



F1000098217B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 12 05 1997

98217

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 07K 1/16 // C 07K 14/525

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	943750
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.08.94
(24) Alkupäivä - Löpdag	03.07.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	15.08.94
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
05.07.84 US 627959 P	05.07.84 US 628059 P
05.07.84 US 628060 P	03.12.84 US 677156 P
03.12.84 US 677257 P	03.12.84 US 677454 P

(71) Hakija - Sökande

1. Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Aggarwal, Bharat Bhushan, 324 Del Rosa Way, San Mateo, CA 94403, USA, (US)
2. Goeddel, David Vannorman, 2115 Forestview, Hillsborough, CA 94010, USA, (US)
3. Lee, Sang He, 1035 San Carlos Avenue, El Granada, CA 94010, USA, (US)
4. Nedwin, Glenn Evan, 429 S. Hoop Pole Road, Guilford, CT 06437, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä nekroositekijän valmistamiseksi
Förfarande för framställning av nekrosfaktor

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan: 852626 (patentti - patent 95472)

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 842560 (C 12P 21/00), FI C 86992 (C 12N 15/28), US A 4457916 (A 61K 35/16),
The Journal of Immunology, vol. 125, 1980, pp 1671-1677

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää ihmisen tuumorinekroositekijän valmistamiseksi adsorboimalla ensin huokoslasille, sitten anioninvaihtohartsille ja lopuksi alkyylisefa-roosille.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av human tumornekrosfaktor genom att först adsorbera på poröst glas, sedan på ett anjonbytarharts och sist på alkylsefaro.

Menetelmä nekroositekijän valmistamiseksi

Jakamalla erotettu patenttihakemuksesta FI 852626.

5 Tämä hakemus koskee menetelmää ihmisen oleellisesti homogeenisen tuumorinekroositekijän valmistamiseksi, jolla on vaatimuksessa 1 esitetty aminohapposekvenssi.

Immuunisolut, kuten B-solut, T-solut, luonnolliset tappajasolut ja makrofagit, muodostavat tunnetusti aineita, joilla on sytotoksinen vaikutus kasvainsoluihin, mutta ovat vaarattomia normaaleille soluille. Näille aineille on annettu erilaisia nimiä, esimerkiksi lymfotoksiini, tuumorinekroositekijä, NK-solujen sytotoksinen tekijä, hemorraginen nekroositekijä, makrofagisytotoksiini ja makrofagin sytotoksinen tekijä. Tällä hetkellä ovat näihin nimiin liittyvien proteiinien identiteetit epäselviä. Päävaikeutena on ollut se, että biologiset kokeet, joita käytetään proteiinien detektointiin, eivät tee eroa niiden välillä, se, että proteiinit näyttävät luonnossa esiintyvän aggregaatteina tai hydrolyysituotteina ja se, että tähän asti saadut määrät ovat olleet niin pieniä, ettei ole saavutettu korkeaa puhdistumisastetta, jota vaaditaan proteiinien täydelliseen karakterisointiin.

Tällaisia sytotoksisia aineita löytyy tyypillisesti intaktien eläinten seerumeista tai imusolu- tai imusolulinjaviljelmien supernatanteista sen jälkeen, kun eläimet tai solut on käsitelty aineella, jonka tiedetään stimuloituvan immuunisolujen lisääntymistä ("indusoija"). Tämän jälkeen seerumi tai supernatantti otetaan talteen ja siitä tutkitaan sytotoksinen aktiivisuus kohdekasvainsolulinjaa vastaan. Tavanomainen kohde on L929, hiiren kasvainsolulinja. Tämä ja muut tämän tyyppisissä biologisissa kokeissa käytettävät solulinjat ovat epäspesifisiä lyttiseltä vasteeltaan, koska erilaiset, näennäisesti erilliset imusolutuotteet pystyvät saamaan aikaan lyysin. Samanlaisia epäspesifisiä vasteita havaitaan tuumorinekroosikokeissa in vitro. Siten sytolyyssikokeet, joissa tehdään havainto- ja solulinjojen lysoitumisesta in vitro

tai kasvainsolukon kuolemista in vivo, ovat kykenemättömiä erottamaan toisistaan erilaisia sytotoksisia imukudostuotteita.

5 Sytotoksiset tekijät on kokeiluluontoisesti luokiteltu imusolujen, joista ne indusoituvat, perusteella. Esimerkiksi lymfotoksiini on nimitys, jota yleensä käytetään B- tai T-lymfosyyttien tai niistä peräisin olevien solulinjojen sytotoksista erityistuotteista, kun taas nimitystä tuumorinekroositekijä käytetään usein kuvaamaan
10 makrofagien tai niistä peräisin olevien solulinjojen sytotoksista tuotteita. Tämä luokitusjärjestelmä ei kuitenkaan ole kehittynyt pisteeseen, jossa olisi mitään takeita siitä, että viitataan vain yhteen proteiiniin tai että proteiinit, joista käytetään eri nimiä, todella ovat erilaisia.
15

On tehty yrityksiä kunkin solutyypin erittämien sytotoksisten tekijöiden puhdistamiseksi ja karakterisoinniseksi. Siitä, missä määrin raportit vaihtelevat jonkin sytotoksisen tekijän jonkin tietyn ominaisuuden suhteen
20 tai ovat täysin ristiriitaisia, voitaisiin päätellä, että karakterisointi on ollut virheellinen tai että kukin solutyyppi erittää useita erillisiä sytotoksista tekijöitä. Esimerkiksi makrofageista, monosyyteistä tai monosyyttisolulinjoista peräisin olevilla sytotoksilla tuotteilla, vaikka niistä joskus käytetään yleisnimitystä tuumorinekroositekijä, on raportoitu olevan ominaisuuksia, jotka näyttävät ristiriitaisilta yhden sytotoksisen tuotteen teorian yhteydessä. Viittaa esimerkiksi seuraaviin julkaisuihin: R. MacFarlan et al., AJEBAK 58(pt 5) (1980)
25 489-500; D. Mannel et al., Infection and Immunology 30(2) (1980) 523-530; H. Ohnishi et al., GB-patenttijulkaisu 2 106 117A; ja J. Hammerström, Scand. J. Immunol. 15 (1982) 311-318.
30

Toisaalta C. Zacharuk et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 6341-6345] ehdottavat, että marsun
35 lymfotoksiini ja marsun makrofagien sytotoksinen tekijä olisivat immuunikemiallisesti samanlaisia elleivät

identtisiä. Samanlaisia päätelmiä esittävät Ruff et al.,
/Lymfokines 2 (1981) 235-272, sivuilla 241-242/.

Yritykset karakterisoida immuunisytotoksisia teki-
jöitä ovat myös keskittyneet eläinten, jotka on altistettu
5 immunogeenisille antigeeneille, seerumien tai vatsaonte-
lonesteiden käyttämiseen lähtöaineena. Nämä lähteet sisäl-
tävät rasitetun immuunijärjestelmän koko tuotannon kaikes-
sa runsaudessaan vastakohtana yhden solutyypin tai -linjan
tuotteelle tai tuotteille. Viittaan seuraaviin tämäntyyppi-
10 siin julkaisuihin: S. Green et al., J. Natl. Cancer Inst.
68(6) (1982) 997-1003 ("tumor necrosis-inducing factor");
M. Ruff et al., J. Immunology 125(4) (1980) 1671-1677
("tumor necrosis factor"); H. Enomoto et al., EP-hakemus
86475 ("antitumor substance"); H. Oettgen et al., "Recent
15 Results Cancer Res. 75 (1980) 207-212 ("tumor necrosis
factor"); F. Kull et al., J. Immunol. 126(4) (1981) 1279-
1283 ("Tumor Cell Cytotoxin"); D. Mannel et al., Infection
and Immunity 28(1) (1980) 204-211 ("cytotoxic factor");
N. Matthews et al., Br. J. Cancer 42 (1980) 416-422
20 ("tumor necrosis factor"); S. Green et al., Proc. Nat.
Acad. Sci. USA 73(2) (1976) 381-385 ("serum factor");
N. Satomi et al., Jpn J. Exp. Med. 51(6) 1981 317-322;
N. Matthews, Br. J. Cancer 40 (1979) 534-539 ("tumor
necrosis factor"); K. Haranaka et al., Jpn. J. Exp. Med.
25 51(3) (1981) 191-194 ("tumor necrosis factor"); ja L. Old
et al., EP-hakemus 90892: T. Umeda et al., Cellular and
Molecular Biology 29(5) (1983) 349-352; ja H. Enomoto et
al., EP-hakemus 86475.

Muuta kirjallisuutta, johon tulisi tutustua, ovat
30 seuraavat julkaisut: J. Nisse-Meyer et al., Infection and
Immunity 38(1) (1982) 67-73; J. Klostergaard et al., Mol.
Immunol. 18(12) (1981) 1049-1054; N. Sloane, US-patentti-
julkaisu 4 359 415; H. Hayashi et al., US-patenttijulkai-
su 4 447 355; K. Hanamaka et al., EP-hakemus 90 892
35 (1983); ja G. Grabger et al., Cellular Immunology 38
(1978) 388-402.

EP-hakemusjulkaisussa 100 641 kuvataan sytotoksis-
ta polypeptidiä, joka puhdistettiin suurin piirtein va-
paaksi epäpuhtauksista ja joka saatiin ihmisen lymfoblas-
toidisolu -viljelmästä. Tämä polypeptidi nimettiin lymfo-
toksiiniksi, vaikkasensukulaisuus muihin lymfotoksiiniksi
5 kutsuttuihin, kirjallisuudessa kuvattuihin polypeptidei-
hin on arveluttava. Ei tiedetty, oliko tämä ainoa immuu-
nisolujen tuottama sytotoksinen polypeptidi, kuten Zac-
harchuk et al. (imid.) ehdottavat vai onko se mahdolli-
10 sesti jäsen sytotoksisten tekijöiden ryhmässä.

Edellä mainitun hakemuksen mukaisessa polypepti-
dissä on kaksi aminopäätä, suurempi muunnos päättyy jak-
soon Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr
Ala Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr ... ,
15 ja pienempi muunnos typistettyyn aminopäähän His Ser Thr
Leu Lys Pro Ala Ala ...

iemman kirjallisuuden mukaan interferonit, joilla
on jonkin verran kasvaimia estävää aktiivisuutta ja hei-
kosti karakterisoitu proteiini, jolla on AlaAla-aminopää
20 (GB-hakemusjulkaisu 2 117 385A) olivat ehdokkaita syto-
toksiksi tekijöiksi, jotka eivät ole lymfotoksiineja.
Kuten tullaan havaitsemaan, tämän keksinnön mukaisesti
valmistettu tuumorinekroositekijä ei ole interferoni eikä
lymfotoksiini eikä siinä ole AlaAla-päätä. Tämän tutki-
25 muksen päämääränä on (a) määrittää lopullisesti, onko
olemassa muuta tuumorinekroositekijää kuin lymfotoksiini
vai ei ja jos sellainen on olemassa, identifioida se sil-
lä tavalla, että se selvästi erottuu muista tällaisista
tekijöistä; (b) tuottaa tällaista tekijää muilla mene-
30 telmillä kuin soluviljelmän indusointi, joka on kallis ja
tuottaa tuotetta, joka sisältää epäpuhtautena indu-
sointiainetta tai induktoimalla ääreisverilymfosyyttejä,
joka on taloudellisesti epäkäytännöllistä, heikosti
toistettavissa ja tuottaa homologisilla soluja plasma-
35 proteiineilla kontaminoituneen tuotteen; (c) saada ai-
kaantällaista tuumorinekroositekijää koodaava DNA ja il-
mentää tämä DNA yhdistelmäviljelmässä; (e) muuntaa

tällaisen tekijän koodausjaksoa tai rakennetta; (f) formuloida tällainen tekijä terapeuttisiin annostelumuotoihin ja antaa sitä eläimille kasvainten hoitamiseksi, ja (g) tuottaa tällaiseen tekijään liittyviä diagnostisia reagensseja.

5 Sytotoksinen tekijä on puhdistettu homogeeniseksi, karakterisoitu ja sitä on ilmennetty yhdistelmäviljelmässä. Tätä tekijää kutsutaan mukavuuden vuoksi tuumorinekroositekijäksi (TNF), ja se määritellään jäljempänä. Se
10 saadaan soluviljelmästä suurin piirtein homogeenisessa muodossa, jonka ominaisaktiivisuus on suurempi kuin noin 10 miljoonaa yksikköä/mg proteiinia ja yleisesti noin 100 miljoonaa yksikköä/mg.

Yhdistelmäviljelmässä syntetisoidulle ihmisen tuumorinekroositekijälle on luonteenomaista sellaisten solukomponenttien, proteiinit mukaan luettuina, läsnäolo, jotka eivät ole ihmissoluista peräisin ja jotka esiintyvät sellaisina määrinä ja ovat luonteeltaan sellaisia, että ne ovat fysiologisesti soveltuvia annettaviksi potilaille yhdessä tuumorinekroositekijän kanssa. Nämä komponentit ovat yleensä peräisin hiivasta, prokaryootista tai muusta korkeammasta eukaryootista kuin ihmisestä ja niitä esiintyy vaarattomina kontaminoivina määrinä, jotka ovat suuruusluokaltaan alle noin 1 paino-%. Yhdistelmäsoluviljelelmä tekee lisäksi mahdolliseksi tuumorinekroositekijän tuottamisen täydellisesti vapaana homologisista proteiineista. Homologiset proteiinit ovat proteiineja, joita normaalisti liittyy tuumorinekroositekijään sen esiintyessä luonnossa, ts. soluissa, solueritteissä ja
25 elimistön nesteissä. Eräs ihmisen tuumorinekroositekijälle homologinen proteiini on esimerkiksi ihmisen seerumi-albumiini. Heterologisten proteiinien kohdalla tilanne on päinvastainen, ts. ne eivät luonnossa liity kyseessä olevaan tuumorinekroositekijään eivätkä esiinny yhdessä sen
30 kanssa.

35 Tarjotaan käytettäväksi DNA, joka koodaa tuumorinekroositekijää ja joka ilmennettynä yhdistelmä-

eli transformanttiviljelmässä tuottaa runsaita määriä tuumorinekroositekijää. Tämä DNA on uusi, koska cDNA, joka saadaan indusoidusta monosyyttisolulinjasta saadusta mRNA:sta käänteiskopioinnilla, ei sisällä introneja ja on
5 vapaa mahdollisista reuna-alueista, jotka koodaavat organismien, joista mRNA on peräisin, muita proteiineja.

Kromosomaalinen DNA, joka koodaa TNF:ää, saadaan tutkimalla genomi-DNA-kirjastoja käyttäen cDNA:ta koettimena. Kromosomaalinen DNA on vapaa muita proteiineja koodaavista reuna-alueista, mutta voi sisältää introneja.
10

Eristettyä tuumorinekroositekijä-DNA:ta on helppo muuntaa nukleotidisubstituutiolla, -deleetoilla tai -insertioilla, jolloin saadaan uusia DNA-jaksoja, jotka koodaavat tuumorinekroositekijää tai sen johdoksia. Näitä
15 muunnettuja jaksoja käytetään mutanttituumorinekroositekijän tuottamiseen ja valmiin tuumorinekroositekijän suoraan ilmentämiseen. Muunnetut jaksot ovat käyttökelpoisia myös tuumorinekroositekijän ilmentymistehon parantamiseen valituissa isäntä-vektorisysteemeissä, esimerkiksi muuntamalla jaksot isäntäsolun kodonipreferenssin mukaisiksi.
20

Nämä uudet DNA-jaksot tai niiden fragmentit leimataan ja niitä käytetään hybridisaatiokokeissa, joissa tutkitaan tuumorinekroositekijää koodaavaa geneettistä materiaalia.

25 Menetelmissä tuumorinekroositekijän syntetisoimiseksi DNA, joka koodaa tuumorinekroositekijää, ligatoidaan replikoituvaan (lisääntyvään) vektoriin, vektorilla transformoidaan isäntäsolut, isäntäsoluja viljellään ja tuumorinekroositekijä otetaan talteen viljelmästä. Tätä yleismenetelmää käytetään valmistettaessa tuumorinekroositekijä,
30 jolla on monosyytin tuumorinekroositekijän ominaisuudet tai uusia tuumorinekroositekijän johdoksia, vektorin rakenteesta ja transformoitavaksi valitusta isäntäsolusta. Tuumorinekroositekijäspesieksiin, joita voidaan tällä tavalla syntetisoida, kuuluvat valmis (valyyliaminoterminaalinen) tuumorinekroositekijä, pretuumorinekroositekijä
35

("preTNF", määritelty tässä hakemuksessa) ja TNF-johdokset mukaan luettuina (a) fuusioproteiinit, joissa TNF tai jokin sen fragmentti on liittynään muihin proteiineihin tai polypeptideihin TNF:n tai sen fragmenttien amino- ja/tai karboksyyliterminaalisisissa aminohapoissa olevien peptididosten kautta, (b) TNF-fragmentit valmis tuumorinekroositekijä ja preTNF-fragmentit, joissa mahdollinen preproteini-aminohappo on fragmentin aminotermiinalinen aminohappo, mukaan luettuina, (c) TNF:n tai sen fragmenttien (valmis tuumorinekroositekijä mukaan luettuna) mutantit, joissa yksi tai useampi aminohapporyhmä on substituoitu, tuotu lisää tai poistettu ja/tai (d) edellä mainittujen proteiinien, fragmenttien tai mutanttien johdokset, joiden aminopäähän on lisätty metionyyli tai muunnettu metionyyli (kuten formyylimetionyyli tai muu suojattu metionyyლისpesies).

Jos nisäkässolu transformoidaan (a) vektorilla, joka sisältää koko tuumorinekroositekijän rakennegeenin (5'-pään aloituskodoni mukaan luettuna) tai (b) valmista tuumorinekroositekijää tai tuumorinekroositekijäjohdosta koodaavalla geenillä, joka on ligatoitu eukaryootin eritysesijaksoon (joka voi olla myös esijakso, joka saa aikaan tuumorinekroositekijän erittymisen) ja solua viljellään, saadaan tavallisesti talteen valmista tuumorinekroositekijää viljelmästä.

Samalla tavalla, jos DNA, joka koodaa TNF:ää, ligatoidaan vektorissa eritysesijaksoon, jota transformoitava isäntäsolu (tavallisesti organismi, josta mainittu esijakso on saatu) käsittelee oikealla tavalla, isäntä transformoidaan vektorilla ja sitä viljellään, syntetisoituu tuumorinekroositekijä, jossa ei ole aminotermiinalista metionyyliä tai suojattua metionyyliä. Erityisesti E. coli, joka on transformoitu vektoreilla, joissa valmista tuumorinekroositekijää koodaava DNA on ligatoitu 5'-päästään DNA:han, joka koodaa STII-enterotoksiinisignaali polypeptidiä, käsittelee oikealla tavalla suuren osan hybridipreproteiinista valmiiksi tuumorinekroositekijäksi. Voidaan myös

valita sellaiset eritysesijaksot ja isäntäsolut, jotka johtavat valmiin proteiinin asianmukaiseen kuljetukseen solun periplasmaan.

5 Tässä kuvataan myös muut tuumorinekroositekijäjohdokset kuin aminohapposekvenssi- tai glykosylaatiomuunnokset. Tällaisille johdoksille on luonteenomaista kovalenttinen tai aggregaatin kautta tapahtuva liittyminen kemiallisiin ryhmiin. Nämä johdokset kuuluvat yleensä johonkin seuraavista kolmesta ryhmästä: suolat, kovalenttiset sivuketju- tai pääteryhmämuunnokset ja adsorptio-

10 kompleksit.

Jos valmista tuumorinekroositekijää koodaava DNA ligatoidaan vektoriin, vektorilla transformoidaan isäntäsolu ja solua viljellään, esiintyy valmista tuumorinekroositekijää solun sytoplasmassa. Siten on tarpeetonta rakentaa erityisjärjestelmiä valmiin tuumorinekroositeki-

15 jän saamiseksi. Tämä oli yllättävää, koska suora ilmentyminen tavallisesti saa aikaan metionyloituneen proteiinin. Proteiini on lisäksi pysyvä ja liukenee yhdistelmäsoluviljelmään, ts. se ei pilkkoudu solunsisäisten proteaasien vaikutuksesta eikä saostu. Siten on saatu aikaan uusia viljelmiä, jotka sisältävät alempien eukaryoottien tai prokaryoottien soluja, joiden sytoplasmassa esiintyy metionyloitumatonta tuumorinekroositekijää.

25 Vaikka tuumorinekroositekijää voidaan valmistaa viljelemällä eläinsolulinjoja, esimerkiksi monosyyttisolulinjaa, joka indusoidaan kasvattamalla 4-beta-forboli-12-myristaatti-13-asetaatin (PMA:n) läsnä ollessa tai immortaalisolulinjoja, kuten hybridoomia tai EBV-trans-

30 formoituja soluja (US-patenttijulkaisu 4 464 465), on edullista syntetisoida tuumorinekroositekijää yhdistelmäsoluviljelmässä jäljempänä kuvattavalla tavalla.

Kun tuumorinekroositekijä on valmistettu fermentoimalla, se yleensä puhdistetaan ottamalla talteen viljelmän supernatanttineeste tai hajotetut solut, poistamalla kiinteä aines, adsorboimalla tuumorinekroositekijä supernatanttiseoksesta (joka sisältää tuumorinekroosite-

35

kijän ja muita proteiineja) hydrofobiselle aineelle, eluoimalla tuumorinekroositekijä tältä aineelta, adsorboimalla tuumorinekroositekijä anioninvaihtohartsille (edullisesti kvaternaarisilla aminoryhmillä substituoitu), jolla on suurin piirtein yhtenäinen hiukkaskoko ja eluoimalla tuumorinekroositekijä hartsilta. Tuumorinekroositekijäkoostumuksia mahdollisesti väkevöidään ja puhdistetaan kromatografisin menetelmin missä tahansa puhdistusmenettelyn vaiheessa, esimerkiksi isoelektrisesti kokoamalla tai johtamalla seulontageelin, kuten Sephadex G-25:n, läpi.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle tuumorinekroositekijän valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään.

Yhdistelmä- tai indusoidusta soluviljelmästä saatu puhdistettu TNF yhdistetään terapeuttista käyttöä varten fysiologisesti vaarattomiin stabilointiaineisiin ja apuaineisiin ja valmistetaan annostelumuotoon esimerkiksi kylmäkuivaamalla annostelupulloissa tai säilyttämällä stabiloituina vesipitoisina valmisteina. Vaihtoehtoisesti tuumorinekroositekijä sisällytetään polymeerimatriisiin istutettavaksi kasvaimiin tai leikkauskohtiin, joista on poistettu kasvaimia, jolloin saadaan aikaan tuumorinekroositekijän pitkäaikainen vapautuminen paikallisesti suurena pitoisuutena.

Koostumukset saadaan keksinnön mukaisesti vapaina kontaminoivista sytotoksisista tekijöistä, kuten lymfotoksiinista, interferoneista tai muista sytotoksisista proteiineista, joihin kirjallisuudessa viitataan. Terapeuttisissa sovellutuksissa on kuitenkin edullista yhdistää tuumorinekroositekijä ennalta määrättyihin määriin lymfotoksiinia ja/tai interferonia. Koostumukset, jotka sisältävät tuumorinekroositekijää ja interferonia, kuten gammainterferonia, ovat erityisen käyttökelpoisia, koska niillä on havaittu olevan synergistinen sytotoksinen vaikutus.

Tuumorinekroositekijäkoostumuksia annetaan eläimille, erityisesti potilaille, joilla on pahanlaatuisia

kasvaimia, terapeuttisesti vaikuttavina annoksina. Asian-
tuntijoille ovat selviä hoidon yhteydessä soveltuvat an-
nokset, kuten jäljempänä tarkemmin kuvataan.

5 Kuvio 1 esittää tuumorinekroositekijän eluoitumis-
käyrää kontrolloidusta huokoslasista.

Kuvio 2 esittää tuumorinekroositekijän eluoitumis-
käyrää dietyyliaminoetyyliselluloosasta.

Kuvio 3 esittää tuumorinekroositekijän eluoitumis-
käyrää nopeassa proteiini-nestekromatografiassa.

10 Kuvio 4 esittää tuumorinekroositekijän eluoitumis-
käyrää kromatofokusoinnissa.

Kuvio 5 esittää tuumorinekroositekijän molekyyli-
painoa SDS-PAGE-geelielektroforeesilla määritettynä.

15 Kuvio 6 esittää tuumorinekroositekijän molekyyli-
painoa HPLC-eluutiolla määritettynä.

Kuvio 7 esittää tuumorinekroositekijän eluoitumis-
käyrää HPLC-C4-kolonnista.

Kuvio 8 valaisee tuumorinekroositekijän trypsiini-
pilkkomisfragmenttien erottumista HPLC:llä.

20 Kuvio 9 valaisee gamma-interferonin ja tuumorinek-
roositekijän seosten sytotoksista vaikutusta.

Kuviossa 10 esitetään ihmisen pretuumorinekroosi-
tekijän, tuumorinekroositekijän koko eritysesijakso mu-
kaan luettuna, nukleotidi- ja aminohapposekvenssi.

25 Kuvio 11 esittää tuumorinekroositekijän ilmenty-
misvektorin muodostamista.

Tuumorinekroositekijä määritellään polypeptidiksi,
joka on muu kuin lymfotoksiini ja jolla on kyky saada
aikaan preferentiaalinen sytotoksinen vaikutus ja joka
30 sisältää alueen, jossa esiintyy funktionaalisten amino-
happojen homologiaa kuviossa 10 esitetyn valmiin tuumori-
nekroositekijän aminohapposekvenssin, sen fragmentin tai
tällaisen polypeptidin tai fragmentin johdoksen kanssa.

35 Preferentiaalinen sytotoksinen aktiivisuus on mää-
ritelmän mukaan kasvainsolujen tuhoamista tai niiden kas-
vun estämistä ensisijaisesti verrattuna normaalisoluihin
samoissa olosuhteissa. Preferentiaalisen sytotoksisen ak-
tiivisuuden detektointi tapahtuu tarkastelemalla polypep-

tidin vaikutusta kasvainsoluihin in vivo tai in vitro verrattuna vaikutukseen normaalisoluihin tai -kudokseen. Solujen hajoaminen on yleensä diagnostisena osoituksena in vitro, kun taas kasvainten nekroosi määritetään kokein in vivo. Sytotoksisesta aktiivisuudesta voi kuitenkin olla osoituksena myös sytostaasi tai antiproliferatiivinen aktiivisuus. Soveltuvat koejärjestelyt ovat hyvin tunnettuja. Esimerkiksi jäljempänä kuvattava solujenhajotuskoe, jota käytetään tuumorinekroositekijän ominaisaktiivisuuden määrittämiseen, on hyväksyttävä, samoin kuin koe, jota kuvaavat B. Aggarwal et al. teoksessa "Thymic Hormones and Lymphokines", toim. A. Goldstein, Spring Symposium on Health Sciences, George Washington University Medical Center, 1983 (tässä julkaisussa mainittu solulinja A549 on saatavana ATCC:sta numerolla CCL185).

TNF:n ominaisaktiivisuutta kuvataan kohdesolujen hajoamisella sytostaasin sijasta. Yksi yksikkö tuumorinekroositekijää määritellään siksi määräksi, joka vaaditaan kuhunkin syvennykseen esimerkin 1 mukaisesti levitettyjen kohdesolujen hajottamiseksi 50-%:isesti. Tällä ei kuitenkaan ole tarkoitus sulkea pois muita kokeita ominaisaktiivisuuden mittaamiseksi, esimerkiksi menetelmiä, jotka perustuvat kohdesolujen kasvunopeuteen.

PreTNF on tuumorinekroositekijäspesies, joka sisältyy edellä esitettyyn tuumorinekroositekijän määritelmään. Sille on luonteenomaista se, että molekyylissä on signaali (eli esi-) polypeptidi, joka luennan jälkeen ohjaa proteiinin johonkin kohtaan solussa tai sen ulkopuolella. Yleensä signaalipolypeptidi (jolla itsellään ei ole tuumorinekroosiaktiivisuutta) lohkeaa proteolyytisesti proteiinin muusta osasta, jolla on tuumorinekroositekijäaktiivisuus, osana erittymisprosessia, jossa proteiini siirtyy isäntäsolun periplasmaan tai kasvualustaan. Signaalipeptidi voi olla mikrobin tai nisäkkään peptidi (luontainen, 76-ryhmäinen esijakson mukaan luettuna), mutta edullisesti se on signaali, joka on homologinen isäntäsolulle.

Normaaleista biologisista lähteistä saatavan luontaisen tuumorinekroositekijän arvioitu molekyylipaino on noin 17 000 natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelelektroforeesilla (SDS-PAGE) tässä kuvatulla tavalla määritettynä, isoelektrinen piste on noin 5,3, ja polypeptidi on herkkä trypsiinihydrolyysille useasta kohtaa. RP-HPLC:llä puhdistettu luonnon tuumorinekroositekijä hydrolysoituu trypsiinillä vähintään yhdeksäksi fragmentiksi tässä hake-
5 muksessa kuvatuissa olosuhteissa. Fragmenttien, joiksi tuumorinekroositekijä hydrolysoituu trypsiinin vaikutuksesta,
10 lukumäärä riippuu sellaisista tekijöistä kuin trypsiinin aktiivisuus, tuumorinekroositekijäpitoisuus ja inkubointiparametrit, ionivahvuus, pH, lämpötila ja inkubointiaika mukaan luettuina.

15 Tuumorinekroositekijä ei näytä olevan glykoproteiini, se ei pidäty lektiiniaffiniteettikolonneihin ja päätel-
lyn aminohapposekvenssin analysointi ei osoita todennäköisiä glykolysoitumiskohtia. Myös yhdistelmä- E. coli -vil-
jelmässä tuotettu materiaali (jolla ei ole glykosyloitumiskykyä) liikkuu yhdessä luonnon TNF:n kanssa SDS-PAGE:ssa.
20

Aminohapposekvenssihomologia-aste, joka tuo polypeptidin tässä annetun tuumorinekroositekijän määritelmän piiriin, vaihtelee riippuen siitä, osuuko ehdokasproteiinin ja tuumorinekroositekijän välinen homologisuus sytotoksisen aktiivisuuden aikaan saavien tuumorinekroositekijän
25 alueiden sisä- vai ulkopuolelle; alueilla, jotka ovat ratkaisevia sytotoksiselle aktiivisuudelle, pitäisi olla korkea homologia-aste, jotta polypeptidi olisi määritelmän mukainen, kun taas jaksoissa, jotka eivät liity tuumori-
30 nekroositekijän rakenteen ylläpidon tai reseptoreihin sitoutumisen aikaansaamiseen, voi homologisuus olla suhteellisen alhainen. Ratkaisevat alueet voivat lisäksi olla sytolyttisesti aktiivisia ja tässä määritellyllä tavalla homologisia, jos ryhmiä, jotka sisältävät funktionaalisesti
35 samanlaisia aminohapposivuketjuja, korvautuu toisillaan. Funktionaalisesti samanlainen viittaa sivuketjujen

vallitseviin ominaisuuksiin, kuten emäksisyys, neutraalisuus tai happamuus tai steerisen esteen läsnä- tai poissa-olo. Tässä määriteltä tuumorinekroositekijä ei kuitenkaan missään tapauksessa ole lymfotoksiini.

- 5 Tuumorinekroositekijäksi määriteltä polypeptidi sisältää yleensä kuvion 10 mukaisen proteiinin tai sen fragmentin kanssa suurin piirtein homologisia alueita, jotka ovat jatkuvan 20-100 aminohappoa käsittävän jakson mittaisia, erityisesti ryhmien 35 ja 66 sekä 110-133 välisten
10 jaksojen kanssa homologisia alueita.

- Merkittävin tekijä polypeptidin määrittelemisessä tuumorinekroositekijäksi on antiseerumien, joilla on kyky oleellisilta osiltaan kumota kuvion 10 mukaisen valmiin tuumorinekroositekijän sytolyyttinen aktiivisuus, kyky kumota oleellisilta osiltaan myös kyseessä olevan polypeptidin sytolyyttinen aktiivisuus. On kuitenkin otettava huomioon, etteivät immunologinen ja sytotoksinen luonne ole välttämättä toisensa kattavia. Kuvion 10 mukaisen tuumorinekroositekijän aktiivisuuden kumoava vasta-aine ei ehkä
20 sitoudu ehdokkaana olevaan proteiiniin, koska aktiivisuuden kumoava vasta-aine sitoutuu spesifisesti tuumorinekroositekijän sellaiseen kohtaan, joka ei ole ratkaiseva sytotoksisen aktiivisuuden kannalta. Vasta-aine saattaa sitoutua proteiinin vaikutuksen kannalta merkityksettömään kohtaan ja saada aikaan kumoavan vaikutuksensa steerisen esteen kautta. Siksi ehdokkaana oleva proteiini, jossa on
25 mutaatio tällä merkityksettömällä alueella, ei enää sido vaikutuksen kumoavaa vasta-ainetta, mutta on siitä huolimatta tuumorinekroositekijä huomattavan homologian ja biologisen aktiivisuuden kannalta katsottuna.
30

- On tärkeää ottaa huomioon, että kuvion 10 mukaiselle luonnon eli villin tyypin valmiille ihmisen tuumorinekroositekijälle, joka on saatu ääreislymfosyytti- tai solulinjaviljelmistä, annetut ominaisuudet, kuten molekyylipaino, isoelektrinen piste ja vastaavat, ovat kuvaavia vain
35 tuumorinekroositekijän luonnossa esiintyville spesieksille.

Edellä esitetyn määritelmän mukaisiin tuumorinekroositekijöihin kuuluu spesieksiä, joilla ei ole luonnon tuumorinekroositekijän kaikkia luontaisia ominaisuuksia. Vaikka tässä määritelty käsite tuumorinekroositekijä sisältää

5 luonnon tuumorinekroositekijän, sisältyy määritelmän piiriin muitakin sille sukua olevia sytotoksisia polypeptidejä. Esimerkiksi sellaiset TNF-johdokset kuin insertiomutantit, deletiomutantit ja fuusioproteiinit, joita edellä kuvattiin, eroavat molekyyllipainoltaan luonnossa esiinty-

10 västä ihmisen tuumorinekroositekijästä (fuusioproteiineilla valmiin tuumorinekroositekijän kanssa tai itse preTNF:llä samoin kuin insertiomutanteilla on suurempi molekyyllipaino kuin valmiilla luonnon tuumorinekroositekijällä, kun taas luonnossa esiintyvän valmiin tuumorinekroositekijän dele-

15 tiomutanttien molekyyllipaino on pienempi). Tuumorinekroositekijää voidaan myös käsitellä alttiuden hydrolysoitua trypsiinin tai muiden proteaasien vaikutuksesta vähentämiseksi tai poistamiseksi. Lopuksi mainittakoon, että ihmisen preTNF:n luennan jälkeinen prosessointi solulinjois-

20 sa, jotka ovat peräisin muista nisäkkäistä kuin kädellisistä, voi johtaa mikroheterogeenisuuteen aminoterminaalilla alueella, niin että aminoterminaalisenä aminohappona ei enää ole valiini.

Ihmisen tuumorinekroositekijän aminohapposekvenssi,

25 joka on päätelty sen cDNA:sta, esitetään kuviossa 10. Valmista eli luonnossa esiintyvää tuumorinekroositekijää vastaavat aminohapot 1-157. Huomaa, että tämä jakso sisältää 76 ryhmästä koostuvan signaalijakson, jonka uskotaan poistuvan luetun transkriptin normaalissa prosessoinnissa valmiiksi proteiiniksi. Trypsiinihydrolyysikohdat osoitetaan

30 nuolin.

Huomaa, että ilmaus "kykenevä" sytotoksiseen aktiivisuuteen tai tuumorinekroosiin in vivo tarkoittaa sitä, että termin "tuumorinekroositekijä" piiriin kuuluvat poly-

35 peptidit, joita voidaan muuttaa esimerkiksi entsyymaattisella hydrolyysillä, epäaktiivisesta, tsymogeenin kanssa

analogisesta tilasta polypeptidifragmentiksi, jolla on haluttu biologinen vaikutus. Tyypillisiä epäaktiivisia esias- teita ovat fuusioproteiinit, joissa valmis tuumorinekroosite- kijä on liittynään karboksyylipäästään peptidisidoksen kaut-
5 ta johonkin ihmisproteiiniin tai sen fragmenttiin. Tämän pep- tidisidoksen kohdalla tai sen lähellä oleva sekvenssi on si- ten valittu, että se on herkkä proteolyttiselle hydrolyysil- le, jolloin tuumorinekroositekijä vapautuu joko in vivo tai, osana valmistusohjelmaa, in vitro. Siten muodostuneella tuu-
10 morinekroositekijällä on tällöin määritelmän edellyttämä sy- totoksinen aktiivisuus.

Vaikka tuumorinekroositekijällä vleensä tarkoite- taan ihmisen tuumorinekroositekijää, kuuluvat sellaisista lähteistä kuin hiiri, sika, hevonen tai nauta peräisin olevat
15 tuumorinekroositekijät tuumorinekroositekijän määritelmän piiriin, kunhan ne muutoin täyttävät edellä kuvatut homologi- sia alueita ja sytotoksista aktiivisuutta koskevat vaatimuk- set. TNF ei ole lajispesifinen, ihmisen TNF vaikuttaa esimer- kiksi hiiren kasvaimiin. Jonkin lajin TNF:ää voidaan siten
20 käyttää toisen lajin hoidossa.

Tuumorinekroositekijä-nimikkeen alle kuuluvat myös multimeeriset muodot. Tuumorinekroositekijä aggregoituu spon- taanisti multimeereiksi, tavallisesti dimeereiksi tai kor- keammiksi multimeereiksi. Multimeerit ovat sytotoksisia ja
25 siten soveltuvia käytettäväksi terapiaan in vivo. Vaikka on toivottavaa ilmentää ja ottaa talteen tuumorinekroositekijä suurin piirtein homogeenisena multimeerinä tai monomeerinä, voidaan tuumorinekroositekijä käyttää terapeuttisesti eri- laisten multimeerien seoksena.

Tuumorinekroositekijän johdokset sisältyvät tuu-
30 morinekroositekijä-termin piiriin. Johdoksiin kuuluvat ami- nohapposekvenssimutantit, glykosyloitumismuunnokset ja kova- lenttisesti tai aggregoitumalla muodostuneet yhteenliitty- mätmuiden kemiallisten ryhmien kanssa. Kovalenttisia joh-
35 doksia valmistetaan liittämällä funktionaalisia ryhmiä TNF-aminohapposivuketjuissa tai N- tai C-päässä esiintyviin

ryhmiin alalla tunnetuin keinoin. Näihin johdoksiin kuuluvat esimerkiksi: karboksyyliipään tai karboksyyilisivuketjuja sisältävien ryhmien, esimerkiksi asp10:n alifaattiset esterit tai amidit; hydroksyyliiryhmän sisältävien aminohapporyhmien, kuten ser52:n, ser3:n, ser4:n tai ser5:n, O-asyylijohto-
5 asetukset; aminotermiinalisen aminohapon tai aminoryhmän sisältävien aminohapporyhmien, esimerkiksi lyysiinin tai arginiinin, N-asyylijohto-
asetukset. Asyyliiryhmä on alkyyliryhmä (C_{3-10} -n-alkyyliit mukaan
10 luettuina), jolloin muodostuu alkanoyylijohto tai karbonyklinen tai heterosyklinen yhdiste, jolloin muodostuu aroyylijohto. Reaktiiviset ryhmät ovat edullisesti difunktionaalisia yhdisteitä, joita sinänsä tiedetään käytettävän proteiinien silloittamiseen liukenemattomiksi matriiseiksi
15 reaktiivisten siuryhmien kautta. Edullisia johdosten muodostuskohtia ovat kysteiini- ja histidiiniryhmät.

Kovalenttiset tai aggregaattijohdot ovat hyödyllisiä reagensseja immuunitutkimukseen ja affiniteettipuhdistukseen. Tuumorinekroositekijä voidaan esimerkiksi tehdä
20 liukenemattomaksi sitomalla se kovalenttisesti syanogeenibromidilla aktivoituun Sepharose-geeliin sinänsä tunnetuin menetelmin tai adsorboida polyolefiinipinnoille (mahdollisesti glutaarialdehydisilloituksen avulla) käytettäväksi anti-TNF-vasta-aineiden tai solujen pintareseptorien tutkimiseen tai puhdistukseen. Tuumorinekroositekijä voidaan
25 myös leimata detektoitavissa olevalla ryhmällä, esimerkiksi radiojodata kloramiini T -menettelyllä, sitoa kovalenttisesti harvinaisia maametalleja sisältäviin kelaatteihin tai liittää johonkin muuhun fluoresoivaan ryhmään, käytettäväksi diagnostisissa tutkimuksissa, erityisesti biolo-
30 gisten näytteiden TNF-pitoisuuksien mittaamiseen kompetitiivista tyyppiä oleville immuunitutkimuksilla. Tällaiset johdot voivat olla edellä annetun TNF:n määritelmän ulkopuolella, koska ei ole välttämätöntä, että niillä on sy-
35 totoksinen vaikutus, vaan ristireaktiivisuus anti-TNF:n kanssa riittää.

Tuumorinekroositekijän mutanttijohdoksiin kuuluvat ennalta määrätyt, ts. paikkaspesifiset, TNF:n tai sen fragmenttien mutantit. Mutanttien muodostuksen tarkoituksena on saada aikaan DNA, joka koodaa edellä määritellyn kal-

5 taista tuumorinekroositekijää, ts. tuumorinekroositekijää, jolla on sytotoksinen vaikutus kasvainsoluihin in vitro tai joka aiheuttaa kasvainsolujen kuoleman in vivo ja jolla on jäljellä homologiaa kuvion 10 mukaisen sekvenssin kanssa, mutta jolla on myös parantuneet ominaisuudet ja parantunut aktiivisuus. Mutanttituumorinekroositekijä määritel-

10 lään polypeptidiksi, joka muuten täyttää tässä hakemuksessa aiemmin annetun tuumorinekroositekijän homologiamääritelmän ehdot, mutta jonka aminohapposekvenssi eroaa tuumorinekroositekijän sekvenssistä deleetion, substituution tai

15 insertion kautta. Tuumorinekroositekijän lyysiini- tai arginiiniryhmät (arginiini 2, 6, 82, 44 ja 131 ja lyysiini 98, 90 ja 85) voidaan esimerkiksi vaihtaa histidiiniin tai muuhun aminohapporyhmään, joka ei tee proteiinista proteolyyt-

20 tisesti labiilia. Samoin voitaisiin kysteiini 101 korvata muilla ryhmillä ja silloittaa kemiallisesti stabiilisuuden antamiseksi hapettumista vastaan. Ei ole välttämätöntä, että mutantit täyttävät tuumorinekroositekijälle asetetut aktiivisuusvaatimukset, koska jopa biologisesti inaktiiviset mutantit ovat käyttökelpoisia reagensseina immuunitut-

25 kimuksissa. Tässä tapauksessa tulee mutantissa kuitenkin säilyä ainakin yksi epitooppinen kohta, joka reagoi tuumorinekroositekijän vasta-aineen kanssa.

Tuumorinekroositekijän alueet, jotka ovat ryhmien 35-66 ja 110-133 välillä mainitut ryhmät mukaan luettuina,

30 ovat merkittävässä määrin homologisia (50-%:isesti) lymfotoksiinin kanssa. Näiden kahden molekyylin hydrofobiset karboksyylipäät (tuumorinekroositekijän ryhmät 150-157) ovat myös merkittävästi samanlaiset. Koska molemmilla proteiineilla on sytotoksinen vaikutus tai kasvainsolujen tappamiskyky in vivo, uskotaan näiden alueiden olevan tärkeitä

35 lymfotoksiinin ja tuumorinekroositekijän yhteisen

aktiivisuuden kannalta. Siten näillä alueilla olevat ryhmät ovat edullisia muutettaviksi silloin, kun mutageneesin tarkoituksena on vaikuttaa suoraan tuumorinekroositekijän vaikutukseen tiettyyn soluun. Tuumorinekroositekijän ryhmien 67-109 välisen suhteellisen paljon muuttuneen alueen tehtävänä saattaa olla sitä ympäröivien kahden suhteellisen homologisen alueen sijoittaminen sytotoksisen vaikutuksen kannalta välttämättömään oikeaan konformaatioon. Tällaisen sijoittamisen, jonka voisi saada aikaan tuumorinekroositekijässä oleva Cys69-Cys101-disulfidisilta, voisi samalla tavalla saada aikaan lymfotoksiinin vastaava alue ja se voi olla syynä eroihin näiden kahden molekyylin spesifisyydessä ja aktiivisuudessa. Tässä yhteydessä mainittakoon, että koska näiden ryhmien otaksutaan muodostavan tuumorinekroositekijän aktiivisen ytimen, voidaan ne syntetisoida kemiallisesti tai deleetiomutageneesin kautta typistettyinä, lyhyinä polypeptideinä, joilla on tuumorinekroositekijävaikutus.

Vaikka mutaatiokohta on ennalta määrätty, ei itse mutaation tarvitse olla määrätty ennalta. Esimerkiksi (asema 131) -mutanttien tehon optimoimiseksi voidaan tehdä satumanvarainen mutageneesi arginiinia 131 vastaavan kodonin kohdalla ja tutkia ilmentyneet tuumorinekroositekijämutantit sytotoksisen aktiivisuuden ja proteaasinkeston optimaalisen yhdistelmän löytämiseksi. Menetelmät substituutio-mutaatioiden aiheuttamiseksi sekvenssiltään tunnetun DNA:n ennalta määrättyihin kohtiin ovat tunnettuja, esimerkiksi M13-alukemutageneesi.

Tuumorinekroositekijän mutageneesi toteutetaan teke-
mällä aminohappoinsertioita, tavallisesti noin 1-10 aminohapon mittaisia tai noin 1-30 ryhmän deleetioita. Substituutioita, deleetioita, insertioita tai näiden mitä tahansa kombinaatioita voidaan yhdistää toisiinsa lopullisen rakenteen aikaansaamiseksi. Insertioihin sisältyvät aminotai karboksyylliterminaaliset fuusiot, esimerkiksi karboksyylipäähän lisätty hydrofobinen jatke. Edullisesti tehdään

kuitenkin vain substituutiomutaatioita. On ilmeistä, etteivät koodaavan DNA:n mutaatiot saa saattaa jaksoa lukukehyksen ulkopuolelle ja on edullista, etteivät ne synnyttä komplementaarisia alueita, joista voisi syntyä sekundaarinen mRNA-rakenne.

Kaikki tuumorinekroositekijää koodaavan DNA:n mutaatiot eivät ilmenny lopullisessa erittyneessä tuotteessa. Tärkeä ryhmä DNA-substituutiomutaatioita ovat esimerkiksi mutaatiot, joissa erilainen eritysesijakso tai signaali on korvannut ihmisen luontaisen eritysesijakson joko esijaksossa tehtyjen deletioiden tai substituutioiden kautta, joissa luontainen esijakso tai suurin osa siitä vaihdetaan esijaksoon, jonka isäntä, jota aiotaan käyttää, todennäköisemmin tunnistaa. Muodostettaessa esimerkiksi prokaryoottiilmentymisvektoria ihmisen eritysesijakso poistetaan bakteerin alkalisen fosfataasin tai lämpöstabiilin enterotoksiini II:n esijaksojen eduksi ja hiivaa varten tämä esijakso korvataan hiivan invertaasin, alfa-tekijän tai happaman fosfataasin esijaksojen eduksi. Ihmisen eritysesijakson voivat kuitenkin tunnistaa muutkin isännät kuin ihmissolulinjat, todennäköisimmin korkeampien eukaryoottien viljelmässä olevat solut. Kun isäntä "tunnistaa" eritysesijakson, fuusioproteiini, joka koostuu tuumorinekroositekijästä ja esijaksosta, katkeaa esijakson ja tuumorinekroositekijän välisen peptidisidoksen kohdalta niiden tapahtumien yhteydessä, jotka johtavat tuumorinekroositekijän erittymiseen. Siten, vaikka isännän transformointiin käytettäisiin mutantti-preTNF-DNA:ta ja välituotteena syntetisoituu mutantti-preTNF:ää, on tuotteena oleva tuumorinekroositekijä tavallisesti luontainen valmis tuumorinekroositekijä.

Toinen tärkeä ryhmä DNA-mutantteja, jotka eivät ilmenny tuumorinekroositekijäjohdoksina, ovat nukleotidisubstituutiot, joita tehdään ilmentymisen edistämiseksi, pääasiallisesti aminotermiinaalisten silmukoiden välttämiseksi tai kodonien, joita valitun isännän on helpompi ko-

pioida, esimerkiksi tunnettujen E. coli -preferenssi-kodonien E. coli -ilmentymistä varten, aikaansaamiseksi.

5 Oleellisilta osiltaan homogeenisella tuumorinekroositekijällä tarkoitetaan tuumorinekroositekijää, joka on suurin piirtein vapaa muista proteiineista, jotka ovat luontaisia lähteelle, josta tuumorinekroositekijä eristettiin. Tämä tarkoittaa sitä, että ho-

10 mogeeninen tuumorinekroositekijä on suurin piirtein vapaa veren plasmaproteiineista, kuten albumiinista, fibrinogeenista, seriiniproteaaseista, α -globuliineista, sytotoksisista polypeptideistä, jotka eivät ole tuumorinekroositekijöitä, kuten lymfotoksiinista ja interferoneista ja tuumorinekroositekijäsynteesi-

15 paikkana toimivan solun tai organisminmuista proteiineista, kokonaiset solut ja hiukkasmaiset solujätteet mukaan luettuina. Homogeeninen tuumorinekroositekijä voi kuitenkin sisältää sellaisia aineita kuin jäljempänä kuvattavia stabilointi- ja täyteaineita,

20 ennalta määrättyjä määriä synteesipaikkana toimivan solun tai organismin proteiineja, proteiineja, jotka ovat lähtöisin muista kuin tuumorinekroositekijän lähdesoluista tai -organismeista ja synteettisiä polypeptidejä, kuten poly-L-lysiiniä. Yhdistelmätuumorinekroositekijä, joka ilmentyy allogeenisessa

25 isäntäsolussa, esimerkiksi bakteerissa, ilmentyy luonnollisesti täysin vapaana geenilähteen proteiineista.

30 Tuumorinekroositekijä syntetisoidaan edullisesti yhdistelmäorganismiviljelmissä. Ääreisverilymfosyytit (PBL:ät) ja solulinjat eivät ole toivottavia. Käytännössä on vaikeaa saada jonkin ryhmän PBL:iä, jotka ovat vapaita muiden ryhmien solujen aiheuttamasta kontaminaatiosta, esimerkiksi B- tai T-soluista vapaita makrofageja. Tällainen kontaminaatio tekee mainittujen solujen tuotteiden erottamisen vaikeammaksi kontaminoivien solujen mahdollisesti vapauttamien sytotoksistentekijöiden ja proteiinien vuoksi.

35 Muista kuin yhdistelmäviljelmistä saatava tuumorinek-

roositekijästä, joten näiltä viljelmiltä puuttuu yhdistelmäviljelmän joustavuus tuumorinekroositekijän ominaisuuksien parantamiseksi.

DNA, joka koodaa tuumorinekroositekijää, saadaan kemiallisella synteesillä, PBL- tai solulinjaviljelmistä saatavan mRNA:n käänteiskopiointituotteita tutkimalla tai tutkimalla mistä tahansa solusta peräisin olevien genomikirjastoja. Soveltuvia solulinjaviljelmiä ovat monosyyttisolulinjat, kuten promyelosyyttisolulinjat, joista käytetään merkintää "HL-60" (ja joista eräs on saatavana ATCC:stä numerolla CCL 240) tai histiosyyttinen lymfoomasolulinja U 937 (ATCC CRL 1593). Nämä ja muut solulinjat indusoidaan ilmentämään ja erittämään tuumorinekroositekijää altistamalla solut alalla tunnetuille kemiallisille tai fysikaalisille tekijöille, yleensä kasvaimia aiheuttaville tai mitogeenisille tekijöille. Tuumorinekroositekijä voidaan indusoida tietyissä monosyyttisolulinjoissa tehokkaasti vain PMA:lla; muuten tavanomaiset aineet, kuten lipopolysakkaridi, stafylokokkaalinen enterotoksiini B tai tymosiini α -1, eivät olleet yhtä tehokkaita kuin PMA tuumorinekroositekijän indusoimiseksi näissä solulinjoissa. Koska täytyy tehdä vaihtelevia määriä tutkimuksia tuumorinekroositekijää ilmentävän (ja siten haluttua mRNA:ta sisältävän) solulinjan paikallistamiseksi, saattaa olla tehokkaampaa yksinkertaisesti syntetisoida geenin. Synteesi on edullinen, koska sen avulla voidaan muodostaa ainutkertaisia restriktiokohtia (jolloin on mahdollista käyttää geenin vektoreissa, jotka sisältävät restriktiokohtia, joita muutoin esiintyisi luontaisessa sekvenssissä) ja suorittaa luentatehoa parantavia toimenpiteitä, joita käsitellään jäljempänä.

Tämä DNA leimataan kovalenttisesti detektoitavissa olevalla aineella, kuten fluoresoivalla ryhmällä, radioaktiivisella atomilla tai kemiluminesoivalla ryhmällä, sinänsä tunnetuin menetelmin. Sitten sitä käytetään tavanomaisiin hybridisaatiotutkimuksiin. Tällaisia tutkimuksia

käytetään TNF-vektoreiden ja transformanttien identifioimiseen tämän hakemuksen esimerkeissä kuvattavalla tavalla tai in vitro -diagnooseihin, kuten TNF-mRNA:n havaitsemiseen punasoluista.

- 5 TNF:ää vastaavaa mRNA:ta on yllättävästi suhteellisen vähän jopa indusoiduissa HL-60-soluissa, mikä ehkä johtuu tuntemattomien tekijöiden aiheuttamasta lähetti-RNA:n epästabiilisuudesta. Lisäksi aika, joka kuluu TNF-mRNA:n ilmaantumiseen solun indusoinnista lukien, on tärkeä. TNF-
- 10 mRNA:ta ilmaantuu soluihin vain lyhyeksi ajaksi noin neljän tunnin kuluttua indusoinnista. Tässä suhteessa sen ilmaantuminen on erilainen kuin lymfotoksiinin, joka ilmaantuu noin 12 tunnin kuluttua indusoinnista. Tästä syystä jää cDNA helposti huomaamatta, ellei tiedetä mitä etsitään.
- 15 Kuitenkin, kun tiedetään sen läsnäolo ja käytettävissä on täydellisesti komplementaarista DNA:ta, minkä tämä keksintö tekee mahdolliseksi, on tuumorinekroositekijä-cDNA:n etsiminen indusoidusta HL-60- tai PBL-soluista saaduista cDNA-kirjastoista tällaisia DNA-sekvenssejä sisältävien
- 20 koettimien avulla rutiinityötä. Esimerkeissä tutkitut kaksi HL-60-fagikirjastoa sisältävät suhteellisen samanlaisen määrän positiivisia plakkeja, joten on selvää, että rutiniinomaisilla hybridisaatiotutkimuksilla voidaan identifioida halutun DNA:n sisältävä faagi.
- 25 HL-60-solulinjan tuumorinekroositekijää syntetisoivia soluja viljellään aluksi tavanomaisella tavalla, kunnes saavutetaan tiheys noin $8-12 \times 10^5$ solua/ml. Solut poistetaan viljelmästä, pestään, siirrostetaan seerumista vapaaseen alustaan ja kasvatetaan PMA:ta sisältävässä alus-
- 30 tassa. Kasvatusta jatketaan, kunnes haluttu tuumorinekroositekijäpitoisuus, tavallisesti noin 400 yksikköä/ml, on akkumuloitunut kasvualustaan. Sen jälkeen viljelmäsupernatantti edullisesti kirkastetaan sentrifugoimalla tai muulla keinolla, jolla voidaan erottaa solujätteet liukoisista
- 35 komponenteista. Sentrifugointi tulisi tehdä niin pienellä kierrosluvulla, että vain suspendoituneet hiukkaset

poistuvat. Sitten supernatantti puhdistetaan tässä hake-
muksessa kuvattavalla tavalla.

Vaihtoehtoisesti ja edullisesti, tuumorinekroosi-
tekijä syntetisoidaan isäntäsoluissa, jotka on transfor-
moitu tuumorinekroositekijää koodaavaa DNA:ta sisältävil-
5 lä vektoreilla. Vektori on replikoituva DNA-rakennelma.
Vektoreita käytetään tässä yhteydessä tuumorinekroosite-
kijää koodaavan DNA:n amplifiointiin ja/tai ilmentämi-
seen. Ilmentymisvektori on replikoituva DNA-rakennelma,
10 jossa tuumorinekroositekijää koodaava DNA-sekvenssi on
sopivin toimenpitein kytketty soveltuviin säätelyjaksoi-
hin, joilla on kyky saada aikaan tuumorinekroositekijän
ilmentyminen sopivassa isännässä. Tällaisia säätelyjakso-
ja ovat mm. transkriptiopromoottori, lisäoperaattorijak-
15 so, joka ohjaa kopiointia, soveltuvia mRNA:n ribosomisi-
toutumiskohtia koodaava jakso ja kopioinnin ja luennan
lopetusta ohjaavat jaksot.

Vektoreihin kuuluvat plasmidit, virukset (faagit
mukaan luettuina) ja integroitavissa olevat DNA-frag-
20 mentit (ts. fragmentit, jotka voidaan integroida isän-
nängenomiin rekombinaation kautta). Kun vektorilla on
transformoitu soveltuva isäntä, se replikoituu ja toimii
isännän genomista riippumattomasti tai saattaa, joissa-
kintapauksissa, integroitua itse genomiin. Tässä selos-
25 tuksessa "vektori" on yleisnimitys, joka sisältää "plas-
midin", mutta plasmidit ovat tällä hetkellä yleisimmin
käytettyjä vektorityyppejä. Kaikki muutkin vektorityypit,
jotka palvelevat samaa tarkoitusta ja ovat alalla tunnet-
tuja tai tulevat sellaisiksi, ovat kuitenkin soveltuvia
30 tämän keksinnön mukaiseen käyttöön. Soveltuvien vektorien
tulee sisältää replikoni ja säätelyjaksot, jotka ovat
peräisin isännän, jota aiotaan käyttää ilmentämiseen,
kanssa yhteensopivasta lajista. Transformoidut isän-
täsolut ovat soluja, jotka on transformoitu tai trans-
35 fektoitu yhdistelmä-DNA-menetelmillä valmistetuilla
tuumorinekroositekijävektoreilla. Transformoidut isän-
nätyyleensä ilmentävät tuumorinekroositekijää. Ilmenty-
nyt tuumorinekroositekijä jää solun sisään tai

erittyy joko periplasmatilaan tai viljelmäsupernatanttiin valitusta isäntäsolusta riippuen.

DNA-alueet ovat toiminnallisesti kytkettyjä, jos ne liittyvät toisiinsa funktionaalisesti. Esimerkiksi esijak-
5 soa tai eritysesijaksoa koodaava DNA on kytketty toiminnal-
lisesti polypeptidiä koodaavaan DNA:han, jos se ilmentyy
preproteiinina, joka osallistuu polypeptidin erittymiseen;
promoottori on kytketty toiminnallisesti koodausjaksoon,
jos se ohjaa tämän sekvenssin kopiointia; tai ribosomin si-
10 toutumiskohta on kytketty toiminnallisesti koodausjaksoon,
jos se sijaitsee siten, että luenta on mahdollinen. Toi-
minnisesti kytketty merkitsee yleensä jatkuvaa ja,
erittymisesijaksojen ollessa kyseessä, jatkuvaa ja samassa
lukukehyksessä olevaa.

15 Soveltuvia isäntäsoluja ovat prokaryootti-, hiiva-
tai korkeammat eukaryoottisolut. Prokaryootteihin kuuluvat
gram-negatiiviset ja -positiiviset organismit, esimerkiksi
E. coli ja basillit. Korkeampiin eukaryoottisoluihin kuu-
luvat nisäkäsperäiset vakiinnutetut solulinjat, joita ku-
20 vataan jäljempänä. Edullinen isäntäsolu on faagiresistent-
ti E. coli W3110 (ATCC 27325) -kanta, jota kuvataan esi-
merkeissä, vaikka myös muut prokaryootit, kuten E. coli B,
E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli 294 (ATCC 31446),
Pseudomonas-lajit ja Serratia marcesans, ovat soveltuvia.

25 Prokaryoottiset isäntä-vektorijärjestelmät ovat
edullisia tuumorinekroositekijän ilmentymisen kannalta.
Vaikka tuumorinekroosi tekijämolekyyli sisältää kaksi kys-
teiniiniryhmää ja vaatii siten mahdollisesti jossain määrin
luennan jälkeistä käsittelyä mahdollisen disulfidisillan
30 muodostamiseksi, ilmentää esimerkiksi E. coli biologisesti
aktiivista tuumorinekroositekijää. Käytettävissä on runsaas-
ti soveltuvia vektoreita. Mikrobiaalisen vektorin tulee
yleensä sisältää replikoitumisen aloituskohta, jonka käy-
tettäväksi aiottu isäntä tunnistaa, isännässä toimiva pro-
35 moottori ja fenotyyppinen valikointigeeni, esimerkiksi gee-
ni, joka koodaa proteiineja, jotka antavat antibiootti-

resistenssin tai toteuttavat jonkin kasvuedellytyksen. Muita isäntiä varten muodostetaan samanlaisia rakenteita. *E. coli* transformoidaan tyypillisesti käyttämällä pBR322, eräästä *E. coli* -kannasta peräisin olevaa plasmidia [Bolívar et al., Gene 2 (1977) 95]. pBR322 sisältää ampicilliini- ja tetrasykliiniresistenssigeenit ja tarjoaa siten helpon tavan transformoitujen solujen identifioimiseksi.

Vektorien tulee sisältää promoottori, jonka isäntä-organismi tunnistaa. Tämä on yleensä aiotulle isännälle homologinen promoottori. Yhdistelmä DNA:iden muodostamisessa yleisesti käytettäviin promoottoreihin kuuluvat β -laktamaasi- (penisillinaasi-) ja laktoosipromoottorisysteemit [Chang et al., Nature 275 (1978) 615; Goeddel et al., Nature 281 (1979) 544], tryptofaanipromoottorisysteemi (TRP) [Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 4057 ja EP-hakemusjulkaisu 36 776] ja tac-promoottori [H. De Boer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80 (1983) 21-25]. Vaikka nämä promoottorit ovat yleisimmin käytettyjä, ovat myös muut tunnetut mikrobialaiset promoottorit soveltuvia. Nukleotidisekvenssejä koskevia yksityiskohtia annetaan julkaisuissa, mikä tekee alaa taitavalle mahdolliseksi ligatoida ne toiminnallisesti tuumorinekroositekijää koodaavaan DNA:han plasmidivektoreissa [Siebenlist et al., Cell 20 (1980) 269]. Tällä hetkellä edullinen vektori on pBR322-johdos, joka sisältää *E. coli* alkalinen fosfataasi -promoottorin yhdessä trp-Shine-Dalgarno-jakson kanssa. Promoottori ja Shine-Dalgarno-jakso kytketään toiminnallisesti TNF:ää koodaavaan DNA:han, ts. ne sijoitetaan siten, että ne edistävät TNF-mRNA:n kopiointia DNA:sta.

Prokaryoottien lisäksi voidaan tuumorinekroositekijää koodaavilla vektoreilla transformoida eukaryoottisia mikrobeja, kuten hiivasoluviljelmiä. *Saccharomyces cerevisiae* eli tavallinen leivinihiiva on yleisimmin käytetty alemmista eukaryoottisista isäntämikro-organismeista, vaikka joukko muita kantoja on myös yleisesti saatavissa. Hiivavektorit sisältävät yleensä replikoitumisen aloituskohdan, joka on

- peräisin kahden mikronin hiivaplasmidista tai itsenäisesti replikoituvan jakson (ARS), promoottorin, TNF-geenin, jak-sot polyadenyylaatiota ja kopioinnin lopetusta varten ja va-likointigeenin. Soveltuva plasmidi hiivassa tapahtuvaa tuu-
 5 morinekroositekijän ilmentymistä varten on YRp7 [Stinchcomb et al., Nature 282 (1979) 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979) 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980) 157]. Tämä plasmidi sisältää valmiiksi trp1-geenin, joka toimii valikointimerk-kerina sille hiivamutanttikannalle, jolta puuttuu kyky kas-
 10 vaa tryptofaanissa, esimerkiksi ATCC-nrolla 44076 eli PEP4-1:lle [Jones, Genetics 85 (1977) 12]. trp1-vaurion läsnä-olo hiivaisäntäsolun genomissa tarjoaa tehokkaan keinon de-tektoida transformoituminen tryptofaanin poissa ollessa ta-
 pahtuvan kasvun avulla.
- 15 Soveltuviin hiivavektorissa esiintyviin promoottori-jaksoihin sisältyvät promoottorit metallotioneiinia, 3-fos-foglyseraattikinaasia [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 2073] tai muita glykolyyttisiä entsyymejä [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7 (1968) 149; Holland et al.,
 20 Biochemistry 17 (1978) 4900], kuten enolaasia, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia, heksokinaasia, pyruvaat-tidekarboksylaasia, fosfofruktokinaasia, glykoosi-6-fos-faatti-isomeraasia, 3-fosfoglyseraattimutaasia, pyruvaatti-kinaasia, trioosifosfaatti-isomeraasia, fosfoglykoosi-iso-
 25 meraasia ja glykokinaasia varten. Hiivassa tapahtuvaan il-mentymiseen soveltuvia vektoreita ja promoottoreita kuvaa-vat tarkemmin R. Hitzeman et al. EP-julkaisussa 73 657.
- Muita promoottoreita, joiden lisäetuna on kasvuolo-suhteiden säätelämä kopiointi, ovat promoottorialueet al-
 30 koholidehydrogenaasi 2, isosytokromi C, hapanta fosfataa-sia, typpimetaboliaan liittyviä hajottavia entsyymejä ja edellä mainittuja metallotioneiinia ja glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia, samoin kuin maltoosin ja galaktoo-sin hyväksikäytöstä vastaavia entsyymejä varten. Muodos-
 35 tettaessa soveltuvia ilmentymisplasmideja ligatoidaan il-mentymisvektoriin myös näihin geeneihin liittyvät termina-

tiojaksot tuumorinekroositekijää koodaavien jaksojen 3'-puolelle mRNA:n polyadenylaation ja terminaation aikaansaamiseksi.

Mikro-organismien lisäksi voidaan isäntinä käyttää myös monisolui-
5 sten organismien soluviljelmiä. Tämä ei kuitenkaan ole edullista niiden erinomaisten tulosten takia, joita on saavutettu tähän mennessä TNF:ää ilmentävillä mikrobeilla. Periaatteessa mikä tahansa korkeamman eukaryootin, olipa se selkärankainen tai ei, soluviljelmä on käyttökelpoinen. Selkärankaissoluihin on kuitenkin tunnettu
10 suurempaa mielenkiintoa ja selkärankaissolujen lisäämistä viljelmässä (kudosviljelmässä) on tullut viime vuosina rutiinimenettely [Tissue Culture, toim. Kruse ja Petterson, Academic Press. 1973]. Esimerkkejä käyttökelpoisista solulinjoista ovat VERO- ja HeLa-solut, kiinanhamsterin munasarjasolulinjat (CHO) ja WI38-, BHK-, COS-7- ja MDCK-solulinjat. Tällaisille soluille käytettävät ilmentymisvektorit sisältävät yleensä replikoitumisen aloituskohdan (mikäli välttämätöntä), promoottorin ilmennettävän geenin edellä
15 sekä ribosomisitoutumiskohdan. RNA-simukoitumiskohdan (jos käytetään introneja sisältävää genomi-DNA:ta), polyadenylaatiokohdan ja kopioinnin lopetusjakson.

Ilmentymisvektorien, joita on määrää käyttää selkärankaissolujen transformointiin, kopioinnin ja luennan säätelyjaksot ovat usein virusperäisiä. Yleisesti käytettäviä
25 promoottoreita ovat esimerkiksi polyomasta, adenovirus 2:sta ja edullisimmin simianvirus 40:stä (SV40:stä) peräisin olevat promoottorit. Aikaiset ja myöhäiset promoottorit ovat erityisen käyttökelpoisia, koska ne saadaan helposti viruksesta fragmenttina, joka sisältää myös SV40-viruksen replikaation aloituskohdan [Fiers et al., Nature 273 (1978) 113]. Pienempiä ja suurempia SV40-fragmentteja voidaan myös käyttää sillä edellytyksellä, että ne sisältävät noin 259 emäsparin jakson, joka ulottuu HindIII-kohdasta viruksen
30 replikoitumisen aloituskohdassa sijaitsevaan BglI-kohtaan päin. Lisäksi on usein mahdollista, ja usein toivottavaa,

käyttää ihmisen genomien promoottori-, säätely- ja/tai signaalijaksoja, jotka normaalisti liittyvät tuumorinekroositekijään, sillä edellytyksellä, että tällaiset säätelyjakso-
sot ovat yhteensopivia isäntäsolusysteemien kanssa.

- 5 Replikoitumisen aloituskohta voidaan saada aikaan joko rakentamalla vektori siten, että se sisältää eksogeenisen aloituskohdan, kuten SV40:stä tai muusta viruksesta (esimerkiksi polyomasta, adenoviruksesta, VSV:stä tai BPV:stä) saatavan tai replikoitumisen aloituskohta voi olla
10 isäntäsolun kromosomaalisen replikoitusmekanismin aikaansaama. Jos vektori integroituu isäntäsolun kromosomiin, on jälkimmäinen usein riittävä.

- Valittaessa edullista nisäkäsistäntäsolua transfektoitavaksi vektorilla, joka sisältää sekä tuumorinekroositekijää että dihydrofolaattireduktaasia (DHFR) koodaavat
15 DNA-jaksot, on usein asiallista valita isäntä käytettävän DHFR-proteiinin tyyppin mukaan. Jos käytetään villin tyyppin DHFR-proteiinia, on edullista valita isäntäsolu, jossa on DHFR-vajaus, jolloin DHFR-koodausjaksoa voidaan käyttää
20 markkerina onnistuneelle transfektiolle selektiivisessä alustassa, josta puuttuu hypoksantiini, glysiini ja tymidiini. Sopiva isäntäsolu on tässä tapauksessa kiinanhamsterin munasarjasolulinja (CHO-solulinja), jossa on CHFR-aktiivisuuden vajaus ja joka valmistetaan ja lisätään Urlaubin
25 ja Chasinin [Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 77 (1980) 42167] kuvaamalla tavalla.

- Jos säätelyjaksona kuitenkin käytetään DNA:ta, joka koodaa DHFR-proteiinia, jolla on alhainen sitoutumisaffiniteetti metotreksaatin (MTX) suhteen, ei ole välttämätöntä
30 käyttää DHFR-resistenttejä soluja. Koska mutantti-DHFR on resistentti MTX:lle, voidaan MTC-pitoista alustaa käyttää valikointivälineenä, sillä edellytyksellä, että itse isäntäsolut ovat MTX-herkkiä. Useimmat eukaryoottisolut, joilla on kyky absorboida MTX:ää, näyttävät olevan metotreksaatti-
35 herkkiä. Eräs tällainen käyttökelpoinen solulinja on CHO-linja CHO-K1 (ATCC-nro CCL 61).

Tuumorinekroositekijä otetaan talteen viljelmistä. Transformoidut erittämättömät solut hajotetaan äänikäsitte-
lyllä tai muulla hyväksyttävällä menetelmällä ja solujät-
teet erotetaan sentrifugoimalla, kun taas erittävistä so-
5 luista (kuten indusoiduista solulinjoista) saatavat super-
natantit yksinkertaisesti erotetaan soluista sentrifugoi-
malla. Sitten voidaan käyttää yhtä tai useampaa seuraavis-
ta vaiheista tai niiden sijasta kokonaan muita menetelmiä.
Seuraavaa menetelmää käytettiin tuumorinekroositekijän puh-
10 distamiseksi riittävässä määrin sekventointia varten. Tämä
ei välttämättä ole samanlainen kuin terapeutin tuotteen
vaatima puhdistus.

Ensimmäisessä puhdistusvaiheessa tuumorinekroosite-
kijä adsorboidaan hydrofobiselle aineelle hajotetusta vil-
15 jelmästä tai kasvualustasupernatantista. Hydrofobinen aine
on edullisesti muu kuin gelatiinipinta, joka on hydrofobi-
nen, kuten silikaatti tai polyolefiini, vaikka alkyyli-
Sephrose on myös soveltuva. Kontrolloitu huokoslasi on
edullinen suoritusmuoto. Kontrolloitua huokoslasiä sekoit-
20 tetaan supernatanttiin tilavuussuhteessa noin 1:50, ja ad-
sorboitumisen annetaan edetä noin 4°C:ssa sekoittamatta
noin 30 minuuttia - kaksi tuntia, edullisesti noin yksi
tunti, lievästi emäksisissä olosuhteissa. Adsorbentti tuli-
si yleensä sen jälkeen pestä soveltuvalla puskurilla siihen
25 tarttuneiden kontaminoivien proteiinien poistamiseksi.

Adsorboitunut tuumorinekroositekijä eluoidaan hydro-
fobiselta aineelta muuttamalla ympäröivän väliaineen solva-
tointiominaisuuksia. Eluointi voidaan tehdä johtamalla ai-
neen läpi liuosta, joka on puskuroitu pH-arvoon noin 7 -
30 8,5, edullisesti noin 8 ja joka sisältää 1 mmol/l suolaa ja
vaikuttavan määrän veteen sekoittuvan orgaanisen polyolin,
kuten esimerkiksi etyleeniglykolin tai glyseriinin, taval-
lisesti etyleeniglykolin, jonka osuus on noin 10-30 tila-
vuus-%, edullisesti noin 20 tilavuus-%, vesiliuosta. Opti-
35 miolosuhteet riippuvat luonnollisesti käytettävästä poly-
olista. Tuumorinekroositekijää sisältävät eluoituneet

fraktiot havaitaan tutkimalla in vitro jäljempänä kuvattavalla tavalla tai jollain muulla soveltuvalla tavalla. Monosyyttisoluviljelmän tuotteen puhdistuminen ja saanto tässä vaiheessa samoin kuin myöhemmissä vaiheissa esitetään

5 taulukossa I.

Taulukko I

HL-60-solujen kasvualustasta saadun ihmisen tuumorinekroositekijän puhdistus

Puhdistus- vaihe	Lopputila- vuus (ml)	Kokonais- proteiini (mg)	Sytolyytti- nen aktiivi- suus (yks.)	Suhteellinen ominaisaktii- visuus (yksik- köä/mg)	Puhdis- tuminen	Saanto (%)
Lähtöaine	58 000	1,964	$14,2 \times 10^6$	$0,007 \times 10^6$	-	-
Kontrolloitu huokoslasi- kromatografia	1 030	88,9	$11,1 \times 10^6$	$0,12 \times 10^6$	17	78,5
DEAE-selluloosa- kromatografia	285	9,05	$8,9 \times 10^6$	$0,98 \times 10^6$	140	62,7
Mono Q -proteiini- pikanestekroma- tografia	75	0,44	$6,9 \times 10^6$	$15,68 \times 10^6$	2,240	48,6
Preparatiinen SDS-PAG- elektroforeesi tai C4-RP-HPLC	6	0,028	$2,71 \times 10^6$ *	$96,79 \times 10^6$ *	13,387*	19,1*

*Korjattu SDS:n tai TFA:n ja propanolin aiheuttaman tuumorinekroositekijäaktiivisuuden osittaisen tuhoutumisen suhteen

Tuumorinekroositekijää puhdistetaan edelleen adsorboimalla se tertiaariselle tai kvaternaariselle anioninvaihtohartsille. Edullisia hartseja tähän tarkoitukseen ovat hydrofiiliset matriisihartsit, kuten silloitettu polystyreeni, dekstraani tai selluloosa, jotka on substituoitu alkyylitertiaarinen tai kvaternaarinen amino)ryhmillä. Tämän tyyppisiä kaupallisesti saatavia tuotteita ovat DEAE-selluloosa, QAE Sephadex ja kauppanimellä Mono Q myytävä tuote (kussakin näistä tuotteista alkyylisubstituentti on etyyli). Parhaita tuloksia saavutetaan proteiinien pikakromatografiamenetelmällä, jota kuvaa J. Richey (American Laboratory, lokakuu 1982) ja jossa käytetään Ugelstadin et al. [Nature 303 (1983) 95-96] mukaisia suurihuokosisia suurin piirtein yhdenmukaisia hiukkasia. Tämä menetelmä teki mahdolliseksi tuumorinekroositekijän puhdistamisen korkeaan puhtausasteeseen.

Puhdistaminen suurin piirtein homogeeniseksi saadaan aikaan vain erottamalla edelleen SDS-PAGE-elektroforeesilla tai C4-vastafaasisuurpainenestekromatografialla (RP-HPLC) jäljempänä kuvattavalla tavalla. Tämä tuote ei kuitenkaan ole terapiatarkoituksiin suositeltava, koska se on menettänyt oleellisesti aktiivisuuttaan joutuessaan SDS:n tai HPLC:n orgaanisen liuottimen vaikutuksen alaiseksi. Proteiinipitoisuus määritettiin M. Bradfordin [Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254] menetelmällä. Viimeisten puhdistusvaiheiden aikana proteiinipitoisuutta arvioitiin sekä aminohappokoostumuksen että myös aminohapposekvenssin perusteella. Tuumorinekroositekijä preparoidaan antamista varten sekoittamalla tuumorinekroositekijä, jolla on haluttu puhtausaste, fysiologisesti hyväksyttäviin kantaja-aineisiin, ts. kantaja-aineisiin, jotka ovat saajilleen myrkyttömiä käytettävinä annoksina ja pitoisuuksina. Yleensä tähän liittyy tuumorinekroositekijän yhdistäminen puskureihin, hapettumisenestoaineisiin, kuten askorbiinihappoon, pienimolekyyliin (alle 10 ryhmää) polypeptideihin, proteiineihin, aminohappoihin, hiilihydraatteihin glukoosi ja dekstriinit

mukaan luettuina, kelatoiviin aineisiin, kuten EDTA:aan ja muihin stabiloiviin ja täyteaineisiin. Kantaja tulisi formuloida siten, että se stabiloii tuumorinekroositekijän dimeeriksi ja/tai, edullisesti, trimeeriksi. Tämä saadaan aikaan välttämällä sellaisia suola- tai detergenttipitoisuuksia, jotka hajottavat tuumorinekroositekijän monomeereiksi. Myös sellaisia olosuhteita, joissa tuumorinekroositekijä aggregoituu korkeammiksi multimeereiksi, tulisi välttää. Yleensä käytetään ionitonta pinta-aktiivista ainetta, kuten Tween 20, liiallisen aggregoitumisen estämiseksi puhdistuksen samoin kuin kylmäkuivauksen tai vesiseoksena säilytyksen aikana. Tuumorinekroositekijän, jota on määrä käyttää terapeuttiseen antamiseen, tulee olla steriiliä. Tämä saadaan helposti aikaan suodattamalla tuote sterilovien suodatuskalvojen läpi. Tuumorinekroositekijä säilytetään yleensä kylmäkuivattuna.

Tuumorinekroositekijä voidaan yhdistää muihin kasvainten vastaisiin aineisiin, kuten kemoterapeuttisiin antibiootteihin (aktinomysiini-D, adriamysiini, aklasinomysiini A) tai immuunivastetta lisääviin tai stimuloiviin aineisiin, esimerkiksi immunoglobuliineihin, kuten gammaglobuliiniin, immunoglobuliinit, joilla on affiniteetti kasvainsolujen pinta-antigeenien suhteen, mukaan luettuina. Lisäksi, koska interferonit toimivat synergistisesti tuumorinekroositekijän kanssa soluhajotuskokeissa, on edullista yhdistää alfa-, beta- tai gamma-interferonia tuumorinekroositekijäkoostumuksiin tai tuumorinekroositekijää ja lymfotoksiinia sisältäviin koostumuksiin. Tyypillinen formula sisältää tuumorinekroositekijää ja gamma-interferonia aktiivisuusyksikkösuhteessa noin 0,1:1 - 200:1, yleensä 10:1, ja voi sisältää lymfotoksiinia korvaamassa osan tuumorinekroositekijästä. Näitä suhteita voidaan luonnollisesti muuttaa hoitokokemusten vaatimalla tavalla.

Tuumorinekroositekijäkoostumuksia annetaan eläimille, joilla on kasvaimia. Antotapa on tunnettujen menetelmien mukainen, esimerkiksi laskimon-, vatsakalvon-, lihaksen-

5 tai leesionsisäisinä infuusioina tai injektioina tai hidas-
tetusti vapauttavien systeemien avulla, kuten jäljempänä
kuvataan. Tuumorinekroositekijä annetaan leesionsisäisesti,
so. ruiskuttamalla suoraan, kiinteisiin kasvaimiin. Disse-
minoituneiden kasvaimien, kuten leukemian, ollessa kyseessä
10 tapahtuu antaminen edullisesti laskimonsisäisesti tai imu-
kudosjärjestelmään. Vatsa-alueen kasvaimia, kuten munasar-
jasyöpää, hoidetaan edullisesti vatsakalvonsisäisellä in-
fuusiolla käyttämällä vatsaontelodialyysilaitteistoa ja
15 vatsaontelolle sopivia liuoksia. Tuumorinekroositekijää
annetaan tavallisesti kuitenkin jatkuvana infuusiona, vaika
suuret kertaruiskeetkin ovat hyväksyttäviä.

Tuumorinekroositekijää annetaan edullisesti istu-
tettavissa olevasta hitaasti vapauttavasta tuotteesta. Esi-
15 merkkeinä järjestelmistä, jotka soveltuvat proteiineille,
joilla on tuumorinekroositekijädimeerejä tai -trimeerejä
vastaava molekyylipaino, ovat L-glutamiinihapon ja gamma-
etyyli-L-glutamaatin kopolymeerit [U. Sidman et al., Biopo-
lymers 22(1) (1983) 547-556], poly(2-hydroksietyyli-
20 laatti) [R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15 (1981)
167-277; ja R. Langer et al., Chem. Tech. 12 (1982) 98-105]
ja etyleenivinyyliaasetatti (R. Langer et al., *imibid.*).
Tämä valmiste istutetaan leikkauskohtaan, josta kasvain on
poistettu. Vaihtoehtoisesti tuumorinekroositekijä kapseloi-
25 daan puoliläpäiseviin mikrokapseleihin tai liposomeihin
kasvaimeen ruiskuttamista varten. Tämä antotapa on erityi-
sen edullinen kasvaimille, joita ei voida poistaa kirurgi-
sesti, esimerkiksi aivokasvaimille.

Annettava tuumorinekroositekijämäärä riippuu esi-
30 merkiksi antotavasta, kyseessä olevasta kasvaimesta ja po-
tilaan kunnosta. Leesionsisäiset injektiot vaativat vähem-
män tuumorinekroositekijää potilaan painoon nähden kuin
laskimonsisäinen infuusio, kun taas jotkut kasvaintyytit,
esimerkiksi kiinteät kasvaimet, näyttävät olevan resisten-
35 timpiä tuumorinekroositekijälle kuin toiset, esimerkiksi
leukemiakasvaimet. Siten hoitavan lääkärin on välttämätöntä

laskea annostus ja muuntaa antotapaa kohteena olevan kasvaimen vastaisen optimaalisen sytotoksisen vaikutuksen saavuttamiseksi vaadittavalla tavalla, joka voidaan määrittää esimerkiksi kasvaimesta otettujen kudoksenäytteiden avulla
5 tai tutkimalla oletettuja syöpämarkkereita, kuten karsinoembryoonista antigeenia, ottaen huomioon mahdollinen toksisuus kohotetuilla annoksilla. Tuumorinekroositekijäannokset aina annostukseen noin 120 $\mu\text{g}/\text{painokilo}/\text{vrk}$ asti laskimon-
sisäisesti annettuna on yleensä havaittu suurin piirtein
10 myrkyttömiksi ja tehokkaiksi in vivo.

Tuumorinekroositekijän ei uskota olevan sytotoksiselta aktiivisuudeltaan lajispesifinen, niin että muuta kuin ihmisen tuumorineksoositekijää, esimerkiksi nautai tai sikaperäistä tuumorinekroositekijää saatettaisiin voi-
15 da käyttää ihmisten kasvaimien hoitoon. On kuitenkin toivottavaa käyttää hoidettavasta lajista peräisin olevaa tuumorinekroositekijää autoantibodien mahdollisen muodostumisen estämiseksi.

Esimerkkien yksinkertaistamiseksi kuvataan tiettyjä
20 usein esiintyviä menetelmiä lyhyesti.

Plasmideja merkitään pikku-p-kirjaimella, joka on ennen isoja kirjaimia ja/tai numeroita tai niiden jälkeen. Tässä käytetyt lähtöaineplasmidit ovat kaupallisesti saatavia, ovat yleisön saatavissa rajoittamattomasti tai voi-
25 daan muodostaa saatavissa olevista plasmideista julkaistujen menetelmien mukaisesti. Lisäksi alalla tunnetaan muita vastaavia plasmideja ja ne ovat alaa tavanomaisesti hallitsevalle ilmeisiä.

DNA:n pilkkomisella tarkoitetaan DNA:n katkomista
30 katalyyttisesti entsyymillä, joka vaikuttaa vain tiettyihin DNA:n kohtiin. Tällaisia entsyymejä kutsutaan restriktioentsyymeiksi ja paikkaa, jolle kukin entsyymi on spesifinen, kutsutaan restriktiokohdaksi. "Osittaisella" pilkkomisella tarkoitetaan restriktioentsyymillä tehtävää epätäydellistä
35 pilkkomista, ts. valitaan olosuhteet, jotka johtavat DNA-substraatissa olevien joidenkin, mutta ei kaikkien, tiettyä

restriktioendonukleaasia vastaavien kohtien katkeamiseen. Tässä yhteydessä käytetyt eri restriktioentsyymit ovat kaupallisesti saatavia ja niiden yhteydessä käytettiin valmistajien antamia reaktio-olosuhteita, kofaktoreita ja muita
5 vaadittavia tekijöitä. Restriktioentsyymejä merkitään yleensä lyhentein, jotka koostuvat isosta kirjaimesta, jota seuraa muita kirjaimia ja sitten yleensä numero, joka edustaa mikro-organismia, josta kyseessä oleva restriktioentsyymi on alunperin saatu. Yleensä käytetään noin 1 µg plasmidi- tai DNA-fragmenttia ja noin 1 yksikkö entsyymiä noin
10 20 µl:ssa puskuriliuosta. Valmistaja ilmoittaa kullekin restriktioentsyymille sopivan puskurin ja substraatin määrät. Yleensä käytetään inkubointiaikoja noin yksi tunti 37 °C:ssa, mutta ne voivat vaihdella valmistajan ohjeiden mukaan.
15 Inkuboinnin jälkeen proteiini poistetaan uuttamalla fenolilla ja kloroformilla ja pilkottu nukleiinihappo otetaan talteen vesifraktiosta saostamalla etanolilla. Restriktioentsyymipilkkomista seuraa joskus harvoin hydrolysoiminen bakteerin alkalisella fosfataasilla terminaalisten
20 5'-fosfaattien, jotta saataisiin estetyksi DNA-fragmentin kahden restriktiopilkotun pään "sirkularisoituminen" eli suljetun lenkin muodostuminen, joka voisi estää toisen DNA-fragmentin sijoittamisen restriktiokohtaan. Ellei toisin mainita, plasmidien pilkkomista ei seuraa 5'-terminaalinen defosforylaatio. Defosforylaatiossa käytettävät menettelyt ja reagenssit ovat tavanomaisia (T. Maniatis et al. Molecular Cloning, 1982, s. 133-134).

Tietyn DNA-fragmentin "talteenotto" eli "eristäminen" restriktiopilkkomisesta tarkoittaa pilkkomistutesteseoksen erottamista polyakryyliamidigeenielektroforeesilla, mielenkiinnon kohteena olevan fragmentin identifioimista vertaamalla sen liikkuvuutta molekyylipainoltaan tunnettujen markkeri-DNA-fragmenttien liikkuvuuteen, halutun fragmentin sisältävän geelin osan poistamista ja geelin erottamista DNA:sta. Tämä menettely on yleisesti tunnettu. Katso
30 esimerkiksi R. Lawn et al., Nucleic Acids Res, 9 (1981)

6103-6114 ja D. Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 4057.

"Southern-analyysi" on menetelmä, jonka avulla varmistetaan DNA-sekvenssien läsnäolo pilkkomistuoteseoksessa tai DNA:ta sisältävässä koostumuksessa tekemällä hybridi-
5 saatio tunnetun leimatun oligonukleotidin tai DNA-fragmentin kanssa. Tässä yhteydessä, ellei toisin mainita, Southern-analyysillä tarkoitetaan pilkkomistuotteiden erottamista 1-%:isella agarosilla, denaturoimista ja siirtoa nitrosel-
10 luloosaan E. Southernin [J. Mol. Biol. 98 (1975) 505-517] menetelmällä ja hybridisoimista T. Maniatisin et al. [Cell 15 (1978) 687-701] kuvaamalla tavalla.

"Transformointi" merkitsee DNA:n tuomista organismiin siten, että tämä DNA on replikoitavissa, joko kromosomin ulkopuolisena osana tai kromosomiin integroituneena
15 elementtinä. Ellei toisin mainita, on tässä yhteydessä E. colin transformointiin käytetty menetelmä Mandelin et al. [J. Mol. Biol. 53 (1970) 154] CaCl_2 -menetelmä.

"Ligaatio" tarkoittaa fosfodiesterisidosten muodostamista kahden kaksisäikeisen nukleiinihappofragmentin välille (T. Maniatis et al., ibid., s. 146). Ellei toisin
20 mainita, ligaatio voidaan tehdä käyttämällä tunnettuja puskureita ja olosuhteita ja noin 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia ("ligaasia")/0,5 μg ligatoitavia DNA-fragmentteja, joiden
25 moolimäärät ovat suurin piirtein yhtä suuret.

DNA:n "preparoiminen" transformanteista tarkoittaa plasmidi DNA:n eristämistä mikrobiviljelmästä. Ellei toisin
mainita, voidaan käyttää Maniatisin et al. (ibid. s. 90) emäs/SDS-menetelmää.

30 "Oligonukleotidit" ovat lyhyitä yksi- tai kaksisäikeisiä polydeoksinukleotideja, jotka syntetisoidaan kemiallisesti tunnetuin menetelmin ja puhdistetaan sitten polyakryyliamidigeeleillä.

Kaikki lainaukset kirjallisuudesta ilmoitetaan viitteinä.
35

Esimerkki 1

Tutkimukset

Tuumorinekroositekijän ominaisuus määritettiin aiemmin kuvatulla solulyysitutkimuksella [B. Spoford, J. Immun. 112 (1974) 2111]. Hiiren L-929-fibroblastisoluja (ATCC CCL-929) kasvatettiin 96-syvennyksisissä tasapohjaisissa maljoissa (3040; Falcon Plastics, Oxnard, CA) tiheytenä 30 000 solua/syvennys (0,1 ml) aktinomysiini D:n (1 µg/ml) ja sarjalaimennetun tutkittavan näytteen (0,125 ml) läsnä ollessa. Soluja inkuboitiin kostutetussa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO₂, 37 °C:ssa. Tutkittava näyte poistettiin 18 tunnin kuluttua, maljat pestiin ja solujen hajoaminen detektoitiin värjäämällä maljat liuoksella, joka sisälsi 0,5 % kristalliviolettia metanolin liuoksessa (tilavuussuhteessa 1:1). Päätepisteet mikromaljoilla määritettiin automaattisella Microelislukulaitteella (Dynatech), jonka absorptioaallonpituus oli säädetty 450 nm:ksi ja transmissioaallonpituus 570 nm:ksi. Solut, jotka olivat alttiina vain kasvualustalle, toimivat 0-%:ista hajoamista vastaavana standardina ja 4 M guanidiinihydrokloridiliuoksella käsiteltyt solut katsoittiin 100-%:isesti hajonneiksi. Yksi yksikkö tuumorinekroositekijää on määritelmän mukaan se määrä tuumorinekroositekijää (0,125 ml:n tilavuudessa määritettynä) joka saa aikaan 50-%:isen solujen hajoamisen.

Tuumorinekroositekijä tutkittiin myös tuumorinekroosikokeella in vivo. Lyhyesti sanottuna tämä koe tehtiin kasvattamalla Meth A -sarkoomasoluja (5×10^5 solua) CB6F₁-naarashiirissä [(BALB/c x C57BL/6)F₁] 7-10 vuorokautta ja ruiskuttamalla sitten tuumorinsisäisesti tuumorinekroositekijänäyte. Hiiret tapettiin 24 tunnin kuluttua taivuttamalla niska, kasvaimet poistettiin ja nekroosi arvosteltiin histologisesti E. Carswellin et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (1975) 3666-3670] kuvaamalla tavalla.

Esimerkki 2

PBL:ien tai monosyyttisolulinjan käyttö tuumorinekroositekijän syntetisoimiseen

Ihmisen HL-60-promyelosyyttisolulinjan alkuviljelmää, jonka solutiheys oli 1×10^5 solua/ml, kasvatettiin 2 litran telapulloissa (890 cm^2) käyttämällä 500 ml RPMI 1640 -alustaa (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), joka sisälsi 10 mmol/l HEPES:iä, 0,05 mmol/l - merkaptetaanolia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 10 % naudan sikiöseerumia. Kun oli kasvatettu kolme vuorokautta 37 °C:ssa, jolloin solutiheys oli saavuttanut arvon $8-12 \times 10^5$ solua/ml, solut kerättiin sentrifugoimalla kiihtyvyydellä $1\,000 \times g$ 10 minuuttia, pestiin kahdesti seerumivapaalla RPMI 1640 -alustalla ja siirrostettiin yllä kuvattuun alustaan, joka ei kuitenkaan sisältänyt seerumia, solutiheydeksi $15-20 \times 10^5$ solua/ml. Soluja kasvatettiin 2 litran telapulloissa PMA:n (10 mg/ml) läsnä ollessa. 16-24 tunnin kuluttua solut poistettiin suodattamalla 3 µm:n Sealkleen-suodattimen läpi (Pall Trinity Micro Corp., Cortland, NY). Kirkas suodos tutkittiin tuumorinekroositekijän suhteen ja sitä käytettiin jatkopuhdistukseen ja karakterisointiin. Tällä menettelyllä saatiin tuumorinekroositekijää noin 400 yksikköä/ml viljelmäsupernatanttia.

Myös ihmisen ääreisverimonosyyttejä käytettiin tuumorinekroositekijän tuotantoon. Verihiutalefereesitähteet toimitti American Red Cross, Boston, MA ja ne käytettiin 24 tunnin kuluessa keräämisestä. Monosyyttien ensimmäinen erotus erytrosyyteistä tehtiin sentrifugoimalla Ficoll-Hypaquegradientteja käyttäen kiihtyvyydellä $1\,000 \times g$ 30 minuuttia. Rajapinnalle kertyneet solut pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella. Kuluttain luovuttajalta peräisin olevia soluja kasvatettiin erikseen 2 litran telapulloissa seerumittomassa RPMI 1640 -alustassa tiheytenä $2,5 \times 10^6$ solua/ml. Viljelmään lisättiin 1 µg/ml stafylokokkienterotoksiini B:tä (SEB) ja yhdis-

- telmätymosiini α -1: kumpaakin ja soluja kasvatettiin kostu-
tetussa atmosfäärissä, joka sisälsi 10 % CO₂, 37°C:ssa.
24-72 tunnin kuluttua, luovuttajasta riippuen, solusuper-
natantit otettiin talteen ja käsiteltiin HL-60-solulinjas-
5 ta saadun supernatantin yhteydessä kuvatulla tavalla. PBL-
viljelmistä saadut tuumorinekroositekijäsaannot vaihtelivat
suuresti käytetyistä indusioijista riippuen. PMA:n lisäämi-
nen edellä kuvattuun induktiosysteemiin lisäsi solusuper-
natanttien sytolyyttistä aktiivisuutta. Solusupernatantit
10 sisälsivät kuitenkin sekä tuumorinekroositekijää että lym-
fotoksiinia (lymfotoksiinin tai tuumorinekroositekijän mää-
rittäminen tuumorinekroositekijän ja lymfotoksiinin seoksis-
ta tehtiin suorittamalla solulyysikokeet näytteillä, joita
oli esi-inkuboitu tuumorinekroositekijän tai lymfotoksiinin
15 vaikutuksen kumoavan kaniini vasta-aineen läsnä ollessa ja
määrittämällä jäännösaktiivisuus kokeella, jossa tutkittiin
L-929-solujen hajoamista).

Esimerkki 3

- Kontrolloidusta huokoslasista valmistetuilla helmil-
20 lä tehtävä kromatografia

- Tuumorinekroositekijäaktiivisuus absorboitiin solu-
viljelmästä panosmenetelmällä kontrolloituihin huokoslasi-
helmiin (Electro-Nucleonics, Fairfield, NJ. luettelo-nro
CPG 00350), jotka oli tasapainotettu käyttämällä 10 mM nat-
25 riumfosfaattipuskuria, pH 8,0, sekoittaen tasaisesti 4°C:ssa.
Lasihelmiä käytettiin 100 ml/5 l alustaa. Kun oli sekoitet-
tu yksi tunti, helmien annettiin laskeutua ja supernatant-
ti dekantoitiin pois. Sitten helmet kaadettiin huoneen läm-
pötilassa 5 x 50 cm:n kolonniin ja pestiin 10 mM natrium-
30 fosfaattipuskurilla, pH 8,0, joka sisälsi 1 mol/l NaCl.
Tuumorinekroositekijäaktiivisuus eluoitiin lasihelmistä
liuoksella, joka sisälsi 20 % etyleeniglykolia ja 1 mol/l
NaCl 10 mM natriumfosfaattipuskurissa, pH 8,0. HL-60-super-
natantin eluoitumiskäyrä kolonnista esitetään kuviossa 1.

Esimerkki 4

DEAE-selluloosakromatografia

Esimerkistä 3 saatu eluaatti syötettiin suoraan DEAE-selluloosa 53 (Whatman) sisältävään kolonniin (2,5 x 20 cm),
5 joka oli tasapainotettu 10 mM natriumfosfaattipuskurilla, pH 8,0, joka sisälsi 0,01 % Tween 20, käyttäen virtausnopeutta noin 500 ml/h. Kun virtausnopeus kolonnissa oli säädetty arvoon 100 ml/h, lisättiin $4,2 \times 10^6$ yksikköä tuumorinekroositekijää 1 080 ml:n näytteessä 4°C:ssa, kolonni
10 huuhdottiin tasapainotuspuskurilla ja tehtiin eluointi käyttäen portaittaista gradienttia 75, 150 ja 500 mmol/l natriumkloridia 10 mM fosfaattipuskurissa (pH 8,0). Eluaatin absorbanssia aallonpituudella 280 nm ja tuumorinekroositekijäaktiivisuutta seurattiin eluoitujen fraktioiden funktiona.
15 Tulokset annetaan kuviossa 2.

Esimerkki 5

FPLC (proteiinien nopea kromatografia)

Esimerkissä 4 saatu tuumorinekroositekijäaktiivisuuden sisältävä fraktio väkevöitiin ja dialysoitiin 20 mM
20 Tris.HCl-puskuria (pH 8,0), joka sisälsi 0,01 % Tween 20 ja 1 mmol/l natriumatsidia (puskuri A) vastaan Amicon-sekoituskennoilla käyttämällä YM-10-kalvoa tai muuta dialyysikalvoa, jonka molekyylipainoraja on TNF:n molekyylipainon alapuolella. Kalvo pestiin kahdesti puskuri A:lla. Kolonni,
25 joka sisälsi kvaternaarisilla ammoniumryhmillä substituoituja Sepharose-helmiä (9,8 µm:n helmiä 5 x 0,5 cm:n kolonnissa; myydään nimellä Mono Q -hartsi, Pharmacia) ja joka oli sijoitettu FPLC-yksikköön (proteiinipikakromatografia) (Pharmacia), joka oli varustettu gradienttiohjelmointiyksiköllä (GP-500) ja kahdella pumpulla (P-500), tasapainotettiin ennalta dialyysipuskureilla virtausnopeudella 1 ml/min J. Richeyn (American Laboratory, lokakuu 1982, s. 1) tarkemmin kuvaamalla tavalla. Yhdistetyt huuhtoutuneet liuokset ja dialyysikonsentraatti laitettiin kolonniin,
35 kolonni huuhdottiin puskuri A:lla ja eluoitiin sitten käyttäen lineaarista gradienttia 40-75 mmol/l natriumklo-

ridia puskuri A:ssa. Lineaariset gradientit ohjelmoitiin seuraavasti 5,1 - 5 minuuttia, 25 mM NaCl; 15,1 - 25 minuuttia, 40 mM NaCl; 25-60 minuuttia, lineaarinen gradientti 40 → 75 mM NaCl; 60-65 minuuttia 75 mM NaCl; 65,1 - 70 minuuttia, 100 mM NaCl; 70-80 minuuttia, lineaarinen gradientti 100 → 1 000 mM NaCl; 80-90 minuuttia, 100 mM NaCl; 90,1 - 110 minuuttia tasapainotuspuskuri. Effluentti kerättiin 2 ml:n fraktioina, joista tutkittiin absorbanssi aallonpituudella 280 nm, ominaisjohtokyky ja tuumorinekroositekijäaktiivisuus. Tulokset esitetään kuviossa 3.

Esimerkki 6

Kromatofokusointi

Kromatofokusointi tehtiin käyttäen Pharmacia Mono P -kolonnia (20 x 0,5 cm) esimerkin 5 mukaisessa FPLC-systeemissä. Biologisesti aktiivinen (tuumorinekroositekijä) fraktio, joka eluoitui esimerkissä 5 fraktioissa 37-45, väkevöitiin ja dialysoitiin Amicon-sekoituskennoilla YM-10-kalvoa käyttäen kolonnin tasapainotuspuskuria, ts. 0,025 M bis-Tris.HCl:ää (pH 6,7), vastaan. Näyte syötettiin Mono P -kolonniin huoneen lämpötilassa ylähaaran kautta virtausnopeudella 1 ml/min. Kolonnia huuhdottiin tasapainotuspuskurilla, kunnes absorbanssi aallonpituudella 280 nm palasi perustasoon ja eluoitui sitten lineaarisella pH-gradientilla, joka saatiin aikaan huuhtomalla kolonnin 7,5-%:isella polypuskuri 74:llä (pH 4,7) (Pharmacia). Kerättiin 1 ml:n fraktioita ja rekisteröitiin absorbanssi aallonpituudella 280 nm ja pH. Tulokset esitetään kuviossa 4. Kuten kuvioista 4 on havaittavissa, oli tuumorinekroositekijän isoelektrinen piste noin 5,3.

Esimerkki 7

Preparatiivinen SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi

Valmistettiin 15-%:iset polyakryyliamidigeelit (11 x 16 cm), joiden paksuus oli 1,5 - 3,0 mm, U. Laemmelin [Nature 227 (1970) 680-685] menetelmän muunnosta käyttäen. Sekä erottavat että tarttuvat geelit sisälsivät 0,1 % SDS:ää

ja 0,05 % Tween 20. Muut puskurit ja silloitusreagenssi olivat samat kuin analyyttisissä SDS-PAGE-geeleissä. Esimerkin 5 tai 6 mukaiset fraktiot, jotka sisälsivät tuumorinekroositekijäaktiivisuutta, yhdistettiin, väkevöitiin ja dialysoitiin 6,25 mM Tris.HCl:ää (pH 7,0), joka sisälsi 0,005 % SDS, vastaan Amicon-sekoituskennoilla käyttämällä YM-10-kalvoa. Dialysoidun konsentraatin poistamisen jälkeen kalvo pestiin kolmesti pienellä tilavuudella näytepuskuriä (0,2 % SDS:ää, 0,02 % Tween 20, 30 % glyserolia, 0,03 mol/l Tris.HCl (pH 6,8) ja 0,005 % tunnistusväriä). Dialysoitu konsentraatti ja pesuliuokset yhdistettiin (kokonaistilavuus 1-4 ml), lisättiin mahdollisesti merkapttoetanolia SDS-PAGE-pelkistysolosuhteiden aikaansaamiseksi, ja näyte laitettiin tarttuvaan geelin valettuun suureen syvennykseen. Näytesyvennyksen viereisiin pieniin syvennyksiin laitettiin ennalta värjättyjä molekyylipainomarkkereita fosforylaasia (94 K), naudan seerumialbumiini (67 K), ovalbumiinia (43 K), karbonianhydraasi (30 K), soijapaputrypsiini-inhibiittori (20 K) ja lysotsyymi (14,4 K). Geelejä ajettiin pystysuorassa elektroforeesisysteemissä (Biorad), joka oli jäähdytetty 12 °C:seen, vakiovirralla 20 mA/mm (geelin paksuus), kunnes tunnistusväri saavutti geelin alareunan.

Elektroforeesin jälkeen poistettiin yksi lasilevyistä geeliltä, ja todettiin molekyylipainomarkkerien sijainnit. Tuumorinekroositekijänäytteen sisältävä kaista leikattiin sitten 0,25 cm:n paloihin markkeriproteiinien molekyylipainojen mukaisesti. Nämä geelipalat laitettiin sitten polypropyleeniputkiin, jotka sisälsivät 1-2 ml 10 mM ammoniumbikarbonaattiliuosta (pH 8,0), joka sisälsi 0,01 % Tween 20 ja annettiin eluoitua 16 tuntia 4 °C:ssa. Eluaateista tutkittiin sitten tuumorinekroositekijäaktiivisuus, tulokset esitetään kuviossa 5. Tuumorinekroositekijän molekyylipaino SDS-geelillä oli noin 17 000 sekä pelkistävässä että pelkistämättömissä olosuhteissa, mikä viittaa yksiketjuiseen molekyyliin.

Proteiini otettiin geelipalaeluaateista talteen suo-
loista ja pienimolekyyllisistä aineista vapaana seuraavan
käsittelyn avulla: Valmistettiin pienet kolonnit, jotka si-
sälsivät 0,2 ml Sep-pak C18 -hartsia, joka oli esihuuhdot-
5 tu asetonitriilillä, 1-propanolilla, 1-%:isella trifluori-
etikkahapolla (TFA) ja tislatusella vedellä ja tasapainotet-
tu sitten 10 mM ammoniumbikarbonaatilla, joka sisälsi 0,01 %
Tween 20 (pH 8,0). Geelieluaatti syötettiin kolonniin ja
kerättiin effluentti. Sitten hartsi huuhdottiin tislatusella
10 vedellä ja 0,1-%:isella TFA:lla, joita kumpaakin käytettiin
noin 5 ml, vapaiden aminohappojen ja puskurisuolojen pois-
tamiseksi. Tuumorinekroositekijä eluoitiin kolonnista
1 ml:lla liuosta, joka sisälsi 50 % 1-propanolia 0,1-%:ises-
sa TFA:ssa. Tehtiin vielä lisäksi eluoinnit liuksilla,
15 jotka sisälsivät 50 % 1-propanolia 1-%:isessä TFA:ssa ja
99 % 1-propanolia 1-%:isessä TFA:ssa (1 ml kumpaakin liuos-
ta), mutta yleensä proteiini eluoitui ensimmäisellä pusku-
rilla. Tuumorinekroositekijän biologisesta aktiivisuudesta
tuhoutui noin 80 % tässä vaiheessa. Vaikka täten saatua
20 tuumorinekroositekijää voidaan käyttää sekvenssianalyy-
siin, on edullista käyttää tähän tarkoitukseen esimerkissä
8 kuvattavaa HPLC-effluenttia.

Esimerkki 8

HPLC-kromatografia

25 Luontaisen, muuttumattoman tuumorinekroositekijän
molekyyllipaino määritettiin suurpainegeelipermeaatiokroma-
tografialla. Tämä tehtiin huoneen lämpötilassa käyttäen TSK
G2000 SW -geeliä sisältävää HPLC-kolonnia (Alltech Associates,
Deerfield, IL) (7,5 x 60 mm). 1 ml:n näyte esimerkissä 5
30 saatua puhdistettua tuumorinekroositekijää, joka sisälsi
noin 1 µg proteiinia ja 16 000 aktiivisuusyksikköä, eluoitiin
isokraattisesti geelikolonnista virtausnopeudella
0,5 ml/min eluenttina 0,2 M natriumfosfaattipuskuri, pH 7,0.
Kolonne kalibroitiin naudan seerumialbumiinilla (M = 66 000),
35 ovalbumiinilla (M = 45 000), naudan karbonianhydraasi B:llä
(M = 29 000) ja lysotsyymillä (M = 14 300). Kerättiin

1 ml:n fraktioita, joista tutkittiin tuumorinekroositeki-
jäaktiivisuus. Fraktiot, joissa oli tuumorinekroositeki-
jäaktiivisuutta, eluoituivat molekyylipainoa 45 000 ±
6 000 vastaavalla kohdalla (kuvio 6).

5 Esimerkki 9

RP-HPLC

Tuumorinekroositekijä puhdistettiin myös RP-HPLC-
:llä käyttämällä C4 Synchropak -kolonneja Water's Asso-
ciates, Inc:n kromatograafisiin järjestelmiin kirjalli-
10 suudessa kuvatulla tavalla [W. Kohr et al., Anal. Bio-
chem. 122 (1982) 348-359]. Proteiinipiikit detektoitiin
aallonpituuksilla 210 ja 280 nm, kun oli tehty eluointi
lineaarisella gradientilla 1 → 23 tilavuus-% 1-propanolia
0,1-%:isessa TFA:ssa ensimmäiset 15 minuuttia ja 23 → 30
15 tilavuus-% 1-propanolia 0,1-%:isessa TFA:ssa seuraavat 15
minuuttia virtausnopeuden ollessa 1 ml/min. Piikeistä
analysoitiin sytolyyttinen aktiivisuus. Orgaaniset liuot-
timet, joita käytettiin tuumorinekroositekijän eluoimi-
seen C4-kolonnista, alensivat tuumorinekroositekijäaktii-
20 visuutta noin 80 %. Tällä menetelmällä puhdistettu tuumo-
rinekroositekijä kuivattiin alipaineessa ja käsiteltiin
sitten aminohappoanalyysiä ja sekventointia varten. Tu-
lokset esitetään kuviossa 7. Kuvio 7 osoittaa, että esi-
merkin 5 effluentin mukana saatu tuumorinekroositekijä
25 sisälsi biologisesti inaktiivisia proteiiniepäpuhtauksia,
jotka eluoituivat noin 16 ja 19 minuutin retentioajoilla.
C4-RP-HPLC:stä saatu biologisesti aktiivinen effluentti
oli suurin piirtein homogeenista aminohapposekvenssiä ar-
vosteluperusteena käytettäessä.

30 Esimerkki 10

Tuumorinekroositekijän aminohapposekvenssin osit-
tainen määrittäminen

Tuumorinekroositekijä pilkottiin trypsiinillä seu-
raavasti: Esimerkin 9 mukaisesti saatu homogeeninen tuu-
35 morinekroositekijä liuotettiin, kuivattiin ja liuotettiin
takaisin 100 mM ammoniumbikarbonaattipuskuriin (pH 8,0),
joka sisälsi 5 paino-% TPCK-trypsiiniä (Worthington

Biochemicals), 1 mmol/l CaCl_2 ja 0,01 % Tween 20, entsyymin ja substraatin välisen suhteen ollessa 1:20, inkuboitiin kuusi tuntia 37°C :ssa, lisättiin vielä 5 paino-% trypsiiniä ja inkuboitiin hydrolyysiseosta vielä 12 tuntia 37°C :ssa. Reaktioseos laitettiin edellä kuvatun kaltaiseen C4-HPLC-kolonneihin peptidifragmenttien erottamiseksi. Tulokset esitetään kuviossa 8. Saatiin kaikkiaan yhdeksän fragmenttia (fragmentit 2 ja 2' eluoituivat yhdessä piikinä, josta kuviossa 8 käytetään merkintää T2). 10. fragmentin uskotaan jääneen pidättymättä kolonneihin. Esimerkkien 8 ja 9 mukaisten kokonaisten tuumorinekroositekijöiden ja tässä esimerkissä saatujen trypsiinihydrolyysifragmenttien aminohapposekvenssit määritettiin automaattisella jaksoittaisella Edman-hajotuksella käyttämällä muunnettua Beckman-sekventoijaa (malli 890B), joka oli varustettu kylmäloukuilla. Kupissa käytettiin kantajana polybreeniä (1,25 mg). Kokonaisen molekyylin aminohappokoostumuksen perusteella on kokonaisen tuumorinekroositekijän molekyylipaino 17 100. Tämä luku sopii yhteen SDS-PAGE-tulosten kanssa ja vahvistaa sitä, ettei glykosylaatiota esiinny.

Esimerkki 11

Tuumorinekroositekijän ja gamma-interferonin synergistinen vaikutus

Hiiren melanooma B16 -solut (Mason Research, Worcester, MA., C57B1/6-peräinen solulinja) ympättiin mikromaljalalle tiheydeksi 5 000 solua/syvennys ja inkuboitiin neljä tuntia 37°C :ssa kostutetussa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO_2 , ennen lymfokiinien lisäämistä. Esimerkin 1 mukaisesti saatu tuumorinekroositekijä puhdistettiin suurin piirtein homogeenisesti HPLC:llä ja sen aktiivisuuden määrä analysoitiin edellä kuvatulla kokeella, jossa tutkittiin L929-solujen hajoamista. Samoin määritettiin hiiren puhdistetun yhdistelmägamma-interferonin [P. Gray et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 80 (1983) 5842-5846] virusten vastainen aktiivisuus EMC-infektoituja L-soluja vastaan [D. Goeddel et al., Nature (London) 287 (1980) 411-416].

Hiiren gamma-interferoni ja ihmisen tuumorinekroositekijä laimennettiin erikseen kuviossa 10 esitettävällä tavalla. Merkittyyihin syvennyksiin lisättiin ensin gamma-interferonia ja heti sen jälkeen laimennettua tuumorinekroositekijää
5 lopullisen tilavuuden ollessa 0,2 ml/syvennys. 72 tuntia kestäneen inkuboinnin lopussa solut värjättiin liuoksella, joka sisälsi 0,5 % kristalliviolettiä 20-%:isessä metanolissa. Tulokset esitetään kuviossa 10. B16 on suhteellisen resistentti sekä pelkälle tuumorinekroositekijälle että
10 pelkälle IFN- γ :lle; tuumorinekroosipitoisuudella 1 000 yksikköä/ml ei havaittu silminnähtävää sytolyysiä. Hyvin pienten gamma-interferonimäärien lisääminen (jopa niin vähän kuin 5 yksikköä/ml) johti kuitenkin sytolyysiin.

Esimerkki 12

15 Lähetä-RNA:n eristäminen

HL-60-soluviljelmistä (4 tuntia PMA-induktion jälkeen) tai esimerkissä 2 kuvatulla tavalla viljellyistä ääreisverilymfosyyteistä eristettiin kokonais-RNA suurin piirtein Wardin et al. [J. Virol. 9 (1972) 61] kuvaamalla
20 tavalla. Solut pellettoitiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin sitten uudelleen liuokseen, joka sisälsi 10 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris.HCl (pH 7,5) ja 1,5 mmol/l $MgCl_2$. Solut hajotettiin lisäämällä NP-40 (loppupitoisuudeksi 1 %) ja tumat pellettoitiin sentrifugoimalla. Supernatantti si-
25 sälsi kokonais-RNA:n, joka puhdistettiin edelleen uuttamalla useaan kertaan fenolilla ja kloroformilla. Vesifaasin NaCl-pitoisuus säädettiin 0,2 mol/l:ksi, ja saostettiin sitten kokonais-RNA lisäämällä kaksinkertainen tilavuus etanolia. Tyypillinen saanto 1 g:sta viljeltyjä soluja oli
30 noin 6 mg kokonais-RNA:ta. Polyadenyloitu mRNA (n. 100 μ g) saatiin käsittelemällä oligo(dT)selluloosalla H. Avivin et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 1408-1412] menetelmällä.

Esimerkki 13

DNA-kirjasto

7,5 µg esimerkissä 12 saatua poly(A)⁺-mRNA:ta muu-
tettiin kaksisäikeiseksi cDNA:ksi käsittelemällä peräk-
kain käänteistranskriptaasilla, DNA-polymeraasin Klenow-
fragmentilla ja S1-nukleaasilla [P. Gray et al., Nature
295 (1982) 503-508; M. Wickers et al., J. Biol. Chem. 253
(1978) 2483-2495]. Polyakryyliamidigeeliltä eristettiin
noin 80 ng cDNA:ta, jonka pituus oli enemmän kuin 600
emäsparia.

Synteettinen DNA-adaptorisekvenssi

5'AATTCATGCGTTCTTACAG 3'

3'GTACGCAAGAATGTC 5'

15

ligatoitiin cDNA:han tarttuvan EcoRI-pään muodostamiseksi. Kuten alalla on tavanmukaista, adaptor syntetisoitiin kemiallisesti kahtena erillisenä säikeenä, toisen säikeen 5'-pää fosforyloitiin polynukleotidikinaasilla ja
saadut kaksi säiettä emäspariutettiin. Sitten eristettiin
cDNA (20 ng) uudelleen polyakryyliamidigeeliltä, sijoitettiin ligaation avulla EcoRI-pilkottuun λgt-10:een,
pakattiin faagipartikkeleihin ja lisättiin E. coli -kannassa C600hfl (Hyunh et al., Practical Approaches in Biochemistry, IRL Press Ltd., Oxford, England, 1984) tai
muhun lambdafaagin lisäämiseen soveltuvassa kannassa.
Saatiin noin 200 000 itsenäistä kloonia sisältävä cDNA-kirjasto.

Esimerkki 14

Deoksioligonukleotidikoettimen valmistaminen tuumorinekroositekijä-cDNA:ta varten

42 nukleotidin DNA-hybridisaatiokoetin, joka perustui trypsiinikäsittelyllä saadun tuumorinekroositekijäpeptidin TD-6 (E-T-P-E-G-A-E-A-K-P-W-Y-E-K-) alustavaan aminohappojaksoon, suunniteltiin käyttäen hyväksi julkaistuja kodonien käyttötiheystietoja [R. Grantham et al., Nucleic Acids Res. 9 (1981) 43-47] ja ihmisen IFN γ :n [P. Gray

et al., 295 (1982) 503-508] ja ihmisen lymfotoksiinin kodonien suosimistietoja. Alustavassa sekvenssissä oli virhe (viimeisen K:n olisi pitänyt olla P). Tämä sekvenssi johti kuitenkin onnistuneeseen koettimeen. Synteettisen koettimen
 5 sekvenssi oli 5'dGAAACCCCTGAAGGGGCTGAAGCCAAGCCCTGGTATGAAAAG
 3' ja se syntetisoitiin R. Crean et al. [Nucleic Acids Res. 8 (1980) 2331-2348] menetelmällä. Koetin fosforyloitiin (λ - 23 P)-ATP:llä ja T4-polynukleotidikinaasilla kirjallisuudessa kuvatulla tavalla [Goeddel et al., Nature 281 (1979)
 10 544].

Esimerkki 15

Tuumorinekroositekijää koodaavia jaksoja sisältävän cDNA-kloonin identifioiminen

λ gt 10 -cDNA-kirjaston noin 200 000 kloonia tutkit-
 15 tiin DNA-hybridisaatiolla käyttäen 32 P-leimattua 42-meeriä (esimerkki 14) ankaruudeltaan lievissä olosuhteissa A. Ulrichin et al. mukaisesti [EMBO J. 3 (1984) 361364] (tai vaihtoehtoisesti P. Grayn et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 5842-5846], S. Andersonin et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 6836-6842] ja M. Jayen et al. [Nucleic Acids Res. 11 (1983) 2325-2335] menetelmällä). Yhdeksän eri kloonia hybridisoitui koettimen kanssa ja ne puhdistettiin täplämenetelmällä. Sitten valmistettiin 32 P-leimattu cDNA käyttämällä indusoimattomien HL-60-solujen
 25 mRNA:ta. Näistä yhdeksästä faagikloonista seitsemän DNA ei hybridisoitunut tämän "indusoimattoman" koettimen kanssa ja niiden pääteltiin siten olevan ehdokkaita tuumorinekroositekijä-cDNA-sekvensseiksi. Suurimman insertin sisältävälle cDNA-kloonille annettiin nimeksi λ 42-4. Tämä insertti sekventoitiin dideoksiketjuterminaatiomenetelmällä [A. Smith, Methods in Enzymology 65 (1980) 560-580; F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467], sen jälkeen kun se oli subkloonattu vektoriin M13mp8 [J. Messing et al., Nucleic Acids Res. 9 (1981) 309-321].
 30

35 λ 42-4:lle saatu cDNA-sekvenssi sisälsi koko valmis- ta tuumorinekroositekijää ynnä osaa sen signaalipeptidistä koodaavan alueen. DNA:n oikea orientaatio ja lukukehys pääteltiin vertaamalla tuumorinekroositekijän trypsiinipilkko-

mispeptidin T4 aminohapposekvenssiin. Proteiinisekventoinnilla määritetty tuumorinekroositekijän aminotermiinalinen valiini-ryhmä on aminohappo 1 ja sitä seuraa 156 muuta aminohappoa, ennen kuin lukukehyksessä kohdataan lopetuskodoni. Laskettu molekyylipaino on 17 356 daltonia.

Esimerkki 16

Koko PreTNF:ää koodaavat sekvenssit sisältävän cDNA-kloonin identifiointi

cDNA-klooni λ 42-4 sisältää valmiin TNF:n koko koodausalueen, mutta siitä puuttuu täydellistä signaali-peptidiä koodaava sekvenssi, mistä on osoituksena aloituskodonin puuttuminen. Puuttuvien sekvenssitietojen saamiseksi syntetisoitiin kemiallisesti heksanukleotidialue dTGGATGTTTCGTCCTCC (komplementaarinen nukleotideille 855870, kuvio 10). Tämä alue emäspariutettiin esimerkin 12 mukaiseen mRNA:han ja syntetisoitiin sitten cDNA esimerkin 13 mukaisella menetelmällä. Valmistettiin uusi, noin 200 000 cDNA-kloonin sisältävä kirjasto gt10:ssä esimerkin 13 mukaisella menetelmällä. Tämä kirjasto tutkittiin hybridisaatioanalyysillä käyttäen koettimena λ 42-4-cDNA-inserttiä, joka oli leimattu 32 P:llä. Saatiin 16 positiivista kloonin joista pisin (λ 16-4) sisälsi cDNA-insertin, joka ulottui 337 emäsparia kauemmaksi 5'-suuntaan kuin λ 42-4-insertti. TNF-cDNA-inserttien λ 16-4:n (nukleotidit 1-870) ja λ 42-4:n (nukleotidit 337-1643) yhdistetty sekvenssi esitetään kuviossa 10.

Esimerkki 17

Ilmentymisvektorin muodostaminen tuumorinekroositekijän suoraa ilmentämistä varten

Menettely, jota käytettiin esimerkissä 15 saadun tuumorinekroositekijää vastaavan DNA-sekvenssin ilmentämiseen esitetään kuviossa 11. Esimerkin 15 mukainen faagi λ 42-4, joka sisälsi koko valmista tuumorinekroositekijää koodaavan jakson ja osan tuumorinekroositekijän oletustaeritysesijaksosta, pilkottiin EcoRI:llä ja otettiin talteen noin 800 emäsparin fragmentti, joka sisälsi tuumori-

nekroositekijää koodaavan alueen. Tämä fragmentti pilkottiin *AvaI*:llä ja *HindIII*:lla ja otettiin talteen 578 emäsparin fragmentti ("C" kuviossa 11). Tämä fragmentti koodaa tuumorinekroositekijän aminohappoja 8-157.

- 5 Valmistettiin kaksi synteettistä deoksioligonukleotidia (fragmentti "B" kuviossa 11) (ks. adaptorisekvenssin muodostaminen esimerkissä 13), joiden 5'-päässä oli tarttuva *XbaI*-pää ja 3'-päässä tarttuva *AvaI*-pää ja jotka sisälsivät met-aloituskodonin ja tuumorinekroositekijän seitsemää ensimmäistä aminotermiinalista aminohappoa vastaavat kodonit. Näitä aminohappoja vastaavat kodonit valittiin *E. coli* -preferenssin perusteella. Aloituskodonin edellä oleva AATT-sekvenssi valittiin sopivalla tavalla erottamaan aloituskodoni *trp*-ribosomisisäisessä sekvenssistä ja yhdistetty-
- 10
15 nä aminohappokodoneihin estämään mahdollinen mRNA-silmukka.

- Sitten segmentit B ja C liitetään kolmella ligatiolla pBR322-johdokseen, joka sisältää *trp*-promoottorijakson ja *trp*-esipeptidin Shine-Dalgarno-jakson (EP-hakemuskokous 36 766). Valitaan tai muodostetaan johdos, joka
- 20 sisältää ainutkertaiset *XbaI*- ja *HindIII*-kohdat *trp*-promoottorin ja Tet^R-geenin välissä. Joko pLT*trp1* [Gray et al., Nature 312 (1984) 721-724] tai ptrpETA [Gray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 2645-2649] ovat soveltuvia tämentyyppisiä lähtövektoreita, vaikka muitakin voidaan
- 25 muodostaa pBR322:sta, *trp*-promoottorista ja mahdollisesti tarvittavista synteettisistä kytkijöistä. Sekä pBR322 että *trp*-promoottorin sisältävät plasmidit ovat yleisesti saatavilla. Valitun vektorin pBR322-osasta voi puuttua *AvaI*-PvuII-segmentti emäsparien 1424 ja 2065 välistä (tällöin
- 30 käytetään plasmidin nimessä merkintää "XAP"). Mikä tahansa edellä mainituista plasmideista pilkotaan samanaikaisesti *XbaI*:llä ja *HindIII*:lla ja otetaan talteen suuri vektori-fragmentti. Tämä fragmentti ja fragmentit B ja C ligatoidaan T4-DNA-ligaasin avulla ja ligaatioseoksella transformoidaan *E. coli* 294 (ATCC 31 446). Valikoitiin ampicilliniresistentit pesäkkeet, otettiin talteen plasmidi-DNA ja
- 35

ja karakterisoitiin sen restriktioendonukleaasikartoituksella ja DNA-sekventoinnilla. Saatiin pTrpXAPTNF, joka sisälsi insertit B ja C.

Esimerkki 18

- 5 Tuumorinekroositekijän ilmentyminen E. colissa
E. colia (ATCC 31 446), joka oli transformoitu pTNFtrp:llä, kasvatettiin M9-alustassa, joka sisälsi 20 μ g/ml ampicilliinia ja viljelmä kasvatettiin optiseen tiheyteen $A_{550} = 0,3$. Lisättiin indolietikkahappoa loppupitoisuudeksi 20 μ g/ml ja viljelmää kasvatettiin, kunnes 10 $A_{550} = 1$. 10 ml soluja väkevöitiin ja ne suspendoitiin uudelleen fosfaattipuskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen. Solut äänikäsiteltiin ja laimennettiin esimerkin 1 mukaisesti tehtävää tuumorinekroositekijämäärittystä varten. Saa-
15 tiin noin 10^5 aktiivisuusyksikköä/ml viljelmää. Tämä aktiivisuus kumoutui esi-inkuboitaessa tuotetta kaniinin antiseerumin kanssa, joka oli saatu ihmisen tuumorinekroositekijää vastaan immunoiduista kaniineista.

Esimerkki 19

- 20 Tuumorinekroositekijän ilmentyminen E. colissa
Tämä menetelmä on edullisempi kuin esimerkin 18 mukainen menetelmä.
Edellä mainittujen vektorien yhteydessä käytettävä isäntä on edullisesti taantumaton tonA-E. coli -kanta. Täl-
25 laiset kannat ovat bakteriofaagiresistenttejä ja siksi paljon paremmin soveltuvia laajamittaiseen viljelyyn kuin villin tyypin kannat. Seuraavassa kuvataan soveltuvaa menetelmää tällaisen kannan aikaansaamiseksi. E. coli W3110 transdusoidaan λ :Tn10:llä, joka on paikasta toiseen siir-
30 rettävässä olevan elementin Tn10 sisältävä lambdabakteriofaagi, jolloin saadaan E. coli W3110:n Tn10-hyppäystuotteiden yhdistelmä [N. Klecker et al., J. Mol. Biol. 116 (1977) 125].
E. coli W3110::Tn10-hyppäystuoteyhdistelmää kasva-
35 tetaan L-liemessä 37°C:ssa solutiheyteen noin 1×10^9 solua/ml. 0,5 ml viljelmää sentrifugoidaan ja pelletti

suspendoidaan 0,2 ml:aan λ phi80- (tai T1-) lysisaattia, joka sisältää $7,0 \times 10^9$ plakin muodostavaa yksikköä (pfu). Faagin annetaan adsorboitua 30 minuuttia 37°C :ssa. Sitten suspensio levitetään EMB-maljoille, jotka on täydennetty tetrasykliinillä (15 $\mu\text{g/ml}$). Kun on inkuboitu yön yli 37°C :ssa, yhdistetään vaaleanpunaiset pesäkkeet 3 ml:aan L-lientä, kasvatetaan yön yli 37°C :ssa, pestään kahdesti ja suspendoidaan takaisin L-liemeen. Tämä viljelmä infektoidaan bakteriofaagi P1 kc:llä ja otetaan talteen faagilysaatti (J. Miller, Experiments on Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, s. 304).

E. coli AT982 (*E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, Conn. nro 4546) muutetaan tetrasykliiniresistentiksi tämän P1 kc -lysaatin avulla. Transduktantit valikoidaan L-liemimaljoilla, joihin on lisätty tetrasykliiniä (15 $\mu\text{g/ml}$) ja diaminopimeliinihappoa (dap, 40 $\mu\text{g/ml}$). Tuloksena olevista transduktanteista tutkitaan tetrasykliiniresistenssi ja dap-geenin regeneraatio (dap^+ , tet^R). dap^+ , tet^R -transduktanteista tutkitaan sitten λ phi80- (tai T1-) resistenssi.

Sitten valmistetaan P1 kc -lysaatit useista dap^+ , tet^R , λ phi80- (tai T1-) resistenteistä kannoista. Lysaateilla transdusoidaan *E. coli* W3110 tetrasykliiniresistentiksi. Transduktantit tutkitaan ja valikoidaan λ phi80- (tai T1-) resistenssin perusteella.

Valikoidaan tetrasykliiniresistentit solut W3110 $\text{fhuA}::\text{Tn10-}\lambda\text{phi80R}$ -transduktanttien joukosta [S. Naloy et al., J. Bact. 145 (1981) 1110]. Näiden eristettyjen solujen faagi λ phi80-resistenssi ja tetrasykliiniherkkyys varmistetaan yksipesäkepuhdistuksen jälkeen.

Eristetään DNA muutamista tetrasykliiniherkistä, λ phi80-faagiresistenteistä mutanteista ja pilkotaan se SstII:lla. SstII-pilkottu DNA karakterisoidaan Southern-täplämenetelmällä käyttäen radionuklidileimattua, SstII-pilkottua $\lambda::\text{Tn10}$ -DNA:ta koettimena sen määrittämiseksi, onko Tn10 poistunut (R. Davis et al., Advanced Bacterial

Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980). Toinen tetrasykliiniresistenteistä eristetyistä mutanteista on menettänyt kaksi Tn10-hybridisaatiovyöhykettä verrattuna $\lambda::\text{Tn10-DNA:n}$ ja parentaalisen W3110 $\text{fhuA}::\text{Tn10}\lambda\text{phi80R:n}$ väliseen hybridisaatioon. Kolmannen hybridisaatiovyöhykkeen liikkuvuus on muuttunut, mikä viittaa siihen, että on tapahtunut Tn10:n epätäsmällisen poistumisen aiheuttama deleetio.

Kannan, jossa esiintyy epätäsmällinen Tn10-deleetio, ulommista kalvoista tehdyn preparaatin SDS-geelelektroforeesi osoittaa, että vyöhykkeen, jonka otaksutaan olevan fhuA-proteiini, elektroforeettinen liikkuvuus on muuttunut verrattuna villin tyyppin fhuA-proteiiniin. Tuloksena oleva proteiini ei toimi λphi80 -faagireseptoriproteiinina. Toisella, edellisestä riippumattomalla kannalla, jolle myös on tapahtunut Tn10:n epätäsmällinen poistuminen, ei näy ollenkaan fhuA-proteiinia SDS-geelillä.

Kummassakaan näistä kannoista ei esiinny taantumista tetrasykliiniresistenssiin tai λphi80 -herkkyyteen, mikä viittaa siihen, että on tapahtunut Tn10-transposonin tai sen osan epätäsmällinen poistuminen yhdessä fhuA-geenin joko osittaisen tai täydellisen deleetion kanssa. Erästä tällaisista W3110-kannoista (NL106) käytetään edullisesti isäntänä TNF:ää koodaaville vektoreille, joita kuvataan toisaalla tässä hakemuksessa.

NL106 transformoitiin ptrpXAPTNF:llä ja tuotteella inokuloitiin 10 litraa alustaa (pH 7,4), jolla oli seuraava koostumus:

	Aineosa	g/l
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
	K_2HPO_4	6,0
	NaH_2PO_4	3,0
5	Na-sitraatti	1,0
	L-tryptofaani	0,2
	NZ Amine AS	4,0
	Hiivauute	4,0
	MgSO_4	1,2
10	Glukoosi	<u>25,0</u>
	Hivenaineliuos (Fe, Zn, Co, Mo, Cu, B ja Mn-ioneja)	0,5 ml
	Tetrasykliini	1,0 mg

Viljelmään alettiin syöttää glukoosia nopeudella

- 15 1 g/min, kun viljelmän A_{550} -arvo oli noussut noin 20:een. Fermentointia jatkettiin 30°C:ssa, kunnes $A_{550} = 136$ (noin 20 tuntia). Viljelmä sentrifugoidaan, jolloin muodostuu solutahna, ja tahnaa uutetaan sitten 30 minuuttia pH-arvossa 8,0 ja huoneen lämpötilassa 50 mM tris-puskurilla, joka
- 20 sisältää 10 mmol/l EDTA, 1 000 mmol/l NaCl, 2 000 mmol/l ureaa ja 0,1 % beta-merkaptetoetanolia. Uute laimennettiin ja tutkittiin esimerkin mukaisesti. Tämän tutkimuksen mukaan 1 mg tuumorinekroositekijää sisälsi 1×10^8 yksikköä tuumorinekroositekijäaktiivisuutta. Saatiin jopa noin 2 g tuumorinekroositekijää litraa kohden viljelmää. Aminotermiinalinen sekventointi osoitti, että noin 75-86 paino-% tästä oli valyyliaminotermiinalista (valmista) tuumorinekroositekijää, lopun ollessa met-TNF:ää. Korkeiden ilmentymistason lisäksi proteiini ei myöskään esiintynyt refraktiivisissä elementeissä eikä näyttänyt muutenkaan olevan myrkyllistä soluille, mitä osoittavat saavutetut äärimmäisen suuret solutiheydet.
- 25
- 30

Esimerkki 20

Tuumorinekroositekijämutanttigeenin muodostaminen ja ilmentyminen

5 Tässä esimerkissä toimitettiin muuten esimerkkien 17 ja 18 mukaisesti, mutta syntetisoitiin oligonukleotidi-fragmentti B, jossa oli histidiinikodoni CAT arginiini 6-kodonin CGT tilalla. Tällöin ilmentyi mutanttituumorinekroositekijä.

Esimerkki 21

10 Toisen tuumorinekroositekijämutanttigeenin muodostaminen ja ilmentyminen

Tässä esimerkissä toimitettiin muuten esimerkkien 17 ja 18 mukaisesti, mutta käytettiin oligonukleotidifragmenttia B, joka koodasi leusiinia (CTT) arginiini 2:n sijasta. Alustavissa yrityksissä saatiin noin 1 200 mg valmista TNF:ää viljelmälitraa kohden. Käsittelemätöntä TNF:ää ei ollut havaittavissa viljelmässä.

Esimerkki 22

20 Vektorin, joka koodaa tuumorinekroositekijän ja erityssignaalsekvenssin fuusioproteiinia, muodostaminen

E. colin lämpöstabiliilia enterotoksiinia vastaavan geenin STII sekvenssiä kuvaavat Picken et al. [Infection and Immunity 42(1) (1983) 269-275]. Tässä esimerkissä li-gatoitiin fragmentti, joka sisältää STII-erityssignaalin ja Shine-Dalgarno-sekvenssin, E. colin alkalisen fosfa-taasin promoottorin alapuolelle (jälkeen). STII-signaalia seuraa 3'-suunnassa synteettinen oligonukleotidi, joka sisältää tuumorinekroositekijän seitsemää ensimmäistä aminohappoa vastaavat kodonit ja loppuosa tuumorinekroo-sitekijää koodaavasta jaksosta. Kaikki edellä mainitut sekvenssit sijoitettiin pBR322-vektoriin.

30 pWM501 [Picken et al., Infection and Immunity 41(1) (1983) 269-275] sisältää STII-geenin. pWM501 pilkottiin XbaI:llä ja NsiI:llä, ja eristettiin noin 90 emäsparin fragmentti. Tämä fragmentti voitaisiin myös syntetisoida kemiallisesti sinänsä tunnetuin menetelmin (fragmentti A).

Esimerkissä 17 kuvattu pBR322-Trp-plasmidi (p29kLT) pilkottiin SbaI:llä ja HindIII:lla ja otettiin talteen suuri fragmentti (fragmentti B). Tämä fragmentti sisältää E. colin replikoitumisen aloituskohdan ja geenin, joka antaa

5 ampisilliiniresistenssifenotyyppin.

Syntetisoitiin synteettinen oligonukleotidi kahtena erillisenä säikeenä, jotka emäspariutettiin seuraavaksi rakenteeksi (tarttuvat restriktiokohtapäät ja oligonukleotidin koodaamat aminohapot ovat myös näkyvissä).

10

```

                VAL ARG SER SER SER ARG THR
5'          GTA CGT TCT TCT TCT CGT ACT          3'
    ACGT CAT ACG AGA AGA AGA GCA TGA GGCT
    NsiI                               AvaI

```

15

Tästä fragmentista käytetään merkintää fragmentti C.

Esimerkin 18 mukainen pTNFtrp pilkottiin AvaI:llä ja HindIII:lla. 578 emäsparin AvaI-HindIII-fragmentti (fragmentti D) otettiin talteen. Se sisältää koko TNF:ää, seitsemää ensimmäistä aminohappoa lukuun ottamatta, koodaavan sekvenssin.

20

DNA-sekvenssi, joka sisältää E. colin alkalisen fosfataasin (AP) promoottorin kytkettynä heterologiseen ShineDalgarno (S.D.) -sekvenssiin (trp) ja jossa on EcoRI- ja Xba-pää, muodostettiin seuraavasti: DNA-fragmentti, joka sisältää osan AP-promoottorista, eristettiin plasmidista pHI-1 [H. Inouye et al., J. Bacteriol. 146 (1981) 668-675], vaikka mitä tahansa soveltuvia A-promoottori-DNA:n sisältäviä lähteitä voitaisiin käyttää. pHI-1 pilkottiin HpaI:llä

25

30 plasmidin avaamiseksi, plasmidiin ligatoitiin synteettinen

GAATTCGAATTC

EcoRI-kytkijä CTTAAGCTTAAG, ja kytkijällä varustettua plasmidia pilkottiin ylimäärällä EcoRI kaikkien EcoRI-kohtien katkaisemiseksi ja alimäärällä RsaI kaikkien RsaI-kohtien katkaisemiseksi vain osittain (EcoRI- ja RsaI-käsittelyt voitaisiin tehdä myös peräkkäin samanaikaisen käsittelyn

35

sijasta). EcoRI-RsaI-pilkkomistuotteesta otettiin talteen 420 emäsparin fragmentti, joka sisälsi AP-promoottorin.

trp S.D. -sekvenssi saatiin seuraavasti. Plasmidi tai organismi, joka sisältää trp-promoottorin [PIFN-beta 2, D. Leung et al., Biotechnology 2 (1984) 458-464], pilkottiin XbaI:llä ja RsaI:llä, ja otettiin talteen 30 emäsparin fragmentti, joka sisältää trp S.D. -sekvenssin. Tämä fragmentti ligatoitiin 420 emäsparin AP-promoottorifragmenttiin, jolloin saatiin 450 emäsparin EcoRI-XbaI-fragmentti E. Fragmentti E:n nukleotidisekvenssi on

EcoRI

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGAGTTGTTATTT
AAGCTTGCCCAAAAAGAAGAAGAGTCGAAAGAACTGTGTGCGCAGGTAGAAGCTTTGGAGATTATCGTCA
CTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCGTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTA
CGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCTGACGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTA
TTGAAGCATCCTCGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTT
ATAGTCGCTTTGTTTTTATTTTTAATGTATTTGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTAGA

trpS.D. XbaI

Fragmentit A, B, C ja D ligatoitiin keskenään ja liigaatioseoksella transformoitiin E. coli 294. Transformantit identifioitiin kasvattamalla ampicilliiniä sisältävillä LB-maljoilla. Plasmidi trpSTIITNF eräästä transformanttipesäkkeestä. Tämä plasmidi pilkottiin XbaI:llä ja EcoRI:llä trp-promoottorin poistamiseksi ja ligatoitiin sitten 450 emäsparin EcoRI-XbaI-fragmenttiin E, joka sisältää E. colin alkalisen fosfataasin promoottorin. Tuloksena olevalle plasmidille annetaan nimeksi pAPSTIITNF.

Esimerkki 23

Tuumorinekroositekijän ja erityssignaalsekvenssin fuusioproteiinin ilmentyminen ja prosessointi

E. coli NL106 transfektoitiin pAPSTIITNF:llä ja tuotteella inokuloitiin 10 litraa alustaa (pH 7,0), jonka koostumus oli:

	Aineosa	g/l
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
	K_2HPO_4	2,6
	NaH_2PO_4	1,3
5	Na-sitraatti	1,0
	KCl	1,5
	NZ Amine AS	5,0
	Hiivauute	2,0
	MgSO_4	1,2
10	Glukoosi	25,0
	Hivenaineliuos (Fe, Zn, Co, Mo, Cu, B ja Mn-ioneja)	0,5 ml
	Ampisilliini	<u>20,0 mg</u>
15	Viljely tehtiin samalla tavalla kuin esimerkissä 19, mutta tällä kertaa saavutettiin A_{550} -arvo 140. Tässä vaiheessa viljelmä sisälsi noin 400 mg/l tuumorinekroositekijää, joista noin 70-80 % oli elektroforeesigeelin perusteella arvioituna prosessoitunut asianmukaisesti valmiiksi proteiiniksi. Suunnilleen saman verran tuumorinekroositekijäaktiivisuutta saatiin talteen esimerkin 19 mukaisella kokonaisten solujen uutolla ja solujen osmoottisella shokilla.	
	<u>Esimerkki 24</u>	
25	Tuumorinekroositekijän ilmentyminen hiivassa ADH-promoottorin ohjauksessa	
	Plasmidi TrpXAPTNF muodostetaan muuten esimerkissä 17 kuvatulla tavalla, mutta p20KLT tai ptrpETA (tai pBR322) pilkotaan EcoRI:llä ja HindIII:lla XbaI:n ja HindIII:n sijasta ja valmistetaan synteettinen fragmentti B, jossa on tarttuva EcoRI-pää tarttuvan XbaI-pään sijasta. Ligaatioseoksella transformoidaan sitten E. coli ATCC31 446 ja identifioidaan restriktioanalyysillä plasmidi pTNFRI, joka sisältää EcoRI-kohtien rajoittaman tuumorinekroositekijää koodaavan DNA:n. Plasmidi pTNFRI eristetään, pilkotaan EcoRI:llä ja otetaan talteen tuumorinekroositekijä-DNA:n sisältävä fragmentti T-1.	
30		
35		

Plasmidi pFRPn (EP-hakemusjulkaisu 60 057A) pilkotaan EcoRI:lla, käsitellään alkalisella fosfataasilla resirkularisoitumisen estämiseksi, ligatoidaan tuumorinekroositekijäfragmenttiin T-1 käyttämällä T4-DNA-ligaasia ja ligaatioseoksella transformoidaan sitten E. coli ATCC 31 446. Ampisilliiniresistentit pesäkkeet tuottavat kahta plasmidiryhmää, joissa T-1-insertti on päinvastaisissa orientaatioissa agarosielektroforeesigeeleillä tehdyllä restriktioanalyysillä määritettynä. E. coli -transformanteista saatavat plasmidit puhdistetaan ja niillä transformoidaan hiiva, jossa on trp1-mutaatio (esimerkiksi hiivakanta RH218, rajoittamaton ATCC-talletusnro 44 076), joka antaa trp⁺-fenotyypin. Plasmidien, joissa orientaatio on sellainen, että segmentin T-1 aloituskodoni on alkoholidegydrogenaasipromoottorifragmentin vieressä, havaitaan transformoiva hiiva siten, että siinä ilmentyy tuumorinekroositekijä. Tuumorinekroositekijä otetaan talteen hiivatransformanttisuutteista. Plasmidin stabiilisuus laajamittaisissa fermentoinneissa paranee, kun käytetään ilmentymisplasmidia, joka sisältää kahden mikronin replikoitumisen aloituskohdan pRFPn:n kromosomaalisen replikoitumisen aloituskohdan (ars 1) sijasta ja sen kanssa yhteensopivaa isäntäkantaa [J. Beggs Nature 275 (1978) 104-109].

25 Esimerkki 25

Tuumorinekroositekijän ilmentyminen nisäkässoluissa

Plasmidi pEHER (EP-hakemusjulkaisu 117 060A) pilkotaan EcoRI:lla, käsitellään vasikan suoliston alkalisella fosfataasilla, ligatoidaan esimerkin 24 mukaiseen fragmenttiin T-1 ja transformoidaan ligaatioseoksella E. coli ATCC 31 446. Eristetään kaksi plasmidia (pEHRTNF I ja pEHRTNF II), jotka sisältävät TNF-DNA:n päinvastaisessa orientaatioissa polyakryyliamidigeeleillä tehdyllä restriktioanalyysillä määritettynä. Näillä plasmideilla transformoidaan ja valikoidaan CHO DHFR-DUX-B11, CHO 1 ja Ltk⁻-solut.

Kudosviljelmäsolut transfektoidaan sekoittamalla 1 µg pEFERTNF I tai pHERTNF II 10 µg:aan rotan kantaja DNA:ta 250 µl:ssa 0,25 M CaCl₂, minkä jälkeen lisätään pisaroiittain 250 µl HEPES-puskuroitua fysiologista suolaliuosta (280 mmol/l CaCl₂, 1,5 mmol/l Na₂PO₄, 50 mmol/l HEPES:iä, pH 7,1). Annetaan seistä 30 minuuttia huoneen lämpötilassa ja lisätään liuos kudosviljelmäsoluille, jotka ovat 60 mm:n muovisissa kudosviljelymaljoissa. Käytetään CHO 1, CHO DHFR-DUX-B11 ja Ltk⁻-soluja. Maljat sisältävät 3 ml isäntäsoluille soveltuvaa kasvualustaa.

CHO 1 ja CHO DHFR-DUX-B11 -soluille kasvualusta on Ham F-12 -alusta (Gibco), johon on lisätty 10 % vasikanseerumia, 100 µg/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 2 µM L-glutamiinia. Ltk⁺-solulinjan alusta on Dulbeccon muunnettu Eagle-alusta (DMEM), joka on täydennetty edellä kuvatulla tavalla.

Alusta poistetaan 3-16 tunnin kuluttua ja solut pestään liuoksella, joka sisältää 20 % glyserolia fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa. Kunkin maljaan lisätään tuoretta alustaa ja soluja inkuboidaan vielä kaksi vuorokautta.

Transfektoitujen isäntäsolujen valikointi tehdään trypsinisoimalla solut kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen (solut käsitellään steriilillä trypsiiniliuoksella (0,5 mg/ml), joka sisältää 0,2 mg/ml EDTA) ja lisäämällä noin 3×10^5 solua 10 mm:n kudosviljelymaljoille, joissa on selektiivistä alustaa. dhfr⁻-soluja varten alusta on F-12-alusta (Gibco), josta puuttuu glysiini, hypoksantiini ja tymidiini (GHT⁻-alusta). DHFR⁺-isäntäsoluille lisätään metotreksaattia (100 - 1 000 mol/l) normaaliin kasvualustaan. Vertailunäytteinä toimivat solut, jotka transfektoidaan ilman plasmidia ja plasmidilla pFD-11 (EP-hakemusjulkaisu 117 060A), joka sisältää normaalin DHFR:n. Solujen, jotka ottavat vastaan ja ilmentävät DHFR-plasmidia, pesäkkeet tulevat näkyviin 1-2 viikon kuluessa. Identifioidaan ne transformantit, jotka ilmentävät tuumorinekroositekijää.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ihmisen oleellisesti homogeenisen
 tuumorinekroositekijän valmistamiseksi, jolla on amino-
 happosekvenssi:

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala
 10
 His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 20
 Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu
 30
 Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr
 50
 Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro
 60
 15 Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 80
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
 90
 Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100
 20 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu
 120
 Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 130
 Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile
 150
 25 Ile Ala Leu
 157

t u n n e t t u siitä, että

(a) adsorboidaan tuumorinekroositekijä seoksesta
 30 muiden proteiinien kanssa kontrolloidulle huokoslasille,
 minkä jälkeen tuumorinekroositekijä eluoidaan kontrolloi-
 dulta huokoslasilta,

(b) adsorboidaan vaiheen (a) tuote anioninvaihto-
 hartsihiukkasille, joilla on suurin piirtein yhtenäinen
 35 hiukkaskoko, minkä jälkeen eluoidaan tuumorinekroositeki-
 jä ja haluttaessa suoritetaan dialyysi, ja sitten

(c) adsorboidaan vaiheen (b) tuote alkyylisefaroo-
siadsorbentille, minkä jälkeen tuumorinekroositekijä
eluoidaan alkyylisefarooosilta, ja haluttaessa,

5 (d) puhdistetaan vaiheen (c) tuote SDS-polyakryy-
liamidigeelielektroforeesilla tai käänteisfaasikorkeapai-
nekromatografialla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tuumorinekroositekijä eluoi-
daan etyleeniglykolilla.

10 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että anioninvaihtohartsin on
kvaternaarisesti aminosubstituoitu ristosidottu polysty-
reeni.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av human väsentli-
gen homogen tumörnekrosfaktor med aminosyrasekvensen:

5

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala
10

His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
20

10

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu
30 40

Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr
50

Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro
60 70

15

Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
80

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys
90

Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 110

20

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu
120

Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
130 140

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile
150

25

Ile Ala Leu
157

k ä n n e t e c k n a t därav, att man

30

(a) adsorberar tumörnekrosfaktorn från en bland-
ning med andra proteiner på ett kontrollerat porglas var-
efter man eluerar tumörnekrosfaktorn från det kontrolle-
rade porglaset,

35

(b) adsorberar produkten från steg (a) på partik-
lar av ett anjonbytarharts med väsentligen likformad par-
tikelstorlek varefter man eluerar tumörnekrosfaktorn, och
om så önskas, utför dialys, och sedan

(c) adsorberar produkten från steg (b) på en alkylsefaro-seadsorbent, varefter man eluerar tumörnekrosfaktorn från alkylsefarosen, och om så önskas,

5 (d) renar produkten från steg (c) med SDS-polyakrylamidgelelektrofores, eller med omvändfas högtryckskromatografi.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att tumörnekrosfaktorn elueras med
etylenglykol.

10 3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att anjonbytarhartset är kvaternärt
aminosubstituerat tvärbundet polystyren.

Fig.1.

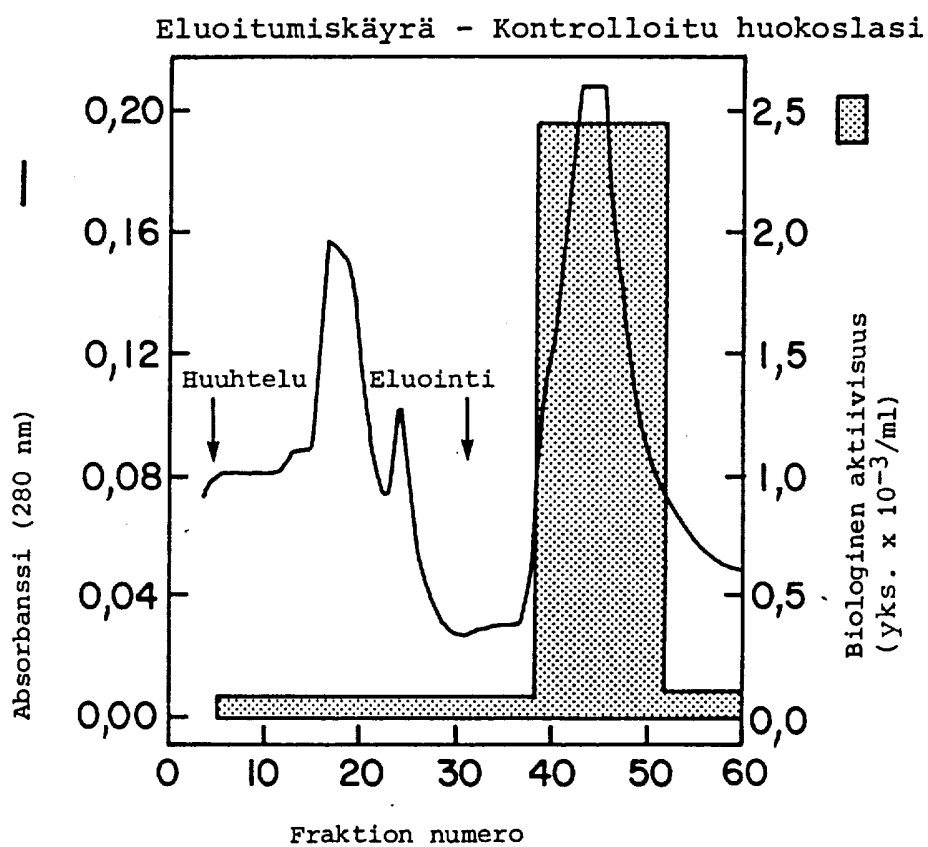


Fig. 2.

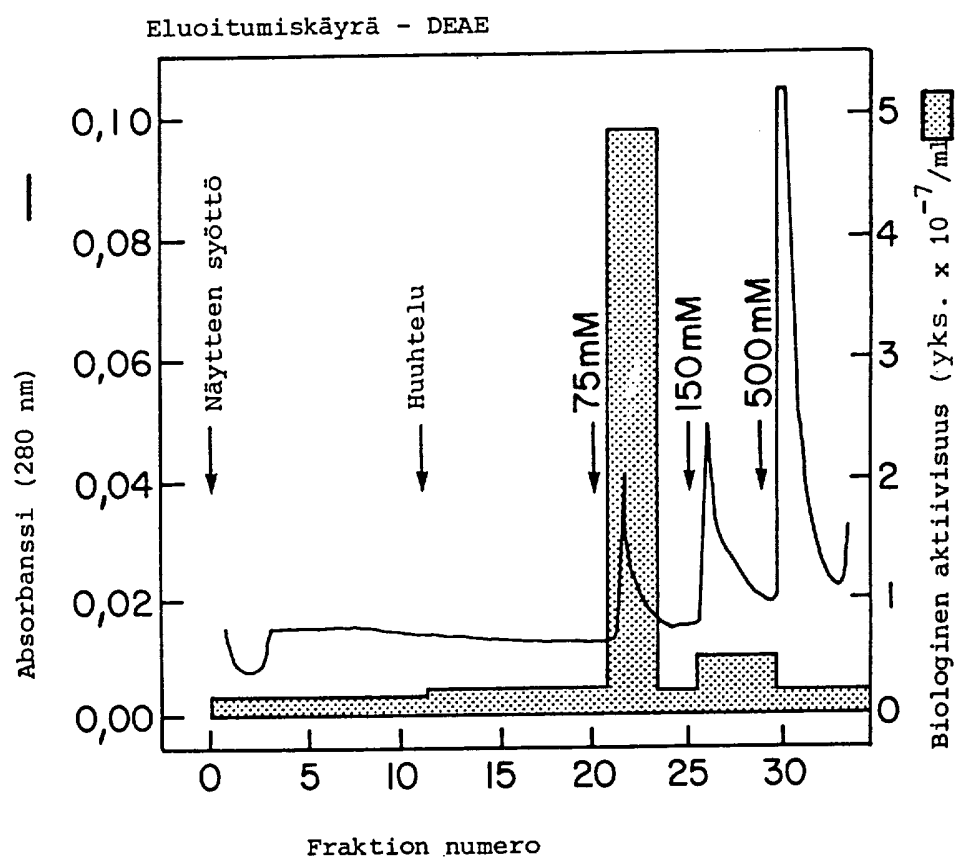


Fig. 3.

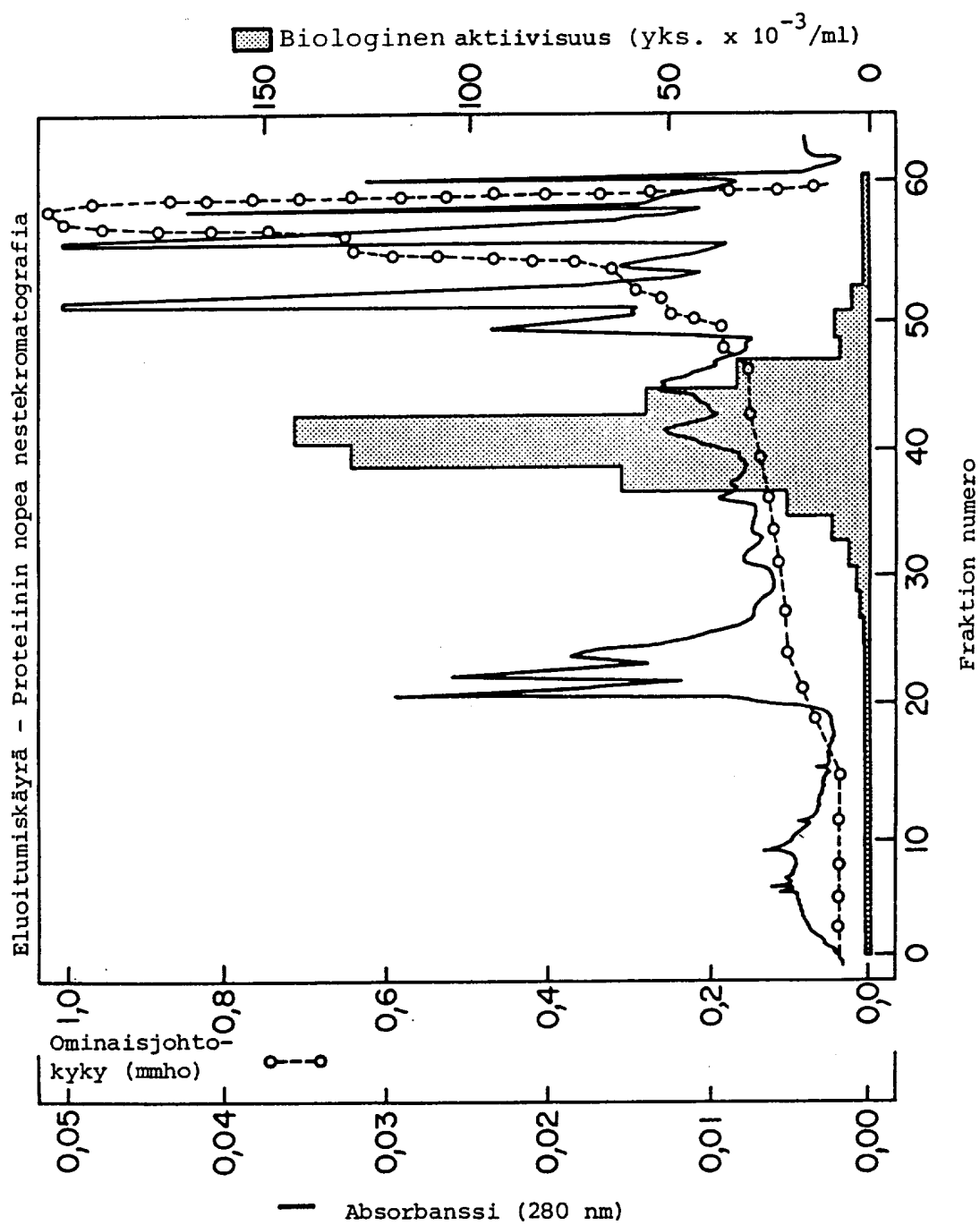


Fig.4.

Eluoitumiskäyrä - Kromatofokusointi

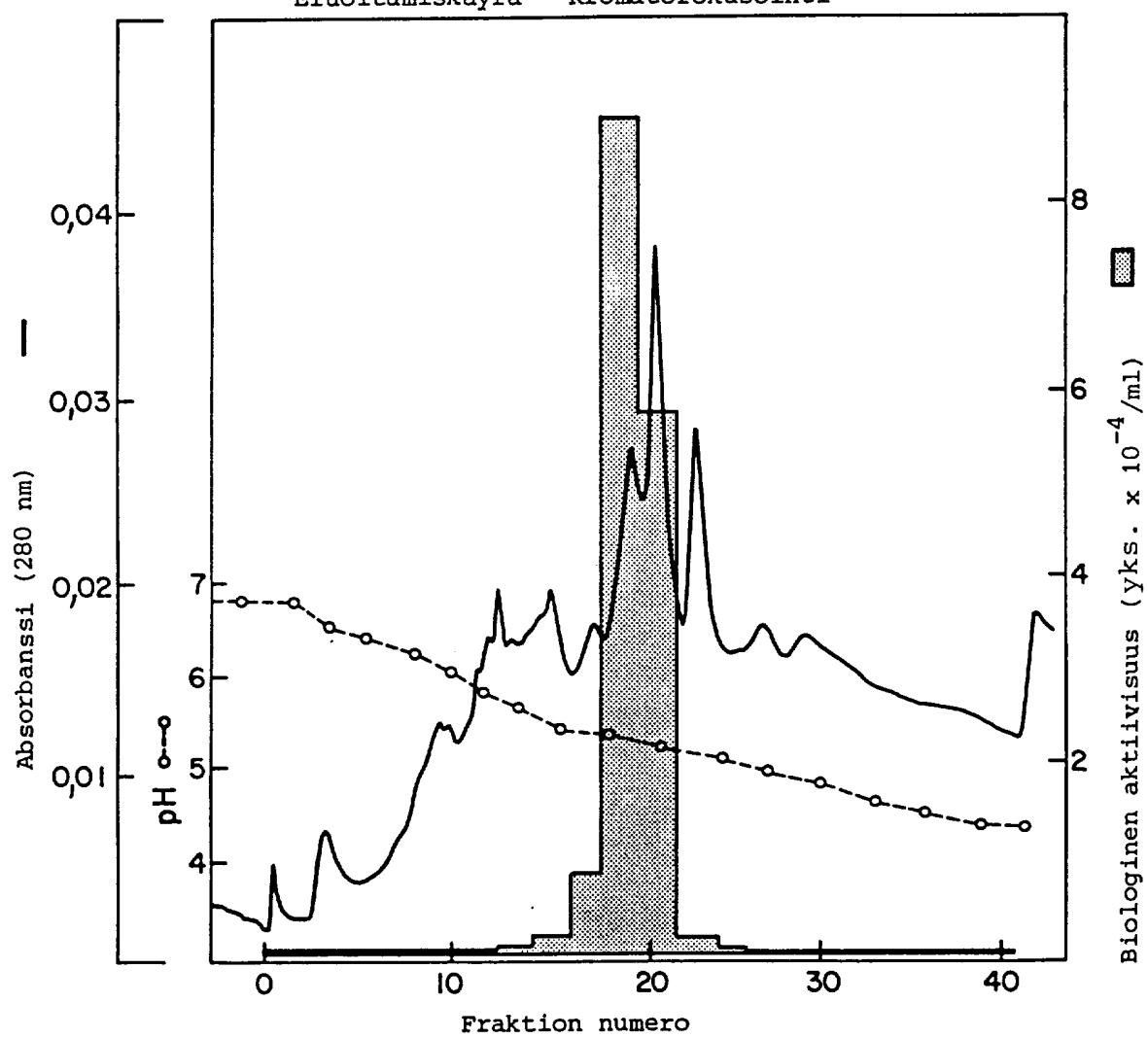


Fig. 5.

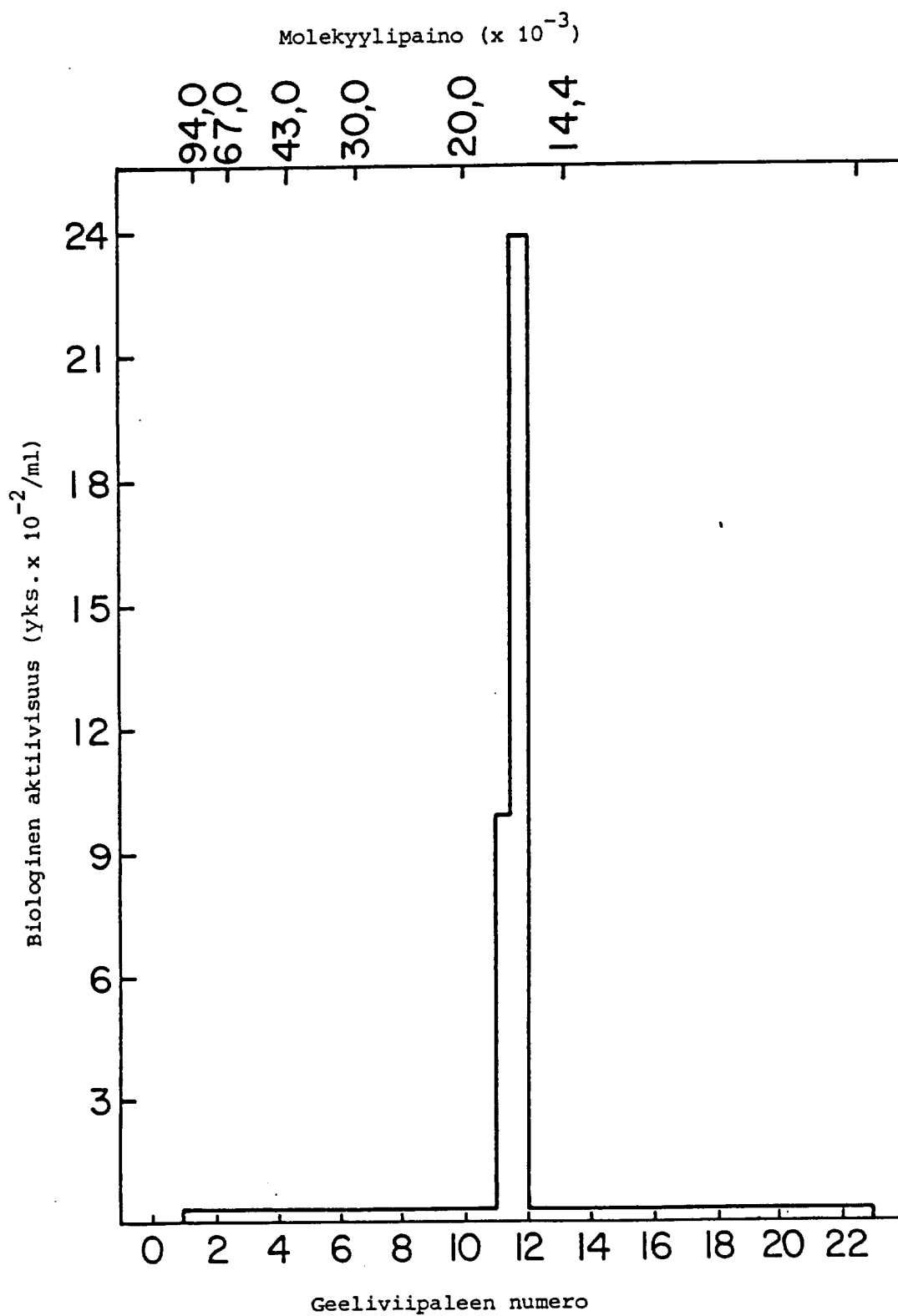


Fig. 6.

Eluotumiskäyrä - HPLC

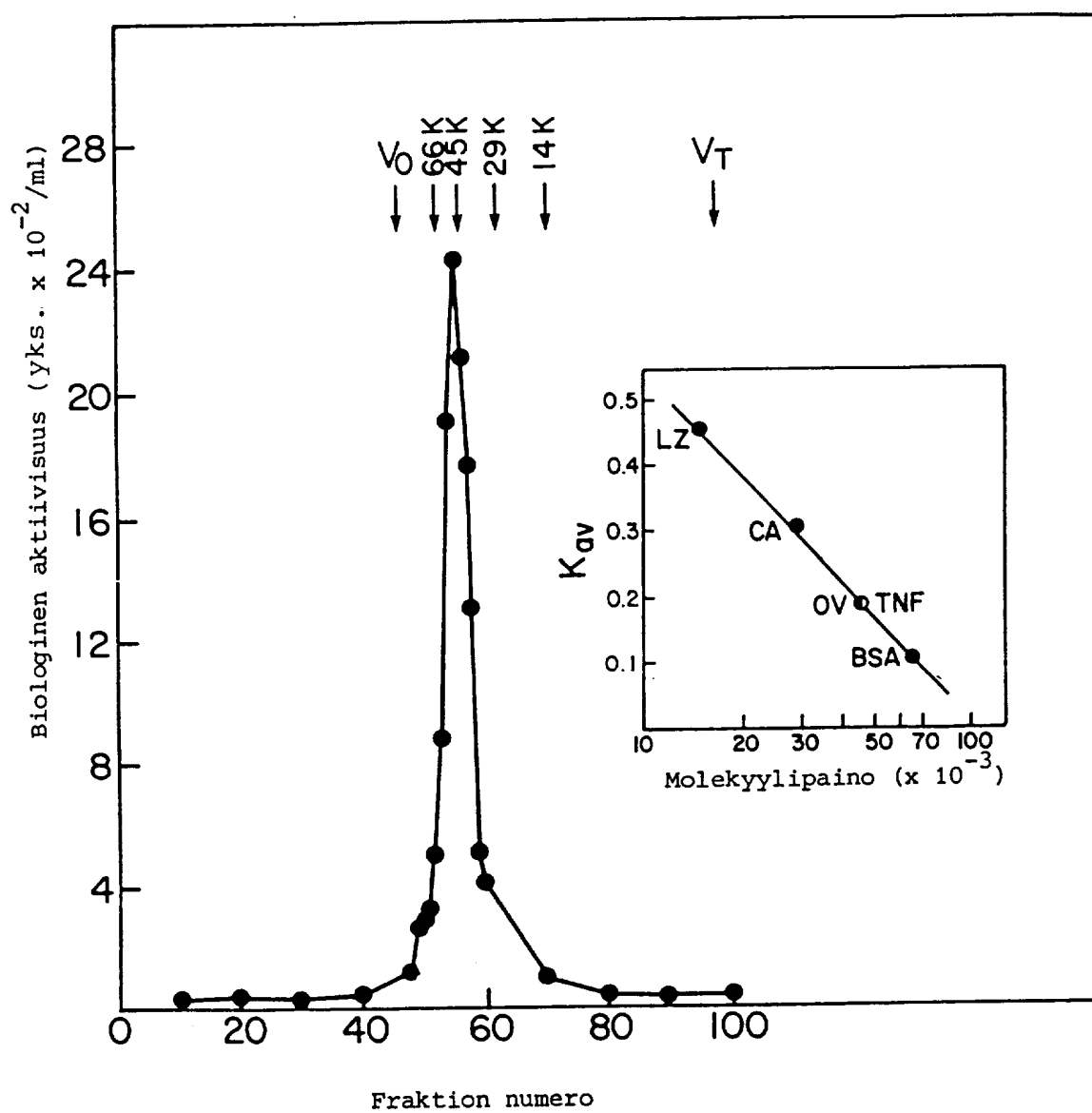


Fig.7.

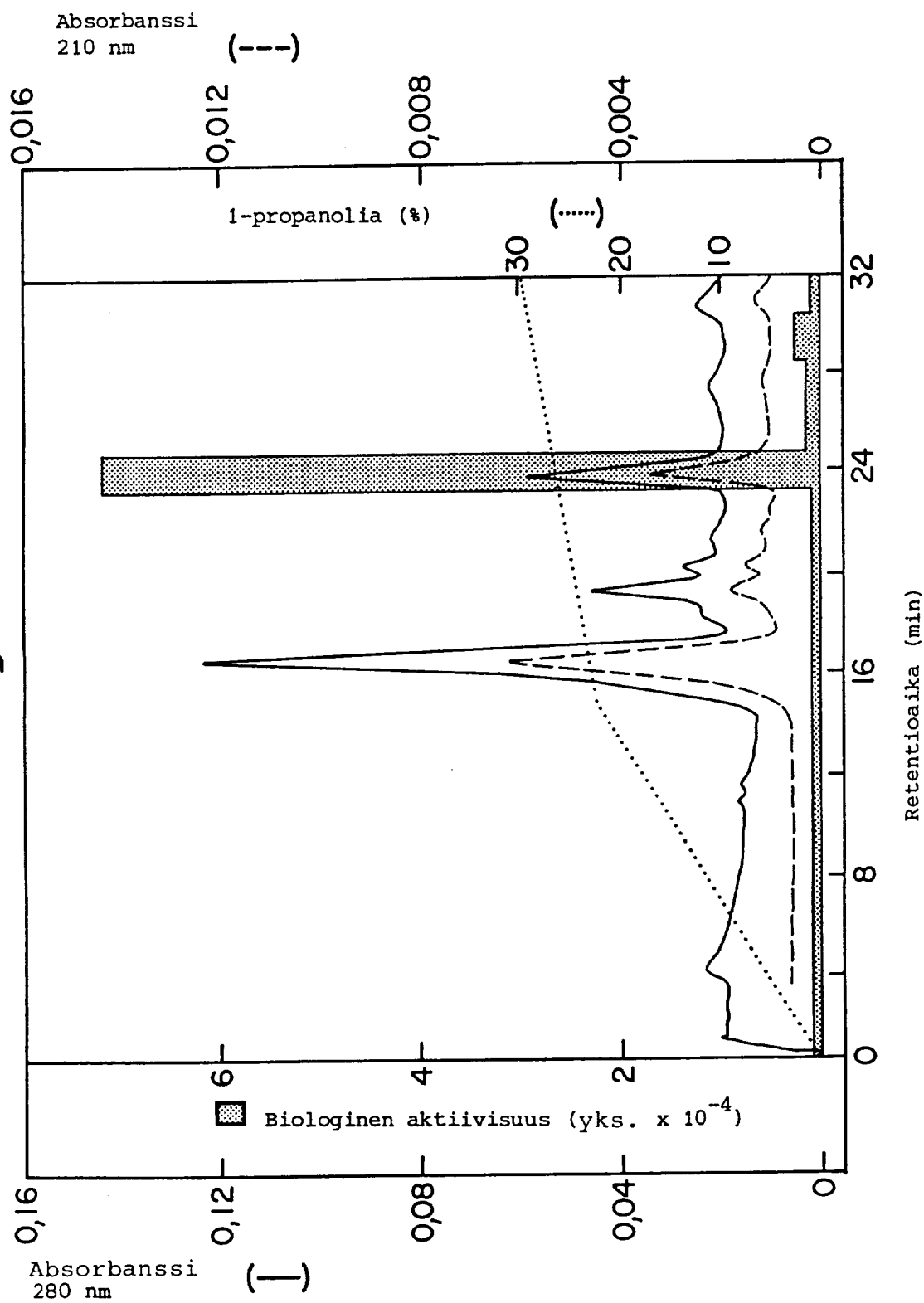


Fig.8.

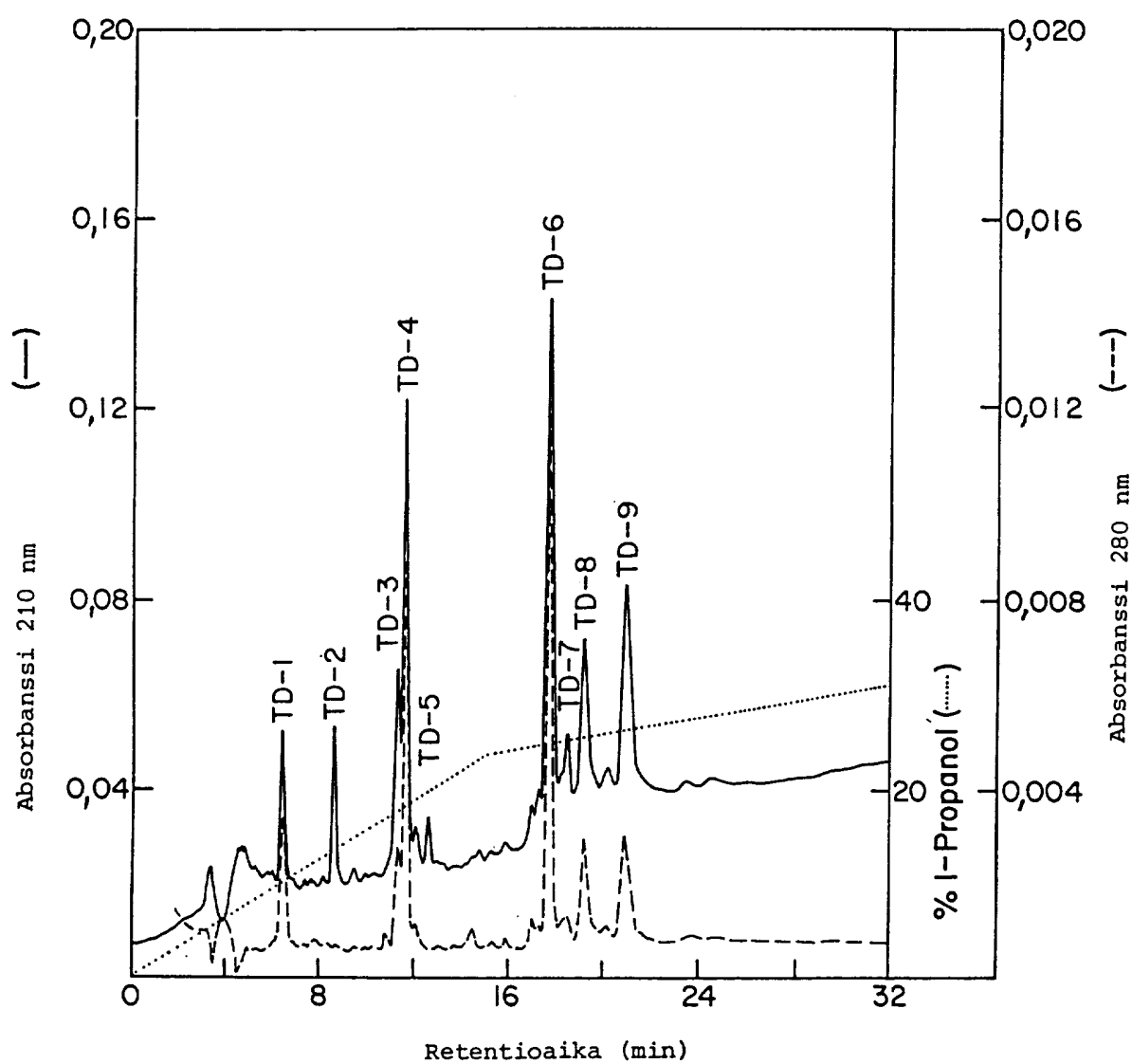
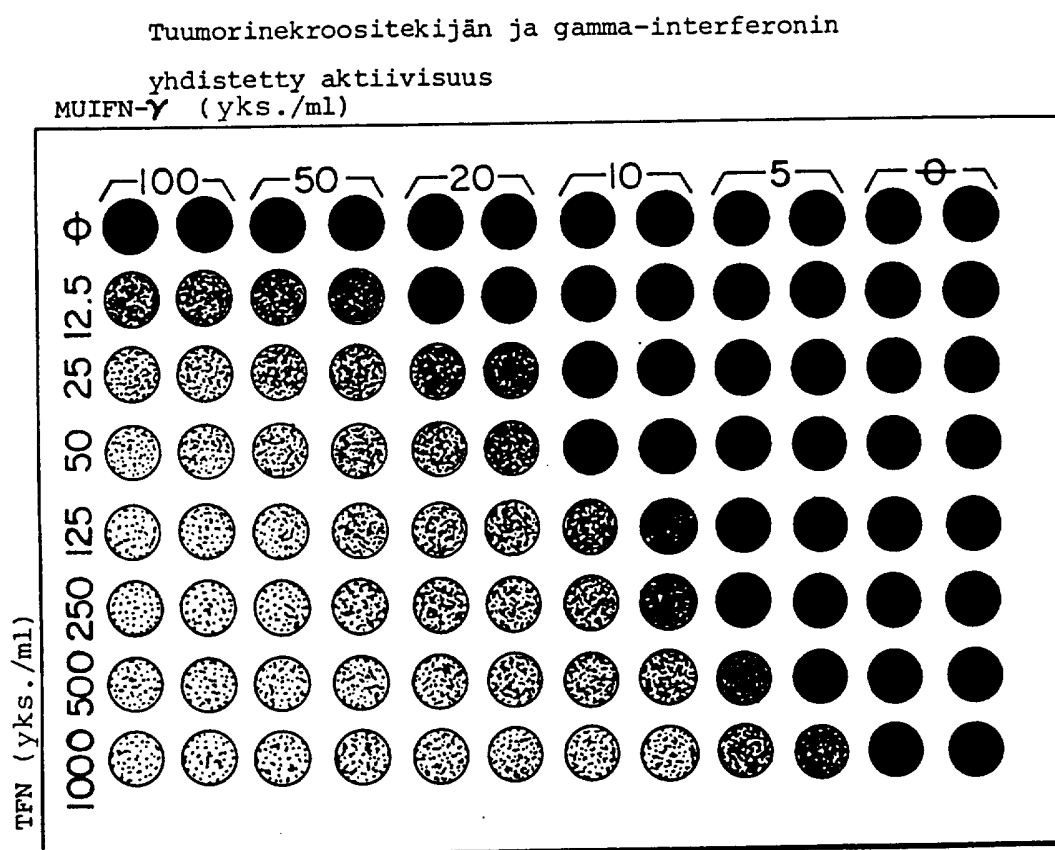


Fig. 9.



Ihmissen tuumorinekroositekiän aminohappo- ja nukleotidisekvenssi

-20
ser pro ser pro gln phe pro arg asp leu ser leu ile ser pro leu ala gln ala val arg ser ser arg thr pro ser
TCT CCT TCT CCC CAA CAG TTC CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC AGC CCT CTG GCC CAG GCA GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT

10 Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Trp Leu Asn Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn
GGAC ANG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GGT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT

20 30 40 50 60
↓ ↓ ↓
Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys
GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTC CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC

70 80 90 100 110 120
↓ ↓ ↓
Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Ser Ala Ile Lys Ser
CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC

130 140 150 160 170 180
Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA CAG GGG GCT GAG GCC AAG CCG TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGC GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT

190 200 210 220 230 240
Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ala Leu OP
GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTG TGA GGA

250 260 270 280 290 300
GGACGAACATCCAACCTTCCCCAACGGCTCCCGTGGCCCAATCCCTTTATTACCCTCTCTTCAGACACCCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTGGGGCTTAGGGTCGGAAC
CAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCACCTTCGAAACCTGGGATTTCAGGAATGTGGCTGCACAGTGAAATTGCTGGCAACCACCTAAGAATTCAAACTGGGGCTCCAGAACTCA
CTGGGGCTACAGCTTTGATCCCTGACATCTGGAATCTGGAGACCAGGGAGCCCTTGGTTCTGGCCAGAAATGCTGAGGACTTGAGAAAGACTCACCTAGAAATTTGACACAAAGTGGACCT
TAGGCCCTCCCTCCTCCAGATGTTCCAGACTTCCTTGAGACACGGAGCCCGCCCTCCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTATTATGTTTGCACTTGIGATTATTATTATTATTATTATT
TTTTTTTATTACAGATGAATGATTATTATTGGGAGACCGGGTATCTCGGGGACCCCAATGTAGGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAACCGGAGCTGAACAATAGGCTG
TTCCCATGTAGCCCCCTGGCCCTCTGCGCTCTTTTGTATTGTTTTTAAAAIATTTAICIGATTAAAGTTGTCIAAACAATGCTGAITTTGGTGACCAACTGICACTCATTTGCTGAGCCT
TGCTCTCCCGAGGGAGTTGTCTGTAATCGCCCTACTATTTCAGTGGCGAGAAATAAAGTTTGCTT

Syntetoinen fragmentti B

met val arg ser ser arg thr
 5' CTAG AATT ATGGTA CGT TCT TCT CGT ACT
 TTAATACCAT GCA AGA AGA GCA TGA GGCT 3'

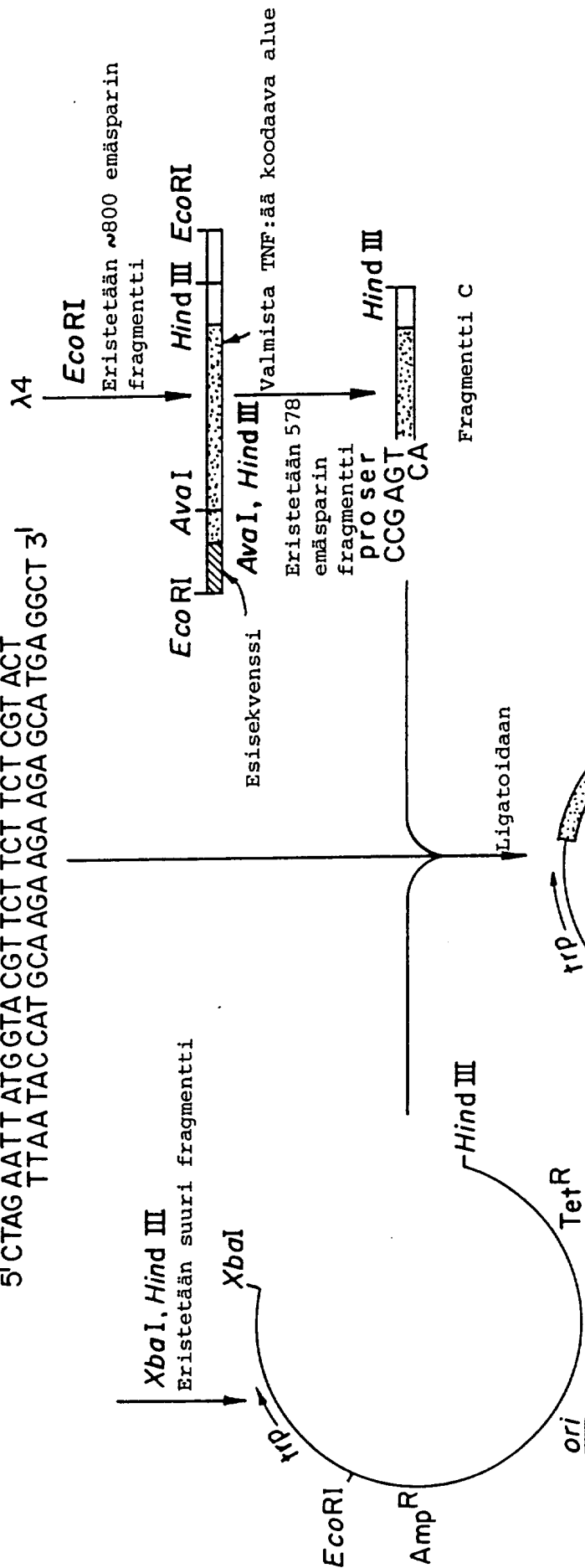


Fig.11.