



MD 1652 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1652** ⁽¹³⁾ **G2**

(51) **Int. Cl.⁷**: C 12 N 15/19; C 12 P 21/02;
C 07 K 14/00; A 61 K 38/00; C 12 N 1/21,
5/10, 1/19 // C12N:1/21, C 12 R 1:19,
C 12 N 1: 19, C 12 R 1: 865; A 61 P 37/02

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) **Nr. depozit:** 97-0099

(22) **Data depozit:** 1992.03.27

(31) **Nr.:** 91/03904; 92/00137

(32) **Data:** 1991.03.29; 1992.01.08

(33) **Țara:** FR

(41) **Data publicării cererii:**

1998.04.30, BOPI nr. 4/1998

(43) **Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului pe
răspunderea solicitantului:**

2001.04.30, BOPI nr. 4/2001

(85) 1997.02.11

(86) PCT/FR92/00280; 1992.03.27

(87) WO 92/17586; 1992.10.15

(71) **Solicitant:** SANOFI-SYNTHELABO, FR

(72) **Inventatori:** CAPUT, Daniel, FR; FERRARA, Pascual, AR; GUILLEMOT, Jean-Claude, FR;
KAGHAD, Mourad, FR; LABIT-LE BOUTEILLER, Christine, FR; LEPLATOIS, Pascal,
FR; MAGAZIN, Marilyn, US; MINTY, Adrian, GB

(73) **Titular:** SANOFI-SYNTHELABO, FR

(74) **Reprezentant :** GLAZUNOV Nicolai, MD

(54) **Proteină cu activitate de tip citochină, ADN recombinant, codificator
pentru această proteină, celule și microorganisme transformate, vector de
expresie, procedeu de obținere a proteinei și remediu care conține această
proteină**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la o proteină cu activitate de tip
citochină sau la precursorul acestei proteine, care 5
conține următoarea succesiune a aminoacizilor (a₁):
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
20 25 30
Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
35 40 45 10
Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
50 55 60
Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
65 70 75 80

2
Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
100 105 110

în care Xaa reprezintă Asp sau Gly.

Invenția se referă de asemenea la ADN recom-
binant, codificator pentru această proteină, la celule
și microorganisme transformate, la vector de
expresie, precum și la un procedeu de obținere a
proteinei și remediu cu acțiune imunomodulatoare.

Revendicări: 25

Figuri: 7

MD 1652 G2

MD 1652 G2

Descriere:

3

5 Obiectul prezentei invenții îl constituie o proteină nouă cu activitate de tip citochină, metode de inginerie genetică pentru producerea ei, și anume metoda de ADN recombinant, un vector de expresie, purtător al acestui ADN recombinant, microorganisme procariote și celule eucariote, ce conțin acest ADN recombinant, precum și un medicament, util ca imunomodulator, care conține această proteină cu titlu de ingredient activ.

10 Este bine cunoscut că sistemul imun cuprinde elemente celulare și substanțe solubile, secretate de acestea din urmă, numite citochine. Ele reprezintă proteine, care asigură comunicarea între o celulă emetrică și o celulă-țintă, sau în sistemul imun, sau într-un alt sistem biologic al organismului. Citochinele au în general o activitate biologică, numită pleiotropică, ele manifestă multiple acțiuni asupra celulei-țintă: proliferarea, diferențierea, citoliza, activarea, chimiotactismul, etc. Multiple din aceste molecule se utilizează deja în terapeutică: de exemplu, interleuchina-2 sau α -interferonul se utilizează pentru tratamentul unor tumori prin imunoterapie și factorii mielopoietici, cum ar fi GCSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor - Factorul de Stimulare al Coloniei Granulocitare) sau GMCSF (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor - Factorul de Stimulare al Coloniei Granulocitare Monocitare), care stimulează creșterea și diferențierea celulelor sanguine, astfel

15 contribuind la îmbogățirea sângelui, sărac în aceste celule, de exemplu, prin chimioterapie.

Despre citochine se cunosc următoarele informații:

20 1) Ele corespund proteinelor secretate. Secreția proteinei, în special a citochinei, evoluează deseori printr-un mecanism, care include hidroliza regiunii aminoterminală hidrofobă a proteinei transformate, numită succesiune prepeptidică sau peptidă semnal, în timpul excreției proteinei mature în mediu [1]. Majoritatea succesiunilor peptidice ale citochinelor cunoscute includ, în esență, o peptidă semnal.

25 2) Citochinele, în general, corespund proteinelor inductibile sau de alte citochine [2], sau de agenți chimici de activare ai proliferării și diferențierii celulelor, așa ca lipozaharidele, ionoforii calcici, de exemplu, calimicina, dibutiril-adenozin-5'-monofosfatul ciclic, dimetilsulfoxidul, acidul retinoic, concanavalina A, fitohemaglutinina (PHA-P) și esterii forbolului, de exemplu, 2-miristat-3-acetat forbolul (PMA), sau de anticorpii contra moleculelor de suprafață, cum ar fi antigenele de suprafață CD2, CD3, CD28 și CD40 [3].

3) Inducția citochinelor fiind tranzitorie, ARN mesageri ai citochinelor sunt instabili. Ei posedă, pentru majoritatea citochinelor, regiuni bogate în A și U, în special, succesiunea AUUUA, succesiune instabilă tipică generalizatoare [4].

30 4) Marea majoritate a citochinelor cunoscute se sintetizează de către celulele sistemului imun, în special, de monocitele și limfocitele T auxiliare ale sângelui [5]. Sinteza lor se induce de agenții inductori menționați în alineatul 2).

În plus, se cunoaște că, antrenând celulele mononucleare ale sângelui periferic, constituite în general din limfocite și monocite, cultivate și stimulate cu diferiți agenți inductori, cum ar fi fitohemaglutinina, 2-miristat-3-acetat forbolul și anticorpii monoclonali anti CD2, poate fi construită o bancă ADN complementar, fără succesiunile ubiquitare ale ADN complementar în celulele animalelor, deci ADN complementar îmbogățit

35 codificator pentru citochine [6].
Pe de altă parte, se cunoaște [7] că producerea citochinelor (numite limfocine) de către limfocitele T este mai importantă, deci corespunde unor cantități mai mari de ARN mesageri la stimularea cu ajutorul unei combinații binare: 2-miristat-3-acetat forbol și fitohemaglutinină sau 2-miristat-3-acetat forbol și anticorpii anti-CD28, comparativ cu stimularea numai cu 2-miristat-3-acetat forbol, și la stimularea cu ajutorul unei combinații binare 2-miristat-3-acetat forbol și fitohemaglutinină, comparativ cu combinarea terțiară: 2-miristat-3-acetat forbol, fitohemaglutinină și ciclosporină A, ciclosporina A având un efect inhibitor evident asupra transcripției de ARN mesageri ai citochinelor [8].

45 Această expresie diferențiată a ARN mesageri ai citochinelor în diverse condiții de stimulare poate servi ca cernere, numită cernere diferențiată a băncii de ADN complementar cu conținut de succesiuni ce codifică citochinele în scopul selectării acestor ultime succesiuni [9]. Într-adevăr, din doi ARN mesageri, corespunzători cu două stări de stimulare a celulelor, definite aici ca starea de stimulare 1 și starea de stimulare 2, starea de stimulare 2 fiind considerată mai bogată în ARN mesageri codificând pentru citochină, comparativ cu starea 1, se pot construi 2 sonde radioactive, definite respectiv sonda 1 și sonda 2, care reprezintă transcripțe, obținute prin transcriptaza inversă a acestor doi ARN mesageri. Aceste două sonde se hibridizează cu colonii bacteriene, cu conținut de succesiuni din banca de ADN complementar. Coloniile bacteriene, ce conțin ADN complementar, în care ARN mesager se modifică preponderent între două stări de activare, lansează semnale diferențiate cu două sonde, hibridizarea fiind mai semnificativă pentru clonele reținute (care corespund proteinelor inductibile) în cazul sondei 2, comparativ cu sonda 1.

55

Se cunoaște de asemenea un vector de expresie care conține ADN menționați [9].

MD 1652 G2

În plus, se cunoaște că celulele COS, celulele rinichilor de maimuță, care expresează antigenul T al virusului SV40 [10], ce permit replicarea vectorilor cu conținut de surse de replicare a ADN al virusului SV40, precum și microorganismele procariote se selectează pentru studiul expresiei genelor în celulele animalelor și secreției proteinelor exprimate. Secreția unei proteine în aceste celule indică faptul că pe ea o
5
secreta celula, care o produce în mod natural. Se mai descrie un procedeu de preparare a proteinei cu activitate de tip citochină și o substanță medicamentoasă care conține această proteină cu titlul de ingredient activ [11].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unei proteine cu activitate de tip citochină cu succesiuni cu un grad înalt de omologie și puritate, fiind eficientă în tratamentul diferitelor stări patologice.

Obiectul invenției este o proteină cu activitate de tip citochină sau un precursor al acestei proteine, care
10
include următoarea succesiune aminoacidă (a_1):

```
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
  1         5         10        15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
      20        25        30
Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
      35        40        45
Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
      50        55        60
Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
      65        70        75        80
Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
      85        90        95
Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
      100       105       110
```

in care

Xaa reprezintă Asp sau Gly, sau succesiunea care posedă un grad înalt de omologie cu succesiunea (a_1).
20
Un grad înalt de omologie definește aici o omologie de identitate (raportul între aminoacizii identici și numărul total de aminoacizi) de cel puțin 80%, de preferință, cel puțin 90% succesiuni aminoacide, în cazul în care ele se compară după omologia maximă, conform metodei de concordanță optimă a succesiunilor Needleman și Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453. Această metodă algoritmică, în care se examinează toate concordanțele posibile și se creează un șir concordat, în care cât mai mulți aminoacizi identici se
25
selectează conform perechilor și numărul de treceri în succesiunile coordonate este minim, în special, se utilizează în asigurarea de program UWGCG al Universității din Wisconsin: Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8722-opțiunea GAP.

Succesiunea peptidică deja cunoscută, cea mai apropiată de succesiunea (a_1) din 112 aminoacizi, este succesiunea din 132 aminoacizi, obținută din ADN complementar al proteinei P600 de șoarece, descrisă de
30
K.D. Brown et al., 1989, J. Imm. 142, 679-687 (proteina exprimată de limfocitele TH2 de șoarece, funcția cărora este neelucidată). Compararea acestor succesiuni peptidice prin metoda Needleman și Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453, atestă că 63 aminoacizi din 112 sunt identici sau omologia de identitate constituie circa 56%.

Proteina conform invenției constituie o proteină, secretată de limfocitele T și indusă în ele de 2-miristat-3-acetat forbol, inducția citochinei (vezi textul anterior) fiind amplificată cu ajutorul fitohemaglutininei sau anticorului anti-CD28, având un efect inhibitor asupra amplificării în cazul stimulării cu fitohemaglutinină în
35
prezența ciclosporinei A. Proteina conform invenției, definită ca proteina NC30, reprezintă, deci, o limfochină umană nouă cu activități imunomodulatoare de tip citochină (proliferarea celulelor, activarea celulelor, chimio-tactismul și reglarea sintezei altor citochine). Ea acționează cel puțin asupra a două genuri de celule cheie ale sistemului imun: monocite și limfocite B. Este vorba, deci, de o nouă interleuchină. Unele din proprietățile ei sunt similare celor ale interleuchinei-4: inhibarea sintezei interleuchinei-1 β și a interleuchinei-6 de către monocitele sângelui periferic, activate de LPZ (lipopolizaharidă), și modularea expresiei antigenului CD23 în
40
limfocitele B ale amigdalelor. Aceste două proprietăți în egală măsură sunt specifice și pentru interleuchina-4 (W. Paul, 1991, Blood, 77, 1959, și Waal Malefyt et al., 1991, J. Exp. Med., 174, 1199-1220).

Proteina conform invenției reprezintă o interleuchină de tip limfochină. Ea prezintă interes ca principiu
45
activ al unui medicament, util pentru tratamentul tumorilor, prin imunomodulare și tratamentul unor afecțiuni infecțioase sau inflamatoare.

50
Proteina conform invenției poate include succesiunile (a_1), prezentate anterior, unul sau câțiva aminoacizi, în special, succesiunea: Ser-Pro.

MD 1652 G2

Această proteină, de preferință, se află într-o formă cu masă moleculară aparentă, determinată prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS), 9.0 ± 2 sau 16.0 ± 2 kDa. Ea este avantajos N-glicozilată, în special, când masa ei moleculară aparentă constituie 16.0 ± 2 kDa.

Prezintă interes faptul că această proteină posedă un grad de puritate, determinat prin electroforeză pe gel
5 de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și manifestare cu argint, mai mare de 70%, de preferință, mai superior de 90%.

Obiectul invenției îl constituie, de asemenea, ADN recombinant, care codifică proteina menționată, obținută dintr-un lizat celular sau, de preferință, codifică precursorul proteinei precedente. Acest precursor include, de preferință, o succesiune de semnal.

10 Funcția acestei succesiuni de semnal, selectate în funcție de celula-gazdă, este de a stimula excreția
proteinei recombinante din citoplasmă, ceea ce permite proteinei recombinante să ia conformația similară celei
a proteinei naturale și facilitează considerabil purificarea ei. Această succesiune de semnal poate fi hidrolizată
sau în câteva etape cu peptidaza de semnal, care eliberează proteina matură, sau în câteva etape, când această
succesiune de semnal include, cu excepția succesiunii eliminate cu peptidaza de semnal, definită peptidă de
15 semnal sau presuccesiune, o succesiune, eliminată mai tardiv în procesul unuia sau a câteva evenimente
proteolitice, definită pro-succesiune.

Succesiunea ce codifică proteina matură reprezintă, de exemplu, una din următoarele succesiuni (Na_1) sau (Na'_1):

	(Na ₁)			
20	GGCCCTGTGC	CTCCCTCTAC	AGCCCTCAGG	GAGCTCATTG
	AGGAGCTGGT	CAACATCACC	CAGAACCAGA	AGGCTCCGCT
	CTGCAATGGC	AGCATGGTAT	GGAGCATCAA	CTTGACAGCT
	GACATGTACT	GTGCAGCCCT	GGAATCCCTG	ATCAACGTGT
	CAGGCTGCAG	TGCCATCGAG	AAGACCCAGA	GGATGCTGAG
25	CGGATTCTGC	CCGCACAAGG	TCTCAGCTGG	GCAGTTTTC
	AGCTTGATCA	TCCGAGACAC	CAAAATCGAG	GTGGCCCACT
	TTGTAAAGGA	CCTGCTCTTA	CATTTAAAGA	AACITTTTCG
	CGAGGGACGG	TTCAAC		

	(Na ⁺)			
30	GGCCCTGTGC	CTCCCTCTAC	AGCCCTCAGG	GAGCTCATTG
	AGGAGCTGGT	CAACATCACC	CAGAACCAGA	AGGCTCCGCT
	CTGCAATGGC	AGCATGGTAT	GGAGCATCAA	CCTGACAGCT
	GGCATGTACT	GTGCAGCCCT	GGAATCCCTG	ATCAACGTGT
	CAGGCTGCAG	TGCCATCGAG	AAGACCCAGA	GGATGCTGAG
35	CGGATTCTGC	CCGCACAAGG	TCTCAGCTGG	GCAGTTTCC
	AGCTTGATAT	TCCGAGACAC	CAAAATCGAG	GTGGCCCAGT
	TTGTAAAGGA	CCTGCTCTTA	CATTTAAAGA	AACCTTTTCC
	CGAGGGACGG	TTCAAC		

Pentru expresie în microorganismele procariote, cum ar fi, de exemplu, *Escherichia coli*, această succesiune de semnal poate reprezenta sau o succesiune derivată de la succesiunea ce codifică precursorul natural al unei proteine, exportate de un microorganism procariot (de exemplu, peptida de semnal OmPA [Gharyeb et al., 1984, EMBO Journal, 3, 2437-2442]) sau peptida de semnal a fosfatazei alcaline (Michaelis et al., J. Bact., 1983, 154, 366-374), sau o succesiune neendogenă, ce codifică precursorul eucariot (de exemplu, peptida de semnal a unuia din precursorii naturali ai hormonului uman de creștere), sau o succesiune, ce codifică peptida sintetică de semnal, de exemplu, similară celei descrise în cererea de brevet francez nr. 2 636 643 cu succesiunea:

Met Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu
1 5 10 15

50 Cys Leu Pro Ser Trp Asn Ala Gly Ala 20 25

Pentru o expresie in celulele eucariote, cum ar fi ascomicetele, *de exemplu*, levura *Saccharomyces cerevisiae* sau ciuperca filamentoasă *Cryphonectria parasitica*, această succesiune de semnal, de preferință, reprezintă succesiunea derivată de la succesiunea ce codifică precursorul natural secretat de aceste celule, al proteinei, *de exemplu*, pentru levură - precursorul invertazei (cererea de brevet EP 0123289) sau precursorul pre-pro-succesiunii alfa-feromon (cererea de brevet DK 2484/84), sau pentru *Cryphonectria parasitica* - precursorul pre-pro-succesiunii endotiapepsinei, cu succesiunea:

Met Ser Ser Pro Leu Lys Asn Ala Leu Val Thr Ala Met Leu Ala Gly

1	5	10	15												
Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Lys	Gln	His	Val	Gly	Ile	Pro	Val	Asn
	20								25						30

Ala Ser Pro Glu Val Gly Pro Gly Lys Tyr Ser Phe Lys Gln Val Arg

MD 1652 G2

- Asn Pro Asn Tyr Lys Phe Asn Gly Pro Leu Ser Val Lys Lys Thr Tyr
35 40 45
50 55 60
Leu Lys Tyr Gly Val Pro Ile Pro Ala Trp Leu Glu Asp Ala Val Gln
65 70 75 80
Asn Ser Thr Ser Gly Leu Ala Glu Arg
85
- 5 Pentru expresie în celulele animale, în calitate de succesiune de semnal se utilizează sau succesiunea de semnal cunoscută pentru exportul proteinei din celula animală, de exemplu, succesiunea ce codifică peptida de semnal a unui precursor natural al hormonului de creștere uman, deja cunoscută din considerentele posibilității secreției interleuchinei-2 (vezi cererea de brevet francez 2619711), sau una din cele patru succesiuni (b₁), (b₂), (b₃) și (b₄) ce urmează:
- 10 (b₁)
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30
- (b₂)
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
15 Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
20 25 30
- Ser Pro
(b₃)
Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala
- 20 (b₄)
Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala Ser Pro
20
- avantajos codificate corespunzător prin următoarele succesiuni (Nb₁), (Nb₂), (Nb₃) și (Nb₄):
- 25 (Nb₁)
ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGCC
TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCC
- (Nb₂)
30 ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGCC
TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCCTCCC CA
- (Nb₃)
ATGGCGCTTT TGTTGACCAC GGTCATTGCT CTCACCTTGCC
35 TTGGCGGCTT TGCC
- (Nb₄)
ATGGCGCTTT TGTTGACCAC GGTCATTGCT CTCACCTTGCC
TTGGCGGCTT TGCCCTCCCA
- Invenția se referă de asemenea la un vector de expresie, care include ADN definit anterior.
- 40 Pentru o expresie în microorganisme procariote, în particular în *Escherichia coli*, ADN recombinant se inserează în vectorul de expresie ce conține un promotor eficient, care urmează după situsul de fixare al ribozomilor deasupra genei exprimate, ca și succesiunea eficientă pentru terminarea transcrierii genei exprimate aflate inferior. Această plasmidă de asemenea trebuie să cuprindă o sursă de replicare și un marker de selecție. Toate aceste succesiuni trebuie selectate în funcție de celula-gazdă.
- 45 Pentru expresie în celulele eucariote, vectorul de expresie conform invenției include ADN recombinant, definit anterior, cu mijloacele necesare pentru expresia, replicarea lui în celulele eucariote și selecția celulelor transformate. De preferință, acest vector poartă un marker de selecție, selectat, de exemplu,
- 50 pentru complementarea mutației celulelor eucariote receptoare, care face posibilă realizarea selecției celulelor care au integrat ADN recombinant într-un număr mare de copii sau în genomul lor sau în vectorul multicopiilor.

MD 1652 G2

Pentru expresie în celulele eucariote, cum ar fi levurile, de exemplu, *Saccharomyces cerevisiae*, este convenabilă inserarea de ADN recombinant între, prim, promotorul și, secund, terminatorul transcripției. Ansamblul promotor-succesiunea codificatoare-terminator, numit casetă de expresie, se clonează sau în vectorul plasmidic monocopie sau policopie pentru levură, sau se integrează ca multicopie în genomul levurii.

5 Pentru expresie în celulele eucariote, cum ar fi celulele ciupercilor filamentoase grupa ascomicetelor, de exemplu, genul *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Trichoderma* sau *Cryphonectria*, vectorul de expresie conform invenției poartă ADN recombinant, definit anterior, cu mijloace necesare pentru expresia acestuia și, eventual, un marker de selecție și/sau succesiuni telometrice. De fapt, se pot selecta transformanți integrați cu ADN căutat cu un marker de selecție aflat sau în același vector, în care se află și ADN căutat, sau în alt vector, 10 acești doi vectori introducându-se deci prin cotransformare. ADN recombinant conform invenției poate fi sau integrat în genomul ciupercilor filamentoase, sau conservat în formă extracromozomică datorită succesiunilor ce permit replicarea și partiția acestui ADN.

Pentru expresie în celulele animale, în special, în celulele ovariene de hamster chinezesc CHO, ADN recombinant, de preferință, se inserează într-o plasmidă (de exemplu, derivată de la pBR322), ce include sau o 15 unitate de expresie, în care este inserat ADN recombinant conform invenției și, eventual, un marker de selecție, anterior unui promotor eficient, sau două unități de expresie. Prima unitate de expresie include ADN recombinant, definit anterior, precedat de promotorul eficient (de exemplu, promotorul precoce de SV40). Succesiunea în jurul ATC (globulina antitumorală) de inițiere, de preferință, se selectează în funcție de succesiunea tipică de generalizare descrisă de Kozak (M. Kozak, 1978, Cell, 15, 1109-1123). Succesiunea 20 intron- α -globulina de șoarece, poate fi inserată mai superior de ADN recombinant, de asemenea, ca succesiune ce comportă saitul de poliadenilare, de exemplu, succesiunea de poliadenilare de SV40, poate fi inclusă mai inferior de gena recombinantă. A doua unitate de expresie poartă un marker de selecție, de exemplu, succesiunea ADN ce codifică dihidrofolatreductaza (DHFR). Plasmida se transfectă în celulele animalelor, de exemplu, celulele CHO dhfr⁻ (incapabile să exprime DHFR). Linia (celulară) se 25 selectează după rezistența la metotrexat: ea integrează în genomul ei un număr mare de copii ale ADN recombinant și aceasta se exprimă la un nivel suficient.

Invenția se referă, de asemenea, la microorganismele procariote transformate de către vectorul de expresie definit anterior, în special, unul de specia *Escherichia coli*, în mod analogic cu celulele eucariote, care conțin ADN recombinant definit anterior. Acesta poate fi introdus prin transformare prin vectorul de expresie, definit 30 anterior, sau prin însuși ADN recombinant, conform invenției, care uneori poate fi integrat direct în genom în locusul, care permite expresia lui.

Celulele eucariote care prezintă interes reprezintă celule animale.

ADN recombinant, de exemplu, se poate introduce în aceste celule prin transfect prin vectorul de expresie, menționat anterior, prin infecția cel puțin cu un virus sau retrovirus, care îl conține, sau prin microinjectare. 35 Celulele animale preferate sunt celulele CHO, în special, celulele CHO dhfr⁻, din care este posibilă obținerea liniei cu productivitate înaltă de proteină conform invenției. Celulele COS constituie, de asemenea, gazda preferată pentru obținerea acestei proteine.

Alte celule eucariote, ce prezintă interes, sunt celulele de levuri, în special, celulele *Saccharomyces cerevisiae*.

40 Invenția se referă, de asemenea, la un procedeu de obținere a proteinei definite anterior, care include etapa de cultivare a celulelor animale menționate sau a levurii, cu etapele de izolare și purificare a proteinei recombinante.

Invenția se referă, de asemenea, la o proteină recombinantă, care poate fi obținută prin procedeul care include etapa de cultivare a acestor celule animale sau a levurii, cu etapele ulterioare de izolare și purificare a 45 proteinei recombinante.

Deci, obiectul invenției îl constituie, de asemenea, un preparat medicamentos, util, în special, în oncologie și în tratamentul prin imunomodulare a unor boli infecțioase și a unor procese inflamatoare, care conține în calitate de ingredient activ proteina definită anterior, într-un excipient farmaceutic acceptabil. El se poate 50 utiliza individual sau în asociere cu alți agenți activi, de exemplu, cu una sau mai multe citochine.

Invenția se elucidează mai detaliat în descrierea ce urmează, divizată în capitole, care conține rezultatele experimentale și dezbaterile lor. Unele din aceste capitole se referă la experiențele efectuate în scopul realizării invenției, alte exemple de realizare a invenției se prezintă, desigur, în scop pur ilustrativ.

Majoritatea tehnologiilor descrise în aceste capitole sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu și sunt 55 descrise detaliat în lucrarea Sambrook, Fritsch și Maniatis: "Molecular cloning: A Laboratory manual", publicată în anul 1989 de editorii Cold Spring Harbor Press la New-York (ediția a 2-a).

Rezultatul constă în aceea că crește gradul de omologie și de puritate a produselor obținute.

60 Descrierea ce urmează, pentru o elucidare mai profundă, este însoțită de figurile 1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5, 6 și 7, care reprezintă:

MD 1652 G2

- fig. 1a, fișa genetică în ansamblu a plasmidei pSE1,8care reprezintă plasmida de clonare a *E. coli* și de expresie în celulele animale, saiturile ce dispar prin ligare fiind notate în paranteze. Simbolurile utilizate în această figură se precizează în descrierea plasmidei menționate (capitolul 2);
- fig. 1b, succesiunea fragmentului sintetic "saitul liant al Hind III"-Hind III, utilizat pentru construirea plasmidei pSE1;
- fig. 1c, succesiunea fragmentului sintetic Hind III-"saitul liant al BamHI";
- fig. 2, succesiunea nucleotidică a ADNc NC30 și vis-a-vis, succesiunea aminoacidă dedusă, în care sunt subliniați doi Met, susceptibili să inițieze translarea, locusurile posibile de dezintegrare a peptidei de semnal fiind indicate cu săgeți verticale și patru regiuni posibile de N-glicozilare fiind subliniate prin punctare;
- fig. 3 și 4, corespunzător coordonarea după omologia maximă conform metodei Needleman și Wunsch, 1970, J. Med. Biol., 48, 443-453, a succesiunii aminoacide, deduse din ADNc NC30 (linia superioară), și a succesiunii deduse din ADNc al proteinei P600 de soarece (linia inferioară) și concordanța conform acestei metode a părții ce codifică ADNc NC30 (linia superioară) și a părții ce codifică ADNc al proteinei P600 (linia inferioară);
- fig. 5, succesiunea fragmentului B, saitul de mutație silențioasă în raport cu ADNc NC30 fiind indicat cu asterisc;
- fig. 6 și 7, variația densității optice și/sau a densității celulelor liniei B9, în funcție de concentrația proteinei purificate NC30, produse din supernatantul celulelor COS (fig. 6) și originară din levură (fig. 7).
- Capitolul 1. Cultivarea și stimularea celulelor mononucleare din sângele periferic cu ajutorul PMA și PHA-P. Prepararea de ARN mesager, utilizat pentru crearea băncii de ADN complementar
- 1) Cultivarea și stimularea celulelor mononucleare din sângele periferic
- Pornind de la alicvot de sânge periferic (prelevate de la trei donatori sănătoși într-un centru de transfuzie a sangelui), în prealabil expuse citoforezei și gradientului Ficoll (Pharmacia, Boyum A., 1968, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, p. 77-89), se prelevă fracția celulelor, îmbogățită cu celule mononucleare din sângele periferic PBMNC (celule mononucleare din sângele periferic) aproximativ cu următoarea compoziție: 70% limfocite, 25% monocite și 5% granulocite (calculul celulelor s-a efectuat cu ajutorul controlului de celule modelul Coulter S-Plus IV).
- Celulele se amplacează într-un flacon de 250 ml, apoi se centrifughează timp de 10 minute la 37°C cu accelerația 300 g. Supernatantul se elimină și sedimentul celular se spală cu 50 ml mediu pe bază de glucoză, săruri minerale, aminoacizi și vitamine, numit mediul RPMI (mediu RPMI 1640, produs de firma Gibco BRL), apoi din nou se centrifughează în condiții similare.
- Sedimentul de celule se tratează cu 500 ml mediu RPMI, completat cu 10% ser fetal de vițel (Gibco BRL - notare standard: 013-06290H), adăugând 10 unități de penicilină și 10 μg de streptomicină (soluția de penicilină cu streptomicină, firma Gibco, notare standard: 043-05140D) pentru 1 ml mediu, la fel și L-glutamină (Gibco BRL - notare standard: 043-05030D) până la o concentrație finală de 2 mM.
- O parte din suspensia de celule se repartizează pentru separarea celulelor aderente și celulelor neaderente, circa 100 ml la o cutie, în patru cutii pătrate mari de cultivare (dimensiunile 245×245×20 mm-Nunc - notare standard: 166508), și se incubează pentru o oră la 37°C. Se cunoaște că majoritatea celulelor monocitare aderă la cutia de cultivare, iar majoritatea celulelor limfocitare rămân în suspensie.
- Celulele neaderente se aspiră cu o pipetă și se cultivă în flacoane de cultivare de tip Falcon cu suprafața 175 cm² în prezența mediului RPMI, completat cum este descris anterior, în care se adaugă 10 ng/ml 2-miristat-3-acetat forbol (PMA) (Sigma - notare standard: P 8139) și 5 μg/ml fitohemaglutinină (PHA-P) (Sigma - notare standard: 1.8754) la 37°C în prezența a 5% CO₂ timp de 24 ore.
- Pe celulele aderente iarăși se toarnă 100 ml mediu RPMI, completat analogic descrierii anterioare, ce conține suplimentar 10 ng/ml PMA și 5 μg/ml PHA-P. Celulele se incubează la 37°C în prezența a 5% (vol.) CO₂ pentru 5 ore.
- Suspensia restantă de celule, numită în continuare total de celule, se repartizează în patru cutii pătrate mari de cultivare și se incubează în prezența mediului RPMI, completat analogic descrierii anterioare, la care se adăunează 10 ng/ml de PMA și 5 μg/ml PHA-P la 37°C în prezența a 5% (vol.) CO₂ timp de 5 ore pentru primele două cutii și 24 ore pentru alte două cutii.
- Peste circa 2 ore după finalizarea incubării, în mediul de cultură al acestor diferite celule se adaugă 10 μg/ml cicloheximidă (Sigma, notare standard: C6255) (inhibitorul translării, care mărește stabilitatea ARN al citochinelor: vezi Lindsten et al., 1989, Science, 244, 339-344) și incubarea continuă timp de 2 ore la 37°C.

2) Prepararea de ARN mesager

a) Extragerea de ARN mesager

Celulele se recuperează în modul următor:

MD 1652 G2

- celulele aderente se spală de 2 ori cu tampon PBS9(fosfat tampon salin - notare standard: 04104040-Gibco BRL), apoi se rad cu un răzor din cauciuc și se centrifughează. Astfel se obține un sediment de celule, numit sedimentul A;
- pentru celulele neaderente, după agitare în flaconul ce conține suspensia de celule, ultima se prelevă și se centrifughează. Astfel se obține un sediment de celule, numit sedimentul NA;
- pentru celule integrale fracția aderentă se spală de 2 ori cu tampon PBS și se rade așa cum este descris anterior, apoi se centrifughează. Fracția neaderentă se centrifughează. Cele două sedimente de celule obținute se reunesc ulterior. Reunirea lor este numită sedimentul celulelor T (5 ore), pentru totalitatea de celule incubate timp de 5 ore, și T (24 ore), pentru totalitatea de celule incubate timp de 24 ore.
- Sedimentele de celule A, NA, T (5 ore) și T (24 ore) se congelează și se conservă la -80°C.
- Fiecare sediment de celule congelat se trece în suspensie într-un tampon de liză cu următoarea compoziție: 5 M guanidin-tiocianat; 50 M tris-(hidroxi-metil)-aminometan, pH 7.5; 10 M EDTA. Suspensia se tratează cu ultrasunet cu dezintegratorul ultrasonor Ultra Turax nr. 231256 (Janke și Kunkel) cu putere maximă timp de 4 cicluri câte 20 secunde. Se adaugă β -mercaptoetanol până la 0.2 M și apoi se mai efectuează un ciclu de tratare cu ultrasunet timp de 30 secunde. Se adaugă clorură de litiu până la 3 M. Suspensia se răcește până la 4°C și se lasă la această temperatură pentru 48 ore. Apoi se izolează ARN prin centrifugare timp de 60 minute. Sedimentul ARN se spală o dată cu soluție de 3M de clorură de litiu, se recentrifughează, se mai tratează cu un tampon cu următoarea compoziție: 1% dodecilsulfat de sodiu, 5 M EDTA și 10 M Tris-HCl, pH 7.5, adăugând 1 mg/ml proteinază K (Boehringer, Mannheim, GmbH). După incubare la 40°C timp de o oră, se extrage soluția de ARN cu un amestec fenol/cloroform. La -20°C se sedimentează ARN conținut în faza apoasă, cu ajutorul soluției de 0.3 M acetat de amoniu și 2.5 volume etanol. Se centrifughează la 15000 g timp de 30 minute și sedimentul se depozitează.
- b) Purificarea fracției poli A⁺ de ARN
- Sedimentul se tratează cu 1 ml tampon cu compoziția 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, și 1 mM EDTC, numit tampon TE, și se trece în suspensie prin agitare cu un malaxor turbionar. Oligo-dT-celuloza de tip 3 (comercializată de Collaborative Research Inc., Biomedicals Product Division) se prepară conform recomandărilor furnizorului. ARN se depune pe oligo-dT-celuloză, se agită atent pentru trecerea în suspensie a bilelor, apoi se încălzește timp de 1 minut la 65°C.
- Suspensia se adaugă la 0.5 M NaCl, apoi timp de 10 minute se agită atent. Se centrifughează apoi timp de un minut cu 1000 g, supernatantul se elimină, sedimentul se spală de 2 ori cu câte 1 ml tampon TE, care conține 0.5 M NaCl. Supernatantul se elimină. Eluarea fracției poliadenilate de ARN (constituit din ARN mesageri) se obține prin suspensia bilelor în 1 ml de tampon TE, apoi prin încălzirea acestei suspensii la 60°C timp de 1 minut cu agitare ulterioară timp de 10 minute pe o placă basculantă. Apoi se centrifughează timp de 1 minut cu 1000 g, ceea ce permite recuperarea supernatantului, ce conține ARN mesageri liberi în soluție. Totalitatea operațiilor menționate (începând cu eluarea) se repetă de 2 ori. Supernatantul astfel obținut se combină, se elimină bilele reziduale prin centrifugare și supernatantul se sedimentează cu 3 volume de etanol și soluție de NaCl cu concentrația finală 0.3 M.
- Astfel, din sedimentele celulelor A, NA, T (5 ore) și T (24 ore) se obțin 4 eșantioane de ARN poli-A⁺, numite în continuare: ARN-poly A⁺-A; ARN-poly A⁺-NA; ARN-poly A⁺-T (5 ore) și ARN-poly A⁺-T (24 ore).
- Capitolul 2. Prepararea băncii de ADN complementar, îmbogățit cu succesiunile specifice ale celulelor mononucleare din sangele periferic
- 1) Construirea vectorului de clonare pSE1
- În strategia utilizată se apelează la fragmentele obținute prin sinteza plasmidei, deja existente și accesibile publicului, și fragmentele obținute prin sinteză, conform tehnologiilor utilizate în prezent. Metodele de clonare utilizate reprezintă metodele descrise de Sambrook et al. în "Molecular Cloning, a Laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Sinteza oligonucleotidelor se realizează cu sintetizatorul de ADN Biosearch 8700.
- Descrierea următoare, pentru o elucidare mai bună, conține referințe la figura 1a.
- Această plasmidă se construiește prin ligarea succesivă a următoarelor elemente:
- a) fragmentul PvuII-PvuII, simbolizat prin ++++++ în fig. 1a, din 2525 perechi de baze, obținut prin digestia completă a plasmidei pTZ18R (Farmacia) cu ajutorul enzimei de restricție PvuII. Acest fragment conține sursa de replicare a fagului f1 (notată în fig. 1a prin ORIF1), gena (notată în fig. 1a prin Amp^R) cu rezistență la ampicilină și sursa de replicare (notată în fig. 1a prin ORI pBR322), care permite realizarea

replicării acestei plasmide în *E. coli*. Primul sait liber PvuII dispare prin ligarea cu saitul liber EcoRV (care de asemenea dispare) al fragmentului, descris în alin. g);

MD 1652 G2

- b) fragmentul PvuII-HpaI, simbolizat XXXXXXXXXX în fig. 1a, din 1060 perechi de baze ale ADN al adenovirusului de tip 5 între pozițiile 11299 (locusul de restricție PvuII) și 10239 (locusul de restricție HpaI) (Dekker și Van Ormondt, Gene, 27, 1984, 115-120), conținând informația pentru ARN VA-I și VA-II.
- II. Săitul liber HpaI dispare prin ligarea cu săitul liber PvuII (care de asemenea dispare) al fragmentului descris în alin. c). Săitul ApaI în poziția 11218 se elimină prin dezintegrare cu ajutorul enzimei ApaI, tratare cu exonuclează: ADN polimeraza fagului T4 și religare;
- c) fragmentul PvuII-HindIII, simbolizat prin //////// în fig. 1a, din 344 perechi de baze, originar de la ADN al virusului SV40, obținut prin digestia completă cu ajutorul enzimelor de restricție PvuII și HindIII. Acest fragment include sursa de replicare și promotorul precoce al ADN al virusului SV40 (B.J. Byrne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80, 721-725).
- Săitul HindIII dispare prin ligarea cu săitul liant la HindIII al fragmentului, descris în alin. d);
- d) fragmentul sintetic "săitul liant la HindIII", simbolizat prin ~~~~~ în fig. 1a, din 419 perechi de baze, succesiunea căruia, prezentată în fig. 1b, conține succesiunea apropiată succesiunii 5' netransformate a virusului HTLV1 (R. Weiss et al., "Molecular Biology of Tumor Viruses", partea a 2-a, ediția a 2-a, 1985, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1057) și intronul periferic al genei α -globulinei șoarecelui (Y. Nishioka et al., 1979, Cell., 18, 875-882);
- e) fragmentul sintetic HindIII, "săitul liant la BamHI", simbolizat prin xxxxxxx în fig. 1a, ce conține promotorul de ARN polimeraza fagului T7, de asemenea ca polilinkerul, ce conține, în special, locusurile de clonare ApaI și BamHI, succesiunea căruia este prezentată în fig. 1c;
- f) fragmentul BamHI-BclI din 240 perechi de baze - simbolizat prin $\Delta\Delta\Delta$ în fig. 1a, fragment mic obținut prin digestia completă de către enzimele BclI și BamHI ale virusului SV40, care conține săitul de poliadenilare a lui (M. Fitzgerald et al., Cell, 24, 1981, 251-260). Siteurile BamHI și BclI dispar prin ligările corespunzătoare cu "Săitul liant la BamHI" al fragmentului descris în alin. e) și săitul BamHI (care de asemenea dispare) al fragmentului descris în alin. g);
- g) fragmentul BamHI-EcoRV, simbolizat prin OOOOOO în fig. 1a, din 190 perechi de baze, fragment mic originar din plasmida pBR322 după digestia completă de către enzimele EcoRV și BamHI.
- Plasmida pSE1, deci, include elementele necesare pentru utilizarea ei ca vector de clonare în *E. coli* (sursa de replicare în *E. coli* și gena de rezistență la ampicilină, originară de la plasmida pTZ18R), precum și ca vector de expresie în celulele animale (promotor, intron, locus de poliadenilare, sursă de replicare a virusului SV40) și pentru copierea ei sub formă de filament simplu în scopul secvențierii (sursa de replicare a fagului f1).
- 2) Construirea băncii de ADN complementar, îmbogățit cu succesiuni specifice ale celulelor mononucleare din sangele periferic
- Metoda de clonare utilizată este descrisă de Caput et al. Metoda amorsă-adaptor (Primer-adopter): Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 1670-1674.
- Ea constă, pe de o parte, în hidroliza enzimică a vectorului pSE1 cu ApaI, adăția "cozii" polydC pe extremitatea 3' protuberantă, urmată de hidroliza enzimică (digerarea) a plasmidelor astfel obținute cu endonucleaza BamHI. Fragmentul corespunzător vectorului se purifică pe coloana de sefăroză CL4B (Farmacia). Deci, ea include "coada" polydC la o extremitate, altă extremitate este coezivă de tip BamHI.
- Pe de altă parte, ARN polyA⁺, obținuți în finalul capitolului 1, se expun unei transcriptii inverse, reieșind din amorsa (primer), succesiunea căreia este următoarea:

5'<GATCCGGGCC CTTTTTTTTT TTT<3'

- Astfel, ADNc conține pe extremitatea 5' succesiunea GATCC, complementară extremității coezive BamHI.
- ARN-ADN hibridi, obținuți prin acțiunea transcriptazei inverse, se expun hidrolizei alcaline, care permite eliminarea ARN. ADNc monofilamentari se supun apoi transferazei terminale, pentru a ajusta polydG în 3', și se purifică prin 2 cicluri de trecere pe coloana de sefăroză CL4B.
- Acești ADNc se hibridizează cu ARN-polyA⁺, provenit din celulele liniei COS3 (linia de celule renale de maimuță, care exprimă antigenul T al virusului SV40: vezi Y. Gluzman, 1981, Cell, 23, 175-182), preparate prin metoda descrisă în capitolul 1 2).
- ADNc nehibridizați se izolează (fracția îmbogățită cu ADN, complementară la ARN mesageri specifici ai celulelor mononucleare din sangele periferic).
- Acești ADNc monofilamentați se inserează în vectorul pSE1. Oligonucleotida secundă (adaptorul), complementară la amorsa, este necesară pentru generarea săitului BamHI la extremitatea 5' a ADNc. După hibridizarea vectorului, ADNc și adaptorul, moleculele recombinante circulă prin acțiunea ligazei fagului T4. Regiunile monofilamente se consolidează atunci datorită ADN-polimerazei fagului T4. Pool-ul

- plasmidelor astfel obținut servește pentru transformarea tulpinii *E. coli* MC 1061 (Casabadian et S. Cohen, J. Bact. (1980), 143, 971-980) prin electrocorporație.
- 60 Protocolul preparării băncii de ADN complementar
- a) Prepararea de ADN complementar

MD 1652 G2

Din 5 µg ARN-polyA⁺ al celulelor mononucleare din sângele periferic, obținute în finalul Capitolului 1, cu următoarea compoziție:

ARN-polyA⁺A: 0.5 µ;

ARN-polyA⁺NA: 2 µ;

5 ARN-polyA⁺T (5 ore): 2 µ şi

ARN-polyA⁺T (24 ore): 0.5 µ,

se prepară ADN complementar monofilar, marcat prin ³²P-dCTP (ADN complementar obținut manifestă o activitate specifică de 3000 imp. min/ng) cu amorsa sintetică cu următoarea succesiune (conținând situl BamHI):

10 5'<GATCCGGGCC CTTTTTTTTT TTT<3'

intr-un volum de 100 µl tampon cu compoziția: 50 mM Tris HCl, pH 8.3; 5 mM clorură de magneziu; 10 mM DTT (ditiotritol), ce conține câte 0.5 mM de fiecare din dezoxinucleotid-trifosfați, 100 µCi dCTP α³²P şi 100 U RNasin (Promega). După incubare timp de 30 minute la 46°C cu 100 unități de enzimă-transcriptază inversă (Genofit-E1 022) se adaugă 4 ml de 0.5 M EDTA. Prima dată se extrage cu fenol (saturat în tampon TE), apoi, secund, se extrage cu cloroform. Se adaugă 10 µg ARN de transfer din ficatul de vițel, 1/10 din volumul soluției 10 M acetat de amoniu şi 2.5 volume de etanol pentru sedimentarea de ADN complementar. Se centrifughează, sedimentul se dizolvă în 30 µl tampon TE, apoi se elimină moleculele mici, cum ar fi sărurile, fenolul şi cloroformul, prin cromatografie de excludere pe coloana de poliacrilamidă P10 (Biogel P10-200-400 mesh, notare standard: 1501050; Biorad).

20 b) Hidroliza alcalină a ARN matrice

Se adaugă 4.6 µl soluție 2N hidroxid de sodiu, se incubează timp de 30 minute la 68°C, apoi se adaugă 4.6 µl 2N acid acetic şi soluția obținută se trece pe coloana de poliacrilamidă P10.

c) Adăptarea homopolimerică a dG

25 ADN complementar se prelungeşte la extremitatea 3' cu o "coadă" dG cu 66 unități de enzimă terminală-transferază (Farmacia 27073001). Se incubează cu 60 ml tampon cu următoarea compoziție: 30 mM Tris HCl, pH 7.6; 1 mM clorură de cobalt, 140 mM acid cacodilic; 0.1 mM DTT; 1 mM dGTP, timp de 30 minute la 37°C, apoi se adaugă 4 µl de 0.5 M EDTA.

d) Purificarea pe coloana de sefaroză CL4B

30 Pentru eliminarea amorsei sintetice, ADN complementar se purifică pe două coloane succesive cu 1 ml sefaroză CL4B (Farmacia), echilibrate cu o soluție cu conținut de 30 mM NaOH/2 mM EDTA.

Primele trei fracții radioactive (circa 80 µl fiecare) se regroupează şi se sedimentează cu 1/10 din volumul soluției de 10 M acetat de amoniu şi 2.5 volume etanol. Cantitatea de ADN complementar constituie 1 µg.

e) Hibridizarea

35 Sedimentul ADN complementar se trece în suspensie în 25 µl tampon TE, se adaugă 15 µg ARN-polyA⁺, extras din celulele liniei COS, apoi 1/10 din volumul soluției de 3M NaCl, 2.5 volume de etanol şi se lasă să se sedimenteze la -20°C.

Se centrifughează, se spală cu 70% etanol, se usucă, sedimentul se dizolvă în 5 µl tampon cu următoarea compoziție: 0.1 M Tris HCl, pH 7.5; 0.3 M NaCl; 1 mM EDTA, soluția obținută se plasează într-un tub capilar, care se închide ermetic (se sudează), apoi se incubează la 65°C timp de 40 ore.

40 Conținutul capilarului se diluează în 100 µl tampon TE, la care se adaugă 300 µl de 50 mM tampon fosfat de sodiu, pH 6.8. Soluția obținută se trece pe o coloană cu hidroxiapatită (Biorad, notare standard: 130.0520) la 60°C, echilibrată cu acest tampon fosfat. Se separă filamentul simplu (ADN complementar nehibridizat) şi filamentul dublu (ARN mesagerul COS, hibridizat cu ADN complementar) cu un gradient de 0.1 M până la 0.2 M tampon fosfat la traversarea coloanei cu hidroxiapatită. Frațiile corespunzătoare se regroupează cu ADN complementar monofilamentar (25% de masă de ADNc eluat, ceea ce corespunde îmbogățirii circa de 4 ori cu succesiuni specifice ale celulelor mononucleare din sângele periferic), se adaugă 20 µg ARN de transfer, volumul total se sedimentează cu 1/10 din volumul soluției de 10M de acetat de amoniu şi 2.5 volume de etanol. Se centrifughează, sedimentul obținut se dizolvă în 200 µl TE, fosfatul rezidual se elimină pe poliacrilamida P10, se resedimentează cu 1/10 din volumul soluției de 10M de acetat de amoniu şi 2.5 volume

50 etanol. Sedimentul se dizolvă în 30 µl soluție de 30 mM NaOH; 2 mM EDTA. ADN complementar se plasează pe coloana cu sefaroză CL4B (Farmacia) în 1 ml, echilibrat cu soluția ce conține 30 mM NaOH; 2 mM EDTA, pentru a elimina restul de amorsă sintetică. Primele trei fracții radioactive în volum de circa 80 µl fiecare se regroupează. ADNc, conținut în aceste fracții, se sedimentează cu 1/10 din volumul soluției de

55

10M de acetat de amoniu şi 2.5 volume etanol. Cantitatea de ADN complementar astfel obținut constituie 20 ng.

60 f) Configurarea vectorului de clonare PSE1 şi de ADN complementar în prezența adaptorului

MD 1652 G2

Se centrifughează, sedimentul se dizolvă în 33 µl tampon TE, se adaugă 5 µl (125 ng) vector de clonare pSE1, 1 µl (120 ng) adaptor cu următoarea succesiune (utilizând saitul ApaI):

5' AAAAAAAAAA AAAGGGCCCG 3'

5

10 µl de 200 mM soluție NaCl, se incubează timp de 5 minute la 65°C, apoi amestecul de reacție se lasă să se răcească până la temperatura camerei.

g) Ligarea

10 Intr-un volum de 100 µl se efectuează ligarea vectorului de clonare și ADNc monofilamentar cu 32.5 unități de enzimă ADN-ligaza fagului T4 (Farmacia, notare standard: 27087002) timp de o noapte la 15°C într-un tampon cu următoarea compoziție: 50 mM Tris HCl, pH 7.5; 10 mM clorură de magneziu, 1 mM adenosin-5'-trifosfat.

h) Sinteza filamentului al doilea al ADNc

15 Se elimină proteinele prin extragere cu fenol, cu extragerea ulterioară cu cloroform, apoi se adaugă 1/10 din volumul unei soluții de 10 mM de acetat de amoniu, apoi 2.5 volume etanol. Se centrifughează, sedimentul se dizolvă într-un tampon cu următoarea compoziție: 33 mM Tris acetat, pH 7.9; 62.5 mM acetat de potasiu, 1 mM acetat de magneziu și 1 mM ditiotritol (DTT), al doilea filament al ADN complementar se sintetizează într-un volum de 30 µl cu 30 unități enzimă ADN-polimeraza fagului T4 (Farmacia, notare standard: 27-0718) și cu amestecul de câte 1 mM din cei patru dezoxinucleotid-trifosfați dATP, dCTP, dGTP și dTTP, la fel ca și cu 2 unități de proteină a genei 32 a fagului T4 (Farmacia, notare standard: 27-0213) timp de o oră la 37°C. Se extrage cu fenol și urmele de fenol se elimină, utilizând coloana cu poliacrilamidă P10 (Biogel P10-200-400 mesh, notare standard: 15011050-Biorad).

i) Transformarea prin electroporație

25 Celulele *E. coli* MC 1061 (Clontech) se transformă cu ADN recombinant, obținut anterior, prin electroporație cu aparatul Biorad Gene Pulser (Biorad), utilizând 2.5 kV în condițiile prescrise de furnizor, apoi se cultivă bacteriile timp de o oră în așa-numitul mediu LB (Sambrook, citat anterior) cu următoarea compoziție: bacto-trypton - 10 g/l; extract de levură - 5 g/l, NaCl - 10 g/l, apoi timp de 6.5 ore în mediul LB, în care se adaugă 100 µg/ml ampicilină.

30 Se determină numărul de clone independente prin introducerea în diluție 1/1000 de un mediu de transformare, după prima oră de incubare în cutia cu mediu LB, la care s-a adăugat 1.5% (vol.) geloză și 100 µg/ml ampicilină, numit în continuare mediu LB de geloză. Numărul clonelor independente constituie 500000.

Capitolul 3. Ciuruirea băncii de ADN complementar sustras și selecția clonei NC30

1. Realizarea replicării coloniilor bacteriene ale băncii de ADNc pe filtru de nailon

35 Circa 40000 bacterii recombinante din banca de ADNc se distribuie în cutii Petri (245×245 mm) cu conținut de mediu LB de geloză (circa 2000 colonii/cutie).

40 Din fiecare dintre aceste cutii se face transferul coloniilor pe membrana de nailon (Hybond N-Amersham) prin plasarea membranei pe suprafața cutiei și se fac puncte prin străpungerea membranei cu un ac. Se retrage membrana și se plasează pe suprafața unei noi cutii Petri cu conținut de mediu LB de geloză. Se lasă pe câteva ore la 37°C pentru a obține creșterea coloniilor. Din această primă membrană se realizează patru replicări pe membrane noi (plasate în prealabil pe mediu LB de geloză pentru umectarea lor) prin contacte succesive cu prima membrană. Replicările obținute pe membrană în final se plasează pe cutiile cu mediu LB de geloză și se incubează timp de o noapte la 30°C.

45 Replicările pe membrană sunt plasate cu coloniile în sus, pe o coală Whatman 3MM, saturată cu o soluție cu compoziția: 0.5 M NaOH; 1.5 M NaCl, pentru 5 minute, ceea ce permite liza bacteriilor și fixarea de ADN. Replicările pe membrană se plasează apoi pe a doua coală Whatman 3MM, saturată în acest caz cu o soluție neutralizantă cu compoziția: 1.5 M NaCl; 5 M Tris HCl, pH 8.0, pentru 5 minute. Replicările pe membrană se cufundă apoi în soluție 2×SSC (compoziția soluției SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M citrat de sodiu) și resturile bacteriene parțial se elimină, atent fricționând cu bumbac pentru curățat.

50 Apoi replicările pe membrană se tratează cu proteinaza K (Boehringer Mannheim GmbH) în concentrația 100 µg/ml de soluție cu următoarea compoziție: 10 mM Tris HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 0.1% dodecilsulfat de sodiu; câte 20 ml pentru membrană. Se incubează timp de 30 minute la 37°C cu agitare. Replicările pe membrană se cufundă din nou în soluție 2×SSC pentru eliminarea definitivă a tuturor urmelor de resturi bacteriene. În final ele se usucă pe hârtie de filtru timp de câteva minute, apoi

55

timp de 30 minute sub vid la +80°C. Astfel, pentru fiecare cutie se obțin 4 replicări pe membrană, numite ulterior replicarea 1, replicarea 2, replicarea 3 și replicarea 4.

2) Prepararea de ARN utilizat pentru construirea sondelor ADNc

60 a) Cultivarea și stimularea celulelor mononucleare din sângele periferic cu PMA (PMA și anti-CD28), (PMA, PHA-P și ciclosporina A) sau (PMA și PHA-P):

MD 1652 G2

- Celulele neaderente se prepară conform descrierii 13 precedente (capitolul 1,1). Ele se cultivă timp de 5 ore în flacoane de tip Falcon cu suprafața 175 cm² în prezența mediului RPMI, completat cu 10% ser fetal de vițel (Gibco BRL, notat standard: 013-06290H), adăugând 10 unități de penicilină și 10 μg streptomicină (soluția penicilină/streptomicină Gibco, notare standard: 043-05140D) în 1 ml de mediu, de asemenea și L-glutamină (Gibco BRL, notare standard: 043-05030D) până la concentrația finală de 2 mM. Celulele se stimulează timp de 5 ore în una din următoarele condiții de stimulare 1), 2), 3) și 4):
- 1) în prezența a 10 ng/ml 2-miristat-3-acetat-forbol (PMA) (Sigma, notare standard: P8139);
 - 2) în prezența a 10 ng/ml PMA și 1 μg/ml anticorp monoclonal anti-CD28 (Reactifs et Systemes S.A., notare standard: ACM0280NC050);
 - 3) în prezența a 10 ng/ml PMA, 5 μg/ml fitohemaglutinină (PHA-P) (Sigma, notare standard: L/8754) și 1 μg/ml ciclosporină A (Sandoz);
 - 4) în prezența a 10 ng/ml PMA și 5 μg/ml PHA-P.
- De fapt, se știe că aditia anticorpului anti-CD28 mărește cantitatea de ARN mesageri ai unor citochine, în special IL-2, IFN γ , TNF α și GM-CSF prin creșterea stabilității de ARN mesageri ai lor (Lindsten T. et al., 1989, Science, 244, 339) în limfocitele T și că imunosupresorul ciclosporinei A inhibă majorarea de ARN mesageri ai citochinelor, induse prin activarea cu PMA și PHA-P în limfocitele T (Thompson C.B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 1333-1337).
- Celulele se recoltează în condițiile menționate anterior de stimulare și se rețin sedimentele celulare, numite, corespunzător, sedimentul celular 1, sedimentul celular 2, sedimentul celular 3 și sedimentul celular 4.
- b) Prepararea de ARN-poly A⁺
- Din sedimentele celulare, menționate mai sus, se extrage ARN și fracția poli A⁺, se purifică cum este descris în capitolul 1-2) a) și b). Astfel, se obțin patru fracții ARN-poly A⁺, numite, respectiv, fracția poly A⁺1, fracția poly A⁺2, fracția poly A⁺3 și fracția poly A⁺4.
- 3) Prepararea sondelor de ADNc radiomarcate
- Sondele de ADNc radiomarcate (marcate cu izotop radioactiv), numite, respectiv, sonda 1, sonda 2, sonda 3 și sonda 4, se sintetizează din patru fracții ARN-poly A⁺, preparate așa cum este descris mai sus.
- 1 μg ARN-poly A⁺ se hibridizează cu 200 ng oligo dT₁₂₋₁₈ (Farmacia) în 2-3 μl tampon cu următoarea compoziție: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, și 1 mM EDTA, prin incubare timp de 2 minute la 65°C și răcire până la temperatura camerei. Sinteza de ADNc radiomarcat se realizează într-un volum de reacție de 10 μl tampon cu următoarea compoziție: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 5 mM MgCl₂; 10 mM ditiotritol, ce conține câte 500 μM de fiecare din dezoxinucleotidfosfați de ATP, dGTP și dTTP (Farmacia), 10 μM dCTP și 150 μCi dCTP α 32P (3000 Ci/mmol-Amersham) și 40 unități RNasine (inhibitorul RNase-Genofit). Reacția se realizează la 46°C timp de 30 minute în prezența a 10-20 unități de transcriptază inversă (Genofit). Această sinteză este urmată de hidroliza alcalină de ARN cu 0.3M soluție NaOH într-un volum final 20 μl timp de 30 minute la 65°C. Se neutralizează prin aditia a 3M acid acetic. Se ajustează până la un volum de 50 μl cu mediul TE. Se efectuează extragerea cu un volum analogic de fenol, cu a doua extragere ulterioară cu un volum analogic de amestec cloroform/alcool izoamilic (în proporțiile respective 24/1). α 32P-dCTP, neinclus în timpul sintezei în filamentul ADNc, se elimină prin cromatografia de eliminare pe coloana cu poli(acrilamidă) P10 (Biogel-200-400 mesh; Biorad).
 - 4) Cantitatea de ADNc constituie 60-100 ng, cu activitatea specifică 1 $\times$ 10⁹ impulsuri pe minut/μg.
 - 4) Hibridizarea replicărilor coloniilor de bacterii cu sondele de ADNc

Replicările pe membrană se hibridizează în prealabil timp de 2 ore la 42°C într-un tampon cu următoarea compoziție: 50% formamidă, 6 $\times$ SSC; 5 $\times$ soluție Denhardt; 0.1% dodecilsulfat de sodiu și 100 μg/ml ADN al spermei de somon tratate cu ultrasunet, aditionat după denaturare timp de 10 minute la 100°C. Replicările pe membrană se hibridizează timp de 2 zile: replicarea 1 cu sonda 1, replicarea 2 cu sonda 2, replicarea 3 cu sonda 3 și replicarea 4 cu sonda 4, și aceste sonde se utilizează în concentrație de 4 ng/ml în tamponul, menționat mai sus. 5 $\times$ soluția Denhardt (vezi Sambrook citată anterior) are următoarea compoziție: 1 g/l Ficoll (tipul 400, Farmacia); 1 g/l polivinilpirolidonă și 1 g/l albumină serică de bovină (BSA).

Prehibridizarea și hibridizarea se realizează în eprubete în cuptoare pentru hibridizare (Hybrad) cu 25 ml și 10 ml, respectiv, de tampon pentru o membrană.

Apoi, replicările pe membrană se spală de câteva ori succesiv timp de 15 minute la 20°C în tamponul cu compoziția: 2 $\times$ SSC; 0.1% dodecilsulfat de sodiu, apoi de două ori timp de 15 minute în soluția 0.1 $\times$ SSC, 0.1% dodecilsulfat de sodiu, la 55°C, apoi se usucă pe hârtia Whatman 3 MM și se autoradiografiază pe filmele Kodak XAR5.

 - 5) Hibridizarea cu un amestec de oligonucleotide, corespunzătoare majorității citochinelor cunoscute

Pentru identificarea clonelor care conțin ADN complementari de ARN mesageri ai citochinelor cunoscute, o altă serie de replicări pe membrană, preparate prin procesul descris mai sus, se hibridizează cu amestecul numit

MD 1652 G2

amestecul C, din 28 oligonucleotide, fiecare din ele incluzând 20 nucleotide, care corespund cu ADN complementari ai următoarelor citochine:

- Interleuchina-1 α (Furutani Y. et al., 1985, Nucl. Ac. Res., 13, 5869-5882), Interleuchina-1 β (Auron P. et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7907-7911), Interleuchina-2 (Degrove W. et al., 1983, EMBO J., 2, 3249-3253), Interleuchina-3 (Yang Y.C. et al., 1986, 47, 3-10), Interleuchina-4 (Yokoto T. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5894-5898), Interleuchina-5 (Hirano T. et al., 1986, Nature, 324, 73-75), Interleuchina-6 (May L. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8957-8961), Interleuchina-7 (Namen A. et al., 1988, Nature, 333, 571-573), Interleuchina-8 (Matsushima K. et al., 1988, J. Exp. Med., 167, 1883-1893), Interleuchina-9 (Yang Y.C. et al., 1989, Blood, 74, 1880-1884), TNF α (Pennica D. et al., 1984, Nature, 312, 724-729), TNF β (Gray P. et al., 1984, Nature, 312, 721-724), GCSF (Nagata S. et al., Nature, 1986, 319, 415-418), MCSF (Kawasaki E. et al., 1985, Science, 230, 291-296), GMCSF (Wong G. et al., 1985, Science, 228, 810-815), LIF (Gough N. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2623-2627), Interferonul α 1 (1981, Nature, 290, 20-26), Interferonul β 1 (Taniguchi T. et al., 1980, Gene, 10, 11-15), Interferonul γ (Gray P. et al., 1982, Nature, 295, 503-508), TGF α (Derynck R. et al., 1984, Cell, 38, 287-297), TGF β 1 (Derynck R. et al., 1985, Nature, 316, 701-705), bFGF (Prats H. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836-1840), Eritropoietina (Jacobs K. et al., 1985, Nature, 313, 806-810), BCGF (Sharma S. et al., 1987, Science, 235, 1489-1492), MIF (Weiser W. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7522-7526), MCP-1 (Yoshimura T. et al., TEBS Lett., 244, 487-493), Oncostatina-M (Malik N. et al., 1989, Mol. Cell. Biol., 9, 2847-2853) și EDF (Murata M. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2434-2438).

- Aceste oligonucleotide, obținute cu sintetizatorul de ADN Biosearch 8700, se cuplează cu peroxidaza de hrean EC 1.11.17 (Boehringer Mannheim, notare standard: 814-407) conform următorului protocol:

- în coloana pentru sinteză, oligonucleotidele interacționează cu carbonildiimidazol (Aldrich-11, 553-3) și 1,6-diaminohexan (Aldrich-H1.169-6) conform metodei Wachter et al., 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 7985-7994;
- după deprotecția bazelor și scindarea suportului prin tratare cu amoniac, oligonucleotidele se purifică cu rășină cu schimbători de ioni (Quiagen-Diagen-500051), schimbând contr-ionul de amoniu în ionul de litiu;
- 5'-amino-oligonucleotidele se cuplează cu peroxidaza de hrean (Boehringer Mannheim-814407) conform metodei lui M. Urdea et al., Nucl. Ac. Res., 1988, 4937-4956.

Amestecul de oligonucleotide se hibridizează cu circa 10% clone din bancă.

- Clonele care lansează un semnal autoradiografic mai puternic cu sonda 2, comparativ cu sonda 1, mai puternic cu sonda 4, comparativ cu sonda 1, și mai puternic cu sonda 4, comparativ cu sonda 3, și care nu se hibridizează cu amestecul C, sunt secvenate parțial așa cum este descris în capitolul 4, ce urmează. Două din aceste clone, numite ulterior clonele NC30 și NC30-bis, în așa mod se păstrează. Aceste clone conțin, respectiv, plasmida, numită pSE1-NC30, și plasmida, numită pSE1-NC30-bis.

- Capitolul 4. Expresia de ARN mesager al clonei NC-30 în celulele mononucleare din sângele periferic

- Celulele neaderente (constituite, în mare parte, din limfocite) se prepară prin metoda descrisă în capitolul 1-1) și se stimulează prin metoda descrisă în capitolul 3-2-a), cu excepția celulelor nestimulate (condițiile de stimulare 0)). ARN mesageri ai acestor celule se prepară în 5 condiții de stimulare, prin metoda descrisă în exemplul 1-2-a), și se analizează prin electroforeză pe 1% gel de geloză în prezența formaldehidei (Sambrook, citat anterior) cu transferul ulterior pe o membrană de nailon (Hybond N+ – Amersham) și hibridizarea conform protocolului prezentat anterior.

- Această membrană se hibridizează cu sonda radiomarcată cu α 32PdCTP, obținută din ADNc NC30 (Amersham) prin secționarea parțială a acestuia din urmă cu DNase I, urmată de polimerizarea cu fermentul ADN polimeraza I (așa-numita metodă de "nick-translate" sau de deplasare a cezurii) conform metodei descrise de Sambrook et al., citate mai sus. Hibridizarea se efectuează la 42°C timp de 16 ore într-un mediu apos cu un conținut de 50% formamidă, 1 M NaCl, soluție 5 $\times$ Denhardt și 0.1% dodecilsulfat de sodiu (SDS). Membranele se spală multiplu la temperatura camerei cu soluție 2 $\times$ SSC, ce conține 0.1% dodecilsulfat de sodiu, apoi se spală de două ori la 50°C timp de 15 minute cu soluție 0.1 $\times$ SSC, ce conține 0.1% dodecilsulfat de sodiu. Soluția 5 $\times$ Denhardt are următoarea compoziție: 1 g/l Ficoll (tip 400, Farmacia), 1 g/l polivinilpirolidonă și 1 g/l albumină serică de bovină. Soluția 1 $\times$ SSC conține 0.15 M NaCl și 0.015 M citrat de sodiu.

- Pentru celulele nestimulate și pentru celulele stimulate în condițiile 1), 2), 3) și 4) se stabilește banda autoradiografică corespunzătoare cu ARN cu lungimea de circa 1.4 m.p.n. (mii perechi de nucleotide). Expresia acestui ARN se măsoară în prezența PMA (bandei cu o intensitate de cel puțin 5 ori mai

- puternică pentru condiția 1), comparativ cu condiția de stimulare 0)), și această majorare se amplifică cu prezența suplimentară de PHA-P sau de anti-CD-28 (benzile de intensitate sunt de circa 5 ori mai pronunțate pentru condițiile de stimulare 2) și 4), comparativ cu condiția de stimulare 1)) și nu se modifică prin prezența suplimentară a PHA-P și a ciclosporinei (benzile de intensitate sunt similare celor pentru condițiile de stimulare 1) și 3)).

MD 1652 G2

În altă experiență, efectuată cu o populație de limfocite T purificate (purificare ce depășește 95%), de asemenea se constată expresia de ARN mesager NC30 după o costimulare cu PMA și anti-CD28.

5 Capitolul 5. Secvenarea și analiza succesiunilor de ADNc al clonei NC30

1) Secvenarea de ADNc al clonei NC30

a) Prepararea de ADN monofilamentar

Clona NC30 conține vectorul pSE1, care poartă ADNc între situsul ApaI și situsul BamHI, numit ulterior ADNc-NC30.

10 Vectorul pSE1, care conține sursa de replicare a fagului f1, permite producerea de ADN monofilamentar prin cultivarea clonei NC30 în prezența bacteriofagului M13K07 (Farmacia, notare standard: 27-1524) în modul următor:

- Clona NC30 se cultivă într-o eprubetă cu volumul de 15 ml agitând la o temperatură de 37°C în 2 ml mediu 2×YT cu compoziția: 16 g/l bacto-tripton, 10 g/l extract de levură, 5 g/l clorură de sodiu (descrișă de Sambrook et al., descrișă anterior), completat cu 0.001% tiamină și 100 μg/ml ampicilină, având o densitate optică până la 600 nm de circa 0.60.

15 - 100 μl de această cultură se infectează cu bacteriofagul M13K07 (Farmacia, notare standard: 27-1524) cu multiplicitatea infecției de ordinul 10, într-o eprubetă cu volumul de 15 ml. Cultura se agită la 37°C.

- Peste o oră se adaugă 2 ml mediu. Cultura se incubează timp de circa 16 ore la 37°C, agitând-o.

20 - 1.5 ml de cultură se centrifughează într-o microeprubetă timp de 2 minute cu accelerația de 15000 g.

- 1 ml supernatant se transferă într-o microeprubetă și se adaugă 250 μl soluție de 20% polietilenglicol cu masa moleculară 6000 cu un conținut de 2,5 M NaCl. Amestecul se incubează timp de 5 minute la 4°C pentru facilitarea sedimentării fagului, apoi se centrifughează timp de 5 minute cu 15000 g. Supernatantul se elimină și sedimentul de fag se trece din nou în suspensie în 500 μl tampon cu compoziția: 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA.

25 - Suspensia se extrage o singură dată cu fenol, saturat cu 100 mM Tris-HCl, pH 8, și de două ori cu cloroform.

- Preparatul se sedimentează prin adăugarea a 1/10 din volumul soluției de 3M acetat de sodiu, pH 4.8, și 2.5 volume etanol. Precipitarea se efectuează la -20°C timp de minimum 20 minute. ADN se separă prin centrifugare timp de 10 minute cu 15000 g, sedimentul după centrifugare se spală cu soluție de 70% etanol, apoi se trece din nou în suspensie în 30 μl tampon cu compoziția: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA.

b) Secvenarea

Reacția de secvenare se realizează cu chitul pentru secvenare United States Biochemical (notare standard: 70770), utilizând metoda Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1977, 14, 5463-5467. Amorșele utilizate reprezintă oligonucleotide din 18 nucleotide, complementare sau la vectorul pSE1 în regiunea imediat în extremitatea-5' a ADNc NC30, sau la succesiunea ADNc NC30.

2) Analiza succesiunii ADNc NC30:

Descrierea ce urmează, pentru o mai bună elucidare, este ilustrată în fig. 2, 3 și 4.

Analiza secvenării de ADNc NC30.

40 1) ADNc NC30 include 1282 nucleotide și se termină cu succesiunea polyA.

2) Acest număr de nucleotide se concordează cu mărimea de ARN mesager corespunzător (circa 1.4 m.p.n., vezi capitolul 4).

3) În poziția 1264-1269 a succesiunii AATAAA, care corespunde succesiunii tipice de generalizare, descrise de M. Birnstein et al., 1985, Cell, 41, 349, este un semnal de poliadenilare. În pozițiile 855-861, 872-878, 1133-1139 și 1152-1158 se află succesiunile din 7 nucleotide: TATTTAT, TATTTAA, AATTTAT și TATTTAA ce conțin succesiunea ATTTA, corespunzătoare elementului consensus de instabilitate AUUUA, descris de G. Shaw et al., 1986, Cell, 46, 659-667. ADN complementar al multiplelor citochine cunoscute posedă succesiunea corespunzătoare acestui element consensus de instabilitate.

4) Succesiunea de ADN include o fază de citire deschisă pentru translarea proteinei din ATG în poziția 15-17 până la TGA în poziția 453-455, care corespunde codonului ce termină translarea. În această fază de citire sunt două codoane ATG în pozițiile 15-17 și 57-59, susceptibile să inițieze translarea, corespunzătoare proteinelor translate din 146 și 132 aminoacizi. Din acestea, împrejmuirea nucleotidică ATG în pozițiile 57-59 este aceea care cel mai mult se apropie de succesiunea tipică generalizatoare, descrisă de Kozak M., 1978, Cell, 15, 1109-1123, pentru inițierea translării în celulele eucariote.

55

5) Asigurarea de program al regăsirii peptidei de semnal, numită ulterior asigurare de program PS, este elaborată de solicitant după metoda și informațiile descrise de Von Heijne, 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 483-490. Această asigurare de program în această fază de citire prevede o regiune hidrofobă, similară peptidei de semnal, și 4 saitari posibile de scindare proteică (hidroliză) în pozițiile 74-75 (între Thr și Thr), 86-87 (între Ala și Leu), 110-111 (între Ala și Ser) și 116-117 (între Pro și Gly). Peptida de semnal prevăzută este plasată între

60

MD 1652 G2

unul dintre doi Met, susceptibili să inițieze translarea, și 16-unul din aceste patru saitari de scindare. Proteina matură prevăzută (proteina translată, scindată în locul peptidei sale de semnal) include, deci, succesiunea din 126, 122, 144 și 112 aminoacizi.

Previziuni similare se obțin cu asigurarea de program UWGCG al Universității din Wisconsin: Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721-Option: Regăsirea peptidei de semnal după metoda G. Heijne (referința este citată anterior).

Compararea cu alte succesiuni cunoscute.

Succesiunea peptidică deja cunoscută, prototipul succesiunii similare din 112 aminoacizi a proteinei mature, reprezintă succesiunea proteinei din 132 aminoacizi, dedusă din ADNc al proteinei P600 de șoarece, descrisă de K.D. Brown et al., 1989, J. Imm., 142, 679-687. Această proteină se exprimă în subclasa limfocitelor T de șoarece: celulele Th2, activate cu concanavalina A.

Compararea acestor succesiuni peptidice prin metoda Needleman și Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453, utilizată în asigurarea de program UWGCG al Universității din Wisconsin: Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721, opțiunea GAP, atestă că 63 aminoacizi din 112 sunt identici sau omologia identității constituie circa 56%. Această metodă algoritmică ia în considerare toate concordanțele posibile și permite crearea unui șir coerent, prezentat în fig. 3, în care cât mai mulți aminoacizi identici se selectează pentru perechi și numărul de treceri în succesiunile coerente este minim.

Compararea succesiunilor nucleotidice conform acestei metode indică o omologie a identității 70% între succesiunea ce codifică ADNc NC30 și ADNc al proteinei P600 de șoarece (vezi fig. 4).

3) Secvenarea de ADNc al clonei NC30-bis

Secvenarea efectuată prin metoda descrisă în 1) permite depistarea pentru ADNc al clonei NC30-bis a aceleiași succesiuni proteice ca și pentru clona NC30, cu excepția aminoacidului al 75-lea translat, care reprezintă Asp, codificat de GAC, pentru clona NC30, și Gly, codificat de GGC, pentru clona NC30-bis.

25 Capitolul 6

Analiza secreției în celulele COS ale proteinei codificate de ADNc NC30

Celulele COS reprezintă celule renale de maimuță, care exprimă antigenul T al virusului SV40 (Gluzman Y. Cell, 23, 1981, 175-182). Aceste celule, care permit replicarea vectorilor, ce conțin sursa de replicare a ADN al virusului SV40 (cazul vectorului pSE1), reprezintă gazdele selectate pentru studierea expresiei genelor în celulele animale.

1) Transfecția celulelor COS și expresia tranzitorie a proteinei, codificate de ADNc NC30:

5×10⁵ celule COS se însămânțează în cutia Petri cu diametrul 6 cm (Corning) în 5 ml mediu Eagle, modificat conform metodei Dulbecco, numit în continuare DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium, Gibco, notare standard: 041-01965), care conține 0.6 g/l glutamină, 3.7 g/l hidrocarbonat de sodiu și este completat cu ser fetal de vițel (Gibco) în cantitate de 5%. După cultivare timp de circa 16 ore la 37°C într-o atmosferă, ce conține 5% bioxid de carbon, mediul de cultură se elimină prin aspirație și celulele se spală cu 3 ml tampon PBS (tampon fosfat salin, Gibco). Apoi, se adaugă următorul amestec: 100 μl (DMEM+10% ser fetal de vițel, Gibco), 110 μl dietilaminoetildextran cu masa moleculară medie 500000 (Farmacia) la o concentrație de 2 mg/ml, 1.1 μl de 100 mM clorochină (Sigma) și 6 μg ADN plasmidic al clonei NC30, preparat prin liza alcalină cu purificarea ulterioară a ADN plasmidic pe un gradient de clorură de cesiu (Sambrook et al., citat anterior). După incubare timp de 5 ore la 37°C într-o atmosferă ce conține 5% bioxid de carbon, amestecul se izolează de la celule. Se adaugă 2 ml tampon PBS, ce conține 10% dimetilsulfoxid (calitatea pentru spectroscopie, Merck). După incubare timp de un minut la temperatura camerei amestecul se elimină și celulele se spală de două ori cu tampon PBS și se incubează în mediu DMEM ce conține 2% ser fetal de vițel. Incubarea continuă timp de 40 ore la 37°C într-o atmosferă cu un conținut de 5% bioxid de carbon.

Pe de altă parte, se prepară celulele de control COS, efectuându-se operațiile descrise mai sus cu ADN al plasmidei pSE1.

2) Marcarea proteinelor

50 Ansamblul de operații descrise anterior se efectuează cu celulele COS, transfectate cu ADN plasmidic al clonei NC30 și cu celulele COS de control.

Mediul de cultură se elimină prin aspirație și celulele se spală dublu cu câte 3 ml tampon PBS. Se adaugă 5 ml mediu MEM (mediu Eagle minimal de susținere) fără metionină (Gibco, notare standard: 041-01900H), completat cu 3 g/ml glucoză și 4 mM glutamină. Se incubează timp de 2 ore la 37°C. Mediul de

55

cultură se elimină și se adaugă 2 ml de mediu similar completat cu 200 μCi metionină ³⁵S (notare standard: SJ1015 Amersham). Se incubează timp de 6 ore la 37°C. Mediul de cultură se elimină, se centrifughează timp de 5 minute pentru eliminarea resturilor celulare și celulelor în suspensie, și se păstrează supernatantul.

60 3) Analiza proteinelor radiomarcate ale celulelor COS transfectate prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă

MD 1652 G2

Se sedimentează 1 ml supernatant de celule COS17transfectate și 9 ml acetonă la -20°C . Se centrifughează și se recuperează sedimentele proteinelor. Ele se tratează într-un tampon cu următoarea compoziție: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 4% dodecilsulfat de sodiu, 20% glicerină, și se încălzesc la 100°C timp de 10 minute. O parte alicată din suspensia obținută, care corespunde unei radioactivități de 200000 impulsuri pe minut, se analizează prin electroforeză pe 15% gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu, conform metodei descrise de U.K. Laemmli, Anal. Biochem., 1977, 78, 459. Gelul se usucă sub vid. Proteinele radiomarcate se depistează prin autoradiografie.

Pe autoradiogramă se constată prezența a două benzi suplimentare pentru celulele transfectate cu ADN plasmidic al clonei NC30, comparativ cu celulele de control: banda clară de o intensitate înaltă, corespunzătoare masei moleculare de circa 9.0 ± 2 kDa, și banda difuză cu o intensitate mai redusă, corespunzătoare masei moleculare aparente de 16.0 ± 2 kDa. Deci, clona NC30 codifică proteina secretată, numită în continuare proteina NC30. Masa moleculară pentru forma proteinei conform invenției, care constituie circa 9 ± 2 kDa, cedează masei moleculare, calculate pentru proteina matură din 112 aminoacizi și egale cu 12366 Da. Această diferență, posibil, este determinată de mobilitatea electroforetică, surprinzătoare pentru această formă de proteină conform invenției.

Banda masei moleculare de circa 16.0 ± 2 kDa poate corespunde formei N-glicozilate a proteinei conform invenției. Într-adevăr, ea posedă 4 sațuri posibile de N-glicozilare, evidențiate prin punctarea în fig. 2 și care corespund succesiunii tipice generalizate, descrise de Donner et al., 1987, J. Cell. Biol., 105, 2665.

4) Depistarea N-glicozilării posibile a proteinei cu masa moleculară de circa 16.0 ± 2 kDa. Marcarea proteinelor se efectuează prin metoda descrisă în 2), însă în prezența a 10 $\mu\text{g/ml}$ tunicamicină (Sigma, notare standard: T7765), agent ce inhibă N-glicozilarea proteinelor.

Analiza proteinelor pe gel de poliacrilamidă se efectuează prin metoda descrisă în 3).

Pe autoradiogramă se constată prezența unei benzi suplimentare de 9 ± 2 kDa pentru celulele transfectate de ADN plasmidic al clonei NC30, comparativ cu celulele de control. Aceste rezultate atestă că forma recombinantă de proteină, examinată în alin. 3), care corespunde masei moleculare de 16.0 ± 2 kDa, este N-glicozilată.

Capitolul 7. Producerea proteinei NC30 în celulele COS

4.3×10^7 celule COS se însămânțează într-un flacon cilindric de cultură, numit de regulă "roller", cu suprafața de 850 cm^2 în 150 ml mediu DMEM, care conține 0.6 g/l glutamină, 3.7 g/l hidrocarbonat de sodiu și este completat cu ser fetal de vițel (Gibco) în cantitate de 5%, apoi se tamponează cu bioxid de carbon.

După circa 16 ore de cultivare la 37°C pe bandă rulantă (viteza de rotație circa 0.2 rotații pe minut), mediul de cultură se elimină prin aspirație și celulele se spală cu tampon PBS (tampon fosfat salin). Se adaugă un amestec cu următoarea compoziție: 35 ml mediu DMEM+10% ser fetal de vițel (Sigma), 4 ml dietilaminoetildextran (Farmacia, masa moleculară mai mică de 500000) într-o concentrație de 2 mg/ml, 40 μl de 100 mM clorchină (Sigma) și 128 μg ADN plasmidic al clonei NC30, preparat prin liza alcalină cu purificarea ulterioară a ADN plasmidic pe gradient de clorură de cesiu (Sambrook et al., citat mai sus). După incubare timp de 5 ore la 37°C într-o atmosferă ce conține 5% bioxid de carbon, amestecul se elimină de pe celule. Apoi se adaugă 35 ml tampon PBS cu un conținut de 7% dimetilsulfoxid (calitate pentru spectroscopie, Merck) la 4°C . După agitare prin rotație timp de un minut 30 secunde la temperatura camerei, amestecul se elimină și celulele se spală de două ori cu PBS. Se adaugă 150 ml mediu DMEM (Sigma), ce conține 1% ser fetal de vițel (SVF), pe roler și celulele se incubează la 37°C în prezența a 5% bioxid de carbon (rotație cu viteza de 0.2 rotații pe minut). Peste o zi după transfecție, mediul se elimină prin aspirație, celulele se spală de două ori cu PBS. Se mai adaugă 150 ml pe roler de mediu DMEM (Sigma) lipsit de ser și rolerul se menține la 37°C în prezența a 5% bioxid de carbon (în cadrul rotației cu viteza de 0.2 rotații pe minut) timp de 5 zile.

Recoltarea se efectuează în ziua a 6-a după transfecție.

Mediul de cultură se centrifughează cu viteza 7000 rotații pe minut timp de 10 minute; supernatantul se filtrează prin filtrul de $0.2 \mu\text{m}$ Nalgene.

50

Capitolul 8. Purificarea proteinei NC30, produse în celulele COS, și determinarea succesiunii ei amino-terminale

1) Purificarea proteinei NC30

Partea majoritară a proteinei recombinante cu masa moleculară de circa 9 ± 2 kDa, din 500 ml supernatant obținut în capitolul 7, se purifică prin următoarele etape:

MD 1652 G2

- Cromatografia cu schimbare de ioni pe coloana S18fast flow (Farmacia) (15×100 mm), în prealabil echilibrată cu 50 mM soluție acetat de sodiu, pH 4.0, utilizând ca eluant soluția de 1M NaCl în 50 mM soluție acetat de sodiu, în calitate de tampon, pH 4.0, consumul 2 ml/min;
- eluantul se concentrează pe membrana centriprep 10 (Amicon) până la un volum de circa 1 ml, apoi se expune cromatografiei HPLC cu fază inversă pe coloana C4 (Bownlee) (100×2.1 mm), în prealabil echilibrată cu soluția ce conține 30% acetonitril și 0.1% TFA, cu gradientul liniar de la 30 până la 70% acetonitril în soluție cu conținut de 0.1% TFA. Frațiile ce conțin proteina recombinantă (se determină după analiza electroforetică pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu) se combină.
- 2) Determinarea succesiunii aminoterminale a proteinei NC30 cu masa moleculară aparentă 9 ± 2 kDa.
- Proteina obținută în alin.1) se expune analizei electroforetice pe 16% gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu. Proteinele, timp de o oră cu o intensitate a curentului 0.8 mA/cm^2 într-un tampon, ce conține 25 mM Tris-borat, pH 9.0 și 10% metanol, se transferă pe membrana Immobilon (Milipore), apoi se decolează cu albastru de Coomassie.
- Banda cu masa moleculară de circa 9 ± 2 kDa se decupează și se introduce în secvențiatorul Applied Biosystems, modelul 470A, cuplat cu analizatorul derivaților de feniltiohidantoină Applied Biosystems, modelul 12A.
- Succesiunea aminoterminală obținută reprezintă următoarea succesiune (tr_O):
- Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
- 1 5 10 15
- care corespunde saitului al patrulea de scindare, prevăzut în asigurarea de program (vezi capitolul 5-2).
- ### Capitolul 9
- Construirea vectorului de expresie a ADNc NC30 în levură, plasmida pEMR 673 și transformarea tulpinii de levură cu această plasmidă
- 1) Construirea plasmidei pEMR673
- Plasmida pEMR583 (descrisă în cererea de brevet EP-435776) se supune digestiei complete cu enzima HindIII și BamHI. Se purifică fragmentul mare (definit în continuare fragmentul A), ce include sursa de replicare și saitul STB de 2 μm, gena LEU2d, gena de rezistență la ampicilină, sursa pBR322, terminatorul genei PGK, gena URA3, promotorul sintetic și debutul regiunii prepro- a alfa - feromonului.
- Fragmentul HindIII-BamHI (numit ulterior fragmentul B), ce include extremitatea regiunii prepro- a alfa - feromonului și ADNc, ce codifică proteina matură, flancat de saitul de restricție BamHI la extremitatea 3', se obține prin amplificare, conform metodei reacției polimerazei în lanț (RPL) din plasmida pSE1-NC30. Succesiunea acestui fragment este prezentată în fig. 5. Fragmentele A și B se liguează pentru obținerea plasmidei pEMR673.
- a) Descrierea metodei reacției polimerazei în lanț (RPL)
- Metoda reacției polimerazei în lanț (RPL) reprezintă o metodă bine cunoscută specialiștilor în domeniu, care permite copierea simultană a două filamente ale succesiunii, denaturate în prealabil de ADN, utilizând două oligonucleotide ca amorse (vezi, în special, publicația H.A. Erlich: "PCR Technology: Principles and Applications for DNA amplification", din anul 1989 de către editura Macmillan Publishers Ltd, Royaume-Uni, și lucrarea M.A. Innis et al., "PCR Protocols", publicată în anul 1990, Academic Press Inc., San Diego, California 92101, USA). Principiul acestei metode se expune succint în continuare.
- Metoda RPL se bazează pe repetări în trei etape, ceea ce permite obținerea, după 10-30 cicluri, a sute de mii de copii ale matricei inițiale cu ADN-polimerază *Thermus aquaticus*, numită de obicei, Taq-polimerază. Aceste trei etape sunt:
- Denaturarea matricei.
- ADN bifilamenta se denaturează până la ADN monofilamenta prin incubare la temperatură înaltă ($92-96^\circ\text{C}$) timp de circa 2 minute.
- Hibridizarea amorsoarelor.
- Aceste amorse reprezintă perechea de oligonucleotide sintetice, care se hibridizează cu extremitățile regiunii amplificate. Două amorse se hibridizează cu filamentele opuse. Amorsele se adaugă în exces pentru a favoriza formarea complexului amorsă-matrice.
- Extensia amorsoarelor.
- Etape, în procesul căreia Taq-polimeraza asigură extensia complexului amorsă-matrice de la extremitatea 5' până la extremitatea 3', se realizează la 72°C .
- In metoda RPL, produsul căutat apare în al treilea ciclu și atunci el într-un grad semnificativ este amplificat. În procesul deschiderii ciclurilor, produsul de amplificare repede devine matrice, cu care se hibridizează amorsa.
- b) Descrierea amorsoarelor utilizate
- Se prepară două oligonucleotide sintetice.

MD 1652 G2

Prima nucleotidă, numită amorsa 1, cu următoarea succesiune:

CAGTGAATTC A AGC TTG GAT AAA AGA TCC CCA GGC CCT GTG CCT CC
Ser Leu Asp Lys Arg Ser Pro Gly Pro Val Pro

- 5 Regiunea 1 Regiunea 2
- posedă două regiuni diferite: regiunea 1, care conține extremitatea regiunii prepro- a alfa-feromonului, modificată, comparativ cu succesiunea naturală, descrisă de Kurjan et al., 1982, Cell, 30, 933-943, prin mutația silențioasă, care permite introducerea în saitul de scindare HindIII, imediat înainte de partea ce codifică regiunea 1 (nucleotida a unsprezecea a regiunii 1); și regiunea 2, care reprezintă regiunea, destinată hibridizării cu regiunea ce codifică, corespunzătoare debutului proteinei mature din 114 aminoacizi (vezi capitolul 5), a filamentului care nu codifică ADNc NC30.

A doua oligonucleotidă, numită amorsa 2, succesiunea căreia este următoarea:

CGACGGATCC CAAATAATGA TGCTTTCGAA G

- 15 Regiunea 1 Regiunea 2
- de asemenea constă din două regiuni diferite: regiunea 1, care în nucleotida a patra conține saitul BamHI, și regiunea 2, care conține succesiunea nucleotidică, corespunzătoare regiunii 3' netranslate a ADNc NC30. Această regiune este destinată hibridizării cu filamentul ce codifică ADNc NC30.

- 20 c) Obținerea fragmentului HindIII-BamHI amplificat, ce reprezintă extremitatea regiunii prepro- a alfa-feromonului și ADNc, care codifică proteina matură NC30.

Ca matrice se utilizează plasmida pSE1-NC30, care include ADNc, care codifică proteina NC30.

- Intr-o eprubetă se introduc 100 ng de plasmidă pSE1 NC30, 100 ng amorsă 1, 100 ng amorsă 2.5 μl amestec de reacție concentrat de 10 ori (concentrația finală: 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.6 mM sulfat de amoniu; 1 mM β-mercaptoetanol; 6.7 mM EDTA, 0.15% Triton×100; 2 mM clorură de magneziu; 0.2 mM dNTP, 200 ng

- 25 gelatină); volumul amestecului se ajustează cu apă până la 50 μl.
- Se adaugă 0.5 μl sau 2.5 unități polimerază Taq (Boehringer Mannheim, notare standard: 1146-173). Apoi amestecul se acoperă cu parafină pentru a evita evaporarea soluției apoase.

Amplificarea se realizează timp de 15 cicluri de reacție cu următoarele etape ale unui ciclu:

- 30 - 1 minut la 94°C - denaturare;
- 1 minut la 55°C - hibridizare;
- 1 minut la 72°C - polimerizare.

După 15 cicluri reacția enzimică se întrerupe adăugându-se 20 mM EDTA.

- Fragmentul ADN astfel amplificat, care are lungimea dezirabilă din circa 380 perechi de baze, se purifică apoi pe 1% gel de agaroză, se dializează cu cromatografie pe coloana de gel de poliacrilamidă P10 (Farmacia), apoi complet și simultan se hidrolizează cu enzima HindIII și BamHI, conform metodei obișnuite, cunoscute specialiștilor în domeniu (Sambrook, 1983), pentru formarea extremităților coezive HindIII și BamHI. După hidroliză fragmentul se purifică pe coloana P10.

Succesiunea fragmentului B obținut este prezentată în fig. 5. Ea include în partea ce codifică NC30 mutația silențioasă, în raport cu ADNc NC30, indicat cu asterisc în fig. 5.

- 40 Fragmentele A și B se lighează în scopul obținerii plasmidei pEMR673.

2) Transformarea tulpinii de levură EMY761 cu plasmida pEMR673 și expresia proteinei NC30 de către tulpina transformată.

- Tulpina EMY761 (alfa-Mat, leu2, ura3, his3), descrisă în brevetul EP-0408461 și care poate fi obținută prin eliminarea plasmidei din tulpina depozitată în Colecția Națională de Culturi de Microorganisme la 27 decembrie 1989 cu numărul 1-1021, conține mutațiile (leu2 și ura3), susceptibile de a fi complementate de marcherul selecției defective LEU2 și marcherul selecției URA3, prezenți în plasmida pEMR673. Tulpina se transformă cu plasmida pEMR673 în cadrul selecției pentru prototrofia leucinei, conform variantei metodei de transformare, descrise de Beggs et al. (Beggs et al., 1978, Nature, 275, 104-109), care constă în aceea că levurile sunt expuse tratării de protoplastizare în prezența stabilizatorului osmotice, sorbitolului, în concentrație de 1 M.

Protocolul succint al transformării se expune în continuare:

a) 200 ml de mediu lichid YPG (vezi tabelul 1 ce urmează) se inoculează cu circa 5×10^6 celule de cultură în faza staționară și cultura astfel inoculată se lasă peste noapte, fiind agitată la 30°C;

- 55 b) când cultura atinge circa 10^7 celule în 1 ml, celulele se centrifughează timp de 5 minute cu viteza de 4000 rotații pe minut și sedimentul după centrifugare se spală cu 1M soluție de sorbitol;

c) celulele se trec în suspensie în 5 ml de 1M soluție de sorbitol, ce conține 25 mM EDTA și 50 mM ditiotreitol și se incubează timp de 10 minute la 30°C;

- 60 d) celulele se spală o dată cu 10 ml soluție de 1M de sorbitol și se trec în suspensie în 20 ml soluție de sorbitol. Se adaugă zimolaza-100T (preparat comercializat de firma Seykagaku Kogyo Co., Ltd., obținut prin

MD 1652 G2

- purificarea parțială a supernatantului culturii *Athrobacter luteus* pe coloana afină și care conține β -1,3-glucanazalaminaripentahidrolază) în concentrația finală de 20 μ l/ml și suspensia se incubează la temperatura camerei timp de circa 15 minute;
- e) celulele se trec din nou în suspensie în 20 ml de mediu, ce conține sorbitol, așa-numitul mediu YPG
- 5 sorbitol (vezi tabelul 1 ce urmează) și se incubează timp de 20 minute la 30°C, fiind agitate moderat;
- f) se centrifughează timp de 3 minute cu viteza de 2500 rotații pe minut;
- g) celulele se trec din nou în suspensie în 9 ml tampon de transformare cu următoarea compoziție: 1M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, și 10 mM clorură de calciu;
- h) se iau 0.1 ml celule și 5 μ l soluție ADN (circa 5 μ g) și suspensia obținută se lasă pentru 10-15 minute la
- 10 temperatura camerei;
- i) se adaugă 1 ml soluție cu următoarea compoziție: 20% polietilenglicol PEG 4000, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, și 10 mM clorură de calciu;
- j) 0.1 ml suspensie obținută în alin. i) se introduce într-o eprubetă, ce conține un mediu de regenerare solid, lipsit de leucină (vezi tabelul 1 în continuare), în prealabil topit și care se menține în stare lichidă la circa 45°C.
- 15 Suspensia se toarnă în cutia Petri, ce conține un strat solidificat din 15 ml mediu de regenerare solid lipsit de leucină.
- Transformanții încep să apară peste trei zile. Astfel se obține transformantul, numit tulpina EMY761 pEMR673.

Tabelul 1

- 20 Compoziția și prepararea mediilor principale, utilizate în protocolul transformării tulpinii de levură EMY761
- mediul lichid YPG:
- 10 g extract de levură (Bacto-Yeast-extractul Difco);
- 20 g peptonă (Bacto-peptonă, Difco);
- 25 20 g glucoză,
- se fuzionează ingredientele în apă distilată. Se completează până la volumul final de 1 l cu apă distilată. Se autoclavează timp de 15 minute la 120°C.
- mediul YPG sorbitol:
- se utilizează compoziția mediului lichid YPG, în care după autoclavare se adaugă sorbitol în concentrație de
- 30 1 M.
- Mediul de regenerare solid lipsit de leucină:
- 6.7 g bază azotată de levură lipsită de aminoacizi (Difco);
- 20 mg adenină;
- 20 mg uracil;
- 35 20 mg L-triptofan;
- 20 mg L-histidină;
- 20 mg L-arginină;
- 20 mg L-metionină;
- 30 mg L-tirozină;
- 40 30 mg L-izoleucină;
- 30 mg L-lizină;
- 50 mg L-fenilalanină;
- 100 mg L-acid glutamic;
- 150 mg L-valină;
- 45 20 g glucoză;
- 30 g agar;
- 182 g sorbitol,
- se fuzionează toate ingredientele în apă distilată. Se completează până la volumul de 1 l cu apă distilată. Se autoclavează timp de 15 minute la 120°C. După autoclavare se adaugă 200 mg L-treonină și 100 mg acid L-
- 50 aspartic.

Capitolul 10. Expresia în erlenmeyer a proteinei NC30 de către tulpina de levură transformată și depistarea proteinei în mediul de cultură pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu

55

1) Cultivarea tulpinii EMY761 pEMR673

- Colonia tulpinii EMY761 pEMR673 (obținută în capitolul 9) se cultivă în 50 ml mediu lichid lipsit de uracil. Acest mediu conține pentru 1 litru:
- 60 - 6.7 g bază azotată de levură lipsită de aminoacizi (Difco);
- 5.0 g hidrolizat de cazeină (cazaminocizi, Difco);

MD 1652 G2

- 10 g glucoză.

21

După agitare timp de o noapte la 30°C, cultura se centrifughează timp de 10 minute, sedimentul după centrifugare se tratează cu 10 ml apă sterilă și din nou se centrifughează timp de 10 minute. Se induce expresia proteinei NC30, activizând celulele în 50 ml mediu cu următoarea compoziție:

- 5
- 6.7 g/l bază azotată de levură lipsită de aminoacizi (Difco);
 - 5.0 g/l hidrolizat de cazeină (cazaminoacizi, Difco);
 - 30.0 g/l glicerol;
 - 30.0 g/l galactoză;
 - 10 ml/l etanol.

10 Se cultivă timp de 24 ore, agitând la temperatura de 30°C.

2) Analiza proteinei exprimate

a) gelul de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu

Prepararea eșantioanelor.

15 Se centrifughează o parte din celulele cultivate timp de o noapte într-un mediu, numit lichid lipsit de uracil, cu glucoză, compoziția concretă a căruia se prezintă în continuare în tabelul 2: eșantionul neindus. Celulele, cultivate timp de o noapte într-un mediu, numit mediu lichid lipsit de uracil, cu etanol, glicerol și galactoză (tabelul 2 în continuare) se centrifughează: eșantionul indus. Supernatantul se colectează. La 10 ml supernatant se adaugă 5 ml acid tricloracetic de 50%, ce conține 2 mg/ml dezoxicolat.

20 Amestecul se expune pentru 30 minute la temperatura de +4°C, apoi se centrifughează timp de 30 minute. După centrifugare sedimentul se tratează cu circa 1 ml acetonă răcită (+4°C) și din nou se centrifughează timp de 30 minute. După uscare sedimentul se tratează cu circa 20 μ l tampon, numit tampon de umplere, care constă din 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 4% dodecilsulfat de sodiu, 0.002% albastru de bromfenol, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, conform protocolului descris de Laemmli în anul 1970, bine cunoscut specialiștilor în domeniu. Sedimentul se dizolvă prin fierbere timp de 15 minute, apoi se neutralizează.

25 Eșantioanele se plasează pe un gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și se expun electroforezei.

Rezultatele:

30 Analiza gelului (depistare după albastru de Coomassie) pentru eșantionul indus indică prezența câtorva benzi suplimentare, comparativ cu eșantionul neindus, dintre care cele două benzi principale corespund masei moleculare 9 ± 2 și 16 ± 2 kDa. Alte benzi suplimentare observate, destul de numeroase și difuze, posibil că corespund unui grad variabil de glicozilare.

35 Se cunoaște că N-glicozilarea proteinei de către levură include N-glicozilarea simplă ("glicozilare centrală") în reticulul endoplasmic și N-hiperglicozilarea ("glicozilare în exteriorul lanțului") în aparatul Golgi (R.A. Hitzeman et al., 1990, "Methods in Enzymology, no. 185", Academic Press, p. 421-440). În general, N-glicozilarea simplă conduce la o glicoproteină cu masă moleculară aparent omogenă (o bandă), iar N-hiperglicozilarea, la o glicoproteină cu masă moleculară aparent neomogenă (multiple benzi difuze).

b) Imunoamprenta (Western blot) cu tratare eventuală cu endoglicozidaza H

Prepararea eșantioanelor

40 Se centrifughează o parte din celulele, cultivate timp de o noapte într-un mediu lichid, lipsit de uracil, cu glucoză (tabelul 2): eșantionul neindus. Se centrifughează celulele, cultivate timp de o noapte în mediul lichid lipsit de uracil, cu etanol, glicerol și galactoză (tabelul 2): eșantionul indus. Supernatantul se colectează. La 10 ml supernatant se adaugă 5 ml acid tricloracetic de 50%, ce conține 2 mg/ml dezoxicolat.

45 Amestecul se menține la temperatura de +4°C timp de 30 minute, apoi se centrifughează timp de 30 minute. După centrifugare sedimentul se tratează cu circa 1 ml acetonă răcită (+4°C) și din nou se centrifughează timp de 30 minute. După centrifugare sedimentul se tratează cu circa 20 μ l tampon de solubilizare (compoziția: 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% dodecilsulfat de sodiu; 2% β -mercaptoetanol). Sedimentul se menține la 100°C timp de 5 minute.

Eșantionul se divizează în două părți:

50 - la prima parte, egală cu 10 μ l, se adaugă 10 μ l de 50 mM tampon citrat de sodiu cu pH 5.5, ce conține H-endoglicozidaza (5mUI: Boehringer, notare standard: 1088726). Eșantionul se menține la 37°C timp de circa o noapte. Apoi se adaugă 20 μ l tampon de umplere;

55 - la partea a doua, egală cu 10 μ l, se adaugă 10 μ l de tampon de umplere. Eșantioanele se fierb timp de 10 minute.

Eșantioanele se plasează pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și se efectuează electroforeza, conform protocolului Laemmli (referința a fost citată anterior).

60 Proteinele ce se conțin în gel se transferă pe membrana de nitroceluloză (conform metodei H. Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354). Imunodetectarea realizată conform protocolului, descris în trusa pentru testarea imuno-Blot, firma Bio-Rad (notare standard: 170-6450), include următoarele etape:

MD 1652 G2

- saturarea membranei de nitro-celuloză cu tampon 22TBS (tris-tampon salin), care conține 3 g/100 ml gelatină, timp de 30 minute;
- spălarea membranei cu un tampon, numit T. TBS (tampon TBS, care conține 0.05% Tween 20) de două ori timp de 5 minute;
- 5 - contactarea membranei cu serul imun, preparat în capitolul 13, timp de o oră la temperatura camerei;
- spălarea membranei cu tampon T. TBS, de două ori timp de 5 minute;
- contactarea membranei cu anticorpul conjugat din trusă;
- spălarea membranei cu tampon T.TBS de două ori timp de 5 minute și o dată timp de 5 minute cu tampon TBS;
- 10 - complexul antigen-anticorp se depistează la contactul membranei cu tamponul de dezvoltare, ce conține 5-brom-4-clor-3-indolil-fosfat (BCIP) și albastru de nitrotetrazoliu (NBT);
- spălarea cu apă.
- Rezultatele:
- Analiza imunoamprente pentru eșantionul indus, netratat cu endoglicozidaza H, atestă prezența a câteva benzi suplimentare, comparativ cu eșantionul neindus, două benzi principale ale căruia corespund masei moleculare de circa 9 ± 2 și 16 ± 2 kDa. Se depistează de asemenea alte benzi multiple și difuze cu o masă moleculară mai mare. Toate aceste benzi se recunosc cu ajutorul serului imun, preparat în capitolul 13.
- În eșantionul indus banda ce corespunde masei moleculare de circa 16 ± 2 kDa manifestă o tendință de dispariție după tratare cu endoglicozidaza H, în timp ce banda cu masa moleculară 9 ± 2 kDa își mărește intensitatea în aceleași condiții. Aceste rezultate atestă că proteina cu masa moleculară de circa 16 ± 2 kDa este N-glicozilată.
- Benzile difuze cu o masă moleculară mai mare, de asemenea, dispar și se observă apariția a două benzi, corespunzătoare masei moleculare de circa 18 ± 2 și 20 ± 2 kDa. Formele de proteină NC30, rezistente la tratare cu endoglicozidaza H, pot corespunde precursorului, care menține succesiunea pro- a feromonului, sau formelor glicozilate ale proteinei NC30.

Tabelul 2

Compozitia si prepararea unor medii, utilizate pentru obtinerea esantioanelor

- 30 - Mediul lichid lipsit de uracil, cu glucoză:
- 6.7 g bază azotată de levrură lipsită de aminoacizi (Difco);
- 5.0 g hidrolizat de cazeină (cazaminoacizi, Difco);
- 10.0 g glucoză,
se fuzionează toate ingredientele în apă distilată și se completează mediul până la volumul de 1 l cu apă distilată. Se autoclavează timp de 10 minute la 120°C;
- mediul lichid lipsit de uracil, cu etanol, glicerol și galactoză:
35 se utilizează compoziția mediului lichid de uracil, descris mai sus, însă fără glucoză. După autoclavare se adaugă 10 ml etanol de 100%, 30 g glicerol și 30 g galactoză.

Capitolul 11

Producerea proteinei NC30 in fermentor cu ajutorul tulpinii EMY761 pEMR673

- 40 Cultivarea tulpinii EMY761 pEMR673 se efectuează în fermentor în modul ce urmează:
a) faza de precultivare în fiole conice cu membrane despărțitoare.
Reieșind din 1 ml de suspensie de cultură, ce conține 20% glicerol de tulpină menționată, cu numărul de
celule corespunzător densității optice 3 pentru $\lambda=600$ nm (în spectrograful Kontron), se însămânțează într-o
45 fiolă conică cu membrană despărțitoare cu capacitatea de 500 ml, ce conține 90 ml mediu semisintetic pentru
cultivarea fazei autoclavabile (MCHPA), completate cu 1.28 g tampon MES pe bază de acid 2-(N-
morfolino)etansulfonic (M 8250, Sigma) și 10 ml mediu semisintetic pentru cultivarea fazei filtrate (MCHPF).
Compozițiile chimice și modul de preparare a mediilor MCHPA și MCHPF sunt prezentate concret în
continuare. După incubare timp de 24 ore și agitare la 30°C densitatea optică a culturii la $\lambda=600$ nm constituie
50 circa 7.
- b) Faza de creștere în fermentor
- 55 Cultura sus-menționată se utilizează pentru însămânțarea fermentorului cu capacitatea de 2.5 l, în prealabil
completat cu 800 ml mediu MCHPA și 100 ml mediu MCHPF.
Valoarea pH a culturii în fermentor se reglează până la 5.5. Presiunea oxigenului de asemenea se menține
mai mare de 4000 Pa (30 mm Hg) prin reglarea agitării. Inițial debitul aerului se fixează la 1 l/min, sau circa 1
VVM, apoi în funcție de necesități, se majorează treptat.
60 După cultivare timp de 6-7 ore la 30°C se adaugă uniform și timp de 9 ore 72 ml soluție de glucoză cu
concentratia de 500 g/l sau în total 36 g glucoză.

MD 1652 G2

c) Faza de expresie în fermentor

23

În amestecul sus-menționat se adaugă 100 ml mediu semisintetic pentru expresia fazei autoclavabile (MEHPA) și 100 ml mediu semisintetic pentru expresia fazei filtrate (MEHPF), compozițiile chimice și modul de preparare al cărora se indică concret în continuare. Cultivarea continuă apoi timp de circa 5 ore fără nici o adăugare. Concentrațiile a trei surse de carbon (glicerol, galactoză, etanol) se controlează prin HPLC și se completează prin injecții sterile, pentru a menține următoarele valori: 15 g/l glicerol, 15 g/l etanol, 7.5 g/l galactoză.

Peste 23-24 ore și în cadrul inducției se obține o densitate optică la $\lambda=600$ nm în jur de 90 și cultivarea se oprește.

10 Suspensia de cultură se centrifughează cu accelerația de 11500 g timp de 30 minute. Sedimentul din celulele de levură se elimină, supernatantul păstrat se congelează la -80°C .

Compoziția chimică a mediilor pentru cultivare și expresie

- Mediul semisintetic pentru cultivarea fazei autoclavabile MCHPA

		Pentru 800 ml-volum final (cu apă ultrapură)
15	NTA (acid nitriltriactic)	1 g
	K_2SO_4	1 g
	Clorură de sodiu	0.5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
20	$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	700 mg
	acid glutamic	3.7 g
	HY-CASE SF (Sheffield Products)	25 g
	leucină	1.8 g
	histidină	500 mg
25	metionină	1 g
	microelemente de tip I-S (vezi în continuare)	5 ml
	Se ajustează pH până la 5.5 cu acid sulfuric concentrat sau cu soluție concentrată de hidroxid de potasiu.	
	Se autoclavează timp de 20 minute la 120°C .	
	- Lista microelementelor de tip I-S.	

		Pentru 1 litru-volum final (cu apă ultrapură)
30	sulfat de cupru	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 780 mg
	acid boric	H_3BO_3 5 g
	sulfat de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g
35	iodură de potasiu	KI 1 g
	sulfat de mangan	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g
	molibdat de sodiu	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g
	clorură de fier	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.8 g
	În soluție se adaugă 100 ml acid clorhidric concentrat. Se completează până la 1000 ml.	
40	- Mediul semisintetic pentru cultivarea fazei filtrate MCHPF	

		Pentru 100 ml-volum final (cu apă ultrapură)
45	KH_2PO_4	4 g
	triptofan	350 mg
	vitamine tip I-S (vezi în continuare)	1 ml
	glucoză	15 g
	Se încălzește pentru dizolvare, se diluează, se adaugă vitaminele de tip I-S și se sterilizează prin filtrare prin membrana de $0.2 \mu\text{m}$.	
	- Lista vitaminelor de tip I-S.	

		Pentru 100 ml-volum final (cu apă ultrapură)
55	biotină	5 mg
	acid folic	4 mg
	niacină	6 mg
	(acid piridoxin nicotinic. HCl)	250 mg
	tiamină. HCl	1 g
	pantotemat de calciu	5 g
60	m. inozitol	10 g

MD 1652 G2

După dizolvare se completează până la volumul de 24100 ml. Se filtrează steril la rece prin membrana de 0.2 µm. Se păstrează la temperatura de +4°C.

- Mediul semisintetic pentru expresia fazei autoclavabile MEHPA

5

Pentru 400 ml-volum

final (cu apă ultrapură)

	NTA	1 g
	K ₂ SO ₄	1.74 g
10	acid glutamic	5 g
	HY-CASE SF (Sheffield Products)	20 g
	leucină	1.8 g
	histidină	500 mg
	metionină	1 g
15	triptofan	350 mg
	MgSO ₄ ·2H ₂ O	600 mg
	microelemente de tip I-S (vezi mai sus)	5 ml

Se ajustează pH până la 5.5 cu acid sulfuric concentrat sau cu soluție concentrată de hidroxid de potasiu. Se autoclavează timp de 20 minute la temperatura de 120°C.

20 - Mediul semisintetic pentru expresia fazei filtrate MEHPF

Pentru 100 ml-volum final (cu apă ultrapură)

	KH ₂ PO ₄	2 g
	triptofan	350 mg
	vitamine de tip I-S (vezi mai sus)	1 ml
	glicerol	15 g
	etanol	15 g
	galactoză	7.5 g

Se încălzește pentru dizolvare, se diluează, se adaugă vitaminele și se sterilizează prin filtrare prin membrana de 0.2 µm.

d) Analiza proteinei produse

25 Eșantioanele se prepară printr-o metodă similară celei descrise în capitolul 10 și se expun electroforezei pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu. Se observă repartizarea benzilor pe gel, identic celor observate în capitolul 10 pentru eșantionul indus.

Capitolul 12. Purificarea proteinei NC30 produse în levură și determinarea succesiunii ei aminoterminale și a hărții ei peptidice

30 1) Purificarea a două forme majoritare de proteină NC30

Se izolează două forme majoritare de proteină recombinantă de levură, benzile cărora corespund maselor moleculare aparente după electroforeză pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și constituie circa 9±2 și 16±2 kDa, și se purifică, reieșind din cantitatea de 500 ml de supernatant obținut în capitolul 11, conform următoarei metode:

35 Câteva etape se realizează succesiv:

- cromatografia cu schimbători de ioni pe coloana Q fast flow (Farmacia) (5×5 cm), în prealabil echilibrată cu 50 mM soluție de acetat de sodiu, pH 4.0. Debitul: 1 ml/min. Valoarea pH-ului supernatantului, în prealabil, se ajustează până la 4.0. În aceste condiții de operare proteina nu se fixează pe gel;

40 - cromatografia cu schimbători de ioni pe coloana S fast flow (Farmacia) (5×4 cm), în prealabil echilibrată cu 50 mM soluție de acetat de sodiu, pH 4.0, cu utilizarea ca eluant a soluției de 1M de clorură de sodiu în 50 mM tampon acetat de sodiu, pH 4.0. Debitul: 1 ml/min;

- eluantul se concentrează pe membrana YM5 (Amicon) până la un volum de circa 2 ml, apoi se aplică pe coloana pentru gel filtrare ACA54 (IBF) (100×1.5 cm), echilibrată în 0.1 M tampon fosfat, ce conține

45

0.14 M NaCl, debit: 0.2 ml/min. Frațiile ce conțin proteina recombinantă (se determină prin analiza electroforetică pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu) se combină.

Soluția astfel obținută se expune analizei electroforetice pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și se developează cu nitrat de argint. Se observă două forme majoritare de proteină NC30, corespunzătoare maselor moleculare de circa 9±2 și 16±2 kDa, cu un grad de puritate mai mare de 70%. Această soluție se utilizează în testările activității biologice, descrise în continuare.

50

Intr-o altă experiență, în acest protocol de purificare se include etapa HPLC cu fază inversă pe coloana C4 (Brownlee), utilizând ca eluant gradientul liniar de la 30 până la 70% acetonitril în 0.1% soluție TFA (acid trifluoracetic), ceea ce permite obținerea produsului cu un grad de puritate mai superior de 90% (se estimează

MD 1652 G2

- prin analiza electroforetică pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și se dezvoltă cu nitrat de argint).
- 2) Determinarea succesiunii aminoterminale a două forme majoritare de proteină NC30:
- Proteina purificată se expune electroforezei pe 16% gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu. Proteinele gelului se transferă pe membrana Immobilon (Millipore) cu 0.8 mA/cm², timp de o oră într-un tampon cu compoziția: 25 mM tris-borat, pH 9.0, și 10% metanol.
- Două benzi corespunzătoare maselor moleculare aparente de circa 9±2 kDa și 16±2 kDa se decupează și se plasează pe un secvenator Applied Biosystems, model 470A, cuplat cu analizatorul derivaților de feniltiohidantoină Applied Biosystems, model 120A.
- Aceste două benzi posedă una și aceeași succesiune aminoterminală (tr₁):
- | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Ser | Pro | Gly | Pro | Val | Pro | Pro | Ser | Thr | Ala | Leu, |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | |
- care reprezintă o succesiune aminoterminală așteptată: succesiunea proteinei mature din 114 aminoacizi (vezi fig. 2), descrisă în capitolul 5, succesiunea codificatoare a căreia se introduce în vectorul pEMR673, descris în capitolul 9.
- 3) Determinarea hărții peptidice a formei de proteină NC30 cu masa moleculară de circa 9±2 kDa.
- Proteina cu masa moleculară de circa 9±2 kDa se digerează pe gel cu tripsină de porcină și peptidele se separă prin HPLC cu fază inversă în următoarele condiții:
- Supernatantul de levură, obținut în capitolul 11, se sedimentează cu acid tricloracetic și precipitatul, după dizolvarea la 100°C în tamponul, ce conține dodecilsulfat de sodiu, se expune electroforezei pe gel de poliacrilamidă. Proteinele gelului se pun în evidență cu albastru de Coomassie. Din gel se decupează o bandă cu masa moleculară de circa 9±2 kDa și se hidrolizează cu tripsina de porcină în gel, conform metodei descrise în articolul J. Rosenfeld et al., în curs de publicare: "In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one or two dimensional gel electrophoresis".
- Apoi peptidele tripsinice se separă prin cromatografia HPLC cu fază inversă pe coloana Altex C18 (0.21×25 cm) Beckman cu un gradient de la 1 până la 70% acetonitril în 0.1% soluție TFA timp de 60 minute. Varfurile se determină prin măsurarea densității optice la 218 nm.
- Două fracții corespunzătoare fiecare unuia din vârfuluri, numite în continuare prima fracție și fracția a doua, se analizează cu secvenatorul Applied Biosystems, model 470A, prin metoda descrisă anterior.
- Succesiunile aminoacide obținute reprezintă următoarele:
- pentru prima fracție:
- Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val,
- care corespunde aminoacizilor 108-118 ai proteinei NC30 translate (vezi fig. 2);
- pentru fracția a doua:
- Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu
- și
- Lys Leu Phe,
- care corespund, respectiv, aminoacizilor 33-43 și 138-140 ai proteinei NC30 translate (vezi fig. 2).
- ### Capitolul 13
- Expresia citoplasmică a proteinei NC30 în *E. coli* și prepararea serului imun
- 1) Expresia citoplasmică a proteinei NC30 în *E. coli*:
- Vectorul de expresie al proteinei mature NC30 din 112 aminoacizi, metonilat în *E. coli*, denumit pSE714.122, se construiește prin inserția în vectorul pET3a, deschis în saiturile NdeI și BamHI, a fragmentului de ADN, ce conține o parte de ADNc NC30. Acest vector de expresie include de la extremitatea 5' la extremitatea 3':
- promotorul ARN-polimerazei al fagului T7, ce se conține în plasmida pET3a, descrisă de Rosenberg et al., Gene, 56, 125-135;
- partea de ADNc NC30, care codifică proteina matură din 112 aminoacizi (vezi capitolul 5), precedată de ATG inițiatorul translării;
- terminatorul genei 10 a fagului T7 (Studier et al., 1986, J. Mol. Biol., 189, 113-130).
- Această casetă de expresie funcționează numai în prezența ARN-polimerazei specifice a fagului T7. Deci, trebuie sintetizată această ARN-polimerază în tulpina-gazdă *E. coli*. Casetă de expresie a acestei ARN-polimeraze se construiește, plasând succesiunea ce codifică această enzimă (clonată de ADN lambda-fagului CE6, conform Studier et al., 1986, J. Molec. Biol., 189, 113-130) în funcție de promotorul PR lambda-fagului.
- Această casetă de expresie de asemenea include alelul de CI (CI857), ce codifică forma termosensibilă a represorului acestui promotor PR (P. Leplatois et al., 1983, Biochimie, 65, 317-324). Deci, la temperatură

MD 1652 G2

joasă, caseta de expresie a ADN-polimerazei se reprimă, la temperatură înaltă expresia nu se reprimă. Această casetă de expresie se clonează în vectorul de integrare pEJL407, derivat de la plasmidele lui N. Kleckner (1984, Gene, 32, 369-379). Vectorul obținut reprezintă plasmida pEMR648. Acest vector se menține în stare episomică în celulă, însă el provoacă integrarea unei sau a mai multor copii ale casetei de expresie a polimerazei (incluzând acolo represorul CI), când se induce transpoziția cu IPTG (izopropil-β-tio-galactozid). Transpozaza responsabilă de această integrare se află sub controlul genei lacI, ea însă nu se transpozează, ceea ce permite obținerea integranților stabili după eliminarea plasmidei. Transformand tulpina *E. coli* K12 HB101 (Gibco BRL, notare standard: 8260 SA) cu pEMR648, apoi provocand evenimente de integrare pe transformanți, se obține derivatul HB101, denumit VG112, care cuprinde 2 casete de expresie a polimerazei fagului T7 sub controlul sistemului termosensibil PL-CI, integrat în cromozom. Tulpina VG112 *E. coli* se purifică de plasmida pEMR648 și se transformă la temperatură joasă (30°C) cu plasmida pEMR714.

Transformantul obținut, denumit tulpina VG112 pSE714.12 și depus în Colecția Națională a Microorganismelor la 20 decembrie 1991 cu numărul 1-1162, se cultivă pe mediul LB, ce conține ampicilină în concentrație de 100 μg/ml la 30°C până la o densitate optică la 600 nm egală cu 1. Apoi expresia genei polimerazei se induce cu IPTG la 41°C timp de 2 ore. Analiza extractului celular în ansamblu pe gel de poliacrilamidă denaturant permite depistarea proteinei de 9 kDa, corespunzătoare benzii suplimentare, comparativ cu tulpina decelată și netransformată VG112 (tulpina de control). Liza celulelor prin tratare cu ultrasunet cu centrifugarea ulterioară permite separarea extractului celular în 2 fracții: fracția solubilă (supernatantul) și fracția insolubilă (sedimentul). Proteina NC30 se află cu proteinele fracției insolubile și constituie circa 50% (masă) din proteinele acestei fracții.

2) Prepararea serului imun, ce recunoaște proteina NC30

Această fracție insolubilă se utilizează pentru imunizarea iepurelui (mascul cu greutatea de circa 2 kg, New-Zeeland). Imunizarea se efectuează toate cele 15 zile conform protocolului descris de Vaitukaitis, 1981, Methods in Enzymology, 73, 46. Pentru prima injecție un volum de soluție de antigen se emulsionează într-un volum de adjuvant complet Freund (Sigma, notare standard: 4258). Șase repetări se administrează prin adjuvantul incomplet Freund (Sigma, notare standard: 5506).

Serul imun obținut este capabil să recunoască proteina NC30, produsă de levură și celulele COS, prin imunodectare după electroforeza pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu.

a) Caracteristica proteinei NC30 cu harta peptidică

Fracția insolubilă, obținută în alin. 1), se expune electroforezei pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu. Proteinele gelului se depistează prin colorare cu albastru de Coomassie. Banda corespunzătoare masei moleculare aparente de 9 ± 2 kDa se decupează din gel și se digeră cu tripsina de porcină în gel și peptidele tripsinice se separă prin metoda descrisă în capitolul 12-3).

Fracția corespunzătoare unui vârf se analizează cu secvenatorul Applied Biosystems, model 470A.

Sucesiunea aminoterminală obținută este următoarea:

Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu N Val Arg,

în care N reprezintă un aminoacid nedeterminat.

Această succesiune corespunde aminoacizilor 108-119 ai proteinei NC30 translate (vezi fig. 2) și peptidei primei fracții, analizate în capitolul 12.

Capitolul 14

Depistarea, pentru proteina NC30, a unei activități inhibitoare asupra producerii de ARN mesageri ai IL-1β și IL-6 cu monocitele sangelui periferic, stimulate cu LPS

1) Metoda utilizată

a) Prepararea celulelor

Dintr-o alicotă de sânge periferic (prelevat de la donatori voluntari într-un centru de transfuzie a sangelui) se separă majoritatea hematiilor prin sedimentare la 37°C timp de 30 minute într-un mediu ce

conține 0.6% dextran, 0.09% clorură de sodiu. Apoi celulele se plasează deasupra stratului Ficoll-Paque (Farmacia) și se centrifughează cu 400 g timp de 30 minute. Celulele mononucleare ale sangelui periferic (PBMNC), care se situează pe suprafața de separare între Ficoll și supernatant, se prelevă. PBMNC se plasează în mediul RPMI 1640, Gibco BRL), ce conține 10% ser fetal de vițel (SVF), din cutiile de cultivare cu diametrul de 15 cm, câte 1.5×10^7 celule în cutie. Peste 30 minute mediul se aspiră și celulele aderente de cutie (în mare parte formate din monocite) se incubează cum este descris în continuare.

b) Incubarea celulelor cu LPS și proteină NC30

PBMNC aderente se incubează în 20 ml RPMI/10% ser fetal de vițel timp de 4 ore la 37°C într-o atmosferă ce conține 5% bioxid de carbon, în prezența a 5 μg la un ml de lipopolizaharidă (LPS) (notare standard: 1.4391, Sigma) și a concentrațiilor crescânde de proteină NC30, originară din levura purificată (0.1-10 ng/ml), sau a

MD 1652 G2

supernatantului celulelor COS, sau transfectate cu plasmida pSE1 NC30 și cultivate prin metoda descrisă în capitolul 7, sau transfectate cu plasmida pSE1 și cultivate în condiții similare (control).

c) Prepararea și analiza de ARN

Celulele se spală cu PBS, apoi se răzuiesc direct în 1 ml de tampon D (următoarea compoziție: 4M tiocianat de guanidiniu, 25 mM citrat de sodiu, 0.5% sarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanol: Chomczynski P. și Sacchi N. (1987), Anal. Biochem., 162, 156-159). ARN se obține prin metoda de extragere cu fenol, la valori acide de pH, descrisă de acești autori. 1-5 μ g ARN se aplică pe 1% gel de agaroză în prezența formaldehidei (Sambrook et al., citat anterior). După migrare ARN se transferă pe o membrană de nitroceluloză amplificată (Schleicher și Schuell) și se hibridizează cu sonde ADNc radiomarcate, metodă descrisă în capitolul 4. Intensitatea hibridizării fiecărui ARN cu diferite sonde se cuantifică prin analiza fosforescenței cu aparatul Phosphorimager (Molecular Dynamics, 800E, Arques Avenue, Sunnyvale, Ca, 94086, S.U.A.).

2) Rezultate

Valorile medii și erorile standard ale rezultatelor obținute cu proteina NC30, purificată în patru experiențe, sunt prezentate în tabelul 3, în care cantitățile de ARN mesageri, determinate prin analiza fosforescenței, se exprimă sub formă de procent în raport cu cantitatea de ARN mesager, determinat pentru eșantion, originar din celulele tratate cu un LPS.

Tabelul 3

Cantitățile de ARN mesageri ai IL-1 β și IL-6, măsurate pentru diferite concentrații de proteină NC30

Condiția de stimulare a celulelor	Cantitatea de ARN mesageri	
	IL-1 β	IL-6
LPS	100	100
LPS+proteina NC30 în concentrație de 0.1 ng/ml	97 $\pm$ 36	77 $\pm$ 18
LPS+proteina NC30 în concentrație de 1 ng/ml	54 $\pm$ 39	24 $\pm$ 11
LPS+proteina NC30 în concentrație de 10 ng/ml	30 $\pm$ 5	13 $\pm$ 4

Din tabelul prezentat rezultă că acumularea de ARN mesageri ai IL-1 β și IL-6 în monocitele tratate cu lipopolizaharidă se inhibă de proteina NC30. O inhibare mai semnificativă se observă pentru concentrația de 10 ng/ml de proteină NC30 și doza pentru inhibarea a 50% (IC50) constituie o valoare de ordinul 1 ng/ml.

În mod analogic se stabilește inhibarea producerii de ARN mesageri ai IL-1 β și IL-6 în prezența supernatanților celulelor COS, transfectate de către plasmida pSE1-NC30, și nu se manifestă nici o inhibare în prezența supernatanților celulelor COS de control.

Pe parcursul altor experiențe de asemenea se constată inhibarea producerii proteinelor IL-1 β și IL-6 în mediile de cultură ale monocitelor, tratate cu LPS în prezența proteinei NC30. IL-6 se analizează cantitativ după efectul lui asupra proliferării liniei hibridomei B9, conform metodei descrise de L.A. Aarden, 1987, Eur. J. Immun., 17, 1411-1416. (Cantitatea de proteină NC30, prezentă în eșantioane, nu interferează cu determinarea de B9 a cantităților de IL-6, produse de monocite.) Dozarea de IL-1 β se realizează pe celulele EL4 după metoda descrisă de E.W. Palaszynski, 1987, Biochem. And Biophys. Res. Comm., 147, p. 204-211, care constă în măsurarea concurenței de cuplare cu IL-1 β radiomarcat.

Capitolul 15. Depistarea, pentru proteina NC30, a modulării cantității de antigen de suprafață CD23 de către celulele B amigdalene

1) Metoda utilizată

a) Prepararea celulelor

Amigdalele umane se prelevă prin intervenție chirurgicală de la o fetiță în vârstă de 6 ani. Amigdalele se fărâmițează cu un bisturiu în mediul RPMI, răcit până la 4°C. Celulele mărite în volum în mediu după această operație se filtrează prin tifon, pentru a obține o suspensie omogenă de celule. După două lavaje celulele se numără și se tratează cu ser fetal de vițel, ce conține 10% dimetilsulfoxid (Merck). Câte 7.5 $\times$ 10⁶ celule într-un volum de 1 ml se repartizează în fiecare eprubetă de congelare. Celulele se plasează în termostat la temperatura de -80°C pentru 24 ore, apoi se depozitează în azot lichid.

b) Incubarea celulelor cu proteina NC30

În ziua experienței o parte alicvotă de celule se decongelează la 37°C, apoi lent se diluează cu 50 ml mediu RPMI, ce conține 10% ser fetal de vițel. Celulele se centrifughează pentru eliminarea dimetilsulfoxidului. După calculul celulelor, 100 μ l suspensie de celule reajustate până la o concentrație de 4 $\cdot$ 10⁶ celule/ml se distribuie pe plachetele de microtitrare cu 96 alveole (NUNC).

MD 1652 G2

Diferite concentrații de proteină NC30 purificată se adaugă în mediul RPMI, ce conține 10% ser fetal de vițel. 100 μl mediu cu diverse concentrații de proteină se adaugă la celulele din alveole pentru titrare. Incubarea continuă 48 ore la 37°C într-o atmosferă ce conține 5% bioxid de carbon.

c) Marcarea celulelor pentru imunofluorescență

5 După incubare celulele se transferă în microeprubete (Labssystem). Pentru o simplă analiză imunofluorescentă, în suspensia de celule se adaugă 10 μl anticorpi anti-CD23, cuplați cu FITC (fluorescenizotiocianat) (Immunotech). Pentru analiză în dublă imunofluorescență, în suspensia de celule, simultan, se adaugă 10 μl anticorpi anti-CD23, cuplați cu ficoeritrină și 10 μl anticorpi anti-CD20, cuplați cu FITC (Becton Dickinson).

10 Incubarea continuă 30 minute la 4°C, apoi celulele se centrifughează și după centrifugare sedimentul se tratează cu 250 μl tampon PBS răcit. Pentru a distinge celulele moarte în timpul analizei, se adaugă 50 μl soluție de iodură de propidiu (Sigma) în concentrație de 20 μg/ml.

d) Analiza prin citometria în flux

15 Eșantioanele se analizează prin determinarea fluorescenței pe un selector de celule FacStar Plus (Becton Dickinson) cu lungimea undei laser de excitație a fluorescenței de 488 nm. În cadrul analizei imunofluorescente simple se colectează emisiile de FITC și de iodură de propidiu, utilizând filtrele interferențiale corespunzătoare de 530 nm și 630 nm. În cadrul analizei în dublă imunofluorescență, emisia suplimentară cauzată de prezența ficoeritrinei se colectează prin filtrul interferențial de 575 nm. Pentru această ultimă analiză se utilizează un sistem de compensare electronică pentru a evita contaminarea fluorescenței FITC în canalul ficoeritrinei, a fluorescenței ficoeritrinei în canalul iodurii de propidiu și a fluorescenței iodurii de propidiu în canalul ficoeritrinei. Rezultatele se colectează și se tratează, utilizând asigurarea de program LYSIS II (Becton Dickinson).

2) Rezultatele

a) Modularea cantității de antigen CD23 în celulele amigdaline prin proteina NC30

25 Valorile medii și erorile standard ale rezultatelor obținute sunt prezentate în tabelul 4 ce urmează, pentru incubarea celulelor amigdaline timp de 48 ore și gama concentrațiilor proteinei NC30 de la 10^{-3} până la 10^2 ng/ml.

Tabelul 4

Variația procentajului de celule amigdaline, ce exprimă antigenul CD23, în prezența diferitelor concentrații de proteină NC30

Concentrația NC30 (ng/ml)	% celulelor, ce exprimă CD23
0	4.8±1.2
10^{-3}	4.8±0.8
10^{-2}	4.9±0.4
10^{-1}	12.0±2.4
1	17.0±2.5
10	27.3±1.6
10^2	20.4±2.5

30

Se constată că procentul de celule amigdaline, ce exprimă antigenul CD23 (receptorul afinității, puțin exprimate față de IgE), este mai semnificativ pentru concentrația proteinei NC30 mai mare de 10^{-1} ng/ml, comparativ cu procentul obținut în absența proteinei NC30. Cel mai important efect al acestei proteine se constată la concentrația de 10 ng/ml.

35

b) Caracterizarea celulelor în care proteina NC30 modulează expresia antigenului CD23

Caracterizarea celulelor care exprimă antigenul CD23 se realizează prin imunofluorescență dublă, utilizând anticorpii anti-CD23 cuplați cu ficoeritrină și anticorpii anti-CD20 cuplați cu FITC. Acesta din

40 urmă se dirijează contra receptorului prezent numai în celulele B. Analiza prin citometrie în flux relevă că fracția de celule B exprimă antigenul CD23 sub acțiunea proteinei NC30.

Capitolul 16. Depistarea acțiunii proteinei NC30 asupra proliferării liniei hibridomei B9

45 Activitatea de stimulare a proliferării liniei hibridomei B9 se depistează utilizând supernatanții culturilor de celule COS, transfectate de plasmida pSE1-NC30 (vezi capitolul 7), și proteina NC30 purificată, originară din levură (vezi capitolul 12). Această linie de obicei se utilizează pentru efectuarea măsurării biologice a IL-6 (L.A. Aarden, 1987, Eur. J. Immun., 17, 1411-1416).

1) Metoda utilizată

a) Principiul de măsurare

50 Principiul de măsurare este descris de T. Mosman, 1983, J. Immun. Methods, 65, 55-63, și se rezumă succint în continuare:

Mitocondriile includ multiple dehidrogenaze, capabile să reducă ciclul tetrazoliu în formazan. Sarea de acest tip, MTT (bromură de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2,5-difenil-tetrazol)), de asemenea redusă, dă o colorare

MD 1652 G2

albastră, cu absorbție puternică la 565 nm. Măsurarea colorimetrică, descrisă aici, permite măsurarea cantitativă a numărului de mitocondrii, deci a numărului de celule.

b) Cultura de celule

5 Celulele utilizate aparțin liniei B9, ce reprezintă linia hibridomei șoarece/șoarece, descrisă de L. A. Aarden, 1987, Eur. J. Immun, 17, 1411-1416. Acestea sunt celulele neaderente, care proliferază în prezența de IL-6 murin sau IL-6 uman.

Mediul de cultură

500 ml mediu RPMI 1640 lipsit de glutamină

notare standard: 041-01870M (Gibco);

10 +50 ml ser fetal de vițel (decomplementat, adică încălzit timp de 30 minute la 55°C pentru inactivarea fragmentelor de complement seric) (Sigma, notare standard: F 4135);

+12.5 ml de 100 mM piruvat de sodiu (notare standard: 043-01360H, Gibco);

+2.5 ml de 1M hepes, pH 7.3 (notare standard: 043-05630D, Gibco);

+10 ml de 200 mM glutamină (notare standard: 043-05030D, Gibco).

15 Ex temporal se adaugă:

- β-mercaptoetanol (Sigma, notare standard: M-6250), concentrația finală 5×10^{-5} M;

- IL-6, concentrația finală de 500 pg/ml.

c) Prepararea eșantioanelor

20 Se utilizează două tipuri de eșantioane: unul, obținut din supernatantul celulelor COS, sau transfectate cu plasmida pSE₁ NC30 și cultivate cum este descris în capitolul 7, sau transfectate cu plasmida pSE₁ și cultivate în aceleași condiții (control), altul, obținut din soluție de proteină NC30, originară din levură purificată conform metodei din capitolul 12, în concentrație de 50 ng/ml.

d) Protocolul măsurării

25 Măsurarea se efectuează pe plachetele de cultură cu 96 alveole cu fundul plat, fiecare eșantion analizându-se într-un rând din 12 alveole cu concentrații variabile.

Celulele liniei B9 se cultivă, se spală de 2 ori cu mediu de cultură lipsit de IL-6, se trec din nou în suspensie în mediul de cultură (lipsit de IL-6) și se incubează timp de 2 ore la 37°C. Această incubare permite o eliminare mai completă a IL-6, responsabil, în fond, de măsurări. În sfârșit, celulele din nou se centrifughează și se trec în suspensie în mediul de cultură menționat (lipsit de IL-6) într-o concentrație de $2 \cdot 10^5$ celule/ml.

30 Pe plachetele cu 96 alveole se distribuie succesiv:

- 50 μl mediu de cultură (lipsit de IL-6) cu fiecare alveolă (cu excepția primelor alveole ale fiecărui rând);

- 100 μl eșantion testat în prima alveolă a fiecărui rând (cu o diluție dublă de la alveolă la alveolă);

- 50 μl suspensie de celule în fiecare alveolă (10000 celule în alveolă).

35 Plachetele se plasează în termostat la temperatura 37°C într-o atmosferă cu conținut de 5% bioxid de carbon.

După incubare timp de 3 zile în fiecare alveolă, în condiții sterile, se introduc câte 10 μl soluție MTT (Sigma, notare standard: 2128) cu concentrația de 5 mg/ml în tampon PBS. Plachetele se introduc din nou în termostat. La microscop se poate urmări apariția formazanului, produs sub formă de cristale albastrii de celule supraviețuitoare. Peste 4 ore celulele mor, supernatantul din fiecare alveolă se aspiră cu precauție și cristalele se dizolvă în 100 ml soluție de n-propanol de 66%, ce conține 10% dodecilsulfat de sodiu și 0.04 N de HCl. Pentru câteva minute plachetele se plasează pe un agitator pentru plachete, pentru a omogeniza colorarea. Apoi citirea se efectuează cu aparatul pentru citirea plachetelor la o lungime de undă de 565 nm.

În plus, la măsurarea cu MTT, descrisă anterior, calculul celulelor se poate realiza utilizând microscopul.

45

2) Rezultatele

a) Supernatantul celulelor COS, ce conține proteina NC30

Se realizează 6 serii de măsurări: 3 cu diferiți supernatanți ai celulelor COS cu conținut de proteină NC30 și 3 cu diferiți supernatanți ai celulelor COS de control, cu diferiți, pentru fiecare serie, factori de diluție ai soluției supernatantului COS.

50 Rezultatele obținute sunt prezentate în fig. 6, în care este reflectată variația densității optice (fiecăre punct reprezintă valoarea medie a densității optice, măsurate pentru unul și același factor de diluție în 3 serii de experiențe) în funcție de factorul de diluție a soluției supernatantului COS.

55 La citirea datelor din această figură se constată că soluția supernatantului COS cu conținut de proteină NC30 este de 4-6 ori mai activă în proliferarea liniei B9, comparativ cu soluția de supernatant COS de control.

Activitatea de stimulare a proliferării liniei B9, constatată la utilizarea soluției de supernatant B9 de control, apare ca urmare a producerii endogene a IL-6 de către celulele COS, care poate fi de asemenea cuantificată prin analiza radioimună (RIA), în special cu chitul firmei Amersham, notare standard: RPA 537. Această analiză radioimună confirmă că amplificarea activității de stimulare a proliferării liniei B9 (prin supernatantul COS cu conținut de proteină NC30) nu este în legătură cu superproducerea de IL-6 de către celulele COS.

60

MD 1652 G2

b) Proteina NC30 purificată, originară din levură 30

Se realizează două serii de măsurări: una, a densității optice după colorare cu MTT, alta, a densității celulelor prin numărarea celulelor la microscop, cu diferite, pentru fiecare serie, concentrații ale proteinei NC30.

5 Rezultatele obținute sunt prezentate în fig. 7, care reflectă variația densității optice și densității celulelor în funcție de concentrația proteinei NC30, exprimate în ng/ml.

Se constată că proteina NC30 purificată stimulează proliferarea liniei B9. ED₅₀ (concentrația la care se constată activitatea egală cu jumătate din activitatea maximă obținută) constituie 100 ng/ml.

10 De remarcat că celulele B9 sunt celule de șoarece, ceea ce explică necesitatea utilizării unor concentrații ridicate de proteină NC30, comparativ cu concentrațiile utilizate pentru acțiunea asupra celulelor umane (vezi capitolele 14, 15 și 17).

Capitolul 17. Depistarea acțiunii proteinei NC30 asupra proliferării liniei umane megacarioblastice MO7_e în prezența GMCSF

15 Amplificarea activității proliferative a GMCSF asupra liniei megacarioblastice umane MO7_e se depistează cu proteina NC30 produsă în levură (capitolul 12). Această linie de celule, descrisă de M.F. Brizzi et al., 1990, British Journal of Haematology, 76, 203-209, în creșterea sa depinde strict de citochinele IL3 sau GMCSF.

1) Metoda utilizată

a) Scopul

20 Se are în vedere compararea proliferării celulelor liniei MO7_e, cultivate sau în prezența cantității de GMCSF, necesare pentru jumătate de proliferare maximă, sau în prezența aceleiași cantități de GMCSF, la care se adaugă proteina în concentrație variabilă.

b) Principiul de măsurare

25 Proliferarea celulelor se determină prin măsurarea radioactivității încorporării timidinei, ce conține tritiiu, de către celulele culturii.

Celulele proliferative utilizează timidina pentru sinteza de ADN. Timidina ce conține tritiiu, fiind introdusă în cultură, concurează cu timidina neradioactivă a mediului și se încorporează în celule.

30 După o perioadă de timp determinată celulele se recuperează pe un filtru și se spală, pentru eliminarea excesului de timidină cu conținut de tritiiu, neinclusă în celule. Fiecare filtru se analizează apoi cu contorul gama. Activitatea proliferativă se exprimă în numărul de impulsuri pe minut ale timidinei cu conținut de tritiiu.

c) Cultura de celule

Celulele utilizate aparțin liniei MO7_e, care reprezintă linia megacarioblastică umană, stabilită de M.F. Brizzi et al. (citată anterior). Acestea sunt celule neaderente, care proliferază în prezența a IL-3 uman sau a GMCSF umane. Jumătatea activității maxime obținute (ED₅₀) constituie:

35 35 pg/ml pentru GMCSF (Genzyme, notare standard: RM-CSF-C);

0.7 pg/ml pentru IL-3 (Genzyme, notare standard: HIL3 C).

Mediul de cultură:

- 500 ml mediu Dulbecco, modificat conform metodei Iscove (mediul IMDM, Gibco, notare standard: 04101980);

40 - 50 ml ser fetal de vițel (decomplementat, adică încălzit la 55°C timp de 30 minute pentru inactivarea fragmentelor de complement seric) (Sigma; notare standard: F4135);

+10 mg/ml gentamicină (1 ml soluție Gibco, notare standard: 043.05710 D).

45 *Ex tempore* se adaugă IL3 recombinant uman (Genzyme, notare standard: HIL3.C) într-o concentrație finală de 4 ng/ml.

d) Prepararea eșantioanelor

Eșantioanele testate se prepară (prin diluție în mediul de cultură lipsit de IL3) din soluția de proteină NC30, originară din levură și purificată conform metodei din capitolul 12, în concentrație de 500 ng/ml.

50 e) Protocolul măsurării

Măsurarea se efectuează pe plachetele de cultură cu 96 alveole cu fund plat și fiecare eșantion se analizează într-un rând din 12 alveole, utilizând concentrații variabile. Celulele cultivate ale liniei MO7_e trebuie să se afle în faza exponențială de creștere.

55 Pentru măsurare, celulele se spală de 2 ori cu mediu de cultură lipsit de IL3 și se incubează timp de 3 ore la 37°C. Această incubare permite o eliminare mai completă a IL3, responsabil, în fond, de măsurare. În sfârșit, celulele se centrifughează din nou și se trec din nou în suspensie în mediul de cultură (lipsit de IL3), menționat anterior, în concentrație de 2·10⁵ celule/ml.

Pe placheta cu 96 alveole se distribuie succesiv:

- sau 50 μl mediu de cultură (lipsit de IL3) în fiecare alveolă;

60 - sau 50 μl mediu de cultură (lipsit de IL3) și 10 μl soluție GMCSF cu concentrația de 200 ng/ml;

- sau 50 μl eșantion testat de concentrație variată și 10 μl soluție GMCSF cu concentrația de 200 ng/ml;

MD 1652 G2

- apoi 50 µg suspensie de celule, în fiecare alveolă³¹(10000 celule/alveolă).

Apoi plachetele se plasează în termosta la temperatura de 37°C într-o atmosferă de 5% bioxid de carbon.

După incubare timp de 3 zile, în fiecare alveolă, în condiții sterile, se adaugă 50 µl soluție de timidină cu conținut de tritiu (10 µCi/ml) (Amersham, notare standard: TRA6=1 mCi/ml până la 10 µCi/ml) în mediul de cultură lipsit de IL3. Placheta se introduce în termosta. Peste 4 ore conținutul fiecărei alveole se aplică pe un filtru prin aspirație și lavaj cu apă distilată și se măsoară radioactivitatea filtrului.

2) Rezultatele

Rezultatele principale obținute sunt prezentate în tabelul 5, în care figurează valorile radioactivității, exprimate în numărul de impulsuri pe minut, pentru mediul lipsit de GMCSF și de proteina NC30, și valoarea radioactivității pentru mediul ce conține 18 pg/ml GMCSF, în funcție de concentrația proteinei NC30.

Valorile radioactivității prezentate aici sunt mărimile medii din 11 experiențe pentru mediul lipsit de GMCSF, precum și pentru mediul ce conține numai GMCSF, și din 7 experiențe pentru mediile ce conțin GMCSF și proteina NC30. Valorile acestor mărimi medii se compară, utilizând criteriul Student cu gradul de autenticitate mai mare de 99.95%.

Tabelul 5

Concentrația proteinei NC30 (ng/ml)	0	0.49	1.95	7.8	31.2	125	500
Radioactivitatea (nr. de impulsuri pe min.) pentru mediul lipsit de GMCSF	550	/	/	/	/	/	/
Radioactivitatea (nr. de impulsuri pe min.) pentru mediul ce conține 18 pg/ml GMCSF	14462	16852	18840	20264	20549	20685	21784
Devierea semnificativă cu probabilitate >99.95%	/	nu	da	da	da	da	da

Din tabelul prezentat rezultă că proteina NC30 sporește considerabil proliferarea liniei MO7_e în prezența GMCSF.

Capitolul 18. Depistarea activității chemotactice pentru proteina NC30

1) Metoda utilizată

a) Izolarea neutrofilelor

Din sângele periferic se elimină, în mare parte, hematiile prin sedimentare la 37°C timp de 30 minute într-o soluție cu conținut de 0.6% dextran T500 (Farmacia, notare standard: 17-0320-01) și 0.09% clorură de sodiu. Apoi celulele se depun pe stratul Ficoll-Paque (Farmacia) și se centrifughează timp de 30 minute cu 400 g. Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMNC) sunt prezente pe linia de demarcare între Ficoll și supernatant, în timp ce hematiile reziduale și elementele polinucleare (în special, neutrofilele) se află în sedimentul celular. Acest sediment se trece din nou în suspensie în 0.8% soluție clorură de amoniu,

10 mM hepes și se incubează timp de 7 minute la 37°C pentru distrucția hematiilor. Celulele reziduale (în special neutrofilele) se centrifughează și se spală în tampon HBSS: Soluție salină echilibrată Hanks (Gibco BRL, notare standard: 041-04025H), denumită în continuare soluție HBSS.

b) Izolarea monocitelor

Principiul izolării monocitelor se descrie de A.Boyum, 1983, Scan. J. Immunol., 17, 429-436. În continuare este prezentată descrierea lui succintă. Metoda constă în separarea monocitelor din sânge, utilizând mediu cu gradient de iod, Nycodenz (N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil)-5-[N-(2,3-dihidroxipropil)acetamido]-2,4,6-triiod-izoftalamidă). Pentru accentuarea diferenței de densitate între monocite și limfocite, se măsoară osmolaritatea soluției, deci limfocitele se deshidratează și devin mai dense. Pentru izolarea monocitelor (Nycomed Pharma AS, Norvege, notare standard: 223510) se poate utiliza mediul "Nycoprep 1.068", care conține Nycodenz, clorură de sodiu și triclină/NaOH în concentrații optime.

Metoda utilizată este următoarea:

Din sângele periferic se elimină, în mare parte, hematiile prin sedimentare la 37°C timp de 30 minute într-o soluție cu conținut de 0.6% dextran și 0.09% clorură de sodiu. Se prelevă faza superioară a plasmăi, ce conține monocite, limfocite și neutrofile. Pentru separarea monocitelor de alte celule, se pregătesc eprubetele în modul ce urmează:

6 ml plasmă se depun pe un strat din 3 ml Nycoprep 1.068 (Nycomed Pharma AS, Norvege, notare standard: 223510) într-o eprubetă cu diametrul de 13-14 mm. După centrifugare cu 600 g timp de 15 minute se

MD 1652 G2

5 prelevă plasma limpezită până la 3-4 mm deasupra fazei intermediare și se colectează restul de plasmă și toată soluția NycoPrep până la circa 1 cm mai sus de nivelul sedimentului de celule, ceea ce permite de a nu preleva limfocitele. Suspensia de monocite colectată se completează până la un volum de 6-7 ml cu o soluție ce conține: 0.9% clorură de sodiu, 0.13% EDTA, 1% albumină serică de bovină, apoi se centrifughează timp de 7 minute cu 600 g.

Monocitele sunt contaminate cu trombocite. Pentru eliminarea trombocitelor, se centrifughează, apoi se colectează supernatantul și se trece din nou în suspensie în aceeași soluție, repetând aceste operații de 3 ori.

10 Celulele se trec din nou în suspensie în mediul RPMI 1640 (Gibco) ce conține 0.5% albumină serică de bovină (BSA).

c) Protocolul depistării chemotactismului

Se utilizează testul descris de W. Falk et al., 1980, J. Imm. Meth., 33, 239-247. Protocolul concret este expus în continuare.

15 Pentru determinarea chemotactismului se utilizează camera Boyden, comercializată de firma Neuroprobe (notare standard: AP48). Eșantioanele pentru testare, diluate în soluția HBSS, pentru testările pe neutrofile, și în mediul RPMI cu conținut de 0.5% albumină serică de bovină, pentru testările pe monocite, se plasează în alveolele plachetei inferioare. Pe ea se pune o membrană de polycarbonat (dimensiunea porilor: 5 mm-Nuclepore, notare standard: 155845) cu partea lucioasă în jos. Pe membrană se amplasează placheta superioară. Se introduc celulele (50000 pentru 50 μ l tampon) în alveolele plachetei superioare. Camera se incubează la 37°C în termostatul umectat sau într-o manta ce conține bumbac umezit timp de o oră, pentru testul pe neutrofile, și timp de 3 ore, pentru testul pe monocite. Membrana se retrage și se îndepărtează celulele aflate pe partea mată (celulele care nu au migrat) prin uscarea membranei și raclajul ei cu un răzor de cauciuc și aceste două operații se repetă doar o dată. Celulele care au migrat se colorează și se fixează, utilizând chitul "Diff-quick" (Dade, notare standard: 130832). Prin microscop se calculează numărul de celule de pe partea lucioasă a membranei (celulele care au migrat). Apoi se calculează indicele chemotactismului eșantionului, în raport cu celulele examinate (monocite sau neutrofile), care se definește ca raportul numărului de celule care au migrat în eșantion față de numărul de celule care în experiența de control au migrat în mediu sau în tamponul de diluție.

3) Prepararea eșantioanelor

a) Eșantioanele proteinei NC30 recombinante:

30 proteina NC30, originară din levură, purificată prin metoda descrisă în capitolul 12, în concentrații de 0.1, 1, 10 și 100 ng/ml.

b) Controlul:

peptida formil-Met-Leu-Phe, de obicei numită fMLP (Sigma, notare standard: F 3506) în concentrație de 1 μ M (concentrație de regulă utilizată drept control pozitiv al chemotactismului).

35 4) Rezultatele

Rezultatele principale obținute sunt prezentate în tabelul 6, care precizează indicele chemotactismului în raport cu monocitele și indicele chemotactismului în raport cu neutrofilele pentru proteina NC30 de diferite concentrații și controlul fMLP. Acest indice se calculează găsind media din patru experiențe independente.

40

Tabelul 6

Proteina NC30, ng/ml	Indicele chemotactismului în raport cu monocitele	Indicele chemotactismului în raport cu neutrofilele
0.1	2.2	0.6
1	4.1	1.0
10	6.1	1.2
100	5.1	1.1
fMLP 1 μ M	3.0	3.8

45 Se constată că în concentrațiile testate, proteina NC30 nu manifestă efect semnificativ asupra neutrofilelor, însă în concentrații de 1, 10 și 100 nm/ml ea are un indice de chemotactism în raport cu monocitele net mai superior celui cu fMLP.

Proteina NC30, deci, este un chemoattractant puternic și specific pentru monocite.

Capitolul 19. Activitatea imunomodulatoare *in vivo* (cu șoareci)

50 Proteina NC30 purificată, originară din levură, se tratează pentru activitatea ei imunomodulatoare în modele infecțioase sistemice cu șoareci.

1) Materialul și metodele

a) Animalele

MD 1652 G2

În acest studiu se utilizează șoareci femele CD1,33 furnizați de C. River (Franța), cu masa medie de 25 g. Loturile utilizate includ 8 sau 10 șoareci.

b) Tulpinile bacteriene

Tulpinile infecțioase reprezintă tulpina *Listeria monocytogenes*, disponibilă din Colecția Institutului Pasteur cu numărul CIP 5734, și tulpina *E. coli*, izolată clinic, conservată la -70°C.

c) Eșantioanele

Proteina NC30, originară din levură, purificată prin procedeul descris în capitolul 12, se utilizează diluată în 0.15M soluție clorură de sodiu cu un conținut de 1% volum plasmă de șoarece. Aceasta este soluția de control.

d) Tratamentul șoarecilor

După repartizarea șoarecilor în câteva loturi, lor li se administrează proteina NC30 intraperitoneal în doze de 2 și 20 μg/kg, la intervale temporale de 24 sau 4 ore înainte de infecție. Lotul de control se tratează cu diluant.

e) Modelele de infecție

Se utilizează două modele de septicemie, provocate prin tulpinile *E. coli* și *L. monocytogenes*. Aceste modele sunt descrise de Kong-Tek-Chong, 1987, Infection and Immunity, 55, 3, p. 668-673, și M. Haakfrendscho et al., Infection and Immunity, 1989, 57, 10, p. 3014-3021.

Tulpinile *E. coli* și *L. monocytogenes* se cultivă într-un bulion nutritiv (Nutrient Broth, Oxoid) timp de 18 ore la 37°C. Un volum de 0.5 ml de o diluție adecvată de bulion nutritiv, care corespunde cu 5×10⁶ UFC (unitate formatoare de colonie) se administrează șoarecilor intraperitoneal. Zilnic, până în ziua a 10-a, se înregistrează mortalitatea șoarecilor în diferite loturi.

f) Explorarea statistică

Numărul de șoareci care au supraviețuit, depistați în loturile tratate, se compară cu cel din lotul de control prin testul khi2. Diferența se consideră autentică, când probabilitatea depășește 95%.

2) Rezultatele

a) Infecția prin *L. monocytogenes*

Loturile de șoareci tratați intraperitoneal la intervale temporale de 24 sau 4 ore înainte de infectare cu 2 sau 20 μg/kg proteină NC30 se comportă analogic lotului de control. Nu s-a constatat nici o ameliorare a gradului de supraviețuire.

b) Infecția prin *E. coli*

Rezultatele sunt prezentate în tabelul ce urmează, în care se indică cota șoarecilor care au supraviețuit în loturile testate.

Tabelul 7

Numărul de șoareci care au supraviețuit/numărul șoarecilor infestați prin *E. coli* în funcție de doza proteinei NC30 și intervalul de timp T, de la tratare până la infectare

T	24 ore		4 ore	
Doza (μg/kg)	Exemplul 1	Exemplul 1	Exemplul 2	Exemplul 3
0 (control)	3/8	1/10	1/8	2/8
2	3/8	5/8*	3/8	2/8
20	7/8*	nu s-a testat	5/8*	3/8

* Diferența autentică, comparativ cu lotul de control, cu o probabilitate ce depășește 95%.

S-a constatat:

Șoarecii tratați intraperitoneal cu 24 ore înainte de infectare cu 20 μg/kg proteină NC30 sunt considerabil mai rezistenți la infecția microbiană, comparativ cu șoarecii din lotul de control.

Tratamentul preventiv, administrat intraperitoneal cu 4 ore înainte de infecție, este eficient în două din trei experiențe realizate și permite majorarea semnificativă a gradului de supraviețuire a animalelor tratate, comparativ cu animalele din lotul de control. În prima experiență este eficientă numai doza testată de 2 μg/kg.

În cea de-a doua experiență numai doza de 20 μg/kg protejează șoarecii de infecție prin *E. coli*.

Intr-o altă serie de experiențe, efectuate pe un lot de 20 șoareci, s-a constatat că doza de 32 μg/kg proteină NC30, originară din levură, purificată prin procedeul descris în capitolul 12 și administrată cu 24 ore înainte de infecția prin *E. coli*, permite supraviețuirea șoarecilor într-un grad mai semnificativ: 11 din 20, comparativ cu 2 din 20 în lotul de control. Diferența constatată este autentică cu o probabilitate ce depășește 99%, conform criteriului Student.

Așadar, proteina NC30 și *in vivo* exercită un efect imunomodulator.

Deci, proteina NC30 reprezintă o nouă limfocină cu activitate imunomodulatoare de tip citochină *in vitro* (proliferarea celulelor, activarea celulelor, chemotactismul și reglarea sintezei altor citochine) și *in vivo*. Ea acționează cel puțin asupra a două tipuri de celule cheie ale sistemului imun: monocite și limfocite B. Deci, aceasta este o interleuchină nouă. Unele din proprietățile ei sunt comune cu interleuchina-4: inhibarea sintezei

MD 1652 G2

interleuchinei-1 β și a interleuchinei-6 de către 34 monocitele umane din sangele periferic, activate cu LPS, și modularea expresiei antigenului CD23 și limfocitelor B amigdalene (W. Paul, 1991, Blood, 77, 1959, și Waal Malefyt et al., 1991, J. Exp. Med., 174, 1199-1220).

5

(57) Revendicări:

1. Proteină cu activitate de tip citochină care conține următoarea succesiune (a₁):

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15
10 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
20 25 30
Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
35 40 45
Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
15 50 55 60
Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
65 70 75 80
Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95
20 Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
100 105 110

în care Xaa reprezintă Asp sau Gly, sau o succesiune care posedă un grad înalt de omologie cu succesiunea (a₁).

25 2. Proteină, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** ea conține imediat deasupra succesiunii (a₁) succesiunea: Ser Pro.

3. Proteină, conform uneia din revendicările 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** are o masă moleculară de circa 9,0 $\pm$ 2 kDa.

30 4. Proteină, conform uneia din revendicările 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** are o masă moleculară de circa 16,0 $\pm$ 2 kDa.

5. Proteină, conform uneia din revendicările 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** ea este N-glicosilată.

6. Proteină, conform uneia din revendicările 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** ea are un grad de puritate, determinat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și dezvoltat cu argint, peste 70%.

35 7. Proteină, conform uneia din revendicările 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** ea are un grad de puritate, determinat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu și dezvoltat cu argint, peste 90%.

8. ADN recombinant codificator pentru proteina definită în una din revendicările 1 și 2, sau precursorul proteinei definite în una din revendicările 1 și 2.

9. ADN recombinant, conform revendicării 8, **caracterizat prin aceea că** el codifică precursorul proteinei definite în una din revendicările 1 și 2, care include succesiunea de semnal.

10. ADN recombinant, conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** succesiunea care codifică proteina matură include următoarea succesiune (Na1):

45 GGCCCTGTGC CTCCCTCTAC AGCCCTCAGG GAGCTCATTG
AGGAGCTGGT CAACATCACC CAGAACCAGA AGGCTCCGCT
CTGCAATGGC AGCATGGTAT GGAGCATCAA CCTGACAGCT
GACATGTACT GTGCAGCCCT GGAATCCCTG ATCAACGTGT
CAGGCTGCAG TGCCATCGAG AAGACCCAGA GGATGCTGAG
50 CGGATTCTGC CCGCACAAGG TCTCAGCTGG GCAGTTTTCC
AGCTTGCATG TCCGAGACAC CAAAATCGAG GTGGCCCACT
TTGTAAAGGA CCTGCTCTTA CATTTAAAGA AACTTTTTTCG
CGAGGGACGG TTCAAC.

11. ADN recombinant, conform revendicării 9, **caracterizat prin aceea că** succesiunea care codifică proteina matură include următoarea succesiune (Na 1'):

55 GGCCCTGTGC CTCCCTCTAC AGCCCTCAGG GAGCTCATTG
AGGAGCTGGT CAACATCACC CAGAACCAGA AGGCTCCGCT
CTGCAATGGC AGCATGGTAT GGAGCATCAA CCTGACAGCT
GGCATGTACT GTGCAGCCCT GGAATCCCTG ATCAACGTGT
60 CAGGCTGCAG TGCCATCGAG AAGACCCAGA GGATGCTGAG
CGGATTCTGC CCGCACAAGG TCTCAGCTGG GCAGTTTTCC

MD 1652 G2

AGCTTGCATG TCCGAGACAC CAAAATCGAG35GTGGCCAGT
TTGTAAAGGA CCTGCTCTTA CATTTAAAGA AACTTTTTCG
CGAGGGACGG TTCAAC.

- 5 12. ADN recombinant, conform uneia din revendicările 9-11, **caracterizat prin aceea că** succesiunea de semnal reprezintă o succesiune selectată din succesiunile (b1), (b2), (b3) și (b4):

(b1)

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
10 20 25 30

(b2)

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
15 20 25 30

Ser Pro

(b3)

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala
20

(b4)

Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala Ser Pro
25 20

13. ADN recombinant, conform revendicării 12, **caracterizat prin aceea că** succesiunea nucleotidică, care codifică peptida de semnal, se selectează din succesiunile (Nb1), (Nb2), (Nb3) și (Nb4):

(Nb1)

ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGCC
30 TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCC

(Nb2)

ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGCC
35 TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCCCTCC CA

(Nb3)

ATGGCGCTTT TGTGACCAC GGTCATTGCT CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT TGCC

(Nb4)

40 ATGGCGCTTT TGTGACCAC GGTCATTGCT CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT TGCCTCCCCA

14. Vector de expresie care conține ADN recombinant definit în una din revendicările 8-13.

15. Celule eucariote care conțin, cu grupările necesare pentru expresia lor, ADN recombinant definit în una din revendicările 8-13.

- 45 16. Celule eucariote, conform revendicării 15, **caracterizate prin aceea că** ele reprezintă celule animale.

17. Celule animale, conform revendicării 16, **caracterizate prin aceea că** ele conțin vectorul de expresie definit în revendicarea 14.

18. Celule animale, conform revendicării 17, **caracterizate prin aceea că** ele reprezintă celule ovariene de la hamster chinezesc.

- 50 19. Celule animale, conform revendicării 17, **caracterizate prin aceea că** ele reprezintă celule renale de la maimuță.

20. Celule eucariote, conform revendicării 15, **caracterizate prin aceea că** ele reprezintă celule de levrură.

21. Microorganism procariot care este transformat de către vectorul de expresie definit în revendicarea 14.

22. Microorganism procariot, **caracterizat prin aceea că** el aparține speciei *E. coli*.

- 55 23. Procedeu de obținere a proteinei definite în una din revendicările 1-7 care include etapa de cultivare a celulelor animale indicate în una din revendicările 16-19, urmată de etapele de izolare și de purificare a proteinei recombinante.

24. Procedeu de obținere a proteinei definite în una din revendicările 1-7 care include etapa de cultivare a celulelor de levrură indicate în revendicarea 20, urmată de etapele de izolare și de purificare a proteinei recombinante.

60

MD 1652 G2

25. Remediu cu acțiune imunomodulatoare care conține proteină definită în una din revendicările 1-7 și un excipient farmaceutic acceptabil.

5

10

15

(56) Referințe bibliografice:

1. Von Heijne G. Nucl. Ac. Res., 1986, vol. 14, p. 4683-4690
2. Matsushima K. et al. J. Exp. Med., 1988, vol. 167, p. 1883-1893
3. Thompson et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, vol. 86, p.1333-1337
4. Peppel K. et al. J. Exp. Med., 1991, vol. 173, p. 349-355
5. Ullman K.S. et al. Ann. Rev. Imm., 1989, vol. 8, p. 421-452
6. Chang H.C. et al. Eur. J. Imm., 1989, vol. 19, p. 1045-1051
7. Lindsten T. et al. Science, 1989, vol. 244, p. 339
8. Mattila et al. EMBO J., vol. 9, p. 4425-4433
9. Cochran B.M. et al. Cell., 1983, vol. 33, p. 939-947
10. Gluzman Y. Cell, 1981, vol. 23, p. 175-182
11. Weiser W. Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol. 86, p. 7522-7526

Șef Secție: EGOROVA Tamara

Examinator: TIMONIN Alexandr

Redactor: CANȚER Svetlana

MD 1652 G2

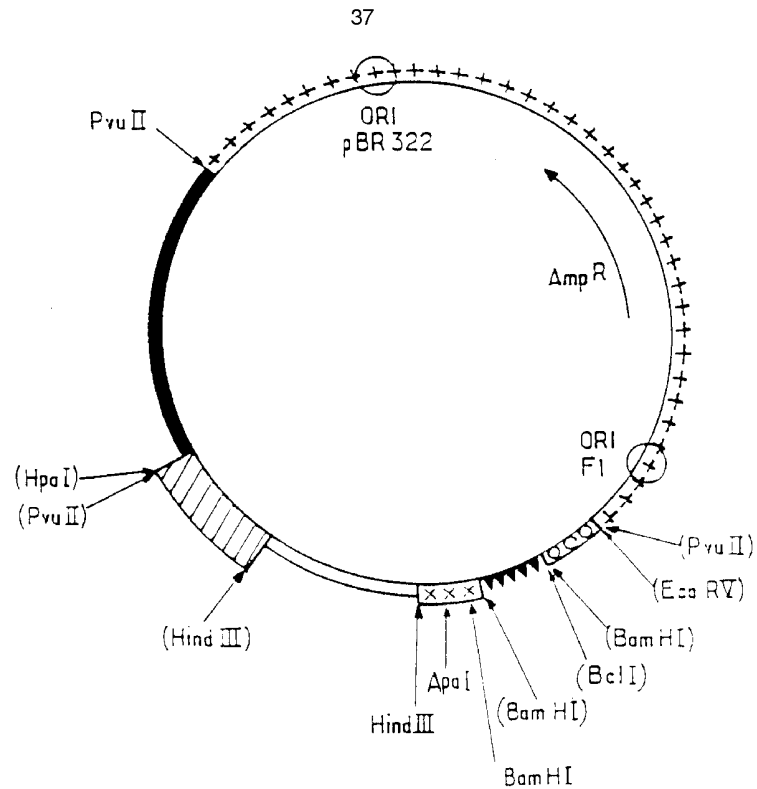


Fig. 1a

siteul de cuplare cu Hind III

▼AGCTGGCTCGCATCTCTCTTCACGCGCCCGCCGCTACCTGAGGCGGCCATCCACGCC
 1 ----- 60
 CCGAGCGTAGAGAGGAAGTGCGCGGGCGGGGATGGACTCCGGCGGTAGGTGCGG

 GGTGAGTCGCGTTCTGCGGCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAAGTGGCTCCGCGCTTA
 61 ----- 120
 CCACTCAGCGCAAGAGCGGCGGAGGGCGGACACACGGAGGACTTGACGCGAGGCGGAGAT

 GGTAGGCTCCAAGGAGCGGACAAAGGCCCGGTCTCGACCTGAGCTCTAACTTACCTA
 121 ----- 180
 CCATCCGAGGTTCCCTCGGCTGTTTCCGGGCCAGAGCTGGACTCGAGATTTGAATGAT

 GACTCAGCGGCTCTCCACGCTTTGCTGACCTGCTTGTCTCAACTCTACGCTTTTGTTF
 181 ----- 240
 CTGAGTCGGCGAGAGGTGCGAAACGGACTGGGACGAACGAGTTGAGATGCAGAAACAA

MD 1652 G2

38

```

CGTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAACCTTCAAGGTATGCGCTGGGACCTGGCAGGCGGCAT
241 -----300
GCAAAAGACAAGACGCGGCAATGTTGAAGTTCATACGCGACCTGGACCGTCCGCCGTA

CTGGGACCCCTAGGAAGGGCTTGGGGGTCCTCGTGCCCAAGGCAGGGAACATAGTGGTCC
301 -----360
GACCCCTGGGGATCCTTCCCGAACCCCGAGGAGCACGGGTTCGTCCCTTGTATCACCAGG

CAGGAAGGGGAGCAGAGGCATCAGGGTGTCCACTTTGTCTCCGCACTCCTGAGCCTGCA
361 -----420
GTCCTTCCCTCGTCTCCGTAGTCCACAGGTGAAACAGAGGCGTCGAGGACTCGGACGT

GA
-----
CTTCGA▲
HindIII

```

Fig. 1b

```

AGCTTGTGCTGACTAATACGACTCACTATAGGGCGGCCGCGGGCCCTGCAGGAATTC
                                     ▲
                                     Apal
ACAGCTGATTATGCTGAGTGATATCCCGCCGGCGCCCGGGGACGTCCTTAAG
    ▲
    Hind III
BamHI ▼ Siteul de cuplare cu Bam HI
GGATCCCCCGGTGACTGACT▼
CCTAGGGGGCCCACTGACTGACTAG

```

Fig. 1c

MD 1652 G2

39

```

0   AAGCCACCCAGCCTATGCATCCGCTCCTCAATCCTCTCCTGTTGGCACTGGGCCTCATG 59
-4   MetHisProLeuLeuAsnProLeuLeuLeuAlaLeuGlyLeuMet 15

60   GCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCCAGGC 119
16   AlaLeuLeuLeuThrThrValIleAlaLeuThrCysLeuGlyGlyPheAlaSerProGly 35
    ↑      ↑      ↑      ↑      ↑      ↑      ↑      ↑
120  CCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAG 179
36   ProValProProSerThrAlaLeuArgGluLeuIleGluGluLeuValAsnIleThrGln 55

180  AACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGAC 239
56   AsnGlnLysAlaProLeuCysAsnGlySerMetValTrpSerIleAsnLeuThrAlaAsp 75

240  ATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTGAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAG 299
76   MetTyrCysAlaAlaLeuGluSerLeuIleAsnValSerGlyCysSerAlaIleGluLys 95

300  ACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCCGACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTCCAGC 359
96   ThrGlnArgMetLeuSerGlyPheCysProHisLysValSerAlaGlyGlnPheSerSer 115

360  TTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCAGTTTGTAAAGACCTGCTCTTACAT 419
116  LeuHisValArgAspThrLysIleGluValAlaGlnPheValLysAspLeuLeuLeuHis 135

420  TTAAAGAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGAACTTCGAAAGCATCATTATTTGC 479
136  LeuLysLysLeuPheArgGluGlyArgPheAsn 155

480  AGAGACAGGACCTGACTATTGAAGTTGCAGATTTCATTTTCTTTCTGATGTCAAAATGT 539

540  CTTGGGTAGGCGGGAAGGAGGGTTAGGGAGGGGTAAAATTCCTTAGCTTAGACCTCAGCC 599

600  TGTGCTGCCCCGTCTTCAGCCTAGCCGACCTCAGCCTTCCCCTTGGCCAGGGCTCAGCCTG 659

660  GTGGGCCTCCTCTGTCCAGGGCCCTGAGCTCGGTGGAGCCAGGGATGACATGTCCCTACA 719

720  CCCCTCCCCTGCCCTAGAGCACACTGTAGCATTACAGTGGGTGCCCCCCTTGCCAGACAT 779

780  GTGGTGGGACAGGGACCCACTTCACACACAGGCAACTGAGGCAGACAGCAGCTCAGGCAC 839

840  ACTTCTTCTTGGTCTTATTTATTATTGTGTGTTATTTAAATGAGTGTGTTTGTACCCGTT 899

900  GGGGATTGGGGAAGACTGTGGCTGCTGGCACTTGGAGCCAAGGCTTCAGAGACTCAGGGC 959

960  CCCAGCACTAAAGCAGTGGACCCAGGAGTCCCTGTAATAAGTACTGTGTACAGAATTC 1019

1020 TGCTACCTCACTGGGGTCCTGGGGCCTCGGAGCCTCATCCGAGGCAGGGTCAGGAGAGGG 1079

1080 GCAGAACAGCCGCTCCTGTCTGCCAGCCAGCAGCCAGCTCTCAGCCAACGAGTAATTTAT 1139

1140 TGTTTTCTCGTATTATAATATTAATATGTTAGCAAAGAGTTAATATATAGAAGGTA 1199

1200 CCTTGAACACTGGGGGAGGGGACATTGAACAAGTTGTTTCATTGACTATCAAACTGAAGC 1259

1260 CAGAAATAAAGTTGGTGACAGATAAAAAAAAAAAAAAAAA... 1300

```

Fig. 2

MD 1652 G2

40

```

1 MetHisProLeuLeuAsnProLeuLeuLeuAlaLeuGlyLeuMetAlaLeuLeuLeuThr 20
  | | | | |
1 . . . . . MetAlaLeuTrpValThr 6
21 ThrValIleAlaLeuThrCysLeuGlyGlyPheAlaSerProGlyProValProProSer 40
  | | | | | | | | | | | | | | |
7 AlaValLeuAlaLeuAlaCysLeuGlyGlyLeuAlaAlaProGlyProValProArgSer 26
41 ThrAla . . . . . LeuArgGluLeuIleGluGluLeuValAsnIleThrGlnAsn 56
  | | | | | | | | | | | | | | |
27 ValSerLeuProLeuThrLeuLysGluLeuIleGluGluLeuSerAsnIleThrGlnAsp 46
57 GlnLysAlaProLeuCysAsnGlySerMetValTrpSerIleAsnLeuThrAlaAspMet 76
  | | | | | | | | | | | | | | |
47 Gln . ThrProLeuCysAsnGlySerMetValTrpSerValAspLeuAlaAlaGlyGlv 65
77 TyrCysAlaAlaLeuGluSerLeuIleAsnValSerGlyCysSerAlaIleGluLysThr 96
  | | | | | | | | | | | | | | |
66 PheCysValAlaLeuAspSerLeuThrAsnIleSerAsnCysAsnAlaIleTyrArgThr 85
97 GlnArgMetLeuSerGlyPheCysProHisLysValSerAlaGlyGlnPheSerSerLeu 116
  | | | | | | | | | | | | | | |
86 GlnArgIleLeuHisGlyLeuCysAsnArgLysAlaProThrThrValSerSer . 103
117 HisValArgAspThrLysIleGluValAlaGlnPheValLysAspLeuLeuLeuHisLeu 136
  | | | | | | | | | | | | | | |
104 . LeuProAspThrLysIleGluValAlaHisPheIleThrLysLeuLeuSerTyrThr 122
137 LysLysLeuPheArgGluGlyArgPheAsn 146
  | | | | | | | | | |
123 LysGlnLeuPheArgHisGlyProPhe . 131

```

Fig. 3

```

ATGCATCCGCTCCTCAATCC.....TCT 23
| | | | | | | | | | |
AGCCACACAGTTCTACAGCTCCCTGGTTCT 29
24 CCTGTGGCACTGGGCCTCATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTC 73
  | | | | | | | | | | | | | | |
30 CTCACCTGGCTCTGGGCTTCATGGCGCTCTGGGTGACTGCAGTCCTGGCTC 79
74 TCACTTGCCTTGGCGSCTTTGCCTCCCCAGGCC.....CTGTG 111
  | | | | | | | | | | | | | | |
80 TTGCTTGCCTTGGTGGTCTCGCCGCCCCAGGGCCGGTGCCAAGATCTGTG 129
112 CCTCCCTCTACAGCCCTCAGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCAC 161
  | | | | | | | | | | | | | | |
130 TCTCTCCCTCTGACCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTGAGCAACATCAC 179
162 CCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCA 211
  | | | | | | | | | | | | | | |
180 ACAAGACCAGA...CTCCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGG 226

```

MD 1652 G2

41

```

212  ACCTGACAGCTGACATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTG  261
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
227  ACCTGGCCGCTGGCGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGACCAACATC  276
      ||  |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
262  TCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTG  311
      ||  |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
277  TCCAATTGCAATGCCATCTACAGGACCCAGAGGATATTGCATGGCCTCTG  326
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
312  CCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTCCAGCTTGCATGTCCGAGACA  361
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
327  TAACCGCAAGGCCCCAC.....TACGCTCTCCAGCCTCCCCGATA  367
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
362  CCAAAATCGAGGTGGCCCAAGTTTGTAAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAG  411
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
368  CCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAACTGCTCAGCTACACAAAG  417
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||  |||||
412  AAACCTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGA  441
      |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||
418  CAACTGTTTCGCCACGGCCCTTCTAATGA.....  447

```

Fig. 4

```

H
i
n
d
I
I
I
AGCTTGGATAAAAGATCCCGAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACGGCCCTCAGGGAGCTCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTATTTTCTAGGGGTCCGGGACACGGAGGGAGATGCCGGGAGTCCCTCGAGTA

TGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTCCTCGACCAGTTGTAGTGGGTCTTGGTCTTCCGAGGCGAGACGTTACCGTCTGACCA

ATGGAGCATCAACCTGACAGCTGACATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTCGTaGTTGGACTGTGACTGTACATGACACGTCCGGACCTTAGGGACTAGTTGCA

GTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGAGCGGATTCTGCCCGCACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAGTCCGACGTACCGGTAGCTCTTCTGGGTCTCCTACGACTCGCCTAAGACGGGCGTGT

GGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCAGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAGGTGGCCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAGAGTCGACCCGTCAAAAGGTGGAACGTACAGGCTCTGTGGTTTTAGCTCCACCGGGT

GTTTGTAAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAAACATTTCCCTGGACGAGAATGTAAATTTCTTTGAAAAAGCGCTCCCTGCCAAGTTGAC

B
a
m
H
I
AAACTTCGAAAGCATCATTATTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTGAAGCTTTCGTAGTAATAAACCCTAG

```

Fig. 5

MD 1652 G2

42

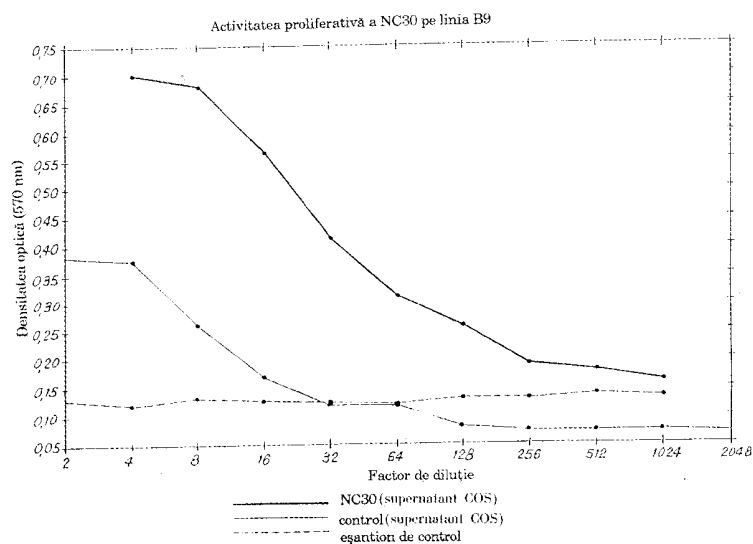


Fig. 6

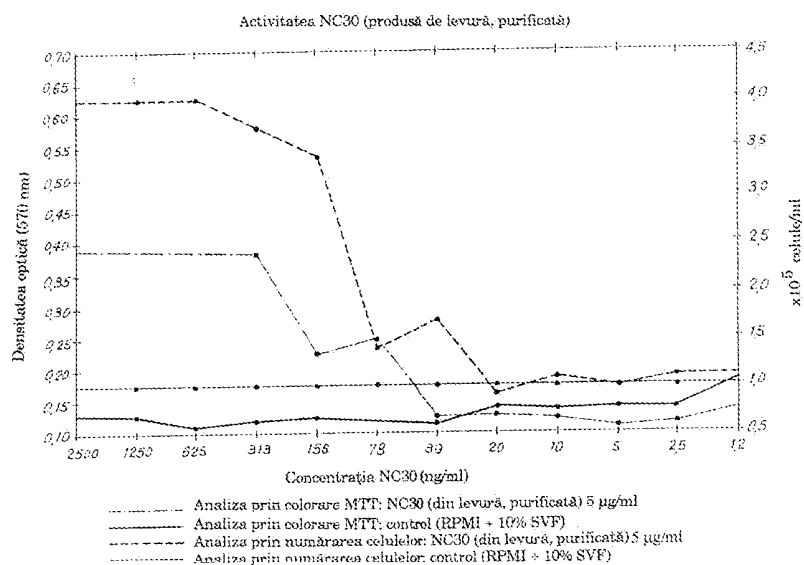


Fig. 7

(70) Către Glazunov Nicolai

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 97-0099	(85) Data fazei naționale PCT: 11.02.1997
(22) Data depozit: 27.03.1992	(86) Data cererii PCT: PCT/FR92/00280; 27.03.1992
(30) Priorități recunoscute : (31) nr. : 91/03904; (32) data: 29.03.1991; (33) țara: FR 92/00137 08.01.1992 FR (10)	
(54) titlul: Proteină cu activitate de tip citochină, ADN recombinant, codificator pentru această proteină, celule și microorganisme transformate Termeni caracteristici : Proteină cu activitate de tip citochină	
II. D O C U M E N T A R E IN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : C 12 N 15/19//C12N 1/21; C 12 P 21/02; C 07 K 13/00; A 61 K 37/02; C 12 N 1/21, 5/10, 1/19//C12N1/21	
M D Perioada :1993-1999 BEA Perioada : 1996-1999	Brevete : n-au fost găsite Cereri publicate : n-au fost găsite Cereri nepublicate: n-au fost găsite Cereri: n-au fost găsite Brevete: n-au fost găsite
Data 27.12.1999	Examinator Gușan Ala