enzymleverandøren. Restriktionsenzymer betegnes almindeligvis ved forkortelser sammensat af et stort bogstav efterfulgt af andre bogstaver repræsenterende den mikroorganisme, hvorfra hver restriktionsenzym oprindeligt blev opnået, og derpå et tal, som betegner det bestemte enzym. I almindelighed anvendes omkring 1 /ug plasmid eller DNA-fragment med omkring 2 enheder enzym i omkring 20 /ul pufferopløsning. Passende puffere og substratmængder for bestemte restriktionsenzymer er specificeret af producenten. Almindeligvis anvendes inkubationstider på omkring 1 time ved 37 °C, men de kan variere i overensstemmelse med leverandørens instruktioner. Efter inkubationen fjernes protein ved ekstraktion med phenol og chloroform, og den nedbrudte nucleinsyre udvindes fra den vandige fraktion ved fældning med ethanol. Nedbrydning med et restriktionsenzym efterfølges i få tilfælde af hydrolyse af de 5'-terminale phosphater med bakteriel alkalisk phosphatase for at forhindre de to restriktionsspaltede ender af et DNA-fragment i at "cirkularisere" eller danne en lukket løkke, som ville forhindre indsætning af et andet DNA-fragment ved restriktionscentret. Med mindre andet er anført, efterfølges nedbrydning af plasmider ikke af 5'-terminal dephosphorylering. Procedurer og reagenser til dephosphorylering er konventionelle (T. Maniatis et al., 1982,

Molecular Cloning, side 133 - 134).

"Udvinding" eller "isolation" af et givet fragment af DNA fra en restriktionsnedbrydning betyder adskillelse af nedbrydningsblandingen på polyacrylamid- eller agarosegel ved elektroforese, identifikation af fragmentet af interesse ved sammenligning af dets mobilitet med mobiliteten af markør-DNA-fragmenter med kendt molekylvægt, fjernelse af gelsektionen indeholdende det ønskede fragment og adskillelse af gelen fra DNA. Denne procedure er alment kendt; se f.eks. R. Lawn et al., 1981, "Nucleic Acids Res." 9: 6103 - 6114, og D. Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057.

"Southern-analyse" er en metode, hvorved tilstedeværelsen af DNA-sekvenser i en nedbrydningsblanding eller DNA-holdig sammensætning bekræftes ved hybridisering til et kendt mærket oligonucleotid eller DNA-fragment. Til de her angivne formål skal "Southern-analyse", med mindre andet er anført, betyde adskillelse af nedbrydningsblandinger på 1 % agarose, denaturering og overførsel til nitrocellulose ved den metode, der er beskrevet af E. Southern, 1975, "J. Mol. Biol." 98: 503 - 517, og hybridisering som beskrevet af T. Maniatis et al., 1978, "Cell" 15: 687 - 701.

"Transformation" betyder indførelse af DNA i en organisme, således at DNA'en er replicerbar, enten som ekstrakromosomalt element eller som kromosomal integrant. Med mindre andet er anført, er den fremgangsmåde, der anvendes i denne beskrivelse til transformation af E. coli, den $CaCl_2$-metode, som er beskrevet af Mandel et al., 1970, "J. Mol. Biol." 53: 154.

"Ligering" henfører til fremgangsmåden til dannelse af phosphodiesterbindinger mellem to dobbeltstrengede

nucleinsyrefragmenter (T. Maniatis et al., Id., side 146). Med mindre andet er anført, kan ligering gennemføres under anvendelse af kendte puffere og betingelser med 10 enheder T4-DNA-ligase ("ligase") pr. 0,5 µg af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder af de DNA-fragmenter, som skal ligeres.

"Præparation" af DNA fra transformanter betyder isolering af plasmid-DNA fra mikrobiel kultur. Med mindre andet er anført, kan den af Maniatis et al., Id. side 90. beskrevne alkali/SDS-metode anvendes.

"Oligonucleotider" er korte enkelt- eller dobbeltstrengede polydeoxynucleotider, som syntetiseres kemisk ved kendte metoder og derpå renses på polyacrylamidgeler.

Alle litteraturhenvisninger betragtes udtrykkeligt som inkorporeret i denne beskrivelse ved henvisningen.

EKSEMPEL 1

Rensning og sekvensanalyse af human TGF-β

Den kendte rensningsmetode ifølge Assoian et al.[15] blev opskaleret og modificeret til opnåelse af tilstrækkeligt homogen ren human TGF-β til aminosyresekvensbestemmelse. 250 enheder af humane blodplader blev ekstraheret i en Waring-blender med 1 liter syre-ethanol. Tilsætning af 4 liter ether gav anledning til et bundfald, som blev opsamlet ved vakuumfiltrering over Whatman nr. 1 papir. Bundfaldet blev opløst natten over i 50 ml 1 M eddikesyre og renset ved gelfiltrering på en "Biogel P-60" søjle (10 x 100 cm) ækvilibreret i 1 M eddikesyre. Fraktionerne indeholdende TGF-β blev identificeret ved analytisk SDS-polyacrylamidgel-elektroforese og bioprøvning[15]. Maksimumsfraktioner blev hældt sammen,

frysetørret og genopløst i 20 ml 1 M eddikesyre, 8 M urinstof. Efterfølgende gelfiltrering over en "Biogel P-60" søjle (5 x 90 cm) i 1 M eddikesyre, 8 M urinstof gav omkring 50 % ren TGF-β. Disse maksimumsfraktioner blev derpå fortyndet med 1 volumen vand og påført en halvpræparativ RPP C_{18} (Synchropak) HPLC-søjle i 0,1 % trifluoreddikesyre og elueret med en 20 - 50 % acetonitrilgradient. Den således opnåede TGF-β blev kvantiseret ved aminosyreanalyse, hvilket viste et udbytte på omkring 0,5 mg pr. præparation. Denaturerende SDS-polyacrylamidgel-elektroforese blev gennemført som beskrevet[60]. I overensstemmelse med tidligere arbejde vandrede den ikke-reducerede TGF-β som et 25 kD protein i en SDS-polyacrylamidgel, medens reduktion med β-mercaptoethanol omdannede den til et molekyle på 12,5 kD. Dette tyder på, at TGF-β består af to 12,5 kD polypeptidkæder forbundet af intermolekylære disulfidbroer[15].

For at opnå proteinsekvensinformation blev den rensede TGF-β reduceret, alkyleret og underkastet aminoterminal sekvensanalyse. 1,2 nmol TGF-β blev dialyseret i 8 M urinstof og reduceret ved inkubation i 0,1 M "Tris"-HCl (pH 8,5), 10 mM dithiothreitol, 8 M urinstof. Efterfølgende alkylering fandt sted i nærvær af 50 mM iodacetat ved stuetemperatur i mørke. Denne reaktion blev afsluttet efter 30 minutter ved tilsætning af et overskud af β-mercaptoethanol og dialyse. 0,7 nmol af denne TGF-β blev anvendt til direkte NH_2-terminal sekvensanalyse. 1,2 nmol reduceret og alkyleret TGF-β blev nedbrudt i 0,75 M urinstof, 50 mM NH_4HCO_3, 5 mM dithiothreitol i 24 timer med 1 % clostripain[15]. Yderligere 1 % clostripain tilsattes efter 12 timers reaktionstid. Reaktionsprodukterne blev adskilt på en "Synchropak RPP C_{18}" revers-fase-søjle (4,6 x 250 mm) med en 0 - 70 % acetonitrilgradient i 0,1 % trifluoreddikesyre. Sekvensbestemmelse fandt sted under anvendelse af enten en stærkt

modificeret "Beckman 890C spinning cup sequencer"[61] eller en dampfase-sequencer som beskrevet af Hewick et al.[62] (Applied Biosystems, model 470A), med aminosyre-derivat-identifikation ved revers-fase-HPLC på en "Rainin Microsorb C-8" søjle. Aminosyresekvensen af flere peptider blev bestemt. Et af disse fragmenter var det NH_2-terminale segment, medens et andet stort peptid gav en sekvens på 37 aminosyrer, som overlappede den NH_2-terminale sekvens og fastslog 60 rester af sammenhængende sekvens.

Umodificeret TGF-β blev også behandlet med CNBr. Spaltning ved methioninresten resulterede i fuldstændigt tab af biologisk aktivitet, hvilket dokumenterede, at mindst en del af dette C-terminale octapeptid er nødvendig for biologisk aktivitet (data ikke vist).

EKSEMPEL 2

Isolering af en TGF-β-exon

Den procedure, som blev fulgt til identifikation af nucleotidsekvensen, som koder for TGF-β, var mage til den strategi, som blev anvendt tidligere for TGF-α[7]. Lange oligonucleotider udformet på basis af den delvise proteinsekvens blev anvendt som hybridiseringssonder til identifikation af en TGF-β-exon i et humant genomisk DNA-bibliotek. TGF-β-exonen blev derpå anvendt som sonde til isolering af TGF-β-cDNA'er.

To 44-baser lange deoxyoligonucleotider, βLP1 og βLP2, komplementære til sekvenser, som koder for aminosyrerne henholdsvis 3 - 17 og 30 - 44, blev syntetiseret kemisk[63,64]. Valget af nucleotidsekvens var baseret på den codontilbøjelighed, som iagttages i humane mRNA'er[26]. CpG-dinucleotider, som er relativt sjældne i hvirvel-

dyr-DNA[27], blev undgået, hvor det var muligt. Desuden syntetiseredes 16 14-mere, som er komplementære til alle mulige codoner for aminosyrerne 13 - 17. Disse deoxyoligonucleotider og den tilsvarende aminosyresekvens er vist nedenfor.

NH_2-AlaLeuAspThrAsnTyrCysPheSerSerThrGluLysAsnCysCysValArgGluLeuTyr
CTGTGGTTGATAACGAAGAGGAGGTGTCTCTTCTTGACGACGCA 5'

TTCTTGACGACGCA
T A A A

LeuGlyTrpLysTrpIleHisGluProLysGlyTyrHisAlaAsnPheCysLeuGlyProCysProTyr
ACCTTCACCTAGGTACTCGGTTTCCCGATAGTACGGTTGAAGAC 5'

Nucleotiderne mærket med en prik er rester, for hvilke der ikke er nogen usikkerhed i codonen.

Et humant genomisk DNA-bibliotek[28] blev sigtet under lav-stringens-hybridiseringsbetingelser under anvendelse af ^{32}P-mærket βLP-1 som sonde. Omkring 7,5 x 10^5 rekombinante fager fra et humant genomisk føtal-lever-bibliotek[28] blev hybridiseret under anvendelse af lav-stringens-betingelser[65] med den ^{32}P-mærkede 44-mer βLP-1 efter replicaudpladning på nitrocellulosefiltre[66]. DNA blev præpareret fra 58 af de hybridiserende fager og hybridiseret med de ^{32}P-mærkede βLP-1- βLP-2-oligonucleotider under anvendelse af "prikdupnings"-analysemetoden[67] og Southern-hybridisering[68] af BamHI-nedbrydningsblandinger. De to fag-DNA'er, som hybridiserede med begge oligonucleotider, blev nedbrudt og sonderet med puljen af ^{32}P-mærkede 14-mere igen ved Southern-hybridisering. 14-mer-hybridiseringer blev gennemført ved 37 °C i 6 x SSC, 0,5 % NP40, 6 mM EDTA, 1X Denhart's opløsning og 50 µg/ml laksesperm-DNA. Flere vaskninger

blev gennemført ved stuetemperatur i 6xSSC før autoradiografi. DNA fra fag βλ58 hybridiserede med oligonucleotiderne βLP-1, βLP-2 og med 14-mer-puljen. Sekvenserne, som hybridiserede til βLP-2 og 14-merene blev lokaliseret i det samme 4,2 kbp BamHI-fragment, medens sonden βLP-1 hybridiserede til et 20 kbp BamHI-fragment. De hybridiserende BamHI-fragmenter blev subklonet i pBR322. Nucleotidsekvensen af mindre hybridiserende fragmenter blev bestemt ved dideoxynucleotid-kædeafslutningsmetoden[69] efter subkloning i M13-derivater[70].

Sigtningen af det genomiske DNA-bibliotek resulterede i isoleringen af en exon, som kodede for kun en del af TGF-β-kodesekvensen (resterne 10 - 60, fig. 3). For at opnå hele TGF-β-kodesekvensen blev denne exon anvendt som sonde til at sigte et λgt10-baseret cDNA-bibliotek afledt fra human udløbsplacenta mRNA.

EKSEMPEL 3

Isolering af TGF-β-cDNA'er

Total RNA blev ekstraheret[71] fra de forskellige cellekilder, og den polyadenylerede mRNA-fraktion blev isoleret ved oligo(dT)-cellulose-chromatografi[72]. cDNA'en blev præpareret[73] ved start med dT_{12-18} eller deoxyoligonucleotidet ACACGGGTTCAGGTAC (komplementært til nucleotiderne 1270 - 1286). Den dobbeltstrengede cDNA blev behandlet med nuclease S1 (Miles Laboratories) efterfulgt af E. coli DNA-polymerase I, Klenow-fragment, (Boehringer Mannheim) og subklonet i EcoRI-spaltet λgt10 som beskrevet[74], undtagen at der anvendtes asymmetriske EcoRI-linkere[75], hvorved man undgik behovet for EcoRI-methylase-behandlingen. Den rekombinante fag blev udpladet på E. coli C600 Hfl[74] og replicaudpladet på nitrocellulosefiltre[66]. Disse blev hybridiseret med ^{32}P-mærkede[76]

specifikke restriktionsfragmenter ved 42 °C i 50 % formamid, 5x SSC, 50 mM natriumphosphat pH 6,8, 0,1 % natriumpyrophosphat, 5x Denhardt's opløsning, 50 µg/ml laksesperm-DNA og vasket i 0,2x SSC, 0,1 % SDS ved den samme temperatur. Lav-stringens-hybridiseringsbetingelser[65] blev anvendt i tilfælde af de ^{32}P-mærkede deoxyoligonucleotider. Nucleotidsekvensen af TGF-β-cDNA-restriktionsfragmenterne blev bestemt ved dideoxyoligonucleotid-kædeafslutnings-metoden[69] efter subkloning i M13-fagderivater[70]. De opnåede cDNA'er er skematisk vist i fig. 1a. λβC1 blev isoleret fra et humant placenta-cDNA-bibliotek under anvendelse af den genomiske exon (fig. 3) som sonde. Sigtningen af omkring 750 000 oligo-dT-startede placenta-cDNA-kloner resulterede i isoleringen af en TGF-β-cDNA (λβC1) på omkring 1050 bp. Den tidligere bestemte delvise TGF-β-sekvens fastslog aflæsningsrammen og afslørede sekvensen, som koder for det komplette TGF-β-polypeptid. Denne sekvens begynder med den NH_2-terminale alaninrest og efterfølges 112 codoner senere af en stopcodon, kun 20 basepar fra 3'-enden. λβC-EcoRI-cDNA-indsætningen blev på sin side anvendt til at sigte A172-glioblastoma-cDNA-biblioteket, hvilket førte til isoleringen af λβC3.19. Sigtning af et specifikt startet HT1080-fibrosarcoma-cDNA-bibliotek med det ^{32}P-mærkede KpnI-KpnI- og ovenfor beliggende EcoRI-KpnI-fragment af λβC3.19-cDNA-indsætningen gav λβC4.10, 4.33 og 4.37. Et andet lignende bibliotek blev sigtet med λβC4.33-indsætningen og en syntetisk 40-mer svarende til nucleotiderne 1-40, hvilket førte til isoleringen af λβC5.7b.

Ingen af de mere end 70 TGF-β-cDNA'er isoleret fra forskellige oligo(dT)-startede cDNA-biblioteker indeholdt mere end nogle få nucleotider af 3'-utranslaterede områder, og den 3'-utranslaterede sekvens blev bestemt under anvendelse af klonet genomisk DNA. Hybridiseringsanalyse viste, at 3'-enden af λβC1-cDNA-indsætningen

var til stede i den genomisk-DNA-holdige fag βλ58. DNA-sekvensanalyse afslørede tilstedeværelsen af en exon, som kodede for den carboxylterminale del af TGF-β, efterfulgt af stopcodonen og den 3'-utranslaterede ende (fig. 1b). En AATAAA-hexanucleotid-sekvens[32] blev mødt 500 bp nedad fra afslutningscodonen, hvilket muliggjorde en tilskrivning af det formodede polyadenyleringscenter. Under antagelse af at dette faktisk er polyadenyleringssignalet, er den udregnede størrelse af TGF-β-mRNA i nær overensstemmelse med længden på 2,3 - 2,5 kb, som blev bestemt ud fra Northern-hybridiseringsforsøg (eksempel 4). Yderligere sigtning af oligo(dT)-startede placenta- og HT1080-cDNA-biblioteker under anvendelse af den genomiske DNA-sonde for den 3'-utranslaterede ende identificerede ikke en eneste hybridiserende cDNA-fag.

EKSEMPEL 4

Diagnostisk metode under anvendelse af TGF-β-cDNA-sonder

Polyadenyleret RNA blev udvundet fra hepatoma HEP-G2, Wilms tumor TuWi, glioblastoma A172, blærecarcinoma T24, skællet epidermoidcarcinoma A431, brystcarcinoma MCF-7, nasopharyngealt carcinoma KB, fibrosarcoma HT1080, Burkitt lymphoma B-lymphoblaster Daudi og Raji, T-lymphoblast Molt-4. Perifere blodlymphocytter blev fremstillet og mitogen-induceret med staphylococ-enterotoxin B og phorbolmyristat som beskrevet[53]. RNA blev indhøstet i dette tilfælde efter 24 timer. 4 µg polyadenyleret mRNA blev underkastet elektroforese i formaldehyd/1,2 % agarosegel[29] og duppet på nitrocellulosefiltre[30]. Den ^{32}P-mærkede[76] EcoRI-cDNA-indsætning fra λβC1 blev anvendt som sonde under de ovenfor anvendte høj-stringens-betingelser. Sammenligning med positionen af 28S- og 18S-rRNA'en på gelen antyder en længde på 2,3 - 2,5 kb for

TGF-β-mRNA'en. I nogle tilfælde kan en mindre mRNA-art være til stede, selv om delvis nedbrydning af mRNA'en ikke kan udelukkes.

TGF-β-mRNA var detekterbar i alle humane tumorcellelinier, inklusive tumorceller af neuroectodermal oprindelse, såsom TuWi (Wilms tumor) og A172 (glioblastoma) og carcinomacellelinierne T24 (blærecarcinoma), A431 (skællet epidermoidcarcinoma), MCF-7 (brystcarcinoma) og KB (nasopharyngealt carcinoma). HT1080, en fibrosarcoma-afledt cellelinie, som var blevet valgt som kilde for mRNA til cDNA-kloningen, indeholdt relativt høje niveauer af TGF-β-mRNA. TGF-β-mRNA var ikke kun til stede i cellelinier afledt fra faste tumorer af meso-, endo- og ectoblastisk oprindelse, men var også detekterbar i tumorcellelinier af hæmatopoietisk oprindelse, f.eks. Daudi (Burkitt lymphoma B-lymphoblast), Raji (Burkitt lymphoma B-lymphoblast) og Molt-4 (T-celleleukæmia). Tilstedeværelsen af TGF-β-mRNA er ikke begrænset til tumorceller, da den er klart detekterbar i placenta- og perifer-blodlymphocyt-(PBL)-mRNA. Således er det, at niveauet af TGF-β-mRNA er signifikant forhøjet efter mitogen stimulering af PBL'er. TGF-β-mRNA var ikke detekterbar i human lever, men var alligevel til stede i HEP-G2 hepatomacellelinien. I alle tilfælde vandrede TGF-β-mRNA som et molekyle med en tilsyneladende længde på 2,3 - 2,5 kilobaser. I nogle tilfælde kan en mindre mRNA-art på omkring 1,8 - 1,9 kb være til stede, selv om dette kunne skyldes delvis nedbrydning af mRNA'en.

EKSEMPEL 5

Rekombinant syntese af TGF-β

Plasmidet, som blev anvendt til rekombinant syntese af TGF-β, var pMBTE6. Det følgende er en forudsagt frem-

gangsmåde til fremstilling af dette plasmid som er en fremgangsmådevariant, der foretrækkes frem for den mere komplekse fremgangsmåde, som faktisk blev anvendt til dets konstruktion.

p342E^{79} nedbrydes med EcoRI, afstumpes med E. coli DNA-polymerase I (Klenow-fragment) og de fire dNTP'er, nedbrydes med SalI, og fragment I (indeholdende Amp^{r}-genet fra pBR322) udvindes.

p342E nedbrydes samtidigt med SalI og HindIII, og fragmentet, som koder for HBsAg, udvindes som fragment 2.

Endelig nedbrydes SV40-genomet samtidigt med HindIII og HincII, og fragmentet på 596 bp indeholdende SV40-originet og den tidlige promotor udvindes som fragment 3.

Fragmenterne 1, 2 og 3 ligeres ved en tre-vejs-ligering, og ligeringsblandingen transformeres ind i E. coli stamme 294 (ATCC 31446). Den transformerede kultur udplades på ampicillinmediumplader, og resistente kolonier selekteres. Stump-endet p342E blev udvundet fra en transformantkoloni.

Det stump-endede p342E nedbrydes samtidigt med HindIII og EcoRI, og det store vektorfragment udvindes. Dette fragment ligeres til en polylinker med den følgende sekvens



og ligeringsblandingen anvendes til at transformere E. coli ATCC 31446 som beskrevet ovenfor. pCVSV-HBs udvindes fra en ampicillinresistent transformant.

pCVSV-HBs nedbrydes samtidigt med HindIII og EcoRI, og vektorfragmentet isoleres (HindIII-EcoRI-fragmentet på 18 bp vil ikke vise sig i gelen på grund af dets ringe størrelse).

pgD-DHFR-Trunc (EP patentansøgning nr. 84.305909.8), et plasmid indeholdende DNA, som koder for herpes simplex gD proteinet, nedbrydes samtidigt med StuI og HindIII og man udvinder fragmentet på omkring 760 bp, som indeholder DNA, der koder for herpes simplex signalpeptidet og kodeområdet for den N-terminale del af det modne HSV-1gD-protein. Plasmid pJ2.9 fra EP patentansøgning nr. 84.305909.8 kan anvendes på samme måde.

pβC1 (fig. 1a) nedbrydes med SmaI og BamHI, og 480 bp fragmentet udvindes. Dette fragment indeholder det meste af sekvensen, som koder for præTGF-β, inklusive sekvensen, som koder for N-terminus af moden TGF-β via rest 314.

pβC1 nedbrydes med BamHI og EcoRI, og 270 bp fragmentet udvindes. Disse to separate nedbrydninger af pβC1-aliquoter blev gennemført, fordi BamHI-EcoRI-pβC1-fragmentet indeholder et SmaI-center. 270 bp fragmentet indeholder sekvensen, som koder for resten af TGF-β-molekylet og strækker sig 20 bp ud over stopcodonen.

pCVSV-HBs-vektorfragmentet ligeres ved en fire-vejsligering med de ovennævnte 760, 270 og 480 bp fragmenter. Den resulterende konstruktion (pCVSVgD) indeholdt således en hybridkodesekvens (Herpes simplex gD-1 signalpeptid og en del af gD-1 hylsterproteinet forbundet i ramme med præTGF-β-forstadiefragmentet) under styring af den tidlige promotor fra SV40. Denne hybridkodesekvens efterfølges igen af den 3'-utranslaterede sekvens og polyadenyleringssignalet fra hepatitisoverfladeantigenet.

pCVSVgD nedbrydes med EcoRI, afstumpes med Klenow og de fire dNTP'er og nedbrydes derefter med PstI. Således opnås to fragmenter, og fragmentet, der inkluderer hybridkodesekvensen og SV40-promotoren (fragment A) udvindes.

pCVSVgD nedbrydes med BamHI, afstumpes med Klenow og de fire dNTP'er og nedbrydes derefter med PstI. Fire fragmenter opnås efter disse nedbrydninger. Fragmentet indeholdende pBR322-originet og Amp^r-genet (omkring 1900 bp) udvindes som fragment B.

Fragmenterne A og B ligeres, og ligeringsblandingen anvendes til at transformere E. coli ATCC 31446. Plasmidet pMBTE6 udvindes fra en Amp^r-koloni.

Plasmidet pMBTE6 blev transficeret ind i DHFR-deficiente CHO-celler (Urlaub and Chasin, 1980, P.N.A.S. 77, 4216 - 4220) sammen med plasmidet pFD11 (Simonsen and Levinson, 1983, P.N.A.S. 80, 2495 - 2499). Det sidstnævnte plasmid koder for DHFR, hvorved det overfører methotrexatresistens på de transficerede celler og gør det muligt at selektere TGF-β-udtrykkende transformanter. Enhver $DHFR^-$ pattedyrværtscelle er egnet til anvendelse. Alternativt kan man anvende enhver pattedyrværtscelle, cotransformere værtscellen med et plasmid, som koder for neomycinresistens, og identificere transformanter ved deres evne til at vokse i neomycinholdigt medium.

De transficerede CHO-celler blev selekteret ved dyrkning i HGT^- medium. Cellerne fik lov at vokse til konfluens i skåle med diameter 15 cm. Cellerne blev derefter dyrket i serumfrit medium i 48 timer før indhøsning. Dyrkningsmediet blev dekanteret fra skålene og prøvet ved en blød-agar-prøvning for tilstedeværelsen af TGF-β som beskrevet[78].

50 ml supernatantmedium blev lyophiliseret og opløst i 700 µl 4 mM HCl indeholdende 0,1 % okseserumalbumin. 200 µl af denne opløsning og af på hinanden følgende tre-ganges fortyndinger blev prøvet. Antallet af kolonier i blød agar med en diameter på over 89 µm blev optalt. Den maksimale reaktion (plateau-værdi) opnået i nærvær af mætningsniveauer af TGF-β var omkring 1500 pr. plade. Mindre end 50 kolonier blev opnået i fravær af TGF-β. En halv maksimal reaktion blev opnået med en 9-ganges fortynding af prøven afledt fra cellerne transformeret med et negativt kontrolplasmid. Udregninger fra værdierne opnået ved rækkevis fortynding af MBTE6-supernatanten viste, at den halve maksimalværdi blev opnået ved en 70 ganges fortynding.

Prøvningerne af rækkefortyndingerne viste, at celler transformeret med MBTE6 og pFD11 syntetiserer omkring 8 - 10 gange mere TGF-β pr. ml medium end CHO-celler transficeret med pFD11 alene eller med pFD11 sammen med et kontrolplasmid (et som lignede pMBTE6, undtagen at Herpes-kodesekvensen var erstattet med sekvensen, som koder for det bakterielle STII-signalpeptid), selv før subkloning og selektion i MTX-holdige medier. Denne yderligere mængde TGF-β er human TGF-β.

Eftersom biologisk aktiv TGF-β findes i dyrkningsmediet, konkluderes det, at CHO-celler spalter præTGF-β på samme måde som humane celler in vivo og secernerer moden TGF-β. Denne konklusion bestyrkes meget stærkt af, at hældningen af TGF-β-koncentrationsfortyndingskurven i den bløde agar er identisk for både den endogene naturlige TGF-β og den rekombinante TGF-β, hvilket afspejler en lignende, om ikke identisk affinitet til TGF-β-receptoren.

Bibliografi

1. De Larco, J.E. and Todaro, G.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4001-4005 (1978).

2. Roberts, A.B., Frolik, C.A., Anzano, M.A. and Sporn, M.B. Fed. Proc. 42, 2621-2625 (1983).

3. Todaro, G.J., Fryling, C. and De Larco, J.E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5258-5262 (1980).

4. Marquardt, H., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. and Todaro, G.J. Science 223, 1079-1082 (1984).

5. Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., De Larco, J.E. and Todaro, G.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3494-3498 (1980).

6. Ozanne, B., Fulton, R.J. and Kaplan, P.L. J. Cell Physiol. 105, 163-180 (1980).

7. Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y. and Goeddel, D.V. Cell 38, 287-297 (1984).

8. Lee, D.C., Rose, R.M., Webb, N.R. and Todaro, G.J. Nature 313, 489-491 (1985).

9. Linsley, P.S., Hargreaves, W.R., Twardzik, D.R. and Todaro, G.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 356-360 (1985).

10. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. and Sporn, M.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5339-5343 (1981).

11. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M., Frolik, C.A., Marquardt, H., Todaro, G.J. and Sporn, M.B. Nature 295, 417-419 (1982).

12. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Meyers, C.A., Wideman, J., Blacher, R., Pan, Y.C., Stein, S., Lehrman, S.R., Smith, J.M., Lamb, L.C. and Sporn, M.B. Biochemistry 22, 5692-5698 (1983).

13. Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M. and Sporn, M.B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3676-3680 (1983).

14. Childs, C.B., Proper, J.A., Tucker, R.F. and Moses, H.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5312-5316 (1982).

15. Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B. J. Biol. Chem. 258, 7155-7160 (1983).

16. Assoian, R.K., Grotendorst, G.R., Miller, D.M. and Sporn, M.B. Nature 309, 804-806 (1984).

17. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Shull, J.H., Smith, J.M., Ward, J.M. and Sodek, J. Science 219, 1329-1331 (1983).

18. Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. and Sporn, M.B. J. Biol. Chem. 259, 10995-11000 (1984).

19. Tucker, R.F., Branum, E.L., Shipley, G.D., Ryan, R.J. and Moses, H.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6757-6761 (1984).

20. Assoian, R.K., Frolik, C.A., Roberts, A.B., Miller, D.M. and Sporn, M.B. Cell 36, 35-41 (1984).

21. Tucker, R.F., Volkenant, M.E., Branum, E.L. and Moses, H.L. Cancer Res. 43, 1581-1586 (1983).

22. Anzano, M.A., Roberts, A.B., De Larco, J.E., Wakefield, L.M., Assoian, R.K., Roche, N.S., Smith, J.E., Lazarus, J.E. and Sporn, M.B. Molec. Cell. Biology 5, 242-247 (1985).

23. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.A., Roche, N.S., Stern, D.F. and Sporn, M.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 119-123 (1985).

24. Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L. and Holley, R.W. Science 226, 705-707 (1984).

25. Mitchell, W.M. Meth. Enzymol. XLVII, p. 165-170 (1977).

26. Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. and Mercier, R. Nucl. Acids Res. 9, 43-73 (1981).

27. Bird, A.P. Nucl. Acids Res. 8, 1499-1504 (1980).

28. Lawn, R.M., Fritsch, E.F., Parker, R.C., Blake, G. and Maniatis, T. Cell 15, 1157-1174 (1978).

29. Dobner, P.R., Kawasaki, E.S., Yu, L.Y. and Bancroft, F.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2230-2234 (1981).

30. Thomas, P.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980).

31. Volckaert, G., Tavernier, J., Derynck, R., Devos, R. and Fiers, W. Gene 15, 215-223 (1981).

32. Proudfoot, N.J. and Brownlee, G.G. Nature 253, 211-214 (1976).

33. Levy, W.P., Rubinstein, M., Shively, J., Del Valle, U., Lai, C.-Y., Moschera, J., Brink, L., Gerber, L., Stein, S. and Pestka, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6186-6190 (1981).

34. Rinderknecht, E., O'Connor, B.H. and Rodriguez, H. J. Biol. Chem. 259, 6790-6797 (1984).

35. Kozak, M. Nucl. Acids Res. 12, 857-872 (1984).

36. Shepherd, J.C.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1596-1600 (1981).

37. Battey, J., Moulding, C., Taub, R., Murphy, W., Stewart, T., Potter, H., Lenoir, G. and Leder, P. Cell 34, 779-787 (1983).

38. Udgår.

39. Udgår.

40. McKnight, S.L., Kingsbury, R.C., Spence, A. and Smith, M. Cell 37, 253-262 (1984).

41. Dynan, W.S. and Tjian, R. Cell 35, 79-87 (1983).

42. Gidoni, D., Dynan, W.S. and Tjian, R. Nature 312, 409-413 (1984).

43. Benoist, C., O'Hare, K., Braetnach, R. and Chambon, P. Nucl. Acids Res. 127-142 (1980).

44. Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toysato, M., Hirose, T., Imayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S. Nature 295, 202-206 (1982).

45. Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P. and Udenfriend, S. Nature 295, 206-208 (1982).

46. Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M., Ong, E.S. and Evans, R.M. Nature 298, 240-244 (1982).

47. Nakanishi, S., Inoue, A., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S. Nature 278, 423-427 (1979).

48. Kyte, J. and Doolittle, R.F. J. Mol. Biol. 157, 105-132, (1982).

49. Winzler, R.J. in Hormonal Proteins and Peptides 1, (Li, C.I., ed.) (New York, Academic Press) p. 1-15 (1973).

50. Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B. J. Mol. Biol. 120, 97-120 (1978).

51. Arnon, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M. and Dinarello, C.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7907-7911 (1984).

52. Lomedico, P., Guebler, U., Hellmann, P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.-C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.D. and Mizel, S.B. Nature 312, 458-462 (1984).

53. Pennica, D., Nedwin, G., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. and Goeddel, D.V. Nature 312, 724-729 (1984).

54. Van den Elsen, Shepley, B.-A., Borst, J., Coligan, J.E., Markham, A., Orkin, S. and Terhorst, C. Nature 312, 413-418 (1984).

55. Nathans, J. and Hogness, D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 4851-4855 (1984).

56. Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. and Numa, S. Nature 312, 121-127 (1984).

57. Gorin, M.B., Yancey, B., Cline, J., Revel, J.-P. and Horwitz, J. Cell 39, 49-59 (1984).

58. Noe, B.D., Moran, M.N. and Spiess, J. in Peptides: Structure and Function (Pierce Chemical Company; Hurby, V. and Rich, D.H., eds.). p. 219-228 (1983).

59. Devault, A., Zollinger, M. and Crine, P. J. Biol. Chem. 259, 5146-5151 (1984).

60. Laemmli, U.K. Nature 227, 680-685 (1970).

61. Rodriguez, H., Kohr, W.J. and Harkins, R.N. Anal. Biochem. 140, 538-547 (1984).

62. Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. and Dreyer, W.J. J. Biol. Chem. 256, 7990-7997 (1981).

63. Crea, R. and Horn, T. Nucl. Acids Res. 8, 2331-2348 (1980).

64. Beaucage, S.L. and Caruthers, M. Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981).

65. Ullrich, A., Berman, C.H., Dull, T.J., Gray, A. and Lee, J.M. EMBO J. 3, 361-364 (1984).

66. Benton, W.D. and Davis, R.W. Science 196, 180-182 (1977).

67. Kafatos, F.C., Jones, C.W. and Efstratiadis, A. Nucl. Acids Res. 7, 1541-1552 (1979).

68. Southern, E.M. J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).

69. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977).

70. Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. Nucl. Acids Res. 9, 309-321 (1981).

71. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. and Goodman, H.M. Science 196, 1313-1317 (1977).

72. Aviv, H. and Leder, P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412 (1972).

73. Wickens, M.P., Buell, G.N. and Schimke, R.T. J. Biol. Chem. 253, 2483-2495 (1978).

74. Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. in DNA Cloning Techniques, A Practical Approach (Glover, D., ed.). (IRL, Oxford) pp 49-78 (1985).

75. Norris, K.E., Iserentant, D., Contreras, R. and Fiers, W. Gene 7, 355-362 (1979).

76. Taylor, J.M., Illmensee, R. and Summers, S. Biochim. Biophys. Acta 442, 324-330 (1976).

77. Crowley et al., Molec. Cell. Biol. 3, 44-55 (1983).

78. Anzano et al., Mol. Cell. Biol. 5, 242-247 (1985).

79. EP 73 656A

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af TGF-β, kendetegnet ved, at (a) der konstrueres en vektor, som inkluderer nukleinsyre, der koder for TGF-β med den aminosyresekvens som er vist i Figur 1b, eller en mutantsekvens deraf, (b) en hvirveldyr værtscelle transformeres med vektoren, (c) den transformerede celle dyrkes, og (d) moden TGF-β eller mutanter deraf udvindes fra kulturen, hvilken TGF-β eller mutant deraf har forankringsuafhængig vækstfremmende biologisk aktivitet og udviser krydsreaktivitet med antisera frembragt overfor nativ TGF-β.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at hvirveldyrcellen er en kinesisk-hamster-ovarie-cellelinie.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, hvori nukleinsyren, som koder for præ TGF-β er operabelt forbundet med en inducerbar promoter.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at nukleinsyren, som koder for præTGF-β er operabelt forbundet med en viral promotor.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, kendetegnet ved, at promotoren er en SV40-promotor.

6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 til 5, hvori TGF-β er human TGF-β.

7. DNA, som koder for TGF-β med den aminosyresekvens som er vist i Figur 1b, og som er fri for en eller flere introns, som findes i genomisk DNA.

8. Ekstrakromosomal DNA, som koder for TGF-β med den aminosyresekvens som er vist i Figur 1b.

9. mRNA, som koder for TGF-β fra en given art med aminosyresekvensen som vist i Figur 1b, og som er cellefri og fri for mRNA, der koder for andre proteiner fra den givne art.

10. DNA ifølge krav 7 eller 8 eller mRNA ifølge krav 9, kendetegnet ved, at den er mærket med en detekterbar del.

11. Udtrykkelsesvektor der er anvendelig i fremgangsmåden ifølge krav 1, omfattende DNA som koder for præ TGF-β med aminosyresekvensen som vist i Figur 1b, eller en mutant sekvens deraf, hvorved ved udtrykkelse af nævnte TGF-β eller mutant deraf, der fremstilles moden TGF-β eller mutant deraf med forankringsuafhængig vækstfremmende biologisk aktivitet som udviser krydsreaktivitet med antisera frembragt overfor nativ TGF-β.

12. Vektor ifølge krav 11, kendetegnet ved, at DNA'en der koder for præ TGF-β eller en mutant sekvens deraf er fri for introns.

13. Værtscelle indeholdende vektoren ifølge krav 11 eller 12.

14. Celle ifølge krav 13, kendetegnet ved, at den er en hvirveldyrcelle.

15. Celle ifølge krav 13, kendetegnet ved, at den er en bakteriecelle.

Fig. 1a.

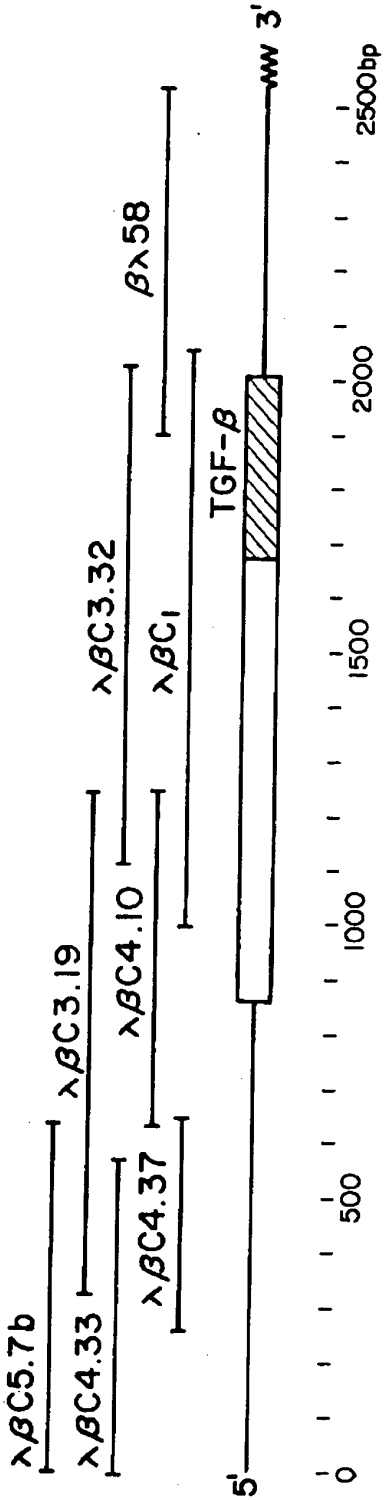
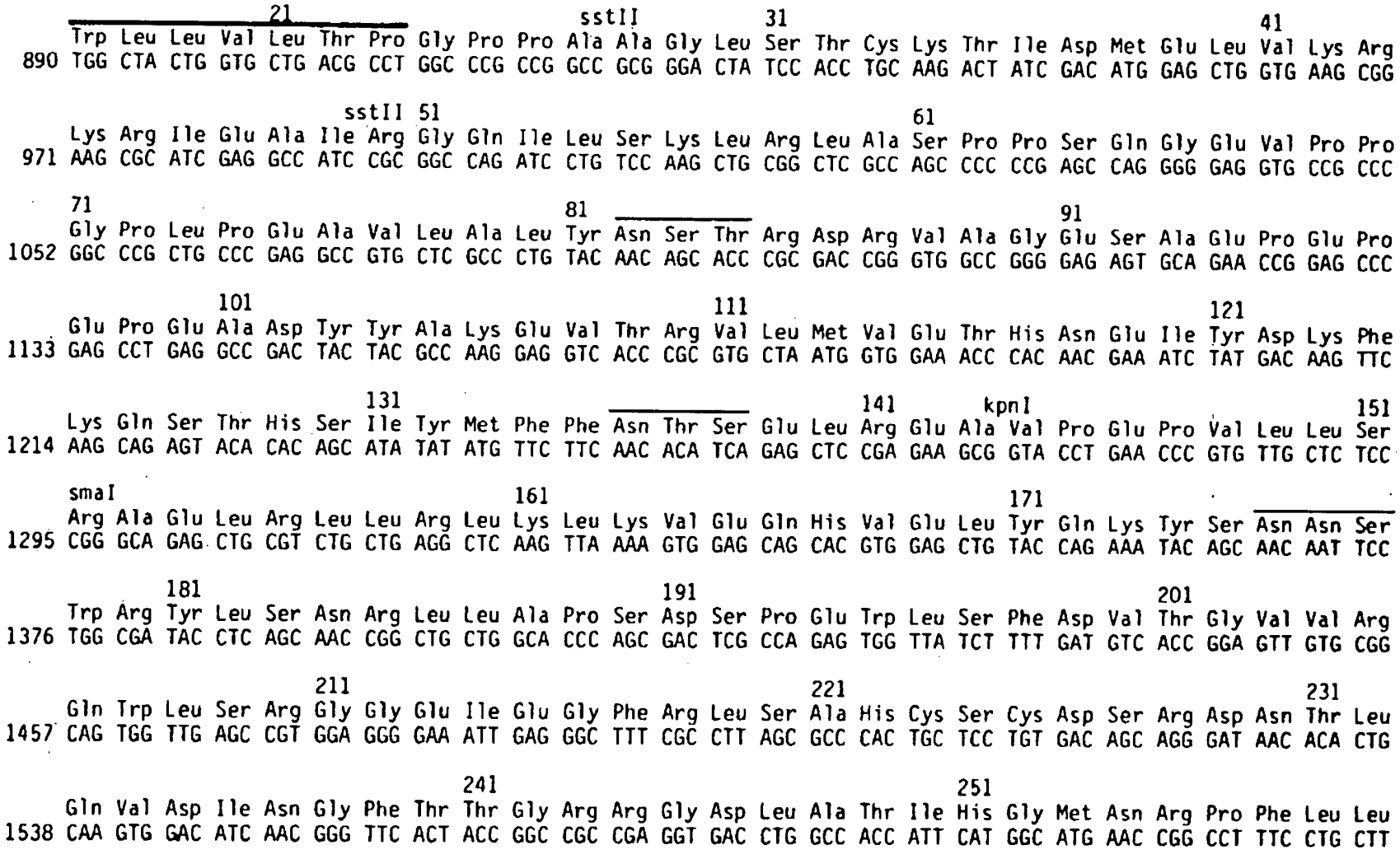

λβC5.7b
λβC4.33
λβC3.19
λβC4.37
λβC4.10
λβC1
λβC3.32
βλ58
TGF-β
5'
3'
0
500
1000
1500
2000
2500bp

Fig. 1b(I)

```
          sstII                                                                                                  sstII
  1 ACCTCCCTCC GCGGAGCAGC CAGACAGCGA GGGCCCCGGC CGGGGGCAGG GGGGACGCCC CGTCCGGGGC ACCCCCCCCG GCTCTGAGCC GCCCGCGGGG

101 CCGGCCTCGG CCCGGAGCGG AGGAAGGAGT CGCCGAGGAG CAGCCTGAGG CCCCAGAGTC TGAGACGAGC CGCCGCCGCC CCCGCCACTG CGGGGAGGAG

201 GGGGAGGAGG AGCGGGAGGA GGGACGAGCT GGTCGGGAGA AGAGGAAAAA AACTTTTGAG ACTTTTCCGT TGCCGCTGGG AGCCGGAGGC GCGGGGACCT

301 CTTGGCGCGA CGCTGCCCCG CGAGGAGGCA GGACTTGGGG ACCCCAGACC GCCTCCCTTT GCCGCCGGGG ACGCTTGCTC CCTCCCTGCC CCCTACACGG

401 CGTCCCTCAG GCGCCCCCAT TCCGGACCAG CCCTCGGGAG TCGCCGACCC GGCCTCCCGC AAAGACTTTT CCCCAGACCT CGGGCGCACC CCCTGCACGC

501 CGCCTTCATC CCCGGCCTGT CTCCTGAGCC CCCGCGCATC CTAGACCCTT TCTCCTCCAG GAGACGGATC TCTCTCCGAC CTGCCACAGA TCCCCTATTC

                     kpnI
601 AAGACCACCC ACCTTCTGGT ACCAGATCGC GCCCATCTAG GTTATTTCCG TGGGATACTG AGACACCCCC GGTCCAAGCC TCCCCTCCAC CACTGCGCCC

                                                                                  pstI
701 TTCTCCCTGA GGAGCCTCAG CTTTCCCTCG AGGCCCTCCT ACCTTTTGCC GGGAGACCCC CAGCCCCTGC AGGGGCGGGG CCTCCCCACC ACACCAGCCC

                                                  1                                                  11
                                                  Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu
801 TGTTCGCGCT CTCGGCAGTG CCGGGGGGCG CCGCCTCCCC C ATG CCG CCC TCC GGG CTG CGG CTG CTG CCG CTG CTG CTA CCG CTG CTG
```

Fig. 1b(II)

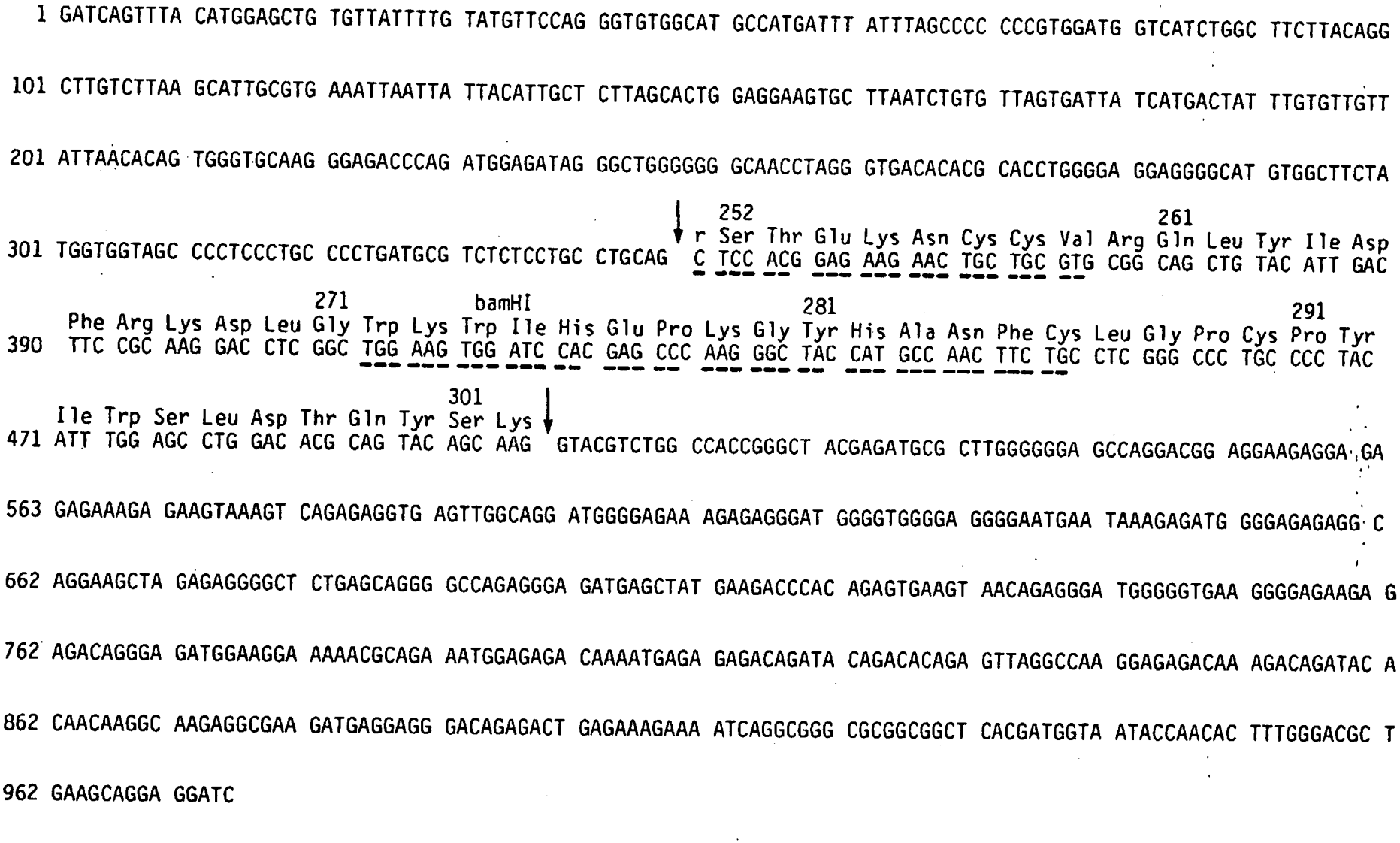


DK 175412 B1

Fig. 1b (III)

```
        261                                     271                                     281
     Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe
1619 CTC ATG GCC ACC CCG CTG GAG AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC TCC CGG CAC CGC CGA GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC TTC

                    291                                     301                                     311 bamHI
     Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu
1700 AGC TCC ACG GAG AAG AAC TGC TGC GTG CGG CAG CTG TAC ATT GAC TTC CGC AAG GAC CTC GGC TGG AAG TGG ATC CAC GAG

                                321                                     331
     Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu
1781 CCC AAG GGC TAC CAT GCC AAC TTC TGC CTC GGG CCC TGC CCC TAC ATT TGG AGC CTG GAC ACG CAG TAC AGC AAG GTC CTG

     341                            smaI     351                                     361
     Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val
1862 GCC CTG TAC AAC CAG CAT AAC CCG GGC GCC TCG GCG GCG CCG TGC TGC GTG CCG CAG GCG CTG GAG CCG CTG CCC ATC GTG

                371                                     381
     Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
1943 TAC TAC GTG GGC CGC AAG CCC AAG GTG GAG CAG CTG TCC AAC ATG ATC GTG CGC TCC TGC AAG TGC AGC  TGA        GGT

                                                                          ncoI
2018 CCCGCCCCGC CCCGCCCCGC CCCGGCAGGC CCGGCCCCAC CCCGCCCCGC CCCCGCTGCC TTGCCCATGG GGGCTGTATT TAAGGACACC GTGCCCCAAG

2118 CCCACCTGGG GCCCCATTAA AGATGGAGAG AGGACTGCGG ATCTCTGTGT CATTGGGCGC CTGCCTGGGG TCTCCATCCC TGACGTTCCC CCACTCCCAC

                                                                                                        bglII
2218 TCCCTCTCTC TCCCTCTCTG CCTCCTCCTG CCTGTCTGCA CTATTCCTTT GCCCGGCATC AAGGCACAGG GGACCAGTGG GGAACACTAC TGTAGTTAGA

2318 TCTATTTATT GAGCACCTTG GGCACTGTTG AAGTGCCTTA CATTAATGAA CTCATTCAGT CACCATAGCA ACACTCTGAG ATGGCAGGGA CTCTGATAAC

2418 ACCCATTTTA AAGGTTGAGG AAACAAGCCC AGAGAGGTTA AGGGAGGAGT TCCTGCCCAC CAGGAACCTG CTTTAGTGGG GGATAGTGAA GAAGACAATA

2518 AAAGATAGTA GTTCAGGCCA
```

Fig.2.



DK 175412 B1