



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 398 433 B**

PATENTSCHRIFT

(12)

(21) Anmeldenummer: 2454/88

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 15/18**

(22) Anmeldetag: 5.10.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 4.1994

(45) Ausgabetag: 27.12.1994

(30) Priorität:

6.10.1987 US 106752 beansprucht.
25. 1.1988 US 148267 beansprucht.
18. 8.1988 US 234065 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

ONCOGEN, A LIMITED PARTNERSHIP
98121 SEATTLE (US).

(54) TRANSFORMING GROWTH FAKTOR BETA1/TRANSFORMING GROWTH FAKTOR BETA2-HYBRID-PREKURSOR UND DAFÜR CODIERENDE NUCLEOTIDSEQUENZ

(57) Es wird ein neuer Transforming Growth Faktor-beta1/Transforming Growth Faktor-beta2-Hybrid-Prekursor beschrieben und die Nucleotidsequenz angegeben, die für diesen Prekursor kodiert.

AT 398 433 B

Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit der Klonierung und Expression von menschlichem Transforming Growth Faktor-Beta2.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleotidsequenz, die für einen Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor kodiert.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor in seiner allgemeinen und speziellen Form.

Der Transforming Growth Faktor-Beta (TGF- β) ist Mitglied einer kürzlich beschriebenen Familie von Polypeptiden, welche die Zelldifferenzierung und Proliferation regulieren. Weitere Mitglieder dieser Familie sind die Mullerian Inhibitorsubstanz (Cate et al., 1986, Cell 45:685-698), die Inhibine (Mason et al., 1985, 10 Nature 318:659-663) sowie ein Protein aus einem Transcript des Decapentaplegischen Genkomplexes aus *Drosophila* (Padgett et al., 1987, Nature 325:81-84).

Der Transforming Growth Faktor-Beta (TGF- β) besteht aus zwei identischen Disulfid-verbrückten Unter-einheiten mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 13 000 (Assoian et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:7155-7160; Frolik et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3676-3680; Frolik et al., 1984, J. Biol. Chem. 15 260:10995-11000). Dieser wurde aus verschiedenen Geweben, wie z.B. der Plazenta (Frolik et al., 1983, Nature 325:81-84), Blutplättchen (Childs et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5312-5316; Assoian et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:7155-7160), Niere (Roberts et al., 1983, Biochemistry 22:5692-5698) und demineralisierten Knochen (Seyedin et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123) isoliert. In Gegenwart von 10% Serum und epidermalem Wachstumsfaktor fördert TGF- β das freie Wachstum 20 normaler Nierenfibroblasten aus Ratten (Roberts et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5339-5343; Roberts et al., 1982, Nature 295:417-419; Twardzik et al., 1985, J. Cell. Biochem. 28:289-297); in Gegenwart von 10% Serum wird durch ihn die Koloniebildung von AKR-2B Fibroblasten induziert (Tucker et al., 1983, Cancer Res. 43:1518-1586). TGF- β ist außerdem in der Lage, fetale Rattenmuskel-Mesenchym-Zellen zu differenzieren und zur Produktion knorpelspezifischer Makromoleküle zu veranlassen (Seyedin et al., 1986, 25 J. Biol. Chem. 261:5693-5695).

Im Gegensatz zu seiner Wirkung auf die Zellproliferation kann der aus menschlichen Thrombozyten isolierte TGF- β ebenso wie ein funktionell verwandtes Protein aus BSC-1-Zellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze das Wachstum bestimmter Zellen in Kultur inhibieren (Tucker et al., 1984, Science 226:705-707). Außerdem konnte eine Wachstumshemmung mehrerer menschlicher Krebszelllinien durch TGF-Beta gezeigt 30 werden (Roberts et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:119-123). Dieser inhibierende/stimulierende Effekt von TGF- β ist unter Umständen von mehreren Faktoren, wie dem Zelltyp und dem physiologischen Zustand der Zellen abhängig (Sporn et al., 1986, Science 233:532-534).

cDNA-Klone, welche für Human- (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705), Mäuse- (Derynck et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:4377-4379) und Simian- (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) TGF- β kodieren, 35 wurden bereits isoliert. DNA-Sequenzanalysen dieser Klone weisen darauf hin, daß TGF- β in Form eines großen Prekursor-Polypeptids synthetisiert wird, wobei dessen carboxy-terminales Ende unter Bildung des maturierten TGF- β -Monomers abgespalten wird. Eine ausgeprägte Sequenzhomologie im gesamten Bereich des Prekursor-Proteins wurde in sämtlichen TGF- β -Faktoren mit oben genannter Abstammung gefunden.

Erst kürzlich wurde aus demineralisierten Rinderknochen ein mit TGF- β verwandtes Protein isoliert 40 (Seyedin et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:1946-1949). Dieses Protein wurde außerdem aus Schweinethrombozyten (Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415), einer menschlichen prostaticen Adenokarzinomzelllinie, PC-3 (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410) sowie aus einer menschlichen Glioblastomzelllinie (Wrann et al., 1987, EMBO 6:1633-1636) isoliert. Eine partielle Aminosäuresequenzanalyse dieses Proteins wies auf eine Homologie zu TGF- β hin, weshalb dieses Protein als TGF- β 2 bezeichnet wurde. Die früher 45 isolierten Human(Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705), Mäuse(Derynck et al., 1986, J.Biol.Chem. 261:4377-4379) und Simian- (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) TGF- β -Faktoren wurden als TGF- β 1 bezeichnet.

Auf die Grundlage neuern Forschungen wurde die Herstellung großer Mengen von TGF- β 2 durch eukaryontische Wirtszellen möglich, welche mit rekombinanten DNA-Vektoren transfiziert sind, die TGF- β 2 50 kodierende Sequenzen enthalten. Diese werden durch expressionsregulierende Elemente kontrolliert. In einer besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens erhält man für den Human-TGF- β 2-Prekursor kodierende cDNA-Klone aus einer cDNA-Genbank, hergestellt aus einer Tamoxifen-behandelten menschlichen prostaticen Adenokarzinomzelllinie PC-3. Aus der cDNA-Sequenz eines solchen Klones ergibt sich, daß TGF- β 2 in Form eines Polypeptid-kursors mit 442 Aminosäuren synthetisiert wird, aus dem die reife 55 (maturierte) TGF- β 2-Untereinheit mit 112 Aminosäuren durch proteolytische Spaltung erzeugt wird. Dieser TGF- β 2-Prekursor mit der Bezeichnung TGF- β 2-442 zeigt eine 41%ige Homologie zum Prekursor von TGF- β 1. Gemäß einer weiteren Ausführungsform erhält man cDNA-Klone, welche für den Simian-TGF- β 2-Prekursor kodieren aus einer cDNA-Genbank einer Nierenzelllinie BCS-40 aus Afrikanische Grüne Meerkat-

ze. Die cDNA-Sequenz eines solchen Klonen ergibt, daß FGF- β 2 ebenso als Prekursor-Polypeptid mit 414 Aminosäuren synthetisiert wird, woraus die maturierte TGF- β 2-Untereinheit mit 112 Aminosäuren durch proteolytische Spaltung abgeleitet wird. Dieser TGF- β 2-Prekursor mit der Bezeichnung TGF- β 2-414 mit einer Aminosäuresequenz von 414 Aminosäuren stimmt mit der Aminosäuresequenz von TGF- β 2-442 überein, wobei allerdings ein einzelner Asparaginrest anstelle der 29 Aminosäuren langen Teilsequenz vom Rest Nummer 116 bis zum Rest Nummer 144 der Human-TGF- β 2-442-Sequenz enthalten ist.

Außerdem wurden in einer BSC-40 cDNA-Genbank für einen Simian-TGF- β 2-442-Prekursor kodierende Klone sowie in einer Human-PC-3 cDNA-Genbank für einen Human-TGF- β 2-414-Prekursor kodierende Klone nachgewiesen. Die Human- und Simian-TGF- β 2-442-Prekursoren scheinen auf der Aminosäureebene ebenso wie die Human- und Simian-TGF- β 2-414-Prekursoren absolut homolog zu sein.

Die maturierten 112 Aminosäure-Monomeren von TGF- β 1 und TGF- β 2 zeigen eine 71%ige Homologie.

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, welche die kodierende Sequenz für den maturierten TGF- β 2-Faktor in Phase mit der Signal- und Prekursorsequenz von TGF- β 1 enthalten, und zur Transfektion von Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) verwendet. Die dabei gebildeten Transfektanten produzieren und sezernieren maturierten, biologisch aktiven TGF- β 2.

Die hierin verwendeten Abkürzungen besitzen folgende Bedeutung:

- TGF- β 2: Ein Transforming Growth Faktor-Beta2 aus Menschen oder Affen, welcher im wesentlichen die Aminosäuresequenz etwa vom Aminosäurerest Nummer 331 bis etwa zum Aminosäurerest Nummer 442 gemäß Fig. 1a umfaßt.
- TGF- β 2-Prekursor: Eine Gruppe von Transforming Growth Faktor-Beta2-Molekülen aus Menschen oder Affen, welche eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 1a etwa vom Aminosäurerest Nummer 1 bis etwa zum Aminosäurerest 442, wobei die Aminosäuresequenz vom Aminosäurerest Nummer 116 bis zum Aminosäurerest 144 deletiert und durch einen einzelnen Asparaginrest ersetzt ist, umfassen. Dieser Ausdruck steht für einen TGF-Beta2-Prekursor mit der Bezeichnung TGF- β 2-442 oder TGF- β 2-414, welche vom Menschen oder vom Affen abgeleitet sind.
- TGF- β 1-Prekursor: Simian-Transforming Growth Faktor-Beta1-Prekursor und Signalsequenzen, welche im wesentlichen etwa die Aminosäurereste Nummer 1 bis etwa 278 gemäß Fig. 1b umfassen.

Gegenstand der Erfindung ist der eingangs genannte

- TGF- β 1/TGF- β 2-Hybrid-Prekursor: Dieser ist ein neues Transforming Growth Faktor-Beta-Prekursor-Molekül, welches im wesentlichen eine Aminosäuresequenz etwa vom Aminosäurerest Nummer 1 bis etwa zum Aminosäurerest 390 gemäß Fig. 1b umfaßt. In spezieller Weise umfaßt der neue TGF- β 1/TGF- β 2-Hybrid-Prekursor eine Aminosäuresequenz vom Aminosäurerest Nummer 30 bis zum Aminosäurerest Nummer 390 gemäß Fig. 1b.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die eingangs genannte Nukleotidsequenz, die für einen Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor kodiert und die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie im wesentlichen die kodierende Nukleotidsequenz vom Nukleotidrest Nummer -70 bis zum Nukleotidrest Nummer 1755 gemäß Fig. 1b umfaßt.

FIGURENBESCHREIBUNG

- Fig. 1a: Nukleotidsequenz von Human-TGF- β 2-442 cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz. Das 2597 bp Insert von pPC-21 wurde in pEMBL subkloniert (Dante et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:1645-1654) und an beiden Strängen unter Verwendung der Dideoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467) sequenziert. Es ist sowohl die kodierende Sequenz als auch unmittelbar darüber die abgeleitete Sequenz angegeben. Die Sequenz des maturierten TGF- β 2 ist eingerahmt und das Signalpeptid mit einer Linie oberhalb gekennzeichnet. Potentielle Glycosylierungsstellen sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die mutmaßliche Signalsequenz-Schnittstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Nukleotidsequenz von Simian-TGF- β 2-414 cDNA ist mit der Human-TGF- β 2-442 cDNA-Sequenz identisch, mit der Ausnahme, daß die Nukleotide 346 bis 432 (geschwärzt), deletiert und durch die Sequenz AAT ersetzt sind. Außerdem sind an verschiedenen Stellen der Sequenz stumme Vertauschungen von Nukleotiden gezeigt (angegeben durch einzelne Buchstaben direkt unter dem ausgetauschten Nukleotid). Die für den Simian-TGF- β 2-414-Prekursor abgeleitete Aminosäuresequenz stimmt mit der Aminosäuresequenz

des Human-TGF- β 2-442-Prekursors überein, mit der Ausnahme, daß Asparagin die Aminosäurereste 116 bis 144 in der Human-TGF- β 2-442-Struktur ersetzt. Die Nukleotidsequenz von Human-TGF- β 2-414 cDNA wurde in dem durch gestrichelte Linien gekennzeichneten Bereich sequenziert, wobei vollkommene Homologie zur Human-TGF- β 2-442 cDNA-Sequenz festgestellt wurde, mit der Ausnahme, daß die Nukleotide 346 bis 432 deletiert und durch die Sequenz AAT ersetzt sind.

Fig. 1b: Nukleotidsequenz der Hybrid-TGF- β 1/TGF- β 2-Prekursor-DNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz. Es ist sowohl die kodierende Sequenz als auch unmittelbar darüber die abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. Die Sequenz des maturierten TGF- β 2 ist eingerahmt und das Prekursor-Signalpeptid mit einer Linie oberhalb gekennzeichnet. Glycosylierungsstellen sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die mutmaßliche Signalsequenz-Schnittstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die kodierende Sequenz entspricht maturiertem Human-TGF- β 2. Die kodierende Sequenz von Simian-TGF- β 2 ist mit der Humansequenz fast identisch: Lediglich drei stumme Basenaustausche wurden gefunden und sind mit einzelnen Buchstaben direkt unter dem ausgetauschten Nukleotid gekennzeichnet. Einzelheiten zur cDNA-Klonierung von TGF- β 2 und zur Konstruktion des TGF- β 1/TGF- β 2-Hybridgens folgen im Text.

Fig. 1c: Schematisches Diagramm des TGF- β 1/TGF- β 2-Hybrid-Prekursor-Gens.

Fig. 1d: Restriktionsendonukleasekarten von pPC-14 (2.2 kb) und pPC-21 (2.3 kb). Die umrahmten Bereiche stehen für die kodierenden Sequenzen des TGF- β 2-Monomers. ATG bezeichnet das Methionin-Startcodon. Der Abstand zwischen ATG und der KpnI-Schnittstelle in pPC-21 (2.3 kb) beträgt ca. 420 bp. Der geschwärzte Bereich zeigt die Position des 84-bp-Inserts in pPC-21 (2.3 kb).

Fig. 1e: Partielle DNA-Sequenzanalyse von pPC-14 (2.2 kb). Ein synthetisches Oligonukleotid 5'-AGGAGCGACGAAGAGTACTA-3', welches ca. 140 bp oberhalb (upstream) der KpnI-Schnittstelle innerhalb des Inserts in pPC-21 (2.3 kb) hybridisiert, wurde als Primer zur DNA-Sequenzierung verwendet. In diesen Bereich ist die Sequenz von pPC-14 (2.2 kb) (obere Zeile) bis zu den Nukleotiden, welche für Asn-116 kodieren, identisch mit pPC-21 (2.3 kb). Das 84-bp-Insert in das Asn-116-codon von pPC-14 (2.2 kb), das in pPC-21 (2.3 kb) gefunden wurde, ist außerdem gezeigt. Die KpnI-Schnittstelle innerhalb des Inserts ist angegeben.

Fig. 2: Homologien von Human-TGF- β 1- und TGF- β 2-442-Prekursorsequenzen.

a) Primäre Sequenzhomologie: Identische Reste sind eingerahmt. Potentielle Glycosylierungsstellen in TGF- β 2 sind mit Sternchen gekennzeichnet, die potentielle Signalsequenz-schnittstelle und die Schnittstelle des maturierten Polypeptids sind gekennzeichnet.

b) Punktmatrixvergleich mit Hilfe der Gene Pro-Software. Durch jeden Punkt wird ein Bereich angegeben, worin 5 von 10 Aminosäuren identisch sind. Diagonale Linien weisen auf homologe Bereiche hin.

Fig. 3: Northern Blot-Analyse von BSC-40 und PC-3 polyadenylierter RNA. Polyadenylierte RNA wird aus BSC-40 und PC-3 Zellen isoliert, auf einem Agarose-Formaldehydgel fraktioniert, auf Hybond-N-Filter übertragen und mit einem [32 P]-markiertem TGF- β 2 spezifischen Marker, pPC-21 (Teil A) oder einem Gemisch von [32 P]-markiertem TGF- β 2- und TGF- β 1-(Sharples et al., 1987) spezifischen Markern (Teil B) wie in Materials und Methoden beschrieben, hybridisiert. Spur 1, BSC-40 polyadenylierte RNA (5 Mikrogramm); Spur 2, PC-3 polyadenylierte RNA (5 Mikrogramm).

Fig. 4: Northern Blot-Analyse von polyadenylierter RNA unterschiedlicher Herkunft. Polyadenylierte RNA wurde aus MCF-7 (Human-Mammakarzinom), SK-MEL 28 (Human-Melanom), KB (Nasopharyngealkarzinom) und HBL-100 (Human-Mammaepithel) Zellen isoliert und durch Northern Blot-Hybridisierung mit einem TGF- β 2-spezifischen Marker (pPC-21) gemäß der Beschreibung in Material und Methoden analysiert. Jede Spur enthält 5 Mikrogramm polyadenylierter RNA aus SK-MEL 28 (Spur 1), MCF-7 (Spur 2), HBL-100 (Spur 3) oder KB (Spur 4) Zellen.

Fig. 5: Bioaktivitätstest mit Rekombinantem TGF- β 2. 1 β 9, 12.5, Klon 36-Zellen werden bis zur Konfluenz in 100 mm Gewebekulturschalen gezüchtet. Die Zellen werden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen und 24 h in serumfreiem Medium inkubiert. Die Medien werden gesammelt, gegen 0,2M Essigsäure dialysiert und auf Inhibition der DNA-Synthese in CCL64-Zellen wie beschrieben (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418) getestet. In diesem Test ergeben 3.3 pg eines gereinigten natürlichen TGF- β 1-Standards 50%ige Inhibition; für die spezifische Aktivität von gereinigtem natürlichen TGF- β 2 wurde etwa der halbe

Wert von TGF- β 1 bestimmt.

Fig. 6: Western Blot-Analyse rekombinanter Proteine sezerniert von 1 β 9, 12.5, Klon 36. Säuredialysierte serumfreie konditionierte Medien von 1 β 9, 12.5, Klon 36 Zellen werden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese fraktioniert und durch Western-Blotting mit einem Antiserum gegen das synthetische NH₂-YNTINPEASAPC-COOH wie beschrieben analysiert (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418)

Im einer bisher unveröffentlichten Patentanmeldung sind die Herstellung einer biologisch aktiven, maturierten Form von TGF- β 2 aus der kodierenden Sequenz eines TGF- β -Prekursor-Genes und dessen Produkt beschrieben. Das maturierte biologisch aktive TGF- β 2 kann durch Klonierung und Expression der kodierenden Nukleotidsequenz des TGF- β 2-Prekursors in voller Länge oder eines seiner funktionalen Äquivalente in einer Wirtszelle produziert werden, welche den Prekursor richtig prozessiert, so daß maturierter TGF- β 2 mit einer biologischen Aktivität erzeugt wird, die sich von der Aktivität eines authentischen natürlichen TGF- β 2 nicht unterscheidet. Funktionale Äquivalente der kodierenden Gesamtnukleotidsequenz des TGF- β 2-Prekursors beinhalten jegliche DNA-Sequenz, die bei Expression in einer geeigneten Wirtszelle die Synthese, Prozessierung und den Export von maturiertem TGF- β 2 steuern kann. Daher können kodierende Prekursor-Hybridsequenzen, wie z.B. die TGF- β 1-Prekursor-Sequenz, die im richtigen Leserahmen mit der maturierten TGF- β 2-Sequenz verbunden ist, konstruiert und zur Herstellung von biologisch aktivem TGF- β 2 verwendet werden.

Zur Verdeutlichung kann das erfindungsgemäße Verfahren in folgende Stufen aufgeteilt werden:

- (a) Isolierung oder Generierung der kodierenden Sequenz für einen TGF- β 2-Prekursor;
- (b) Konstruktion eines Expressionsvektors, welcher die Expression einer kodierenden Sequenz für TGF- β 2 steuert;
- (c) Transfektion einer geeigneten Wirtszelle, welche das Gen repliziert und exprimiert und das Genprodukt zur Produktion der maturierten, biologisch aktiven Form von TGF- β 2 prozessiert; und
- (d) Identifizierung und Reinigung des maturierten biologisch aktiven TGF- β 2.

Nach Identifizierung des Transfektanten, welcher eine hohe Expressionsrate für bioaktives maturiertes TGF- β 2 aufweist, wird erfindungsgemäß dieser Klon vermehrt und das exprimierte Genprodukt daraus isoliert.

Das genannten Verfahren wird anhand von Beispielen beschrieben. Hierin werden cDNAs der kodierenden TGF- β 2-Prekursorregion hergestellt, kloniert, sequenziert und zur Konstruktion eines Expressionsvektors verwendet, welcher eine hohe Expressionsrate von TGF- β 2 in CHO-Zellen steuert. In einer speziellen Ausführungsform wird die gesamte Aminosäuresequenz der maturierten Form von Human-TGF- β 2 bestimmt, welche insgesamt eine Homologie von 71% mit TGF- β 1 aufweist. Unter Verwendung synthetischer Oligonukleotidsonden wurden Klone einer PC-3 cDNA-Genbank identifiziert, welche für TGF- β 2 kodieren. Die DNA-Sequenzanalyse eines dieser Klone ergab, daß TGF- β 2 ebenso wie TGF- β 1 in Form eines größeren Prekursorproteins synthetisiert wird, woraus unter Abspaltung des carboxyterminalen Endes das maturierte TGF- β 2-Monomer entsteht. Während eine 71%ige Homologie zwischen TGF- β 1 und TGF- β 2 maturierten Bereiche dieser Moleküle zu beobachten ist, ergibt sich lediglich eine maximal 31%ige Homologie innerhalb der restlichen Prekursorsequenz. Funktionale Unterschiede der aminoterminalen Bereiche von TGF- β 1 und TGF- β 2 können daraus geschlossen werden.

In einer speziellen Ausführungsform wird die Herstellung großer Mengen von biologisch aktivem TGF- β 2 durch Expression des neuen erfindungsgemäßen TGF- β 1/TGF- β 2-Hybridgens in CHO-Zellen erreicht.

Die verschiedenen Aspekte des genannten Verfahrens werden im folgenden sowie in den Beispielen näher beschrieben.

Isolierung und Erzeugung der TGF- β 2-kodierten Region

Die kodierende Nukleotidsequenz für TGF- β 2 ist in Fig. 1a dargestellt. Zur Durchführung des Verfahrens können die darin dargestellten Nukleotidsequenzen oder Fragmente oder funktionale Äquivalente davon zur Erzeugung des rekombinanten Moleküls verwendet werden, welches die Expression des TGF- β 2-Produktes in einer geeigneten Wirtszelle steuert. Gemäß einer speziellen Ausführungsform wird das TGF- β 1/TGF- β 2-Hybridgen (Fig. 1b) hergestellt und zur Transfektion von CHO-Zellen verwendet. Transfektanten mit einer Produktionsrate von 500 μ g maturiertem biologisch aktivem TGF- β 2 pro ml Kulturmedium wurden isoliert.

Aufgrund der Degeneration der kodierenden Nukleotidsequenz können andere DNA-Sequenzen, welche für Aminosäuresequenzen kodieren, die den Sequenzen gemäß Fig. 1a und 1b im wesentlichen gleichen, zur Klonierung und Expression von TGF- β 2 verwendet werden. Derartige Veränderungen beinhalten Deletionen, Additionen oder Substitutionen unterschiedlicher Nukleotidreste, welche zu einer Sequenz

führen, die für ein identisches oder funktional äquivalentes Genprodukt kodiert. Das Genprodukt kann Deletionen, Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten innerhalb der Sequenz aufweisen, welche zu stummen Veränderungen führen und wodurch ein bioaktives Produkt erzeugt wird. Derartige Aminosäuresubstitutionen können auf der Grundlage von Ähnlichkeiten in der Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobizität, Hydrophilie und/oder der amphipathischen Natur der betroffenen Reste erfolgen. Beispielsweise umfassen negativ geladene Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure; positiv geladene Aminosäuren umfassen Lysin und Arginin; Aminosäuren mit ungeladenen polaren Kopfgruppen oder unpolaren Kopfgruppen mit vergleichbarer Hydrophilie beinhalten: Leucin, Isoleucin, Valin; Glycin, Alanin; Asparagin, Glutamin; Serin, Threonin; Phenylalanin, Tyrosin.

Die kodierende Nukleotidsequenz für TGF- β 2 kann man aus Zellen erhalten, welche eine TGF- β 2 ähnliche Aktivität aufweisen. Die kodierende Sequenz kann man durch cDNA-Klonierung von RNA erhalten, welche aus derartigen Zellen durch genomische Klonierung isoliert und gereinigt wurde. Man kann entweder cDNA- oder genomische Genbanken von Klonen herstellen, welche mit Hilfe von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, z.B. unter Verwendung von Restriktionsenzymen aus DNA-Fragmenten erzeugt wurden. Die Genfragmente, welche für TGF- β 2 kodieren, können durch Screening solcher Genbanken mit einer Nukleotidsonde nachgewiesen werden, welche zu einem beliebigen Teil der in Fig. 1a dargestellten Sequenz im wesentlichen komplementär ist. Klone mit der Gesamtsequenz, d.h. Klone, welche den gesamten kodierenden Bereich des TGF- β 2-Prekursors enthalten, können selektiert und exprimiert werden.

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann die kodierende Sequenz in Fig. 1a als ganzes oder teilweise unter Verwendung von bekannten chemischen Methoden synthetisiert werden (s. z.B. Caruthers et al., 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-223; Crea und Horn, 1980, Nuc. Acids. Res. 9(10):2331; Matteucci und Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21:719 und Chow und Kempe, 1981, Nuc. Acids. Res. 9(12):2807-2817). Andererseits könnte das Protein dadurch hergestellt werden, daß man mit Hilfe von chemischen Methoden die Aminosäuresequenz in Fig. 1a als Ganzes oder teilweise synthetisiert. Beispielsweise können Peptide mit Hilfe der Festphasensynthese auf einem Beckman 990-Gerät hergestellt werden, und anschließend wie beschrieben (L.E. Gentry et al., 1983, J. Biol. Chem. 258:11219-11228; L.E. Gentry and A. Lawton, 1986, Virology 152:421-431) abgespalten werden. Zur Reinigung kann man präparative hochauflösende Flüssigchromatographie verwenden. Die Peptidzusammensetzung kann durch Aminosäureanalyse bestimmt werden.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform in den hierin beschriebenen Beispielen erhält man die TGF- β 2-kodierende Sequenz durch Klonierung der cDNA der kodierenden Sequenz des Human-TGF- β 2-Prekursors, abgeleitet von polyadenylierter RNA. Diese wurde aus einer Tamoxifen-behandelten menschlichen prostatistischen Adenokarzinomzelllinie PC-3 isoliert, deren TGF- β 2-Produktion bereits nachgewiesen war. Der gesamte kodierende Bereich eines cDNA-Klons wurde sequenziert und mit der veröffentlichten Sequenz für Human-TGF- β 1 verglichen (s. Fig. 2).

Die DNA-Sequenzanalyse von TGF- β 2-cDNA-Klonen zeigt, daß TGF- β 2 ebenso wie TGF- β 1 als großes Prekursorprotein synthetisiert wird, dessen carboxyterminales Ende unter Bildung des maturierten 112 Aminosäuren langen TGF- β 2-Monomers abgespalten wird. Für TGF- β 2 wurde ein Molekulargewicht von 24 000 nachgewiesen, wobei das Molekül aus zwei disulfidverbrückten 13 000 Dalton großen Untereinheiten besteht (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410; Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415). Zur Produktion von maturiertem TGF- β 2 ist daher sowohl eine entsprechende proteolytische Spaltung als auch die Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken erforderlich. Eine aminoterminal hydrophobe Leadersequenz (Reste 3-19) ist im Prekursor nachweisbar und kann für das Ausschleusen des Proteins aus der Zelle verantwortlich sein. Maturierter TGF- β 2 kann während dieses Vorgangs mit dem restlichen Teil des Prekursors noch verbunden sein.

TGF- β 2 zeigt gegenüber TGF- β 1 im maturierten Bereich des Prekursors eine 71%ige Homologie, die auf funktionale Ähnlichkeiten hinweist. Hierfür gibt es experimentelle Hinweise (Seyedin et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:1946-1949; Cheifetz et al., 1987, Cell 48:409-415). Der aminoterminal Bereich der Prekursoregion aus Human-, Nager- und Simian-TGF- β 1 (Derynck et al., 1985, Nature 316:701-705; Derynck et al., 1986, J. Biol. Chem. 261:4377-4379; Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) weist einen hohen Konservierungsgrad auf und deutet darauf hin, daß dieser Teil des Moleküls eine wichtige biologische Funktion besitzen könnte. Im Gegensatz dazu ist lediglich eine 31%ige Homologie zwischen den N-terminalen Prekursorbereichen von TGF- β 1 und TGF- β 2 zu beobachten. Nach Abspaltung des wahrscheinlichen Signalpeptids würde der TGF- β 2-Prekursor eine größere Anzahl von Aminosäuren als der TGF- β 1-Prekursor besitzen. Die primären Strukturunterschiede innerhalb des aminoterminalen Bereichs des TGF- β 1- und TGF- β 2-Prekursorproteins können auf funktionalen Unterschieden beruhen. Es werden jedoch auffällig homologe Bereiche innerhalb der Prekursoren in isolierten Blocks gefunden, welche eine Konser-

vierung wichtiger funktionaler Domänen auch innerhalb der N-terminalen Prekursorregion andeuten.

Northern Blot-Analysen ergaben größtmäßig zwei Hauptklassen von TGF- β 2-spezifischer mRNA mit 4.1 und 6.5 kb in BSC-40-Zellen. Tamoxifen-behandelte PC-3-Zellen enthalten drei TGF- β 2-Transkriptionen mit 4.1 kb, 5.1 kb und 6.5 kb. Diese unterschiedlichen Größen können durch differentielles RNA-Spleissen und/oder Polyadenylierung, wie bereits für andere Gene beschrieben (Helfman et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6:3582-3595; Sayre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2941-2945, verursacht werden. Vorläufige Analysen eines weiteren TGF- β 2-cDNA-Klons ergaben am 3'-Ende einen nicht-translatierten Bereich, welcher annähernd 1 kb größer ist als der entsprechende Bereich in pPC-21 und pPC-14 und der außerdem eine unterschiedliche Polyadenylierungsstelle aufweist. Daraus kann geschlossen werden, daß eine alternative Polyadenylierung eine Ursache ist, die zur Erzeugung multipler TGF- β 2-mRNAs (wie in Northern Blots beobachtet) führt.

BSC-40-Zellen enthalten vergleichbare Mengen von TGF- β 1- und TGF- β 2-spezifischen Transkriptionen; Tamoxifen-behandelte PC-3-Zellen enthalten mehr TGF- β 1-mRNA als TGF- β 2-mRNA (Fig. 3b). Letzteres Ergebnis ist nicht zu erwarten, da diese Zellen mehr TGF- β 2-Protein als TGF- β 1 produzieren (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410). Daraus kann auf eine posttranscriptionale Regulation der Synthese dieser Wachstumsmodulatoren geschlossen werden. Versuche zum besseren Verstehen der transcriptionalen und translationalen Kontrollmechanismen, die zur Produktion von TGF- β 1 und TGF- β 2 führen, werden durchgeführt. Die Herstellung adequater Mengen von TGF- β 2 mit Hilfe der DNA-Rekombination, wie bereits für TGF- β 1 durchgeführt, sollte der Durchführung weiterer Experimente zur Erforschung der verschiedenen Effekte dieses Proteins dienen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wurde die TGF- β 2-kodierende Sequenz durch cDNA-Klonierung der kodierenden Sequenz des Simian-TGF- β 2-Prekursors hergestellt. Letzterer wurde von polyadenylierter RNA abgeleitet, die aus der BSC-40-Zelllinie afrikanischer grüner Meerkatzen isoliert wurde. Die gesamte kodierende Region eines cDNA-Klons wurde sequenziert. Daraus ergaben sich identische Aminosäuresequenzen des Human- und Simian-TGF- β 2-Prekursors und eine annähernde Identität ihrer Nukleotidsequenzen.

Konstruktion eines Expressionsvektors mit der TGF- β 2 kodierenden Sequenz

Zur Expression von biologisch aktivem, maturiertem TGF- β 2 sollte ein Expressionsvektor/Wirtssystem gewählt werden, welches nicht nur hohe Transcriptions- und Translationsraten, sondern auch die richtige Prozessierung des Genproduktes bewirkt. Dies ist insbesondere wichtig bei Verwendung der gesamten kodierenden Sequenz eines TGF- β 2-Prekursors im Expressionssystem, da die maturierte Form von TGF- β 2 wahrscheinlich über zelluläre Prozessierungsvorgänge vom Prekursorprodukt abgeleitet wird. Zusätzlich kann ein Expressions/Wirtszellen-System ausgewählt werden, welches das Genprodukt sezerniert.

Anscheinend wird der maturierte TGF- β 2, ein disulfidverbrücktes Homodimeres mit 112 Aminosäuren pro Untereinheit, durch zelluläre Prozessierung gebildet. Hierbei erfolgt eine proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren Arg-Ala des Prekursors (Reste 330 und 331 in Fig. 1a). Zusätzlich enthält der TGF- β 2-Prekursor drei potentielle N-Glycosylierungsstellen, welche in der maturierten Form nicht zu beobachten sind; eine richtige Glycosylierung des Prekursors kann für die zelluläre Synthese und Freisetzung oder Sekretion des maturierten Moleküls entscheidend sein. Der maturierte TGF- β 2 umfaßt ein disulfidverbrücktes Dimer mit neun Cysteinresten je Untereinheit. Einige dieser Reste sind an intermolekularen Disulfidbrücken, andere an intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt, wodurch die Tertiärstruktur und die Konfiguration des maturierten Moleküls und als Folge davon dessen biologische Aktivität beeinflußt wird. Die Fähigkeit der im Expressionssystem verwendeten Wirtszelle zur korrekten Expression und Prozessierung des TGF- β 2-Genproduktes ist daher für die Produktion eines biologisch aktiven maturierten TGF- β 2 von Bedeutung.

Eine Vielzahl von Tierzellen/Expressionsvektorsystemen (d.h. Vektoren, welche die zur Steuerung der Replikation, Transcription und Translation der TGF- β 2-kodierenden Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle enthalten) können vom Fachmann in gleicher Weise verwendet werden. Beispiele hierfür sind Systeme mit viralem Expressionsvektor und Säugerwirtszelle (z.B. Cytomegalovirus, Vaccinavirus, Adenovirus u.dgl.); Systeme mit einem Insektenvirus-Expressionsvektor und einer Insektenzelle (z.B. Baculovirus); oder nicht-virale Promotor-Expressionssysteme als dem Genom von Säugerzellen (z.B. Mäuse-Metallothionein-Promoter).

Die Expressionselemente dieser Vektoren variieren in Stärke und Spezifität. In Abhängigkeit des verwendeten Wirts/Vektorsystems können beliebige Transcriptions- und Translationselemente aus einer Vielzahl von geeigneten Elementen verwendet werden. Wenn z.B. in einem Säugetierzellsystem kloniert wird, können z.B. Promotoren aus dem Genom von Säugetierzellen (z.B. Mäuse-Metallothionein-Promoter)

oder aus Viren, welche in diesen Zellen wachsen (z.B. Vaccinavirus 7.5 K Promoter) verwendet werden. Mit Hilfe von rekombinanten DNA oder synthetischen Methoden hergestellte Promotoren können ebenso zur Transcription der insertierten Sequenzen verwendet werden.

Spezifische Initiationssignale sind für eine ausreichende Translation der insertierten proteinkodierenden Sequenzen erforderlich. Diese Signale beinhalten das ATG-Startcodon und die daran angrenzenden Sequenzen. Für den Fall, daß das gesamte TGF- β 2-Gen einschließlich seines eigenen Startcodons und der daran angrenzenden Sequenzen in geeignete Expressionsvektoren insertiert wird, sind keine weiteren Translationskontrollsignale erforderlich. Wenn jedoch nur ein Teil der kodierenden Sequenz insertiert wird, müssen exogene Translationskontrollsignale sowie das ATG-Startcodon eingeführt werden. Außerdem ist es erforderlich, daß das Startcodon mit dem Leserahmen der TGF- β 2-kodierenden Sequenz in Phase insertiert wird, um die Translation des gesamten Inserts zu gewährleisten. Die erwähnten exogenen Translationskontrollsignale und Startcodons können sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sein. Die Effektivität der Expression kann mit Hilfe von Transcriptions-Attenuationssequenzen, Enhancerelementen usw. verstärkt werden.

Jede beliebige bekannte Methode zur Insertion von DNA-Fragmenten in einen Vektor kann zur Konstruktion des Expressionsvektors der das TGF- β -Gen und geeignete Transcriptions/Translations-Kontrollsignale enthält, verwendet werden. Diese Verfahren umfassen in vitro-DNA-Rekombinationstechniken, synthetische Techniken und in vivo-Rekombinationen (genetische Rekombination).

Bei Verwendung eines Adenovirus als Expressionsvektor kann die TGF- β 2-kodierende Sequenz an einen Adenovirus-Transcriptions/Translations-Kontrollkomplex (z.B. die Late Promoter und die Tripartite Leader-Sequenz) ligiert werden. Diese chimären Gene können dann in das Adenovirus-Genom durch in vitro- oder in vivo-Rekombination insertiert werden. Eine Insertion in eine nicht-essentielle Region des viralen Genoms (z.B. Region E1 oder E3) führt zu einem lebensfähigen rekombinanten Virus, welches zur Expression von TGF- β 2 im infizierten Wirt befähigt ist. In ähnlicher Weise kann der Vaccina 7.5 K-Promoter verwendet werden.

Ein anderes Expressionssystem zur Expression von TGF- β 2 ist ein Insektensystem. In einem dieser Systeme wird als Vektor zur Expression fremder Gene das Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) verwendet. Das Virus wächst in Spodoptera frugiperda-Zellen. Die TGF- β 2-kodierende Sequenz kann in nicht-essentiellen Bereichen (z.B. dem Polyhedringen) des Virus kloniert und von einem AcNPV-Promotor (z.B. dem Polyhedrin-Promotor) kontrolliert werden. Nach erfolgter Insertion der TGF- β 2-kodierenden Sequenz ist eine Inaktivierung des Polyhedringens und die Produktion unverschlossener rekombinanter Viren (d.h. Viren mit fehlender Polyhedringen-kodierter proteinhaltiger Hülle) zu beobachten. Diese rekombinanten Viren werden dann zur Infektion von Spodoptera frugiperda-Zellen verwendet, in denen das insertierte Gen exprimiert wird.

Zusätzlich kann ein Wirtszellstamm gewählt werden, welcher die Expression der insertierten Sequenz moduliert oder das Genprodukt auf gewünschte Weise modifiziert und prozessiert. Die Expression bestimmter Promotoren kann in Gegenwart bestimmter Induktoren (z.B. Zink- und Cadmiumionen für Metallothioneinpromotoren), erhöht werden. Somit kann die Expression von gentechnisch erzeugtem TGF- β 2 kontrolliert werden. Dies ist von Bedeutung, wenn das produzierte Protein des klonierten Fremdgens auf die Wirtszelle letal wirkt. Außerdem sind Modifikationen (z.B. Glycosylierung) und Prozessierung (z.B. Spaltung) des produzierten Proteins für die Funktion des Proteins von Bedeutung. Unterschiedliche Wirtszellen besitzen charakteristische und spezifische Mechanismen zur posttranslationalen Prozessierung und Modifikation von Proteinen. Geeignete Zelllinien oder Wirtssysteme können zur Gewährleistung der richtigen Modifikation und Prozessierung des exprimierten Fremdproteins ausgewählt werden.

45 Identifizierung von Transfektanten oder Transformanten, welche das TGF- β 2 Genprodukt exprimieren

Die die rekombinante TGF- β 2-kodierende Sequenz enthaltenden Wirtszellen, welche das biologisch aktive, maturierte Produkt exprimieren, können mit Hilfe von wenigstens vier allgemeinen Verfahren identifiziert werden:

- (a) DNA-DNA-Hybridisierung;
- (b) Anwesenheit oder Abwesenheit von "Marker"-Genfunktionen;
- (c) Bestimmung der Transcriptionsrate, wie z.B. durch Messung der Expression des TGF- β 2-mRNA-Transcriptes in den Wirtszellen; und
- (d) Detektion des maturierten Genproduktes über einen Immunoassay und schließlich dessen biologische Aktivität.

In einem ersten Versuch kann die Anwesenheit der insertierten TGF- β 2-kodierenden Sequenz im Expressionsvektor durch DNA-DNA-Hybridisierung nachgewiesen werden, wobei als Sonden Nukleotidse-

quenzen verwendet werden. Diese weisen Homologien zur kodierenden Sequenz von TGF- β 2 (im wesentlichen gemäß Fig. 1a) oder zu Teilen oder Derivaten davon auf.

In einem zweiten Versuch kann das rekombinante Expressionsvektor/Wirtssystem durch Abwesenheit oder Anwesenheit bestimmter "Marker"-Genfunktionen (z.B. Thymidinkinase-aktivität, Antibiotikaresistenz, Methotrexatresistenz, Transformationsphänotyp, Occlusionskörperbildung im Baculovirus, usw.) identifiziert und selektioniert werden. Wenn z.B. die TGF- β 2-kodierende Sequenz in eine Marker-Gensequenz eines Vektors inseriert wird, können diejenigen Rekombinanten durch die Abwesenheit der Marker-Genfunktion identifiziert werden, welche die TGF- β 2-kodierende Sequenz enthalten. Andererseits kann eine Marker-Gensequenz zusammen mit der TGF- β 2-Sequenz unter Kontrolle desselben oder eines weiteren Promotors zur Kontrolle der TGF- β 2-kodierenden Sequenz gestellt werden. Die Expression des Markers nach Induktion oder Selektion weist auf die Expression der TGF- β 2-kodierenden Sequenz hin.

In einem dritten Versuch kann die Transkriptionsaktivität für die TGF- β 2-kodierende Region mit Hilfe von Hybridisierungsversuchen bestimmt werden. Beispielsweise kann polyadenylierte RNA isoliert und durch Northern Blotting analysiert werden. Hierzu wird eine zur gesamten oder teilweisen TGF- β 2-kodierenden Sequenz homologe Sonde verwendet. Außerdem können alle Nukleinsäuren der Wirtszelle extrahiert und durch Hybridisierung mit den oben genannten Sonden verwendet werden.

In einem vierten Versuch kann die Expression des maturierten Proteinproduktes immunologisch z.B. durch Western Blots, Immunoassays, wie der Radioimmuno-Präzipitation, enzymgebundene Immunoassays u.dgl. bestimmt werden. Der letzte Test zur Beurteilung des Expressionssystems beinhaltet die Detektion von biologisch aktivem TGF- β 2-Genprodukt. Wird das Genprodukt durch die Wirtszelle sezerniert, kann das zellfreie Medium der kultivierten transfizierten Wirtszelle auf TGF- β 2-Aktivität getestet werden. Wird das Genprodukt nicht sezerniert, können Zell-Lysate auf die gesuchte Aktivität hin getestet werden. In beiden Fällen können biologische Tests, wie der hierin beschriebene Wachstumsinhibitionstest oder die Stimulierung des verankerungsunabhängigen Wachstums in Targetzellen (Twardzik und Sherwin, 1985, J. Cell. Biochem. 28:289-297; Delarco und Todaro, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4001-4005) oder ähnliche Tests verwendet werden.

Nach einmaliger Identifizierung eines Klons, welcher große Mengen von biologisch aktivem maturiertem TGF- β 2 produziert, kann dieser Klon vermehrt und TGF- β 2 unter Verwendung bekannter Techniken gereinigt werden. Solche Verfahren sind die Immunoaffinitätsreinigung, chromatographische Methoden einschließlich der hochauflösenden Flüssigchromatographie und andere.

BEISPIEL 1: Klonierung des TGF- β 2-Prekursors aus PC-3-Zellen

Die folgenden Beispiele beschreiben die cDNA-Klonierung der TGF- β 2-Prekursor kodierenden Sequenzen aus der menschlichen prostaticen Adenokarzinomzelllinie PC-3, aus der TGF- β 2 bereits früher isoliert wurde.

Die folgenden Verfahren wurden zur Klonierung von cDNAs verwendet, welche für den Human-TGF- β 2-Prekursor kodieren.

40 Züchtung der Zellen und Extraktion der RNA

Die menschliche prostatiche Adenokarzinomzelllinie PC-3 wurde in einem Tamoxifen-haltigen Medium wie bereits beschrieben (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410) gezüchtet. MCF-7-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium mit einem Gehalt von 10% fetalen Kälberserum und 6 Einheiten/ml Insulin gezüchtet. Alle anderen Zelllinien wurden in dem gleichen insulinfreien Medium gezüchtet. Polyadenylierte RNA wurde durch Oligo[dT]-Cellulosechromatographie isoliert (Purchio und Fareed, 1979, J. Virol. 29:763-769).

Konstruktion der cDNA-Genbank und Screening

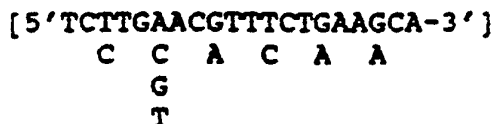
Doppelsträngige cDNA wurde, ausgehend von polyadenylierter RNA synthetisiert, welche aus PC-3-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Tamoxifen isoliert wurde (Maniatis et al., 1982, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). cDNA-Faktionen mit mehr als 1000 Basenpaaren wurden in Lambda gt10 wie beschrieben kloniert (Webb et al., 1987, DNA 6:71-79). Die Genbank wurde zuerst mit einer [32 P]-markierten 24fach degenerierten Sonde zweifach gescreent. Die verwendete Sonde ist komplementär zu der für die Aminosäuresequenz WKWIHEP kodierenden DNA (Sonde 1), welche in TGF- β 1 und TGF- β 2 konserviert ist:



5

Positive Klone wurden anschließend mit einer zweiten 128-fach degenerierten Sonde gescreent, welche zu der für die Aminosäuresequenz CFRNVQD kodierenden DNA (Sonde 2) komplementär ist; fünf dieser sieben Aminosäuren sind spezifisch für TGF- β 2:

10



15

Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C in 6XSSC, 5X Denhart's Lösung (Lösungen definiert in "Molecular Cloning" A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press), 0,15 mM Pyrophosphat, 100 µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA, 100 µg/ml Hefe tRNA und 1 mM EDTA (Maniatis et al., 1982, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). Die Filter wurden bei 42°C in 2XSSC (Lösungen definiert in "Molecular Cloning" A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press), 0,1% NaDodecylsulfat, viermal 30 min gewaschen. Mehrere cDNA-Klone wurden isoliert, welche mit beiden Sonden hybridisierten und wurden in pEMBL (Dante et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:1645-1654) subkloniert. Ein Klon (pPC-21) mit einem 2.6 kb Insert wurde beidsträngig mit Hilfe der Dideoxykettenabbruchmethode sequenziert, wobei verschiedene Restriktionsfragmente und Exonuklease III-Deletionsfragmente zusammen mit spezifischen Oligonukleotidprimern (Henikoff, 1984, Gene 28:351-359) verwendet wurden. Ein weiterer Klon (pPC-14) mit einem 2.2 kb Insert wurde teilweise sequenziert. Eine Dot-Matrixanalyse wurde auf einem IBM AT-PC unter Verwendung der Gene Pro-Software von Riverside Scientific Enterprises (Seattle, WA) durchgeführt.

30 Northern Blot Analyse

Polyadenylierte RNA wurde auf einem 1%igen Agaroseformaldehydgel (Lehrach et al., 1977, Biochemistry 16:4743-4751) fraktioniert, auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond, Amersham) und mit einer [³²P]-markierten Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 42°C in 50% Formamid mit 0,9 M NaCl, 50 mM Natriumphosphat (pH 7,0), 5 mM EDTA, 0,1% NaDodecylsulfat, 4X Denhardt's Lösung, 0,4 mg/ml Hefe-tRNA und 0,25 mg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Die Filter wurden bei 65°C in 0,25X SSC, 0,1% NaDodecylsulfat gewaschen, getrocknet und auf einen Cronex-4-Röntgenfilm (DuPont) unter Verwendung eines Lightening Plus-Verstärkerschirms (DuPont) aufgelegt.

40 ERGEBNISSE

Eine cDNA-Genbank wurde unter Verwendung von polyadenylierter, aus Tamoxifen behandelten PC-3-Zellen isolierter RNA aufgestellt. Frühere Beobachtungen wiesen darauf hin, daß eine Tamoxifen-Behandlung zu einer 2- bis 5-fachen Zunahme der Sekretion von TGF- β 2 führt (Ikeda et al., 1987, Biochemistry 26:2406-2410). Die Genbank wurde mit den Sonden 1 und 2 wie oben beschrieben gescreent. Man erhielt fünf Klone, welche mit beiden Sonden hybridisierten: Ein Klon (pPC-21) mit einem Insert von 2.6 kb wurde für die Sequenzierung ausgewählt. Ein weiterer Klon (pPC-14) mit einem Insert von 2.2 kb wurde teilweise sequenziert. Die DNA- und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind in Fig. 1 gezeigt.

pPC-21 enthält einen einzigen offenen Leserahmen, welcher für ein abgeleitetes Polypeptid mit 442 Aminosäuren kodiert; die 112 carboxyterminalen Aminosäuren umfassen das maturierte TGF- β 2-Monomer (in Fig. 1a eingerahmt). Auf das erste durch den offenen Leserahmen kodierte Methionin folgt unmittelbar eine Reihe hydrophober und ungeladener Aminosäuren, charakteristisch für ein Einzelpeptid (in Fig. 1a durch eine Linie über der Sequenz gekennzeichnet). Weder die Nukleotidsequenz für dieses Methionin noch die Nukleotidsequenzen für die nächsten zwei Methionine im offenen Leserahmen stehen in Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz für die Methionin-Startsequenz (Kozak, 1986, Cell 44:283-292). Da die Translation gewöhnlich am ersten Methionin in einem offenen Leserahmen beginnt und da zu TGF- β 1 homologe Bereiche (wie hierin diskutiert) oberhalb (in 5'-Richtung) des zweiten Methionins zu beobachten sind, wurde das erste Methionin versuchsweise als Startsignal für die Translation festgesetzt. Daraus ergibt

sich, daß TGF- β 2 ebenso wie TGF- β 1 als Teil eines sehr viel größeren sezernierten Prekursors exprimiert wird. Der pPC-21-Klon enthält 467 bp oberhalb (in 5'-Richtung) des mutmaßlichen Methionin-Startsignals und eine 3'-untranslatierte Region von etwa 800 bp einschließlich einer Poly(A)-Folge. Fünfzehn Basen oberhalb davon stromaufwärts; in 5'-Richtung) befindet sich eine Polyadenylierungs-Signalsequenz (Proudfoot and Brownlee, 1976, Nature 263:211-214).

Die Nukleotidsequenz-Homologie innerhalb der kodierenden Regionen von TGF- β 1 und TGF- β 2 pPC-21 cDNA Klonen beträgt 53%. Die für das maturierte Protein kodierenden Bereiche weisen eine 57%ige Homologie auf, während die Stromaufwärts-Prekursor-Region eine 48%ige Homologie zeigt. Nach optimaler Anordnung der beiden Sequenzen waren mehrere Nukleotidinsertionen in der TGF- β 2-Prekursor-Region, eine davon mit 75 Nukleotiden, zu beobachten. Inwiefern diese Insertionen durch Anwesenheit zusätzlicher Exons in TGF- β 2 verursacht werden, ist nicht bekannt. Eine signifikante Homologie zwischen den DNA-Sequenzen in den nicht-kodierenden Bereichen der beiden Klone war nicht zu beobachten. TGF- β 1 weist ausgedehnte G-C-reiche nichtkodierende Bereiche auf, während TGF- β 2 ausgedehnte A-T-reiche nicht-kodierende Bereiche zeigt. Beide cDNA-Klone enthalten wiederkehrende Strukturmuster im 3'-nichtkodierenden Bereich mit Wiederholungen in TGF- β 1, bestehend aus (Purin)CCCC (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) und in TGF- β 2, bestehend aus ATG oder A (Pyrimidin)(Purin).

Restriktionsanalysen vieler Klone führten zu dem Ergebnis, daß einem Klon (pPC-14) eine KpnI-Schnittstelle im aminoterminalen Teil der für TGF- β 2 kodierenden Sequenz fehlt. Restriktionsanalysen für pPC-14 und pPC-21 sind in Fig. 1d angegeben. pPC-14 wurde mit Hilfe eines zu den Nukleotiden 277 bis 296 in Fig. 1a komplementären Primer-Oligonukleotids (20 Nukleotide) in einem Bereich von etwa 100 Nukleotiden im betreffenden aminoterminalen Ende sequenziert. Die Ergebnisse zeigten, daß der Klon pPC-14 eine Deletion von 87 Nukleotiden (Nukleotidpositionen 346 bis 432 in Fig. 1a; s. auch Fig. 1e) enthält, welche für die fehlende KpnI-Schnittstelle verantwortlich ist und durch die Sequenz AAT, dem Codon für Asparagin, ersetzt ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Klon pPC-14 für einen kürzeren TGF- β 2-Prekursor mit 414 Aminosäuren kodiert, welcher sich von der durch pPC-21 kodierten Sequenz lediglich durch eine Deletion der Aminosäurereste 116 bis 144 unterscheidet, die durch einen einzelnen Asparaginst rest ersetzt sind.

Obwohl die gesamte kodierende Region von pPC-14 nicht bestimmt wurde, liegt wahrscheinlich eine vollständige Übereinstimmung mit der kodierenden Sequenz aus pPC-21 vor, da sich mit Ausnahme der KpnI-Schnittstelle die Restriktionsmuster beider Klone decken (Fig. 1d). Außerdem wurde ein Simian-Klon kodierend für einen 414 Aminosäure großen TGF- β -Prekursor mit der gleichen 29 Aminosäure großen Deletion und Substitution nachgewiesen (s. Beispiel im Abschnitt 7, unten). Dieser Simian-Klon weist eine kodierende Sequenz auf, welche zu der des Human-pPC-21-Klons im 5'- und 3'-Bereich der Deletion nahezu identisch ist.

Fig. 2A zeigt die abgeleitete Proteinsequenz für Human-TGF- β 1 (Derynck et al., 1985, Nature 316:101-705) im Vergleich zu der Sequenz von Human-TGF- β 2-442. Es wurde eine 71%ige Homologie von TGF- β 2 mit Human-TGF- β 1 im maturierten Bereich des Moleküls bestimmt (Marquardt et al., 1987, J. Biol. Chem., im Druck). Der aminoterminal Teil des Prekursors oberhalb (stromaufwärts) des maturierten Moleküls zeigt eine 31%ige Homologie zwischen TGF- β 1 und TGF- β 2-442. Der Dot-Matrix-Homologievergleich in Fig. 2B ergibt eine signifikante Homologie in mehrerer spezifischen Bereichen der Proteine. Ein Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen im mutmaßlichen Signalpeptidbereich ergibt keinerlei signifikante Homologie.

In TGF- β 2 wird eine Signalsequenz-Schnittstelle nach Aminosäure 20 (Serin) und in TGF- β 1 nach Aminosäure 29 (Glycin) (Von Heijne, 1983, Eur. J. Biochem. 133:17-21) vorgeschlagen. Dieser Schnittstelle folgt direkt der erste homologe Block (zwischen TGF- β 1 und TGF- β 2), der sich 34 Aminosäuren in 3'-Richtung (stromabwärts) erstreckt. Nach Abspaltung der Signalsequenzen würden die TGF- β 1- und TGF- β 2-Prekursoren in den ersten vier aminoterminalen Aminosäuren übereinstimmen (einschließlich Cystein an Position 4). Vierzehn Aminosäuren stromabwärts von diesen mutmaßlichen N-Terminus sind 19 der folgenden 21 Aminosäuren in TGF- β 1 und TGF- β 2 konserviert. Dieser Homologiebereich ist größer als irgendein anderer Homologiebereich in der G-terminalen Region, die das maturierte TGF- β -Protein enthält. Wie aus den Fig. 2A und 2B zu entnehmen ist, zeigen sich noch mehrere Bereiche mit auffallender Homologie im Upstream-Bereich des maturierten Proteins. Diese Domänen sind jeweils durch eine Vielzahl nichthomologer Aminosäuren voneinander getrennt.

Der TGF- β 2-Prekursor weist drei potentielle N-Glycosylierungsstellen an den Resten 72, 168 und 269 (s. Fig. 1a) auf. Lediglich die erste Stelle ist in TGF- β 1 konserviert und liegt innerhalb eines größeren Blocks konservierter Reste, woraus man entnehmen kann, daß diese Glycosylierungsstelle wichtige strukturelle und/oder funktionelle Eigenschaften besitzt.

Nach Abspaltung der Signalsequenz würde der TGF- β 2-Prekursor 31 bzw. 59 Aminosäuren mehr als TGF- β 1 aufweisen. Ein zusätzlicher Cysteinrest in TGF- β 2 befindet sich unmittelbar upstream einer großen nicht-homologen Aminosäuresequenz vor der Sequenz des maturierten Proteins. Ebenso wie in TGF- β 1 findet man in TGF- β 2 die Schnittstelle für das maturierte Protein unmittelbar nach einem Bereich von 4-5 basischen Aminosäuren (s. Fig. 2A). Der maturierte Bereich enthält 9 Cysteine. Eine Konservierung von 7 der 9 Cysteine ist ein wesentliches Merkmal der verschiedenen Mitglieder der TGF- β -Familie. Eine Bestimmung der hydropathischen Indizes für TGF- β 1 und TGF- β 2 ergab sowohl für den Prekursor als auch für die maturierte Form ähnliche Muster, wobei beide Proteine generell hydrophiler Natur sind (keine Daten angegeben).

Fig. 3A zeigt eine Northern Blot-Analyse unter Verwendung von pPC-21 als Sonde zur Detektion von polyadenylierter RNA aus BSC-40 (einer Afrikanische-Grüne-Meerkatze-Zelllinie) und tamoxifen-behandelten PC-3-Zellen. PC-3-Zellen enthalten drei Hauptgruppen von TGF- β 2-spezifischen mRNAs mit einer Größe von 4.1, 5.1 und 6.5 kb (Fig. 3A, Spur 2); BSC-40-Zellen enthalten überwiegend die 4.1- und 6.5-kb-Transcripte und geringere Mengen der 5.1 kb RNA (Fig. 3A, Spur 1). Es ist zu erwähnen, daß die pPC-21-Sonde unter diesen Hybridisierungsbedingungen den in diesen Zellen vorliegenden TGF- β 1-spezifischen 2.5 kb-mRNA-Typ nicht detektiert. Diese Ergebnisse und frühere Beobachtungen (Sharples et al., 1987, DNA 6:239-244) weisen darauf hin, daß BSC-40-Zellen sowohl TGF- β 1- als auch TGF- β 2-spezifische mRNAs enthalten. Um dies deutlicher zu demonstrieren, wurden Northern Blots mit einem Gemisch aus gleichen Teilen TGF- β 1- und TGF- β 2-Sonden hybridisiert, welche mit gleicher spezifischer Aktivität radio-markiert waren. Spur 1 in Fig. 3B zeigt, daß BSC-40-Zellen sowohl das TGF- β 1-spezifische 2.5 kb-mRNA-Fragment als auch die TGF- β 2-mRNA-Typen mit 4.1 und 6.5 kb enthalten; Spur 2 in Fig. 3B zeigt, daß tamoxifen-behandelte PC-3-Zellen außerdem die TGF- β 1-spezifische 2.5 kb-mRNA enthalten. Fig. 3B zeigt außerdem, daß tamoxifen-behandelte PC-3-Zellen mehr TGF- β 1-als TGF- β 2-spezifische mRNA enthalten.

Der Nachweis von TGF- β 2-spezifischen cDNA-Klonen ermöglichte ein Screening verschiedener Zelllinien auf TGF- β 2-mRNA. Der Northern Blot in Fig. 4 zeigt, daß TGF- β 2-spezifische Transkripte in HBL100 (einer normalen Epithelzelllinie aus menschlicher Milch, von Dr. Greg Schultz), in MCF-7 (einer menschlichen Mammarkarzinomzelllinie) in SK-MEL 28 (einer Melanomzelllinie) nachgewiesen werden können und KB-Zellen (eine Nasopharyngeal-Karzinomzelllinie) geringe Mengen von TGF- β 2-mRNA enthalten.

BEISPIEL 2: Klonierung der cDNA des TGF- β 2-Prekursors aus BSC-40-Zellen

Die folgenden Beispiele beschreiben die cDNA-Klonierung der TGF- β 2-kodierenden Sequenzen aus der MSC-40-Zelllinie der Niere Afrikanischer Grüner Meerkatzen, welche TGF- β 2-spezifische mRNAs enthalten (Abschnitt 6, oben). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß Simian-TGF- β 2 ähnlich wie Human-TGF- β 2 in Form eines von mindestens zwei längeren Prekursormolekülen synthetisiert wird, woraus das maturierte TGF- β 2-Molekül durch proteolytische Spaltung abgeleitet wird.

Die folgenden Verfahren wurden zur Klonierung der für den Simian-TGF- β 2-Prekursor kodierenden cDNAs verwendet.

Züchtung der Zellen und RNA-Extraktion

BSC-40-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium mit 10% fetalem Kälberserum gezüchtet. Polyadenylierte RNA wurde mit Hilfe von Oligo[dT]-Cellulosechromatographie wie beschrieben (Purchio und Fareed, 1979, J. Virol, 29:763-769) isoliert.

Konstruktion der cDNA-Genbank und Screening

Doppelstrangige cDNA wurde mit polyadenylierter RNA aus BSC-40-Zellen wie beschrieben hergestellt (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 371-372) und nach Behandlung mit EcoRI-Methylase mit Oligonukleotidlinkern ligiert, welche eine EcoRI-Restriktionsenzymkennungsstelle enthielten (EcoRI-Linker). Die cDNA wurde mit EcoRI verdaut und durch Chromatographie fraktioniert. cDNA-Fractionen größer als 750 Basenpaare wurden vereinigt und mit Lambda-gt10 ligiert, welcher zuvor mit EcoRI geschnitten wurde (Davis et al., 1980, A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), verpackt (Grosveld et al., 1981, Gene 13:227-237) und mit E.coli C₆₀₀ rK⁻mK⁺hfl plattiert. Die Genbank wurde durch Plaque-Hybridisierung (Benton et al., 1977, Science 196: 180-182) mit [³²P]-markierten pPC-21- und pPC-14-Sonden gescreent. Der mit pPC-21 hybridisierende Klon pBSC-40-16 und der mit pPC-14 hybridisierende Klon pBSC-40-1 wurde isoliert und in pEMBL subkloniert. Die TGF- β 2-kodierende Sequenz

aus pBSC-40-1 wurde durch Sequenzierung beider Stränge mit Hilfe der Dideoxykettenabbruchmethode bestimmt (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467). pBSC-40-16 wurde teilweise sequenziert.

5 ERGEBNISSE

Man erhielt zwei Klone aus der BSC-40 cDNA-Genbank, die jeweils mit Sonden hybridisierten, welche für die kodierenden Sequenzen für den Human-TGF- β 2-442- und TGF- β 2-414-Prekursor konstruiert wurden.

Klon pBSC-40-16, welcher mit der TGF- β 2-442-Sonde hybridisierte, wurde über einen Bereich von 150
10 Nukleotide (Nukleotide 300 bis 450 in Fig. 1a) sequenziert, von dem man vermutete, daß er die kodierende Sequenz des 29 Aminosäuren großen Segmentes aus den Positionen 346 bis 432 in Fig. 1a enthält. Die Ergebnisse zeigten, daß pBSC-40-16 in diesem Bereich für eine Aminosäuresequenz kodiert, die der korrespondierenden Sequenz im Human-TGF- β 2-442 cDNA-Klon, pPC-21, identisch ist und zeigt, daß pBSC-40-16 für einen 442 Aminosäure großen TGF- β 2-Prekursor kodiert.

15 Klon pBSC-40-1, welcher mit der TGF- β 2-414-Sonde hybridisiert, wurde im gesamten kodierenden Bereich sequenziert. Die Ergebnisse zeigten, daß dieser Klon für einen 414 Aminosäure großen TGF- β 2-Prekursor kodiert, welcher mit dem Human-TGF- β 2-442-Prekursor identisch ist, mit der Ausnahme, daß die Reste 116 bis 144 von Human-TGF- β 2-442 deletiert und durch einen einzelnen Asparaginrest ersetzt sind. Auf der Nukleotidebene unterscheidet sich pBSC-40-1 von Human-TGF- β 2-442 in der deletierten Region:
20 Die Nukleotide 346 bis 432 in Fig. 1a sind deletiert und durch das Asparagin-Codon AAT ersetzt. Mit Ausnahme von 13 stummen Basenaustauschen sind die beiden Strukturen im restlichen Bereich der kodierenden Sequenz absolut homolog.

BEISPIEL 3: Expression von TGF- β 2

25 Die folgenden Beispiele beschreiben die Expression von maturiertem, biologisch aktivem TGF- β 2 in Chinesischer Hamster-Ovarialzellen (CHO-Zellen), welche mit einem rekombinanten Plasmid transfiziert wurden, das unter der regulatorischen Kontrolle der SV40-Promotorsequenz die kodierende Sequenz für maturierten Human-TGF- β 2 enthält, die downstream und im richtigen Leserahmen mit der kodierenden
30 Sequenz für den Simian-TGF- β 1-Prekursor ligiert ist. Die Konstruktion steuert Synthese und Sekretion von maturiertem, biologisch aktivem TGF- β 2 bei einer Ausbeute von etwa 0,5 mg/l.

Zellkultur

35 Chinesischer-Hamster-Ovarialzellen (CHO-Zellen) mit fehlender Dihydrofolatreductase (Urlaub und Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4216) wurden in Ham's F-12 Medium (Gibco Laboratories, NY) mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) und 150 μ g/ml L-Prolin vermehrt. Außerdem waren 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin enthalten. Die CHO-Transfektanten wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium mit den oben beschriebenen Zugaben vermehrt. CHO-Zellen und deren Derivate wurden routine-
40 mäßig durch Trypsinisierung bei einem Teilungsverhältnis von 1:5 überführt.

Methotrexat (Sigma, MO) wurde mit einer Stammkonzentration von 10 mg/ml in Wasser hergestellt. Verdünnte NaOH (0,2 M) wurde zur Solubilisierung des Wirkstoffs hinzugegeben (pH-Endwert von 6). Die Stammlösung wurde filtersterilisiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Stammlösungen von Methotrexat im Medium (100 μ M) wurden bei 4°C nicht länger als 1 Monat aufbewahrt.

45

DNA-Manipulationen und Plasmidkonstruktionen

Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligase, Phosphatase aus Kälberdarm, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und andere DNA-Reagentien wurden von Bethesda Research Laboratories, MD. bezogen.
50 Standard-DNA-Manipulationen wurden nach T.Maniatis, et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, durchgeführt.

Das Plasmid pSV2-(β 1-TGF-dhfr), welches die Simian-TGF- β 1-cDNA und das Maus-dhfr-Gen in Tandemposition und ebenso die SV40-Zwischensequenz enthält, wurde wie beschrieben hergestellt (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418).

55 Das Plasmid pSV2/ β 1- β 2/dhfr wurde gemäß Absatz 8.2. hergestellt.

DNA-Transfektionen

Etwa 24 h nach Aufbringen von 10^6 dhfr-negativen CHO-Zellen auf 100 mm-Platten, wurden die Kulturen mit 20 μ g NdeI-linearisiertem pSV2-(β 1-TGF-dhfr)-Plasmid in Form eines Calciumphosphatpräzipitates (M. Wigler, et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:1373-1376, transfiziert. Hierzu wurden 20 μ g der linearisierten DNA zu 1 ml einer sterilen CaCl_2 -Lösung (250 mM) hinzugefügt. 1 ml einer 2X HEPES-Lösung (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Natriumphosphat, pH 7,1) wurde anschließend tropfenweise hinzugefügt und das Gemisch 30 min in Eis aufbewahrt. Das Präzipitat wurde anschließend tropfenweise in 10 ml eines die Zellen enthaltenden F12-Mediums dispergiert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium entfernt und durch 10 ml F12-Medium mit 25% Glycerin 90 s lang bei Raumtemperatur ersetzt. Die Zellen wurden einmal mit 20 ml F12-Medium gespült und weitere 48 h in nicht-selektivem F12-Medium (20 ml) inkubiert. Die Selektion der dhfr-exprimierenden Transfektanten erfolgte durch Substitution des Mediums mit einem DMEM-Supplement mit 10% dialysiertem FBS (Gibco, N.Y.) und 150 μ g/ml L-Prolin. Kolonien wurden nach 10- bis 14-tägiger Kultivierung der Zellen im Selektionsmedium erhalten. Zehn Kolonien wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgesaugt und vermehrt.

Selektion von Methotrexat-resistenten Zellen

Dihydrofolat-Reduktase (dhfr)-amplifizierte Zellen wurden aus den Primär-Transfektanten wie beschrieben hergestellt (C.S. Gasser und R.T. Schimke, 1986, J. Biol. Chem. 261: 6938-6946). Nach Vermehrung wurden 10^5 Zellen auf 100 mm-Platten überimpft und auf erhöhte Methotrexat-Konzentrationen eingestellt. Die Platte, die bei der höchsten Methotrexat-Konzentration sichtbare Kolonien ergab, wurde trypsinisiert und auf diese Methotrexat-Konzentration für zwei weitere 1:5-Zellübertragungen eingestellt. 10^5 Zellen wurden anschließend bei 5facher Methotrexat-Konzentration auf 100 mm-Platten aufgebracht. Platten, die sichtbare Kolonien enthielten, wurden erneut trypsinisiert und auf das Methotrexathaltige Medium eingestellt. Zellen wurden in verschiedenen Stadien der Amplifikation in einem Medium mit 40% FBS, 10% Dimethylsulfoxid und 50% DMEM eingefroren. Methotrexat war in den Gefriermedien nicht enthalten.

Wachstumsinhibitionstest

Mink-Lungenepithelzellen, Mv 1 Lu (Hinterlegungsnummer CCL-64, American Type Culture Collection) mit hoher Sensitivität für TGF- β 1 wurden im Wachstumsinhibitionstest verwendet. Zur Bestimmung der DNA-Synthese wurde die Thymidin-analoge Verbindung 5'-[125 I]-Jod-2'-deoxyuridin (125 IdU) verwendet. Eine Aktivitätseinheit wurde als diejenige Menge definiert, die zur 50%igen Inhibition des 125 IdU-Einbaus im Vergleich zu unbehandelten CCL-64-Zellen erforderlich ist.

Zum Nachweis der Sekretion von aktivem TGF- β 2 aus transfizierten Zellen wurde serumfreier Überstand konfluenter Zellkulturen innerhalb von 24 h abgetrennt und ausgiebig gegen 0,2 M Essigsäure dialysiert. Essigsäure wurde durch Lyophilisierung abgetrennt und die Proben in sterilem vollständigem Kulturmedium zur Verwendung im Test gelöst.

Konstruktion des TGF- β 1/TGF- β 2-Hybrid-Prekursor-Gens zur TGF- β 2-Expression

Ein Hybrid TGF-Beta-Prekursor-Gen, bestehend aus der Simian-TGF- β 1-kodierenden Prekursorsequenz und der 5'-untranslatierten Sequenz und der im richtigen Leserahmen daran gebundenen kodierenden Sequenz für maturierten Human-TGF- β 2 und der 3'-untranslatierten Sequenz wurde gemäß der Darstellung in Fig. 1c konstruiert.

pPC-21 wurde zuerst mit EcoRI verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, das 2.3 kb-Fragment mit HincII-verdaulichem pEMBL ligiert und zur Transformation von E.coli verwendet. Zwei Klone, pPC-21/HincII⁺ und pPC-21/HincII⁻ mit den Inserts in jeweils entgegengesetzter Orientierung wurden zur Erzeugung überlappender ExoIII-Fragmente durch jeweiligen Verdau mit SstI und BamHI, gefolgt von ExoIII-Verdau, Klenow-Behandlung, erneuter Ligierung der DNA und Transformation von E.coli verwendet. Zwei Klone, Exo 5.9 und Exo 25C wurden mit unterschiedlich langen 5'- bzw. 3'-Sequenzen gefunden und in pEMBL zur Erzeugung von pEMBL 5.9 und pEMBL 25C subkloniert.

pEMBL 5.9 wurde mit HindIII verdaut, zur Erzeugung stumpfer Enden mit dem Klenow-Enzym behandelt, mit KpnI verdaut und daraus das 0.6 kb-Fragment (Fragment 1) isoliert. Exo 25C wurde mit EcoRI und KpnI verdaut und daraus das 1.1 kb-Fragment (Fragment 2) isoliert. pGS62 wurde mit BamHI verdaut, mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt, mit EcoRI verdaut und mit den Fragmenten 1 und 2 ligiert (pGS62 wurde aus pGS20 (Mackett et al., 1984, J. Virol. 49:857) durch Deletion einer einzelnen EcoRI-

Schnittstelle erzeugt). Das Gemisch wurde zur Transformation von E.coli verwendet, woraus pGS62/CIFB isoliert wurde.

- pGS62/CIFB wurde mit PstI und EcoRI verdaut, daraus das 1600 bp-Fragment isoliert und nochmals mit XhoII verdaut. Das daraus resultierende 400 bp große Fragment XhoII-EcoRI wurde isoliert (Fragment 3).
 5 pSV2-beta-TGF (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418) wurde mit ApaI und EcoRI verdaut und daraus das 300 bp große Fragment isoliert (Fragment 4).

Zwei komplementäre DNA-Stränge mit den unten angegebenen Sequenzen wurden synthetisiert, phosphoryliert, annealiert und mit den oben beschriebenen Fragmenten 3 und 4 ligiert.

10 ' 5 CAA CAT CTG CAA AGC TCC CGG CAC CGC CGA GCT TTG
 GAT GCG GCC TAT TGC TTT AGA AAT GTG CAG GAT AAT
 TGC TGC CTA CGT CCA CTT TAC ATT GAT TTC AAG AGG 3'

15 5' GATC CCT CTT GAA ATC AAT GTA AAG TGG ACG TAG GCA
 GCA ATT ATC CTG CAC ATT TCT AAA GCA ATA GGC CGC
 ATC CAA AGC TCG GCG GTG CCG GGA GCT TTG CAG ATG
 TTG GGCC 3'

- 20 E.coli wurde mit dem Ligierungsgemisch transformiert und daraus p β 1/ β 2 isoliert.

Das Plasmid p β 1/ β 2 wurde mit EcoRI verdaut, mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt, mit HindIII geschnitten und daraus das 1600 bp-Fragment isoliert; pSV2, β 1/ β 2 wurde durch Insertion dieses Fragmentes in pSV2, neo, welches zur Entfernung des neo-Gens zuvor mit HindIII und HpaI verdaut wurde.

- 25 pSV2, β 1/ β 2 wurde mit PvuI und EcoRI verdaut, mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt, mit NdeI verdaut und daraus das 2.6 kb (circa) NdeI-EcoRI-Fragment isoliert und mit pSV2,dhfr ligiert, welches zuvor mit NdeI und PvuI verdaut wurde. E.coli wurde mit dem Ligierungsgemisch transformiert und daraus pSV2/ β 1- β 2/dhfr isoliert.

30 Expression von TGF- β 2 in CHO-Zellen

pSV2/ β 1- β 2/dhfr wurde zur Transfektion von dhfr-negativen CHO-Zellen verwendet und dhfr-amplifizierte Zellen wurden aus den primären Transfektanten, wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellt.

- Positive Klone wurden mit Hilfe des Bioassays (Inhibition der Mink-Lungenepithelzellen (CCL-64)) wie
 35 beschrieben nachgewiesen (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418). Rekombinante Proteine wurden mit Hilfe von Western Blotting unter Verwendung eines Antipeptid-Antiserums gegen die Sequenz NH₂-YNTINPEA β ASPC-COOH (Gentry et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:3418), die in maturiertem TGF- β 2 zu finden ist, nachgewiesen.

- Eine Zelllinie 1 β 9, 12.5, ergab eine Sekretion von 240 ng/ml TGF- β 2 (Fig. 5). Diese Zelllinie wurde
 40 anschließend durch Verdünnung in Mikrotiterplatten (96 wells) kloniert. Der Klon 1 β 9, 12.5, cl 36, produzierte annähernd 500 ng/ml des Faktors (Fig. 5).

- Eine Analyse des von diesem Klon sezernierten Proteins mit Hilfe von Western Blotting unter Verwendung des Antipeptid-Antiserums ist in Fig. 6 gezeigt. Daraus ist zu entnehmen, daß sowohl das
 45 maturierte 24kd TGF- β 2-Dimer als auch die größere (annähernd 90kd) Prekursorform nachgewiesen werden konnte.

HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN

- Die folgenden Mikroorganismen wurden bei der Agricultural Research Culture Collection, Northern
 50 Regional Research Center (NRRL) hinterlegt und mit folgenden Hinterlegungsnummern bezeichnet:

Mikroorganismen	Plasmid	HinterlegungsNummer
Escherichia coli HB101	pPC-21	B-18256
Escherichia coli HB101	pPC-14	B-18333
Escherichia coli HB101	pBSC-40-1	B-18335
Escherichia coli HB101	pBSC-40-16	B-18334
Chinese Hamster Ovary	pSV/ β 1- β 2/dhfr	

Patentansprüche

1. Nukleotidsequenz, die für einen Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor kodiert, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie im wesentlichen die kodierende Nukleotidsequenz vom Nukleotidrest Nummer -70 bis zum Nukleotidrest Nummer 1755 gemäß Fig. 1b umfaßt.
2. Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er im wesentlichen eine Aminosäuresequenz vom Aminosäurerest Nummer 1 bis zum Aminosäurerest Nummer 390 gemäß Fig. 1b umfaßt.
3. Transforming Growth Faktor- β 1/Transforming Growth Faktor- β 2-Hybrid-Prekursor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er im wesentlichen eine Aminosäuresequenz vom Aminosäurerest Nummer 30 bis zum Aminosäurerest Nummer 390 gemäß Fig. 1b umfaßt.

Hiezu 9 Blatt Zeichnungen

Ausgegeben
Blatt 1

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

FIG 1a

-397
GAGTTCAGATCCGCCACCTCCGCACCCGAGATTGACACACTGAATCCCACTTCCTCCTTAATAATTTATTTCTACTTAATAGCACTCGTCTCTTTTTT -398
CCCCATCTCATTTCTCCAAGAATTTTTTCTCTTACTCGCCAAAGTCAGGGTTCCTCTGCCCCTCCCGATTAAATATTTCCACTTTTGGAAGTACTG -399
GCTTTTCTTTTTAAAGGAATTCAGCAGGATACGTCTTTCTGTTGGCATTGACTAGATGTTTTCGAAAAGTTCCCATCAAAAACAACAACAAAA -100
AAACCAAACAACTCTCTCTGATCTATATCTTGAGAATTCGTGATTCTCTTTTTTATTTCTGACTTTTAAAAACAACTTTTTTTTCCACTTTTTTAAAAA -1

MET His Tyr Cys Val Leu Ser Ala Phe Leu Ile Leu Met Leu Val Thr Val Ala Leu Ser Thr Cys Ser
ATG CAC TAC TGT GTG CTG AGC GCT TTT T ATC CTC CAT CTG GTC ACC GTC GCC CTC ACC CTG TCT ACC TGC AGC 75

Thr Leu Asp Met Asp Glu Phe Met Arg Lys Arg Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu
ACA CTC GAT ATG CAC CAG TTC ATG CGC AAG AGG ATC GAG GCG ATC CEC GCG CAG ATC CTG AGC AAC CTG AAG CTC 150

Thr Ser Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Val Pro Pro Glu Val Ile Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Arg
ACC AGT CCC CCA GAA GAC TAT CCT GAG CCC GAG GAA GTC CCC CCG GAG GTC ATT TCC ATC TAC AAC ACC ACC AGG 225

Asp Leu Leu Gln Glu Lys Ala Ser Arg Cys Arg Ala Ala Ala Cys Glu Arg Glu Arg Ser Asp Glu Glu Tyr Tyr Ala
GAC TTG CTC CAG GAG AAG GCG AGC CGA AGC GCG GCG GCG GCG GCG GAG CCG GAG GAG ACC GAG GAA GAG TAC TAC ACC 300

Lys Glu Val Tyr Lys Ile Asp Met Pro Phe Phe Phe Pro Ser Glu Thr Val Cys 120
AAG GAG GTT TAC AAA ATA GAC ATG CCG CCC TTT TTC CCC TCC GAA ACT GTC TGC CCA GTT VLT ACA ACA CCC TCT 375

Gly Ser Val Gly Ser Leu Cys Ser Arg Gln Ser Gln Val Leu Cys Tyr Leu Asp 145
GCC TCA GTG GGC ACC TTG TGC TCC ARG CAC TCC CAG CTG CTC TGT GGG Tyr TAC CTT GAT GCC ATC CCC CCC ACT TTC 450

Tyr Arg Pro Tyr Phe Arg Ile Val Arg Phe Asp Val Ser Ala Met Glu Lys Asn Ala Ser Asn Leu Val Lys Ala
TAC AGA CCC TAC TTC AGA ATT GTT CCA C GAC GTC TCA GCA ATC GAG AAG AAT GCT TCC AAT TTG GTG AAG GCA 525

Glu Phe Arg Val Phe Arg Leu Gln Asn Pro Lys Ala Arg Val Pro Glu Gln Arg Ile Glu Leu Tyr Gln Ile Leu
CAG TTC AGA GTC TTT CCT TTG CAG-AAA TCCA AAA GCG AGA GTC CCT GAA CAA CCG ATT GAG CTA TAT CAG ATT CTC 600

Lys Ser Lys Asp Leu Thr Ser Pro Thr Gln Asy Tyr Ile Asp Ser Lys Val Val Lys Thr Arg Ala Glu Gly Glu
AAG TCC AAA GAT TTA ACA TCT CCA ACC CAG GCG TAC ATC CAC AGC AAA GTT GTG AAA ACA AGA GCA GAA GCG GAA 675

Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Ala Val His Glu Trp Leu His His Lys Asp Arg Asn Leu Gly Phe Lys Ile
TGG CTC TCC TTC GAT GTA ACT GAT GCT GTT CAT GAA TGG CTT CAC CAT AAA GAC AGG AAC CTG GGA TTT AAA ATA 750

Ser Leu His Cys Pro Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro Asn Lys Ser Glu Glu Leu Glu
AGC TTA CAC TGT CCC TCC TGC ACT TTT GTA CCA TCT AAT AAT TAC ATC ATC CCA AAT AAA AGT GAA GAA CTA GAA 825

Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys
GCA AGA TTT GCA GGT ATT GAT GCG ACC TCC ACA TAT ACC AGT GGT GAT CAG AAA ACT ATA AAG TCC ACT AGG AAA 900

Lys Asn Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser Thr Tac Arg Leu Glu Ser Gln Gln Thr Asn
AAA AAC AGT GCG AAG ACC CCA CAT CTC CTG CTA ATG TTT TTT CCC TCC TAC AGA CTT GAG TCA CAA CAG ACC AAC 975

Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu
CGG CCG AAG AAG COT GCT TTG GAT GCG GCC GAT TAT TGT TTT AGA AAT GTG CAG GAT AAT TGC TGC CTA GGT CCA GTT 1050

Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala
TAC ATT GAT TTC AAG AGC GAT CBA GCG TGG AAA TGG ATA CAC GAA CCC AAA GCG TAC AAT GCC AAC TTC TGT GCT 1125

Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro
CGA GCA TCC CCG TAT TTA TGC ACT TCA CAC ACT CAG CAC AGC AGC GTC CTC AGC TTA TAT AAT ACC ATA AAT CCA 1200

Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr
GAA GCA TCT GCT TCT CCT TCC TGC GTG TCC CAA CAT TTA GAA CCT CTA ACC ATT CTC TAC TAC ATT GCG AAA ACA 1275

Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser ***
CCC AAG ATT GAA CAG CTT TCT AAT ATG ATT GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TAA AATCTTGGAAAAGTGGCAACCCAAA 1356

ATGCAATGATCATATAATCATGATGACGACGACAAACGATGATCTTGAACAGAAAACATAGACAGCCCTTGGTTCATCAGCTTAAAAATTTTT 1456

CAAAAGCGGTACTAGTTCAGACACTTTGGCAATTTGTGTTCTGTTTGTAAAACTGGCATTCGACACAAAAAGTTGAAGCCCTTTATTCAGATTTC 1556

ACCTACTTTGTAAGTCGACAGCAGCAAGAAATTTTTTAAAGAAAAATAAACATGCAAGCAATTTTACTGTTAAATATGTGAACAAAGCA 1656

ACAAACAACCAACAACAACAACCAATCCCATTAAGTTAAAGTTGCTGTACGTACCGTTCCTATCCCGCGCTCACTTGATTTTCTGTAATGCTATG 1756

CAATAGGCTTCTCCCATCTTCTACTCTTAGAGTTAAACAGTGAAGTATTTATTTGTGTTTACTATATAATGAACGTTTCATTCGCCCTTGGAAAAATAAA 1856

CAGGTGTATAAAGTGGAGCAAAATACTTTGCCAGAAACTCATGATGCGCTTAAGGAACCTGAACCTCAACAGGCGCAAAAAAAGAGGTATATTAAT 1956

GGGATGAAAACCAAGTGAATTTATATATGACCGAGAAAGTCTGCATTAGATAAAGACCCGAAACACATUTTTATGTATCAGCTGCGCTAAGGAAGCT 2056

TCTGTGAAGGTCAAAAACATAAAAGACTGTTAATAAAGAAACTTCACTCAG (poly A) 2111

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

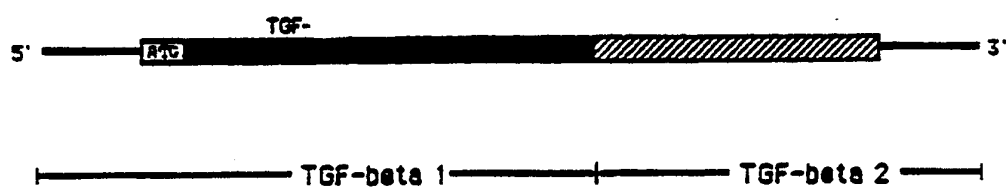
Patentschrift Nr. AT 398 433 B

Ausgegeben
Blatt 3

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

FIG. 1c



Ausgegeben
Blatt 4

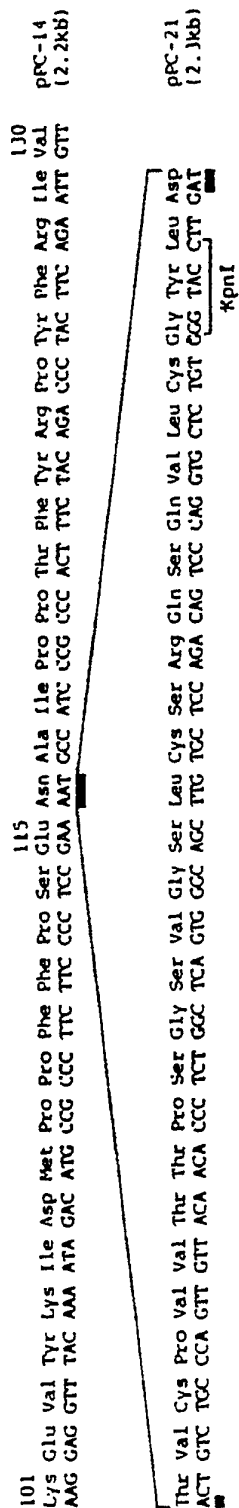
27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

FIG. 1d



FIG. 1e



Ausgegeben
Blatt 5

27.12.1994

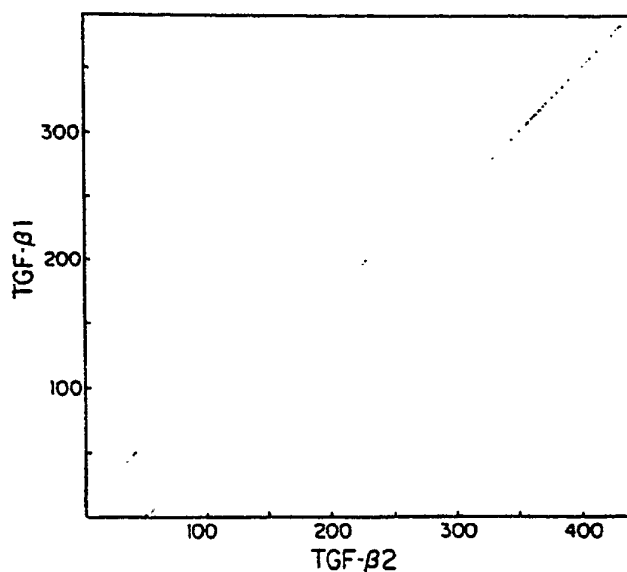
Int. Cl.⁵: C12N 15/18

FIG. 2

A

Beta 1	1	M	P	P	S	G	L	R	L	L	F	L	L	P	L	L	V	L	T	P	G	P	N	A	C	L	S	T	C	R	T	I	D	H	E	L	V	K	R	K	R	I					
Beta 2	1	M	N	Y	C	V	L	S	A	-	F	L	I	L	M	L	V	T	-	-	-	-	-	-	V	A	L	S	L	S	T	C	S	T	L	D	H	D	O	F	H	R	K	R	I		
Beta 1	47	E	A	I	R	G	Q	I	L	S	K	L	R	L	A	S	P	P	S	Q	G	E	V	P	P	G	F	L	P	E	A	V	L	A	L	Y	N	S	T	R	D	R	V	A	G	E	S
Beta 2	38	E	A	I	R	G	Q	I	L	S	K	L	R	L	T	S	P	P	-	E	D	Y	P	E	P	E	E	V	P	P	E	V	I	S	I	Y	N	S	T	R	D	L	L	O	E	K	A
Beta 1	93	-	-	-	A	E	P	E	P	E	-	P	E	A	D	Y	Y	A	K	E	V	T	R	V	L	H	V	E	T	H	N	E	I	Y	D	K	F	Q	S	T	H	S	-	-			
Beta 2	83	S	R	R	A	A	C	E	R	E	-	R	S	D	E	E	Y	Y	A	K	E	V	Y	K	I	D	H	P	P	F	F	P	S	E	T	V	C	P	V	V	T	T	P	S	G	S	V
Beta 1	131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Beta 2	129	G	S	L	C	S	R	Q	S	Q	V	L	C	G	Y	L	D	A	I	P	P	T	F	Y	R	P	V	F	R	I	V	R	F	D	V	S	A	H	E	K	N	A	S	N	L	V	K
Beta 1	153	A	E	L	R	L	R	L	-	-	X	L	K	V	-	E	G	H	V	E	L	Y	Q	-	-	-	-	-	-	K	Y	S	N	S	W	R	Y	L	S	N	R	L	L	A	P		
Beta 2	175	A	E	L	R	L	R	L	-	-	X	L	K	V	-	E	G	H	V	E	L	Y	Q	-	-	-	-	-	-	K	Y	S	N	S	W	R	Y	L	S	N	R	L	L	A	P		
Beta 1	191	S	D	S	P	E	W	L	S	F	D	V	T	G	V	V	R	Q	W	L	S	R	G	E	I	E	G	F	R	L	S	A	N	C	S	C	D	S	-	-	-	-	-	-	-		
Beta 2	221	R	A	E	G	E	W	L	S	F	D	V	T	D	A	V	N	Z	W	L	N	H	K	D	R	N	L	G	F	R	I	S	L	N	C	P	C	T	F	V	P	S	N	H	Y	I	
Beta 1	229	-	-	-	R	D	N	T	L	Q	V	D	I	N	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta 2	267	I	P	N	K	S	E	E	L	E	A	R	F	A	G	I	D	G	T	S	T	T	T	S	G	O	Q	K	T	I	K	S	T	R	K	K	M	S	G	K	T	P	N	L	L	L	M
Beta 1	263	A	T	P	L	E	R	A	Q	Q	H	L	Q	S	S	R	N	R	R	A	L	D	T	N	Y	C	F	S	S	T	E	K	N	C	C	V	R	Q	L	Y	I	D	F	K	R	D	L
Beta 2	313	L	L	P	S	Y	R	L	E	S	Q	T	N	R	R	K	R	A	L	D	A	A	Y	C	F	R	N	V	Q	D	N	C	C	L	R	F	L	Y	I	D	F	K	R	D	L		
Beta 1	309	G	N	K	H	I	H	E	P	K	G	T	H	A	N	F	C	L	G	P	C	P	Y	I	N	S	L	D	T	Q	Y	S	K	V	L	A	L	Y	N	Q	H	N	F	G	A	S	A
Beta 2	359	G	N	K	H	I	H	E	P	K	G	T	H	A	N	F	C	L	G	P	C	P	Y	I	N	S	L	D	T	Q	Y	S	K	V	L	A	L	Y	N	Q	H	N	F	G	A	S	A
Beta 1	355	A	P	C	C	V	P	Q	A	L	E	P	L	P	E	V	Y	V	I	G	R	K	T	P	K	I	E	Q	L	S	N	H	I	V	R	S	C	R	K	S	-	-	-	-	-	-	
Beta 2	405	S	P	C	C	V	S	Q	D	L	E	P	L	T	I	L	Y	I	G	K	T	P	K	I	E	Q	L	S	N	H	I	V	R	S	C	R	K	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

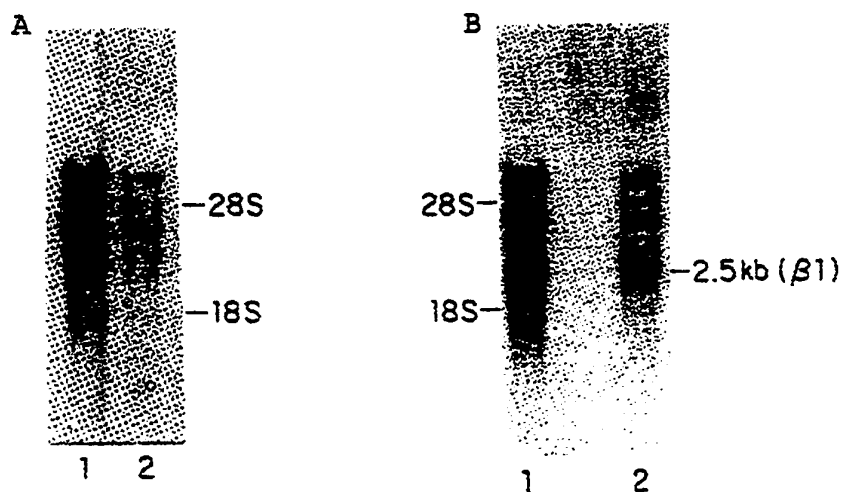
Patentschrift Nr. AT 398 433 B

Ausgegeben
Blatt 6

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

FIG. 3



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

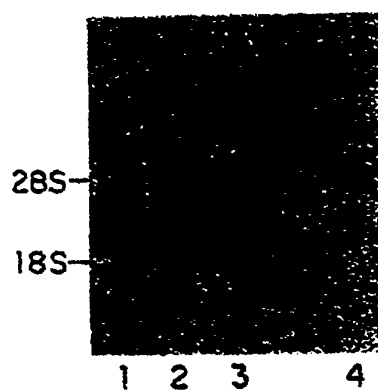
Patentschrift Nr. AT 398 433 B

Ausgegeben
Blatt 7

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

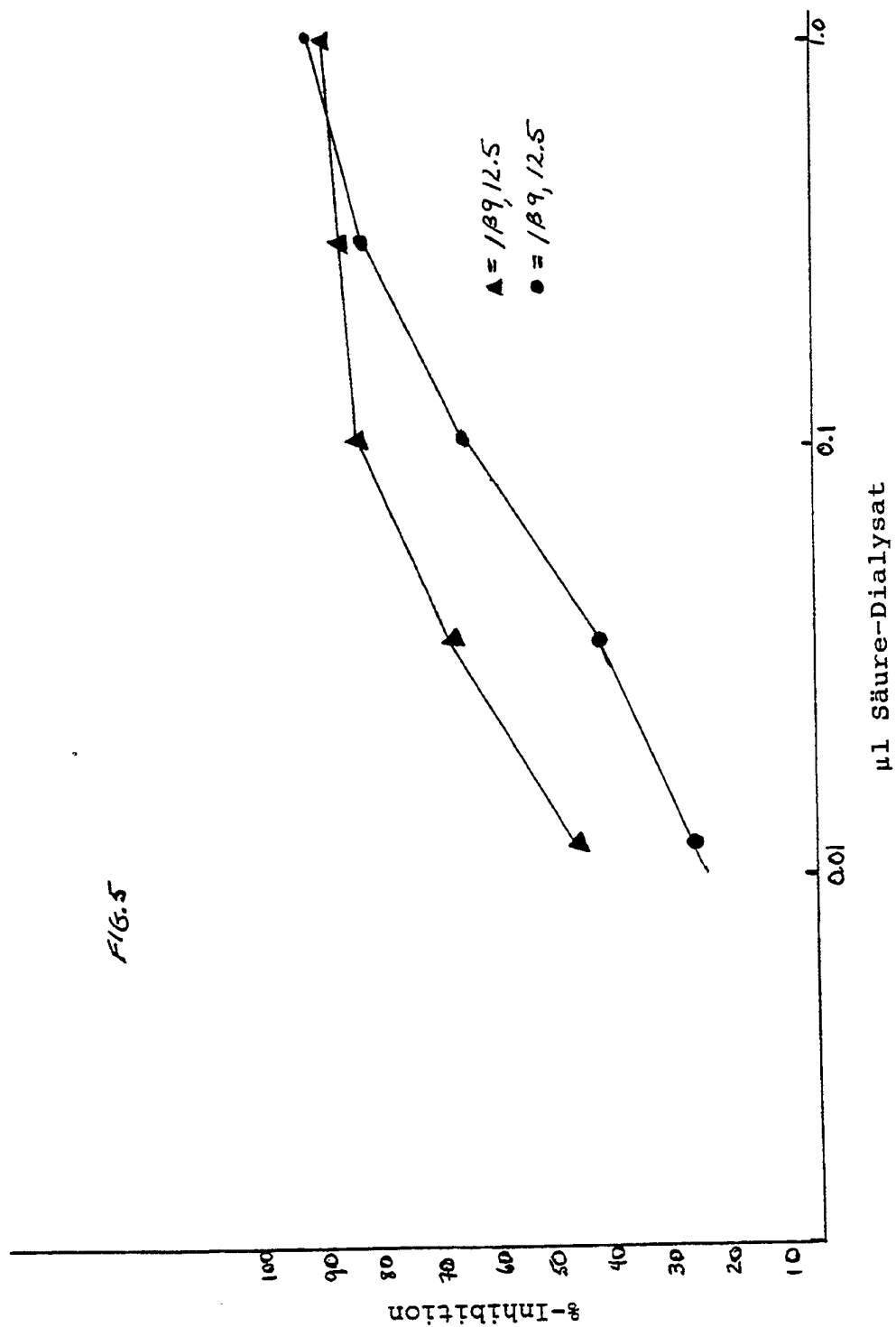
FIG. 4



Ausgegeben
Blatt 8

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 398 433 B

Ausgegeben
Blatt 9

27.12.1994

Int. Cl.⁵: C12N 15/18

68

42

25

18

15



1 2

1) AUTHENTISCHER B2

2) ÜBERSTAND
von 1B9,12.5
KLON 36(rB2)

FIG. 6