

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 931488 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **931488**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12N 15/28
A61K 38/19
C12P 21/02
C07K 14/525**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.04.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **01.04.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.10.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

02.04.1992 EP 92810249

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • F. Hoffmann - La Roche AG, 124 Grenzacherstrasse, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Lesslauer, Werner, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • Lötscher, Hansruedi, Switzerland, SVEITSI, (CH)

3 • Stüber, Dietrich, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

TNF-muteiinit

TNF-muteiner

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

6240 DSM

6241 DSM

6713 DSM

TNF-muteiinit

Kasvaimen nekroosifaktori, tai spesifisemmin kasvaimen nekroosifaktori-alfa (TNF- α), on sytokiini, jota
5 tuottavat pääasiassa stimuloidut makrofagit, joka tekijä ei ainoastaan sisällä tavatonta sytotoksisuutta eri kasvainsoluja vastaan [Carswell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666 - 3670, (1975)] vaan sillä on myös useita rooleja tulehduksen ja immuunivasteen välittäjänä
10 [yleiskatsausta varten katso Beutler ja Cerami, Ann. Rev. Immunol. 7, 625 - 655 (1989); Bonavista ja Granger (toim.), "Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy," Karger, Basel (1990)]. Ihmisen kasvaimen nekroosifaktori-alfan (hTNF- α)
15 primaarirakenne on päätelty cDNA:n nukleotidisekvenssistä, joka on kloonattu ja ekspressoitu E. coli -bakteerissa [Pennica et al., Nature 312, 724 - 729 (1984); Marmenout et al., Eur. J. Biochem. 152, 515 - 522 (1985); Wang et al., Science 228, 149 - 154 (1985); Shirai et al., Nature
20 313, 803 - 806 (1985)]. Silmäänpistävä homologia (30 %) löydettiin hTNF- α -proteiinin ja ihmisen lymfotoksiinin, jota usein kutsutaan ihmisen kasvaimen nekroosifaktori-beetaksi (hTNF- β), joka on sytokiini, jota tuottavat pääasiassa lymfosyytit, aminohapposekvenssien välillä [Gray et al., Nature 312, 721 - 724 (1984); Fiers et al., Cold
25 Spring Harbour Symp. 51, 587 - 595 (1986)].

Modifioituja aminohapposekvenssejä sisältävät hTNF- α -proteiinit, joita kutsutaan TNF- α -muteiineiksi, on myös kuvattu alalla [katso esimerkiksi Yamagishi et al., Protein Engineering 3, 713 - 719 (1990) tai Fiers teoksessa
30 "Tumor Necrosis Factors: Structure, Function and Mechanism of Action," Aggarwal ja Vilcek (toim.), Marcel Dekker, Inc., New York, painossa, tai Fiers et al. teoksessa Bonavista ja Granger, sivut 77 - 81 (katso yllä)]. TNF- α -
35 muteiinit ovat lisäksi olleet myös aiheina useissa poti-

lassovellutuksissa, esim. kansainväliset patenttihakemus-
 julkaisut WO 86/02 381, WO 86/04 606, WO 88/06 625 ja EP-
 patenttihakemusjulkaisut 155 549, 158 286, 168 214,
 251 037 ja 340 333, ja Deutsche Offenlegungsschrift numero
 5 3 843 534.

Lymfotoksiinin muteiinit on myös kuvattu alalla,
 esim. EP-patenttihakemusjulkaisut 250 000, 314 094 ja
 336 383.

TNF-proteiinin biologiset vaikutukset välittyvät
 10 spesifisten reseptorien kautta, nimittäin reseptorin, jon-
 ka ilmeinen molekyylipaino on 55 kD (p55-TNF-R) natriumdo-
 dekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesissa
 (SDS-PAGE), ja reseptorin, jonka ilmeinen molekyylipaino
 on 75 kD (p75-TNF-R) SDS-PAGE:ssa. Molemmat TNF-resepto-
 15 rimuodot on kloonattu, nimittäin p55-TNF-R-reseptorin
 Loetscher et al. [Cell 61, 351 - 359 (1990)] ja p75-TNF-R-
 reseptorin esimerkiksi Dembic et al. [Cytokine 2, 53 - 58
 (1990)] (molempien reseptorien osalta katso myös EP-pa-
 tenttihakemus 90 116 707,2) ja äskettäin havaittiin, että
 20 molemmat reseptorit eivät sido ainoastaan TNF- α -proteiinia
 vaan myös TNF- β -proteiinia suurella affiniteetilla
 [Schönfeld et al., J. Biol. Chem. 266, 3863 - 3869
 (1991)].

Alalla tiedetään hyvin, että biologisista aktiivi-
 25 suuksistaan johtuen TNF- α voi olla arvokas yhdiste eri
 häiriötilojen hoitamiseksi. Esimerkiksi TNF- α yksinään tai
 yhdessä interferonin kanssa voi olla tehokas kasvaimen
 vastainen aine [Brouckaert et al., Int. J. Cancer 38,
 763 - 769 (1986)]. Sen koko elimistöön vaikuttava tok-
 30 sisuus on kuitenkin pääasiallinen rajoittava tekijä sen
 laajemmalle terapeuttiselle käytölle [Taguchi, T. ja
 Sohmura, Y., Biotherapy 3, 177 - 186 (1991)].

On osoitettu, että hiirissä ihmisen TNF- α (hTNF- α),
 joka sitoutuu ainoastaan hiiren pienempään TNF-reseptoriin
 35 (jyrsijän p55-TNF-R), on paljon vähemmän toksinen kuin

jyrsijän TNF- α (mTNF- α), joka sitoutuu molempiin p55-TNF-R- ja p75-TNF-R-reseptoreihin. Esimerkiksi C57Bl6-hiirissä LD50-arvo on noin 10 μ g/hiiri ja 500 μ g/hiiri mTNF- α -proteiinilla ja hTNF- α -proteiinilla, vastaavassa järjestyksessä [Brouckaert et al., Agents and Actions 26, 196 - 198 (1989); Everaerd, B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 378 - 385 (1989); Lewis, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 (1991)]. Sen vuoksi p75-TNF-R-reseptorilla tuntuu olevan spesifinen rooli koko elimistöön vaikuttavassa toksisuudessa.

hTNF- α ja mTNF- α sitoutuvat melkein samalla tavalla ihmisen p55-TNF-R- ja ihmisen p75-TNF-R-reseptoreihin. Kuitenkin hTNF- α -mutantit, joiden hp55-TNF-R-reseptorin välittämä biologinen aktiivisuus on säilynyt, mutta joiden aktiivisuus hp75-TNF-R-reseptoria kohtaan on hävinnyt melkein kokonaan, ovat hTNF- α -proteiinin toiminnallisia ekvivalentteja jyrsijän systeemissä ja niiden oletetaan sisältävän alentuneen koko elimistöön vaikuttavan toksisuuden kädellisissä.

Ihmisen kasvaimen nekroosifaktorimuteiinit, joiden sitoutumisaktiivisuudessa ihmisen kasvaimen nekroosifaktori reseptoriin p75 (hp75-TNF-R) ja ihmisen kasvaimen nekroosifaktori reseptoriin p55 (hp55-TNF-R) on huomattava ero, on kuvattu EP-patenttihakemusjulkaisussa 486 908.

On havaittu, että hTNF-muteiinit tai niiden farmaseuttiset suolat, joilla on ihmisen kasvaimen nekroosifaktorin aminohapposekvenssi, joka on muutettu ainakin kohdassa 86 (jossa on treoniini seriinitähteen tilalla), säilyttävät sitoutumisaktiivisuutensa hp55-TNF-R-reseptoria kohtaan, mutta niistä häviää lähes kaikki sitoutuminen hp75-TNF-R-reseptoriin. Lisäksi on havaittu sellaisia hTNF-muteiineja, joiden hp55-TNF-R-reseptorin välittämä biologinen aktiivisuus on säilynyt, mutta jotka eivät enää sitoudu hp75-TNF-R-reseptoriin. Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit eivät kuitenkaan rajoitu tämän

tyyppiseen muteiiniin. Muun tyyppiset muteiinit, jotka yhä sitoutuvat yksinomaan hp55-TNF-R-reseptoriin, mutta joiden kyky saada aikaan toiminnallinen soluvaste on hävinnyt, kuuluvat myös keksinnön piiriin.

5 Esillä oleva keksintö esittää sen vuoksi sellaiset ihmisen kasvaimen nekroosifaktorimuteiinit tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, jotka sisältävät selektiivisen sitoutumisaffiniteetin ihmisen kasvaimen nekroosifaktoriin p55 (hp55-TNF-R), joille muteiineille on ominaista, että ihmisen kasvaimen nekroosifaktorin aminohapposekvenssi on muuttunut ainakin kohdassa 10 86, jossa on treoniini seriinitähteen tilalla.

Ihmisen TNF- α -proteiinin aminohapposekvenssi, jonka ovat kuvanneet Pennica et al. (katso yllä), on seuraava:

15 1 10
VAL ARG SER SER SER ARG THR PRO SER ASP LYS PRO VAL ALA HIS

20 20 30
VAL VAL ALA ASN PRO GLN ALA GLU GLY GLN LEU GLN TRP LEU ASN

40
20 ARG ARG ALA ASN ALA LEU LEU ALA ASN GLY VAL GLU LEU ARG ASP

50 60
ASN GLN LEU VAL VAL PRO SER GLU GLY LEU TYR LEU ILE TYR SER

70
25 GLN VAL LEU PHE LYS GLY GLN GLY CYS PRO SER THR HIS VAL LEU

80 90
LEU THR HIS THR ILE SER ARG ILE ALA VAL SER TYR GLN THR LYS

100
VAL ASN LEU LEU SER ALA ILE LYS SER PRO CYS GLN ARG GLU THR

110 120
30 PRO GLU GLY ALA GLU ALA LYS PRO TRP TYR GLU PRO ILE TYR LEU

130
GLY GLY VAL PHE GLN LEU GLU LYS GLY ASP ARG LEU SER ALA GLU

140 150
ILE ASN ARG PRO ASP TYR LEU ASP PHE ALA GLU SER GLY GLN VAL

35 157
TYR PHE GLY ILE ILE ALA LEU

5 tai sellainen, jonka ovat kuvanneet Marmenout et al. (katso yllä) tai Wang et al. (katso yllä) tai Shirai et al. tai vielä erikoisemmin sellainen, jota koodittaa plasmidissa pDS56/RBSII, SphI-TNF α (katso kuviot 1a ja 1b ja
esimerkki I) olevan insertin nukleotidisekvenssi, joka koodittaa kypsää TNF- α -proteiinia.

Yllä määritellyissä hTNF-muteiineissa voi hTNF-proteiinin aminohapposekvenssi olla muuttunut yhdessä tai useammassa lisäkohdassa, suositeltavasti yhdessä tai kahdessa lisäkohdassa, jolloin kohdat 29, 31, 32, 29 ja 32, tai kohdat 31 ja 32 ovat erikoisen suositeltavia. Mitä tahansa aminohappoa, suositeltavasti mitä tahansa luonnollisesti esiintyvää aminohappoa, voidaan käyttää näissä lisäkohdissa. Kohdassa 29 tapahtuvia substituutioita varten
10 seriini, glysiini tai tyrosiini ovat suositeltavia, kun taas seriini on erikoisen suositeltava. Kohdassa 31 tapahtuvia substituutioita varten glutamiinihappo tai asparagiini ovat suositeltavia. Kohdassa 32 tapahtuvia substituutioita varten tyrosiini, tryptofaani tai treoniini
15 ovat suositeltavia, jolloin tryptofaani ja treoniini ovat erikoisen suositeltavia.

Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voivat sisältää lisäaminohapposubstituutioita, jos sellaiset substituutiot eivät muuta niiden selektiivistä sitoutumisaffiniteettia p55-TNF-R-reseptoria kohtaan. Aminohapposubstituutiot proteiineissa ja polypeptideissä, jotka substituutiot eivät oleellisesti muuta biologista aktiivisuutta, tunnetaan alalla ja ne ovat kuvanneet esim. H. Neurath ja R. L. Hill teoksessa "The Proteins", Academic
25 Press, New York (1979), erikoisesti sivulla 14 olevassa kuviossa 6. Useimmin havaitut aminohapposubstituutiot ovat Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly ja päinvastoin. Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voi-
35

vat lisäksi sisältää useiden aminohappojen sekvenssejä, joita koodittavat "liittäjäsekvenssit". Nämä sekvenssit voivat muodostua johtuen ekspressiovektoreista, joita käytetään hTNF-muteiinien ekspressoimiseksi, kuten yllä on määritetty.

Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voivat myös sisältää spesifisiä sekvenssejä, jotka paremmin sitoutuvat affiniteettikantajamateriaaliin. Esimerkkejä sellaisista sekvensseistä ovat sekvenssit, jotka sisältävät ainakin kaksi vierekkäin olevaa histidiinitähdettä (katso tässä suhteessa EP-patenttihakemusjulkaisu 282 042). Sellaiset sekvenssit sitoutuvat selektiivisesti nitrilotrietikkahappo-nikkelikelaatti-resiineihin (Hochuli ja Döbeli, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 748 (1987); EP-patenttihakemusjulkaisu 253 303). hTNF-muteiineissa, jotka sisältävät sellaisen spesifisen sekvenssin, se voidaan liittää hTNF-muteiinin aminohapposekvenssin C-päähän tai N-päähän tai molempiin päihin.

Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voidaan myös yhdistää immunoglobuliinien eri raskasketju- tai kevytketjupolypeptidien kanssa. Tämä johtaa kimeeriin hTNF-muteiini-immunoglobuliinipolypeptideihin, joilla voi olla kohonnut puoliaika in vivo. Kohonnut puoliaika in vivo on osoitettu esim. kimeerisillä polypeptideillä, jotka koostuvat nisäkkään immunoglobuliinin raskasketjun tai kevytketjun vakioalueiden kahdesta ensimmäisestä domeenista [katso Traunecker et al., Nature 331, 84 - 86 (1988) ja EP-patenttihakemusjulkaisu 394 827].

hTNF-muteiinit voidaan myös kopiata polymeereihin, esim. polyetyleeniglykoliin tai polypropyleeniglykoliin, joiden molekyylipaino on 500 - 20 000 daltonia. Tämä johtaa suojattuihin hTNF-muteiini-koostumuksiin, jotka voivat olla oleellisesti ei-immunogeenisiä. Useita tapoja kopiata polymeeri polypeptidin kanssa on saatavissa ja kuvattu, esim. US-patentti 4 179 337.

Erikoisen suositeltavia esillä olevan keksinnön mukaisia hTNF-muteiineja ovat Thr⁸⁶-TNF- α , Ser²⁹-Thr⁸⁶-TNF- α , Glu³¹-Thr⁸⁶-TNF- α , Trp³²-Thr⁸⁶-TNF- α , Ser²⁹-Trp⁸⁶-TNF- α tai Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶-TNF- α .

5 Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voidaan tuottaa menetelmillä, jotka alalla tunnetaan ja jotka ovat kuvanneet esim. Sambrook et al. [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 10 USA (1989)] tai jotka on kuvattu seuraavissa kappaleissa. Se, onko sellaisilla hTNF-muteiineilla edelleen selektiivistä sitoutumisaffiniteettia p55-TNF-R-reseptoria kohtaan, voidaan määrittää, kuten seuraavissa esimerkeissä on kuvattu. Vaihtoehtoisesti esillä olevan keksinnön mukaiset 15 hTNF-muteiinit voidaan syntetisoida myös kemiallisesti käyttäen standardeja alalla tunnettuja menetelmiä, suositeltavasti kiinteän faasin menetelmiä, kuten menetelmiä, jotka on kuvannut Merrifield [J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 - 2154 (1963)]. Lisäksi sellaisten muteiinien suolat ovat 20 myös esillä olevan keksinnön aiheena. Sellaiset suolat voidaan tuottaa alalla tunnetuilla menetelmillä.

Uskotaan, että strategioita, joissa erotellaan edulliset ja ei-toivotut TNF- α -aktiivisuudet toisistaan käyttämällä yhdisteitä, jotka sitoutuvat spesifisesti yhteen tai toiseen TNF-reseptoriin, kuten esillä olevan keksinnön mukaisia hTNF-muteiineja, voidaan käyttää yleisesti 25 muissa tautitiloissa, joissa TNF-proteiinilla on rooli.

DNA-sekvenssit, jotka sisältävät DNA-sekvenssin, joka koodittaa tässä aiemmin kuvattuja hTNF-muteiineja, 30 ovat myös esillä olevan keksinnön aiheena. Sellaiset DNA-sekvenssit voidaan rakentaa aloittaen genomisista tai cDNA-sekvensseistä, jotka koodittavat hTNF-proteiinia, kuten alalla on kuvattu (katso yllä), käyttäen tunnettuja in vitro -mutageneesimenetelmiä (katso esim. Sambrook et al., 1989). Sellainen mutageneesi voidaan suorittaa sat- 35

tumanvaraisesti niin, että saadaan suuri määrä mutantteja, jotka sitten voidaan testata niiden haluttujen ominaisuuksien suhteen sopivissa testisysteemeissä tai niin, että mutatoidaan annetun DNA-sekvenssin määritellyt kohdat niin

5 kutsutulla kohdennetulla mutageneesillä (katso esim. Sambrook et al., 1989, 15.51 - 15.113) tai mutageneesillä, jossa käytetään polymeraasiketjureaktiota [katso esim. White et al., Trends in Genetics 5, 185 - 189 (1989)].

Yksi kemiallinen mutageeni, jota usein käytetään

10 sattumanvaraisessa mutageneesissä, on natriumbisulfiitti, joka muuttaa sytosiinijäännöksen urasiilijäännöksi ja näin ollen johtaa "C"-tähteen muuttumiseen "T"-tähteeksi (nukleotidien standardilyhenteet)[menetelmää varten katso

15 esim. Shortle ja Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2170 - 2174 (1978) tai Pine ja Huang, Meth. Enzym. 154, 415 - 430 (1987)]. Tämä mutageeni toimii ainoastaan yksijuosteisella DNA:lla, kun taas mutatoitun DNA-kohdesekvenssin ekspressio saadaan aikaan kaksijuosteisessa plasmidivektorissa. Yksi mahdollisuus uusintakloonauksen vält-

20 tämiseksi mutageneesissa ja ekspressiovektorien tapauksessa on käyttää niin kutsuttuja "phasmideja". Nämä ovat vektoreita, jotka sisältävät plasmidin replikaatio-origion lisäksi replikaatio-origion, joka on peräisin filamentti-faagista. Esimerkit sellaisista phasmideista ovat pMa- ja

25 pMc-phasmidit, kuten ovat kuvanneet Stanssen et al. [Nucleic Acids Res. 17, 4441 - 4454 (1989)]. Tätä ekspressiosysteemiä käyttäen voidaan rakentaa niin kutsutut "gap-duplex"-rakenteet [katso myös Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12, 9441 - 9456 (1984)], joissa ainoastaan TNF-pro-

30 teiinia koodittava sekvenssi (katso yllä) on yksijuosteisessa muodossa ja näin ollen altis spesifiselle kemialliselle mutageenille. "Gap-duplex"-rakenteet sattumanvaraisessa mutageneesissä käytettäväksi voidaan rakentaa, kuten

35 ovat kuvanneet kohdennettua mutageneesiä varten Stanssen et al. (katso yllä) sillä poikkeuksella, että (-)-juoste

sisältää saman aktiivisen antibioottiresistenssigeenin kuin (+)-juoste. Käyttämällä hyväksi hTNF- α -proteiinia koodittavassa DNA-sekvenssissä olevia eri restriktiokoh-
 tia, vaihtelut yksijuosteisen aukon laajuudessa ovat mah-
 5 dollisia. Esimerkit sellaisista restriktiokohdista ovat ClaI-SalI-kohdat (470 nukleotidia), BstXI-BstXI-kohdat (237 nukleotidia) tai StyI-StyI-kohdat (68 nukleotidia). Sitten sellaisia gap-duplex-rakenteita voidaan käsitellä kohoavilla konsentraatioilla (aina 4 M asti) bisulfiittia,
 10 jonka jälkeen suoritetaan useita dialyysivaiheita, kuten ovat kuvanneet Shortle ja Nathans (katso yllä). Sitten sopiva prokaryoottinen isäntäsolu voidaan transformoida sellaisilla phasmidirakenteilla menetelmillä, jotka ovat alalla tunnettuja ja jotka ovat kuvanneet esim. Sambrook
 15 et al. (katso yllä). Sopiva prokaryoottinen isäntäsolu tarkoittaa tässä yhteydessä isäntäsolua, jolta puuttuu spesifinen korjausmekanismitoiminta niin, että urasiili-
 tähde säilyy DNA:ssa replikaation aikana ja joka isäntäso-
 lu kykenee ekspressoimaan vastaavaa mutatoitua TNF-pro-
 20 teiinia. Sellaisia sopivia isäntäsoluja tunnetaan alalla, esimerkiksi E. coli -kannat, esim. E. coli BW 313 [Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488 - 492 (1985)]. Tuloksena syntyneet kloonit voidaan sitten seuloa niiden suhteen, jotka ekspressoivat haluttua hTNF-muteiinia, so-
 25 pivilla testisysteemeillä. Kukin pesäke voidaan esimerkik-
 si ympätä mikrotiitterilevylle sopivaan alustaan, joka sisältää asiaankuuluvaa antibioottia. Solut voidaan lyy-
 sata lisäämällä lysotsyymiä, jonka jälkeen suoritetaan peräkkäiset jäädytys-sulatus-syklit. Kun nukleiinihapot on
 30 saostettu ja sentrifugoitu, kunkin pesäkkeen supernatant-
 tia voidaan suoraan käyttää sopivissa testeissä, kuten on kuvattu esimerkiksi esimerkeissä IIa ja IIb tai esimerkis-
 sä VIII, jossa mitataan sitoutumista elävien solujen pin-
 nalla tai puhdistetussa muodossa oleviin p75-TNF-R- ja
 35 p55-TNF-R-reseptoreihin.

Jos halutaan, spesifiset mutaatiokohdat voidaan määrittää esimerkiksi restriktiofragmenttianalyysillä [katso esim. Sambrook et al. (katso yllä)]. Sellaisten fragmenttien DNA-sekvenssin määrittämisellä voidaan muta-

5 tion tarkka kohta määrittää ja jos sellainen mutaatio joh-

taa aminohapon korvautumiseen, uusi aminohappo voidaan saada selville määritetystä DNA-sekvenssistä. DNA:n sek-

vensointi voidaan suorittaa alalla tunnetuilla menetelmil-

lä, esim. käyttäen T7-polymeraasia supercoil-muodossa ole-

10 van DNA:n kanssa kaupallisesti saatavissa olevan sekvens-

sointikäyttöpakkauksen muodossa (Pharmacia, Uppsala, Ruot-

si).

Kuten yllä on jo mainittu, toinen mahdollisuus an-

netun DNA-sekvenssin mutatoimiseksi on "kohdennettu muta-

15 geneesi". Sellaisten mutageneesin laajasti käytetty stra-

tegia, jonka kuvasivat ensimmäisinä Hutchinson ja Edgell [J. Virol. 8, 181 (1971)], sisältää synteettisen oligonuk-

leotidin, jossa on haluttu nukleotidisubstituutio, hybri-

disoimisen yksijuosteisen DNA-sekvenssin kohdealueelle,

20 johon mutaatio tulisi tehdä [yleiskatsausta varten katso

Smith, Annual Rev. Genet. 19, 423 (1985) ja parannettuja menetelmiä varten katso viitteet 2 - 6 artikkelissa

Stanssen et al. (1989)].

Yksi sellainen suositeltava menetelmä on menetelmä,

25 jonka ovat kuvanneet Stanssen et al. (1989), jossa käyte-

tään "gap-duplex-muodossa" olevaa DNA:ta, kuten alunperin

kuvasivat Kramer et al. (1984) [katso yllä ja Kramer ja

Fritz, Methods in Enzymology (1987), Academic Press, Inc.,

USA], mutta käyttäen antibioottiresistenssigeenejä M13-

30 faagin toiminnallisten geenien sijasta selektoimaan muta-

tion sisältävä juoste käyttäen lisäksi phasmidi-menetel-

miä, kuten myös ovat kuvanneet Stanssen et al. (1989)

(katso yllä). Tämän menetelmän etu on myös se, että sen

avulla voidaan suorittaa peräkkäisiä mutageneesisyklejä

35 ilman, että tarvitsee siirtää geeni uuteen mutageneesivek-

toriin; toinen mutageneesikierros eroaa ainoastaan siinä, että selektio suoritetaan toisen antibiottimerkkigeenin suhteen (Stranssen et al., katso yllä). Kontrollina voidaan käyttää mutantin kohdennettua mutageneesia takaisin villityypin TNF-proteiiniksi. Lisäksi oligonukleotidin käyttö, restriktiokohdan luominen tai tuhoaminen TNF-geenissä sallivat mutantin kontrolloimisen ei ainoastaan hybridisoimalla kohdennetussa mutageneesissä käytettyn oligonukleotidin kanssa vaan myös restriktiokohdan läsnäolon tai poissaolon avulla. Sellaisen hTNF-muteiini-ryhmän luomiseksi, jossa niiden aminohapposekvenssin määritellyssä kohdassa villityypin aminohappo on korvattu millä tahansa luonnollisesti esiintyvällä aminohapolla, käytetään ryhmää oligonukleotideja, joissa määritellyssä kohdassa on kaikki mahdolliset kodonit.

Kuten yllä on jo mainittu, toinen mahdollisuus mutatoita annettu DNA-sekvenssi on mutageneesi käyttäen polymeraasiketjureaktiota (PCR). Tämän menetelmän periaatteet ovat hahmotelleet esim. White et al. (1989), kun taas parannetut menetelmät ovat kuvanneet esim. Innis et al. [PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. (1990)].

PCR-on in vitro -menetelmä, jolla tuotetaan suuria määriä määritellyn pituuden ja sekvenssin sisältävää spesifistä DNA-fragmenttia pienestä DNA-templaattimäärästä. PCR perustuu siten sellaisen DNA-fragmentin entsymaattiseen amplifikaatioon, jota reunustaa kaksi oligonukleotidialuketta, jotka hybridisoituvat kohdesekvenssin vastakkaisiin juosteisiin. Alukkeet sijoittuvat niin, että niiden 3'-päät osoittavat toisiaan kohti. Toistetut sykliit, jotka sisältävät vaiheet, joissa templaatti denaturoidaan lämmöllä, alukkeet hybridisoidaan niiden komplementaarisiin sekvensseihin ja hybridisoidut alukkeet pidennetään DNA-polymeraasilla, johtavat PCR-alukkeiden 5'-päiden välissä olevan alueen amplifioitumiseen. Koska kum-

mankin alukkeen pidennystuote voi toimia templaattina toiselle alukkeelle, kukin sykli oleellisesti kaksinkertaistaa aiemmassa syklissä tuotetun DNA-fragmentin määrän. Koska alukkeet sisältyvät fyysisesti amplifioituun tuotteeseen ja koska emäserot alukkeen 5'-pään ja templaatin välillä eivät merkittävästi vaikuta amplifikaatiotehokkuuteen, on mahdollista muuttaa amplifioitu sekvenssi näin muodostaen haluttu mutaatio amplifioituun DNA:han. Käyttäen lämpöstabiilia Taq DNA -polymeraasia, joka on eristetty termofiilisestä *Thermus aquaticus* -bakteerista, on ollut mahdollista välttää polymeraasin denaturoituminen, joka denaturoituminen teki tarpeelliseksi entsyymin lisäyksen kunkin denaturaatiovaiheen jälkeen. Tämä kehitys johti PCR-reaktion automatisoimiseen useita erilaisia yksinkertaisia lämpötilaa muuttavia kohteita käyttäen. Lisäksi, amplifikaatioreaktion spesifisyys kohoaa, kun voidaan käyttää korkeampia lämpötiloja alukkeen hybridisoimiseksi ja pidentämiseksi. Kohonnut spesifisyys parantaa amplifioitujen tuotteiden kokonaissaantoa minimoimalla ei-kohdefragmenttien kilpailua entsyymistä ja alukkeista.

Oligonukleotidien suunnittelu ja synteesi voidaan suorittaa, kuten alalla tunnetaan ja kuten ovat kuvanneet esim. Sambrook et al. (1989) tai kuten on kuvattu yhdessä yllä lainatuista viitteistä, joka koskee kohdennettua mutageneesiä.

Heti, kun esillä olevan keksinnön mukaista hTNF-muteiinia koodittava DNA-sekvenssi on luotu, ekspressio voidaan suorittaa phasmidimenetelmällä, kuten yllä on kuvattu, tai käyttäen mitä tahansa sopivaa prokaryoottista tai eukaryoottista ekspressiosysteemiä, jotka alalla hyvin tunnetaan (katso esim. Sambrook et al., katso yllä).

Ekspressio suoritetaan suositeltavasti prokaryoottisissa soluissa, esim. *E. coli*-, *Bacillus subtilis*- jne. soluissa siten, että *E. coli*, erikoisesti *E. coli* K12 -kannat, esim. M15 [kuvanneet nimellä DZ 291 Villarejo et

al., J. Bacteriol. 120, 466 - 474 (1974)], HB 101 (ATCC-numero 33694), WK6 (Stranssens et al., katso yllä) tai E. coli -kanta SG13009 [Gottesmann et al., J. Bacteriol. 148, 265 - 273 (1981)] ovat suositeltavia. Esillä olevan keksinnön mukaisten hTNF-muteiinien ekspressio voidaan myös suorittaa alemmissa tai korkeammissa eukaryoottisissa soluissa, kuten esimerkiksi hiivasoluissa (kuten *Saccharomyces*, *Pichia* jne.), filamenttihomeissa (kuten *Aspergillus* jne.) tai solulinjoissa (kuten marsun munasarjasolulinjoissa jne.) siten, että ekspressio hiivasoluissa on suositeltavaa [katso Sreekrishna et al., Biochem. 28, 4117 - 4125 (1989); Hitzeman et al., Nature 293, 717 - 722 (1981); EP-patenttihakemusjulkaisu 263 311]. Esillä olevan keksinnön mukaisten hTNF-muteiinien ekspressio voi tapahtua sellaisissa systeemeissä joko solunsisäisesti tai, geenin sopivan muokkauksen jälkeen, solunulkoisesti [katso Leemans et al., Gene 85, 99 - 108 (1989)].

Sopivat vektorit E. coli -bakteerissa ekspressoimiseksi ovat maininneet esim. Sambrook et al. (katso yllä) tai Fiers et al. teoksessa "Procd. 8th Int. Biotechnology Symposium" [Soc. Franc. de Microbiol., Paris, (Durand et al., toim.), sivut 680 - 697 (1988)] tai, ja vielä spesifisemmin, pDS-ryhmän vektorit [Bujard et al., Methods in Enzymology, toim. Wu ja Grossmann, Academic Press, Inc., osa 155, 416 - 433 (1987); Stüber et al., Immunological Methods, toim. Lefkovits ja Pernis, Academic Press, Inc., osa IV, 121 - 152 (1990)], kuten esimerkiksi pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Thr86) (katso esimerkki I) tai pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Trp32Thr86) (katso esimerkki III) tai pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Ser29Thr86) tai pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Ser29Trp32Thr86) tai pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Asn31-Thr32Thr86) tai pDS56/RBSII,SphI-TNF α (Glu31Thr86) (katso esimerkki IV). Koska näillä spesifisillä pDS56/RBSII-plasmideilla voidaan saada aikaan korkean tason ekspressio johtuen niiden spesifisistä säädeltävistä promoottori/ope-

raattorielementeistä ja ribosomin sitoutumiskohdista, plasmidit voidaan ylläpitää *E. coli* -soluissa ainoastaan silloin, kun promoottori/operaattorielementin aktiivisuus on repressoitu operaattoriin sitoutuneen lac-repressorin toimesta. Promoottorin aktiivisuus voidaan saada uudelleen aikaan halutussa solutiheydessä lisäämällä IPTG:tä, joka inaktivoi repressorin ja paljastaa promoottorin. Koska useimmat *E. coli* -kannat eivät sisällä tarpeeksi repressorimolekyylejä niin, että näissä korkean kopioluvun omaavissa plasmideissa läsnä olevien promoottorisekvenssien toiminta olisi täysin repressoitu, sellaiset *E. coli* -kannat, kuten *E. coli* M15 tai SG13009 on transformoitava ensin plasmidilla, kuten pREP4 (katso kuviot 2a ja b), joka koodittaa lac-repressorin, ennenkuin ne transformoidaan spesifisillä keksinnön mukaisilla pDS56/RBSII-plasmideilla, jotka sitten voidaan stabiilisti ylläpitää *E. coli* -soluissa. Sen lisäksi, että pREP4 koodittaa lac-repressorin, se sisältää myös plasmidin pACYC184 [Chang ja Cohen, *J. Bacteriol.* 134, 1141 - 1156 (1978)] alueen, joka sisältää kaiken informaation, joka tarvitaan replikaatioon ja stabiiliin siirtoon tytärsoluihin [lisäinformaatiota varten katso myös Stüber et al., "System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis" teoksessa *Immunological Methods*, osa IV, sivut 121 - 152, Lefkovits ja Pernis (toim.), Academic Press, New York (1990)].

Isäntäsolujen transformaatio yllä kuvatuilla vektoreilla voidaan suorittaa millä tahansa tavanomaisella menetelmällä [katso esimerkiksi Sambrook et al. (katso yllä)]. Kun isäntäsolu on prokaryootti, kuten *E. coli* esimerkiksi, valmistetaan DNA:n sisäänottoon kykenevät kompetentit solut soluista, jotka kerätään eksponentiaalisen kasvuvaiheen jälkeen, ja sen jälkeen käsitellään tunnetun CaCl_2 -menetelmän mukaisesti. Transformaatio voidaan myös

suorittaa sen jälkeen, kun on muodostettu isäntäsolusta protoplasti, tai muilla alalla tunnetuilla menetelmillä, jotka ovat kuvanneet esim. Sambrook et al. (katso yllä). Sen vuoksi vektori, erikoisesti prokaryoottisessa tai
 5 alemmassa eukaryoottisessa isäntäsolussa ekspressoitua varten, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa hTNF-muteiinia, kuten yllä on kuvattu, ja isäntäsolu, erikoisesti prokaryoottinen isäntäsolu, kuten E. coli, tai alempi eukaryoottinen isäntäsolu, joka on transformoitu sellaisella vektorilla, ovat myös esillä olevan keksinnön
 10 aiheena.

Isäntäorganismit, jotka sisältävät halutun ekspressiovektorin, kasvatetaan tavallisesti olosuhteissa, jotka ovat optimaalisia niiden kasvulle. Prokaryoottisen isännän
 15 tapauksessa eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopussa, jolloin solumäärän kohoaminen per aikayksikkö laskee, halutun hTNF-muteiinin ekspressio indusoidaan, se on, haluttua hTNF-muteiinia koodittava DNA transkriptoidaan ja transkriptoitu mRNA transloidaan. Induktio voidaan suorittaa lisäämällä kasvualustaan indusoijaa tai derepressoraa tai
 20 muuttamalla fysikaalista parametriä, esim. lämpötilaa. Esillä olevan keksinnön mukaisissa suositeltavissa suoritustavoissa käytetyissä ekspressiovektoreissa ekspressiota säädellään lac-repressorin avulla. Lisäämällä isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidia (IPTG) ekspression säätelysekvenssi derepressoidaan ja näin halutun hTNF-muteiinin synteesi indusoituu.
 25

Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit, jotka yllä mainitut transformoidut isäntäsolut ovat tuotaneet, voidaan saada talteen viljelyalustasta tai solujen
 30 hajotuksen jälkeen ja/tai uuttamalla millä tahansa sopivalla menetelmällä, jotka tunnetaan proteiini- ja peptidikemian alalla, kuten esimerkiksi saostamalla ammoniumsulfaatilla, dialysoimalla, ultrasuodatuksella, geelisuodatuksella tai ioninvaihtokromatografiolla, geelielektrofo-
 35

reesilla, isoelektrisellä fokusoinnilla, affiniteettikromatografialla, kuten immunoaffiniteettikromatografialla, HPLC:llä tai niiden kaltaisilla menetelmillä. Erikoisen suositeltavia menetelmiä ovat saostus ammoniumsulfaatilla ja/tai polyetyleni-imiinillä, dialysointi, affiniteettikromatografia esim. fenyyliagarosissa, erikoisesti fenyyli-sepharosissa, tai ioninvaihtokromatografia, erikoisesti MONO-Q- ja/tai MONO-S-matriksissa (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi) tai vielä erikoisemmin, kuten ovat kuvanneet Tavernier et al. [J. Mol. Biol. 211, 493 - 501 (1990)] ja kuten on kuvattu esimerkissä V.

Näin ollen esillä olevan keksinnön aiheena on myös esittää menetelmä yllä spesifioitujen hTNF-muteiinien valmistamiseksi, joka menetelmä sisältää vaiheet, joissa viljellään yllä kuvattua transformoitua isäntäsolua sopivassa alustassa ja eristetään muteiini viljelmän supernatantista tai isäntäsolusta itsestään ja jos halutaan, muutetaan mainittu muteiini sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi. Yhdisteet, kun ne on valmistettu sellaisen menetelmän mukaisesti, ovat myös esillä olevan keksinnön aiheena.

Esillä olevan keksinnön mukaisille hTNF-muteiineille on ominaista se, että ne sisältävät selektiivisen sitoutumisen ihmisen p55-TNF-R-reseptoriin. Sellainen ominaisuus voidaan määrittää alalla tunnetulla testillä, jossa mitataan sitoutumisaffiniteetteja. Esimerkiksi TNF-proteiinin itsensä ja esillä olevan keksinnön mukaisten muteiinien sitoutuminen voidaan mitata käyttäen soluviljelmän soluja, jotka ekspressoivat kahta TNF-reseptorityyppiä eri tasoina, kuten esimerkiksi Hep-2-soluja, jotka ekspressoivat yksinomaan ihmisen p55-TNF-R-reseptoria, ja U937- tai HL60-soluja, jotka ekspressoivat lisäksi myös ihmisen p75-TNF-R-reseptoria [katso Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3127 - 3131 (1990); Hohmann et al., J. Biol. Chem. 264, 14927 - 14934 (1989);-

Loetscher et al. (1990); Dembic et al. (1990)]. Sitoutumisaffiniteetit voidaan tietysti määrittää myös suoraan käyttäen puhdistettuja luonnollisia p55-TNF-R- ja p75-TNF-R-reseptoreita tai p55-TNF-R- ja p75-TNF-R-rekombinantti-reseptoreita, kuten erikoisesti on kuvattu esimerkeissä, tai käyttämällä sellaisten reseptorien vastaavia liukoisia analogeja.

Termi "selektiivinen sitoutumisaffiniteetti ihmisen kasvaimen nekroosifaktorin p55-reseptoriin" viittaa esillä olevan keksinnön yhteydessä eroon kahden TNF-reseptorityypin sitoutumisaffiniteeteissa, joka on, mitä tulee käytettyyn testisysteemiin, riittävän merkittävä niin, että voidaan sanoa, että esillä olevan keksinnön mukainen muteiini sitoutuu selektiivisesti p55-TNF-R-reseptoreihin samaan tapaan kuin villityypin TNF, mutta siitä on kadonnut oleellisesti toiminnallisesti asiaankuuluva sitoutuminen hp75-TNF-R-reseptoriin. Erikoisemmin tämä termi tarkoittaa esimerkkien testisysteemin yhteydessä, että esillä olevan keksinnön mukaisen spesifisen hTNF-muteiinin K_D -arvo on ainakin 10 kertaa tai enemmän, erikoisen suositeltavasti ainakin 10^2 kertaa tai enemmän, suurempi kuin villityypin TNF- α -proteiinin arvo määritettynä käyttäen in vitro -sitoutumistestiä liukoisella hp75-TNF-R-rekombinanttireseptorilla, kun taas saman hTNF-muteiinin K_D -arvo määritettynä käyttäen in vitro -sitoutumistestiä liukoisen hp55-TNF-R-rekombinanttireseptorin kanssa ei eroa enempää kuin 2 kertaaisesti verrattuna villityypin TNF- α -proteiiniin. On kuitenkin ymmärrettävä, että nämä spesifiset K_D -arvot on annettu kuvauksen vuoksi eikä niitä pidä pitää millään tavoin rajoittavina.

Esillä olevan keksinnön mukaiset hTNF-muteiinit voidaan karakterisoida niiden kasvaimen vastaisen aktiivisuuden suhteen alalla tunnetuilla menetelmillä.

hTNF-muteiineja voidaan antaa yksinään tai yhden tai useamman esillä olevan keksinnön mukaisen lisäyhdis-

teen kanssa farmaseuttisesti hyväksyttävänä suun kautta annettavina, injektoitavina tai ulkoisesti annettavina koostumuksina ja tapoina. Anto tapahtuu sellaisena annoksena, että koostumuksen määrä potilaassa on tehokas modifioimaan biologista toimintaa, joka liittyy hTNF-muteiinin toimintaan.

Farmaseuttiset koostumukset, jotka sisältävät hTNF-muteiineja yhdessä yhteensopivan farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajamateriaalin kanssa, ovat sen vuoksi esillä olevan keksinnön lisäaihe. Mitä tahansa tavanomaista kantajamateriaalia voidaan käyttää. Kantajamateriaali voi olla orgaanista tai epäorgaanista, joka sopii suolen kautta tapahtuvaan, ihon kautta tapahtuvaan tai parenteraaliseen antoon. Sopivat kantajat sisältävät veden, gelatiinin, arabikumin, laktoosin, tärkkelyksen, magnesiumstearaatin, talkin, kasvisöljyt, polyalkyleeniglykolit, vase-liinin ja niiden kaltaiset. Lisäksi farmaseuttiset valmisteet voivat sisältää muita farmaseuttisesti aktiivisia aineita. Lisäaineita, kuten makuaineita, säilöntäaineita, stabiloivia aineita, emulsifioivia aineita, puskureita ja niiden kaltaisia voidaan lisätä farmaseuttisten koostumusten hyväksytyn valmistuksen mukaisesti.

Farmaseuttiset valmisteet voidaan tehdä mihin tahansa tavanomaiseen muotoon sisältäen: a) kiinteän muodon suun kautta antoa varten, kuten tabletit, kapselit, pillerit, jauheet, jyvät ja niiden kaltaiset; b) nestemäisen muodon suun kautta antoa varten, kuten liuokset, siirapit, suspensiot, eliksiirit ja niiden kaltaiset; c) valmisteet parenteraalista antoa varten, kuten steriilit liuokset, suspensiot tai emulsiot; ja d) valmisteet ulkoista antoa varten, kuten liuokset, suspensiot, voiteet, ihovoiteet, geelit, mikrojauheet, aerosolit ja niiden kaltaiset. Farmaseuttiset valmisteet voidaan steriloida ja/tai ne voivat sisältää adjuvantteja, kuten säilöntäaineita, stabiloivia

aineita, kosteutusaineita, emulsifioivia aineita, suoloja osmoottisen paineen muuttamiseksi ja/tai puskureita.

5 Parenteraaliset annosmuodot voivat olla infuusioita tai injektoitavia liuoksia, jotka voidaan injektoida laskimonsisäisesti tai lihaksensisäisesti. Nämä valmisteet voivat sisältää myös muita lääkinnällisesti aktiivisia aineita. Lisäaineita, kuten säilöntäaineita, stabiloivia aineita, emulsifioivia aineita, puskureita ja niiden kaltaisia voidaan lisätä farmaseuttisten koostumusten hyväksytyn valmistuksen mukaisesti.

10 Sen mukaisesti esillä olevan keksinnön aiheena on myös esittää menetelmä sellaisen farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, joka menetelmä on tunnettu siitä, että se sisältää vaiheen, jossa esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä saatu yhdiste, ja jos halutaan, farmaseuttisesti aktiiviset lisäaineet, sekoitetaan myrkyttömän, inertin, terapeuttisesti yhteensopivan kantajamateriaalin kanssa ja seos saatetaan kasvislääkeannosmuotoon.

20 Lisäksi esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetun yhdisteen käyttö yllä kuvatun farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi on myös esillä olevan keksinnön aihe.

25 Lopuksi, vasta-aineita voidaan valmistaa esillä olevan keksinnön mukaisia hTNF-muteiineja vastaan. Näitä vasta-aineita voidaan käyttää hyvin tunnetulla tavalla diagnostisiin tai terapeuttisiin tarkoituksiin kuin myös puhdistustarkoituksiin. Sellaiset vasta-aineet voidaan tuottaa injektoimalla nisäkäs- tai lintueläin riittävällä määrällä rokoteformulaatiota, joka sisältää esillä olevan keksinnön mukaista hTNF-muteiinia ja yhteensopivan farmaseuttisen kantajan niin, että saadaan aikaan vasta-aineiden tuotto mainittua hTNF-muteiinia vastaan. Sopiva määrä hTNF-muteiinia, joka tarvitaan, on alan asiantuntijan tuntema tai se voidaan määrittää rutiinikokeilla. Tämän kek-

sinnön yhteydessä käytettynä termi "farmaseuttinen kantaja" voi tarkoittaa joko standardeja koostumuksia, jotka ovat sopivia ihmiselle annettaviksi, tai tyypillisiä adjuvantteja, joita käytetään eläinrokotuksissa.

5 TNF on vahva pleiotrooppinen sytokiini. Sen monet erilaiset aktiivisuudet, kuten esimerkiksi kasvutekijäaktiivisuus immuunisoluille, tulehduksen välitysaktiivisuus tai endoteelin geenien indusoija-aktiivisuus, voidaan havaita isännän puolustuksen yhteydessä infektiota ja vammoja vastaan. TNF sisältää myös korkean koko elimistöön vaikuttavan toksisuuden; bakteremian ja septisen sokin tai bakteerin aiheuttaman aivokalvontulehduksen tuhoisat vaikutukset välittyvät suurelta osin endogeenisten sytokiinien välityksellä, joista TNF-proteiinilla on aikainen ja tärkeä rooli. Lisäksi monet solut ja solulinjat ovat 15 herkkiä TNF-proteiinin suoralle sytoksisuusaktiivisuudelle. Erilaiset koko elimistöön vaikuttavat vaikutukset ja solutoksisuus luultavasti yhdistyvät TNF-proteiinin kasvaimen vastaisessa aktiivisuudessa, joka on havaittu 20 eläinkokeissa.

Nämä tosiasiat muodostavat järkevän perustan uusien 25 terapeuttisten strategioiden kehitykselle, joissa käytetään esillä olevan keksinnön mukaisia hTNF-muteiineja, joissa strategioissa erikoisesti mahdollisuus erottaa monet erilaiset hTNF-aktiivisuudet käytetään täysin hyväksi niin, että erotetaan ei-toivotut toksiset aktiivisuudet halutuista aktiivisuuksista. Yksi esimerkki on käyttää esillä olevan keksinnön mukaisia hTNF-muteiineja kasvaimen vastaisina aineina korkeina annoksina, jotka luultavasti 30 tekee mahdolliseksi alempi koko elimistöön vaikuttava toksisuus ja näin päästään eroon annoksia rajoittavasta toksisuudesta, joka luultavasti vakavasti rajoittaa villityypin hTNF-proteiinin käyttöä syöpäpotilailla. Esillä olevan keksinnön mukaisten hTNF-muteiinien mahdollinen käyttö ei 35 kuitenkaan ole rajoittunut syöpäterapiaan. Mikä tahansa

tauti, jossa TNF isännän puolustustekijänä bakteeri-infektiossa [esimerkiksi Kindler, V. et al., Cell 56, 731 - 740 (1989); Nakano, Y. et al., J. Immunol. 144, 1935 (1990)] tai tulehduksen välittäjänä esittää edullista roolia, voi
 5 hyötyä 55 kD:n TNF-reseptorityyppispesifisestä lääkkeestä, kuten esillä olevan keksinnön mukaisista hTNF-muteiineista. TNF-proteiinin on osoitettu myös sisältävän roolin näivetyystaudissa [esim. Beutler, B. ja Cerami, (katso yllä)] ja esillä olevan keksinnön mukaisia TNF-muteiineja,
 10 joilla on matala koko elimistöön vaikuttava toksisuus, voidaan ehkä käyttää liikalihavuuden vastaisessa terapiassa. Jopa tautitilat, joille on ominaista liiallisen vapautuneen TNF-proteiinin toksiset aktiivisuudet, kuten septinen sokki tai bakteerin aiheuttama aivokalvontulehdus,
 15 voivat hyötyä 55 kD:n TNF-reseptorispesifisistä agonisteista, kuten yllä olevista esillä olevan keksinnön mukaisista muteiineista, tai yhdessä TNF-antagonistien kanssa.

Lyhyt yhteenveto TNF-proteiinin esiintulevasta roolista uusissa terapioissa, joissa p55-TNF-reseptorityyppispesifisten agonistien, joilla on alempi koko elimistöön vaikuttava toksisuus ja jotka selektiivisesti laukaisevat
 20 ainoastaan joitain monista erilaisista TNF-aktiivisuuksista, joilla voidaan odottaa olevan merkittävät edut verrattuna villityypin TNF-proteiiniin, on julkaistu (Tumor Necrosis Factors, The Molecules and their Emerging Role in
 25 Medicine, B. Beutler, toim., Raven Press, 1992, ISBN 0-88167-852-X). Se sisältää TNF-proteiinin aktiivisuudet endoteelisen solun homostaattisten ominaisuuksien ja neutrofiilien kiinnittymisen, kudoksen hapenpuutteen ja reperfuusiovamman moduloimisessa, aktiivisuudet luun imeytymiseen
 30 osaa ottaviin osteoblasteihin ja osteoklasteihin, aktiivisuudet kasvutekijänä monissa soluissa yleensä ja hematopoieesissa kuin myös metaboliset ja ravitsemusvaikutukset. Spesifisten geenien induktio, jotka muodostavat
 35 solun suojamekanismit, kuten Mn-superoksididismutaasin

induktio, joiden tiedetään olevan p55-TNF-R-reseptorin säätelyn alaisuudessa [Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 (1991); Tartaglia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9292 (1991)] tai TNF-proteiinin suora sytotoksisuus joissain soluissa kaikki muodostavat järkevän perustan uusille terapeuttisille strategioille, joissa käytetään reseptorityyppispesifisiä TNF-agonisteja. TNF-proteiinin rooli kasvu/erilaistumisfaktorina lymfokiinillä aktivoitujen tappajasolujen (LAK) muodostuksessa tuntuu myötävaikuttavan TNF-proteiinin kasvaimen vastaiseen aktiivisuuteen.

Tärkeä näkökohta on, että kaikkia näitä aktiivisuuksia voidaan tehostaa tai moduloida yhdessä muiden rekombinanttisytokiinien, kuten esimerkiksi gamma-interferonin, kanssa.

Kun keksintö on kuvattu tässä aiemmin yleisesti, seuraavien esimerkkien on tarkoitettu kuvaavan keksinnön yksityiskohtia ilman, että ne näin rajoittavat keksintöä millään tavalla, yhdessä seuraavien kuvioiden kanssa.

Seuraavia lyhenteitä ja symboleita on käytetty: B, E, H, S, Xb ja X osoittavat katkaisukohtia restriktioentsyymeille BglI, EcoRI, HindIII, SalI, XbaI ja XhoI, vastaavassa järjestyksessä.

 edustaa säädeltävää promoottori/operaattori-elementtiä N25OPSN25OP29,  edustaa synteettistä ribosomin sitoutumiskohtaa RBSII, SphI,  edustaa TNF α -(TNF α), β -laktamaasi- (bla), kloramfenikoliasetyyli transferaasi- (cat), lac-repressor- (lacI) ja neomysiinifosfotransferaasigeenejä (neo),  edustaa lambdafaagin t₀-transkriptioterminaattoria (t₀) ja E. coli -bakteerin rrnB-operonin T1-transkriptioterminaattoria (T1),  edustaa plasmidien pBR322 ja pREP4 replikaatioalueita (repl.),  edustaa N25OPSN25OP29- ja RBSII, SphI-alueiden säätelyn alaisuudessa olevaa koodittavaa aluetta.

Kuvio 1a on kaavakuva plasmidista pDS56/RBSII, SphI-TNF α .

5 Kuvio 1b kuvaa plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α täydellisen nukleotidisekvenssin. Tässä sekvenssissä on osoitettu kuviossa 1a kuvattujen restriktioentsyymien tunnistuskohdat. Esitetty aminohapposekvenssi edustaa kypsän TNF α -proteiinin (157 aminohappoa) sekvenssin kolmekirjaimisella koodilla esitettynä.

Kuvio 2a on kaavakuva plasmidista pREP4.

10 Kuvio 2b esittää plasmidin pREP4 täydellisen nukleotidisekvenssin. Tässä sekvenssissä on osoitettu kuviossa 2a kuvattujen restriktioentsyymien tunnistuskohdat.

Kuvio 3 esittää TNF α -muteiinia Thr⁸⁶-TNF α koodittavan EcoRI-HindIII-fragmentin valmistuksen.

15 Kuvio 4 esittää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α -(Trp32) fragmentin 1 nukleotidisekvenssin.

Kuvio 5 esittää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α -(Ser29) fragmentin 1 nukleotidisekvenssin.

20 Kuvio 6 esittää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α -(Ser29Trp32) fragmentin 1 nukleotidisekvenssin.

Kuvio 7 esittää ihmisen villityypin TNF α -proteiinin ja Thr⁸⁶-, Trp³²-Thr⁸⁶- ja Ser²⁹-Trp³²-Thr⁸⁶-muteiinien kilpaillevan sitoutumisen ihmisen p75- ja p55-TNF-R-rekombinant-tireseptoreihin.

25 Mikrotiitterilevyjä, jotka oli päällystetty ihmisen p75-TNF-R-rekombinanttireseptori-IgG γ 3-fuusioproteiinilla (paneeli A) ja ihmisen p55-TNF-R-rekombinanttireseptori-IgG γ 3-fuusioproteiinilla (paneeli B), inkuboitiin ihmisen radioaktiivisesti leimatun TNF α -proteiinin kanssa niin,
30 että läsnä oli eri konsentraatiot villityypin TNF α -proteiinia (suljetut ympyrät), Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet ympyrät), Trp³²-Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet neliöt) ja Ser²⁹-Trp³²-Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet kolmiot). Kun oli inkuboitu kolme tuntia huoneenlämpötilassa, sitoutunut radioaktiivisuus
35 laskettiin gammalaskurilla.

Kuvio 8 esittää ihmisen villityypin TNF α -proteiinin ja Ser²⁹-Thr⁸⁶-, Glu³¹-Thr⁸⁶- ja Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶-muteiinien kilpailevan sitoutumisen ihmisen p75- ja p55-TNF-R-rekombinanttireseptoreihin.

5 Mikrotiitterilevyjä, jotka oli päällystetty ihmisen p75-TNF-R-rekombinanttireseptori-IgG γ 3-fuusioproteiinilla (paneeli A) ja ihmisen p55-TNF-R-rekombinanttireseptori-IgG γ 3-fuusioproteiinilla (paneeli B), inkuboitiin ihmisen radioaktiivisesti leimatun TNF α -proteiinin kanssa niin,
10 että läsnä oli eri konsentraatiot villityypin TNF α -proteiinia (suljetut ympyrät), Ser²⁹-Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet ympyrät), Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet neliöt) ja Glu³¹-Thr⁸⁶-muteiinia (avoimet kolmiot). Kun oli inkuboitu kolme tuntia huoneenlämpötilassa, sitoutunut radioaktiivisuus laskettiin gammalaskurilla.

Jollei muuta ole spesifioitu, alla kiinteissä seoksissa oleville kiinteille aineille, nesteissä oleville nesteille ja nesteissä oleville kiinteille aineille annettut prosentit ovat w/w-, v/v- ja w/v-prosentteja, vastavassa järjestyksessä.

Esimerkki I

Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Plasmidi pDS56/RBSII,SphI-TNF α

Ihmisen TNF α -ekspressioplasmidi pDS56/RBSII,SphI-TNF α (katso kuvio 1) oli TNF α -geenin lähde valmistettaessa tämän keksinnön mukaiset eri TNF α -muteiinit. Transformoitu E. coli -kanta M15 (pREP4; pDS56/RBSII,SphI-TNF α) on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti patenttitarkoituksia varten kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Saksa, 8.9.1991 koodinumerolla DSM 6713.

TNF α -geenin mutageneesi PCR-reaktiota käyttäen

Kaksi PCR-reaktiota suoritettiin niin, että DNA-templaattina oli plasmidi pDS56/RBSII,SphI-TNF α (kuvio 1) käyttäen Perkin-Elmer Cetus GeneAmpTM-DNA Amplification

Reagent Kit -käyttöpakkausta ja AmpliTaq™ Taq DNA -rekombinanttipolymeraasia (katso kuvio 3).

Reaktio I suoritettiin alukkeilla 17/F (5'-GGCGTA-TCACGAGGCCCTTTTCG-3'; aluke 17/F sisältää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNFα nukleotidit 3949 - 3970) ja 29/M22 (5-GTA-GGTGACGGCGATGCGGCTGATGGT-3'; aluke 29/M22 sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNFα nukleotideille 378 - 352, mutatoitu emäs on alleviivattu).

Reaktio II suoritettiin alukkeilla 29/MR1 (5'-CAGACCAAGGTCAACCTCCTC-3'; aluke 29/MR1 sisältää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNFα nukleotidit 379 - 399) ja 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; aluke 17/O sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNFα nukleotideille 748 - 727).

Tyypillisessä kokeessa sekoitettiin 10 µl DNA-templaattia (10 ng), 5 µl kumpaakin kahta aluketta (100 pmolia kumpaakin), 16 µl dNTP-seosta (1,25 mM dATP:n, dGTP:n, dCTP:n ja dTTP:n suhteen), 10 µl 10 x reaktiopuskuria (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ ja 0,1 % gelatiini), 1 µl (5 yksikköä) AmpliTaq™ DNA -polymeraasia ja 53 µl H₂O:ta Eppendorf-putkessa ja päälle laitettiin 80 µl mineraaliöljyä (Perkin-Elmer Cetus). Putket siirrettiin DNA:n lämpötilaa muuttavaan laitteeseen (TRIO-Thermoblock, Biometra) ja pidettiin 1 minuutti 94 °C:ssa ennen kuin tehtiin 35 sykliä, joissa DNA denaturoitiin (1 minuutti 94 °C:ssa), hybridisoitiin alukkeiden kanssa (1 minuutti 50 °C:ssa) ja pidennettiin alukkeita (3 minuuttia 72 °C:ssa). Kun oli pidetty lisäksi 2 minuuttia 72 °C:ssa, reaktiot jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja uutettiin kloroformilla. Vesifaasissa läsnäoleva DNA saostettiin etanolilla ja sille suoritettiin elektroforeesi 6-%:isessa polyakryyliamidigeelissä (Sambrook et al., 1989). Kun DNA oli värjätty etidiumbromidilla, fragmentit I ja II (katso

kuvio 3) eristettiin geelistä ja puhdistettiin (Sambrook et al., 1989).

Thr⁸⁶-TNF α -proteiinia koodittavan DNA-fragmentin valmistus

5 Fragmentit I ja II fosforyloitiin entsyymaattisesti ennen niiden ligoimista toisiinsa (Sambrook et al., 1989). Kun ligaasi oli inaktivoitu lämmöllä ja oli suoritettu digestio EcoRI- ja HindIII-entsyymeillä, DNA:lle suoritettiin elektroforeesi 6-%:isessa polyakryyliamidigeelissä.

10 Kun DNA oli värjätty etidiumbromidilla, EcoRI-HindIII-fragmentti A (katso kuvio 3) eristettiin geelistä ja puhdistettiin (katso yllä).

Thr⁸⁶-TNF α -proteiinia koodittavan plasmidin valmistus

15 EcoRI-HindIII-fragmentti A insertoitiin standardien menetelmien (Sambrook et al., 1989) mukaisesti EcoRI-HindIII-entsyymeillä avattuun plasmidiin pDS56/RBSII, SphI-TNF α muodostaen plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Thr86). Plasmidi-DNA valmistettiin (Birnboim et al., 1979) ja

20 TNF α -muteiinia koodittavan alueen identiteetti varmistettiin kaksijuosteisen DNA:n sekvensoinnilla (Sambrook et al., 1989).

Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuotto

25 Plasmidi pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Thr86) transformoitiin E. coli M15-soluihin, jotka sisälsivät jo plasmidin pREP4, standardeilla menetelmillä (katso yllä). Transformoituja soluja kasvatettiin 37 °C:ssa LB-alustassa (Sambrook et al., 1989), joka sisälsi 100 mg ampisilliinia/l ja 25 mg kanamysiiniä/l. Kun optinen tiheys 600 nm:ssa oli noin 0,7 - 1,0, IPTG:tä lisättiin niin, että

30 lopullinen konsentraatio oli 2 mM. Kun oli kasvatettu lisää 2,5 - 5 tuntia 37 °C:ssa, solut kerättiin sentrifugomalla.

Esimerkki II**Glu³¹-TNF α - ja Asn³¹Thr³²-TNF α -proteiinien valmistus**
Periaatteet

TNF α -muteiinit Glu³¹-TNF α ja Asn³¹Thr³²-TNF α valmistettiin seuraten menetelmää, joka on kuvattu yksityiskoh-
 5 taisesti esimerkissä I Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistamiseksi. Näin ollen yllä mainittujen TNF α -muteiinien valmistuksen kuvauksessa on ainoastaan PCR-reaktioissa I ja II käytetyt alukkeet spesifioitu. Lisäksi on annettu eri TNF α -
 10 muteiineja koodittavien ekspressioplasmidien nimet.

Glu³¹-TNF α -proteiinin valmistus

PCR-reaktio I suoritettiin alukkeilla 17/F (5'-GGC-GTATCAGAGGCCCTTTCG-3'; aluke 17/F sisältää plasmidin
 pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotidit 3949 - 3970) ja 21/M5
 15 (5'-ATTGGCCCGCTCGTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-3'; aluke 21/M5 sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotideille 219 - 184, mutatoituidut emäkset on alleviivattu). PCR-reaktio II suoritettiin alukkeilla 21/MR (5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3';
 20 aluke 21/MR sisältää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotidit 220 - 241) ja 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; aluke 17/O sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotideille 748 - 727).

25 Tuloksena syntynyttä ekspressioplasmidia pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Glu31) käytettiin Glu³¹-TNF α -proteiinin tuottamiseen ja plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Glu31-Thr86) rakentamiseen (katso esimerkki IV).

Asn³¹Thr³²-TNF α -proteiinin valmistus

30 PCR-reaktio I suoritettiin alukkeilla 17/F (5'-GGC-GTATCAGAGGCCCTTTCG-3'; aluke 17/F sisältää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotidit 3949 - 3970) ja 21/M6 (5'-ATTGGCAGTGTGTTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-3'; aluke 21/M6
 35 sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotideille 219 - 184, mu-

tatoidut emäkset on alleviivattu). PCR-reaktio II suoritettiin alukkeilla 21/MR (5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3'; aluke 21/MR sisältää plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotidit 220 - 241) ja 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; aluke 17/O sisältää nukleotidit, jotka ovat komplementaarisia plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α nukleotideille 748 - 727).

Tuloksena syntyneitä ekspressioplasmidia pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Asn³¹Thr³²) käytettiin Asn³¹Thr³²-TNF α -proteiinin tuottamiseen ja plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α -(Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶) rakentamiseen (katso esimerkki IV).

Esimerkki III

Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Periaatteet

Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistamiseksi rakennettiin ekspressioplasmidi pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp³²Thr⁸⁶), jota sen jälkeen käytettiin Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuottamiseksi E. coli -soluissa.

Plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp³²Thr⁸⁶) rakentaminen

Kaikki esimerkeissä I ja II kuvatut ekspressioplasmidit sisältävät samat kaksi BglI-restriktioentsyymien katkaisukohtaa kuin plasmidi pDS56/RBSII, SphI-TNF α (katso kuvio 1). Toinen näistä kohdista sijaitsee β -laktamaasi-geenissä, kun taas toinen kohta sijaitsee TNF α -geenissä. Tämä jälkimmäinen kohta erottaa TNF α -proteiinia koodittavan alueen kahteen osaan: toinen osa koodittaa TNF α -proteiinin aminohappoja 1 - 36, toinen osa koodittaa TNF α -proteiinin aminohappoja 37 - 157 (katso kuvio 1b).

Plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp³²Thr⁸⁶) rakentamiseksi DNA-fragmentit 1 ja 2 valmistettiin standardien menetelmien (Sambrook et al., 1989) mukaisesti. Fragmentti 1 (sekvenssejä varten katso kuvio 4) oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp³²) pieni BglI-fragmentti, jossa oli säädeltävä promoottori ja koodittava alue Trp³²-TNF α -pro-

teinille aminohappoon 36 asti. Fragmentti 2 oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Thr86) suuri BglI-fragmentti, jossa oli koodittava alue Thr⁸⁶-TNF α -proteiinille aminohaposta 37 lähtien ja plasmidin replikaatioalue. Fragmentti 1 ja entsymaattisesti defosforyloitu fragmentti 2 ligoitiin yhteen (Sambrook et al., 1989), joka johti plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp32Thr86) syntyyn.

M15-solut [pREP4; pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp32)] on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti patenttitarkoituksia varten kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Saksa, 19.11.1990 koodinumerolla DSM 6241.

Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuotto

Plasmidi pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp32Thr86) transformoitiin E. coli M15-soluihin, jotka sisälsivät jo plasmidin pREP4, standardeilla menetelmillä (katso yllä). Transformoituja soluja kasvatettiin 37 °C:ssa LB-alustassa (katso yllä), joka sisälsi 100 mg ampisilliinia/l ja 25 mg kanamysiiniä/l. Kun optinen tiheys 600 nm:ssa oli noin 0,7 - 1,0, IPTG:tä lisättiin niin, että lopullinen konsentraatio oli 2 mM. Kun oli kasvatettu lisää 2,5 - 5 tuntia 37 °C:ssa, solut kerättiin sentrifugoimalla.

Esimerkki IV

Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF α -, Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -, Glu³¹Thr⁸⁶-TNF α - ja Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinien valmistus

Periaatteet

TNF α -muteiinit Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF α , Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNF α , Glu³¹Thr⁸⁶-TNF α ja Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNF α valmistettiin seuraten menetelmää, joka on kuvattu yksityiskohtaisesti esimerkiksi III Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistamiseksi. Näin olleen yllä mainittujen TNF α -muteiinien valmistuksen kuvauksessa on ainoastaan esimerkin III fragmenttia 1 vastaavat DNA-fragmentit spesifioitu. Lisäksi on annettu eri TNF α -muteiineja koodittavien ekspressioplasmidien nimet.

Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Fragmentti 1 (sekvenssejä varten katso kuvio 5) oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29) pieni BglI-fragmentti, jossa oli säädeltävä promoottori ja koodittava alue Ser²⁹-TNF α -proteiinille aminohappoon 36 asti. Fragmentti 1 ja entsyymaattisesti defosforyloitu fragmentti 2 (katso esimerkki III) ligoitiin yhteen (Sambrook et al., 1989), joka johti plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29-Thr86) syntyyn, jota sen jälkeen käytettiin Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuottamiseksi E. coli -soluissa.

M15-solut [pREP4; pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29)] on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti patenttitarkeituksia varten kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Saksa, 19.11.1990 koodinumerolla DSM 6240.

Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Fragmentti 1 (sekvenssejä varten katso kuvio 6) oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29Trp32) pieni BglI-fragmentti, jossa oli säädeltävä promoottori ja koodittava alue Ser²⁹Trp³²-TNF α -proteiinille aminohappoon 36 asti. Fragmentti 1 ja entsyymaattisesti defosforyloitu fragmentti 2 (katso esimerkki III) ligoitiin yhteen (Sambrook et al., 1989), joka johti plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29-Trp32Thr86) syntyyn, jota sen jälkeen käytettiin Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuottamiseksi E. coli -soluissa.

Glu³¹Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Fragmentti 1 oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Glu31) pieni BglI-fragmentti, jossa oli säädeltävä promoottori ja koodittava alue Glu³¹-TNF α -proteiinille aminohappoon 36 asti. Fragmentti 1 ja entsyymaattisesti defosforyloitu fragmentti 2 (katso esimerkki III) ligoitiin yhteen (Sambrook et al., 1989), joka johti plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Glu31Thr86) syntyyn, jota sen jälkeen käytettiin Glu³¹Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuottamiseksi E. coli -soluissa.

Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin valmistus

Fragmentti 1 oli plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α -(Asn31Thr32) pieni BglI-fragmentti, jossa oli säädeltävä promoottori ja koodittava alue Asn³¹Thr³²-TNF α -proteiinille aminohappoon 36 asti. Fragmentti 1 ja entsymaattisesti defosforyloitu fragmentti 2 (katso esimerkki III) ligoi-
 5 tiin yhteen (Sambrook et al., 1989), joka johti plasmidin pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Asn31Thr32Thr86) syntyyn, jota sen jälkeen käytettiin Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNF α -proteiinin tuottami-
 10 seksi E. coli -soluissa.

Esimerkki V

Ihmisen TNF α -muteiinien puhdistus

Yksi litra E. coli -solujen, jotka oli transfor-
 moitu ja indusoitu, kuten yllä on kuvattu, yli yön kasva-
 15 neita viljelmiä kerättiin sentrifugoimalla ja suspen-
 doitiin uudelleen 20 ml:aan liuosta, jossa oli 50 mM Tris-
 puskuria, pH 7,2, 200 mM KCl:a, 50 mM MgCl₂:a, 5 % glyse-
 rolia. Solut hajotettiin French press -laitteella paineel-
 la 20 000 psi:tä. Kun oli kirkastettu sentrifugoimalla
 20 (70 000 x g, 30 minuuttia, 4 °C), lisättiin kiinteää am-
 moniumsulfaattia niin, että lopullinen konsentraatio oli
 30 %. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yhden tun-
 nin ajan ja sitten sentrifugoitiin 10 000 x g 20 minuutin
 ajan 4 °C:ssa. Supernatantti suodatettiin 0,45 μ m:n suo-
 25 dattimen läpi ja säädettiin 70-prosenttiseksi ammoniumsul-
 faatin suhteen. Saostuneet proteiinit kerättiin sentrifu-
 goimalla, liuotettiin 20 ml:aan 20 mM Tris-liuosta, pH
 9,0, ja dialysoitiin samaa puskuria vastaan yli yön
 4 °C:ssa. Dialysoitujen näytteiden 1 ml:n määrät lisättiin
 30 MonoQ-pylvääseen (HR 5/5, LKB-Pharmacia), joka oli tasa-
 painotettu 20 mM Tris-liuoksella, pH 9,0, ja eluoitiin
 lineaarisella NaCl-gradientilla (0 - 400 mM 20 mM Tris-
 liuoksessa, pH 9,0) -virtausnopeudella 0,5 ml/minuutti.
 Kerättiin 0,5 ml fraktiot ja ne analysoitiin TNF α -muteii-
 35 nien läsnäolon suhteen natriumdodekyylisulfaatti-polyak-

ryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE). Positiiviset fraktiot yhdistettiin, dialysoitiin 20 mM 2-morfolinoetaanisulfonihappoa (MES), pH 6,0, vastaan ja lisättiin MonoS-pylvääseen (HR 5/5, LKB-Pharmacia), joka oli tasapainotettu 20 mM MES-puskurissa, pH 6,0. Proteiinit eluoitiin lineaarisella NaCl-gradientilla (0 - 400 mM 20 mM MES-puskurissa, pH 6,0) virtausnopeudella 0,5 ml/minuutti. Eri TNF α -muteiinit eluoituivat elektroforeettisesti puhtaina proteiineina NaCl-konsentraatioiden 250 mM ja 350 mM välillä. Kun oli dialysoitu fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta (PBS) vastaan, proteiinikonsentraatio määritettiin BCA-proteiinitestillä (Pierce Chemical Company) käyttäen ihmisen villityypin TNF α -proteiinia standardina.

Esimerkki VI

Ihmisen TNF α -proteiinin ja muteiinien kilpaileva sitoutuminen ihmisen p75-TNF-R- ja p55-TNF-R-rekombinanttireseptoreihin

Kilpailevaa sitoutumistestiä varten mikrotiitterilevyt päällystettiin ihmisen p75-TNF-R-rekombinanttireseptori=ihmisen IgG 3 ja p55-TNF-R-ihmisen IgG 3 -fuusioproteiineilla, jotka oli liuotettu PBS:ään konsentraatioiksi 0,3 μ g/ml ja 0,1 μ g/ml, vastaavassa järjestyksessä (100 μ l/kuoppa, yli yön 4 °C:ssa)[Loetscher, H. et al., J. Biol. Chem. 266, 18324 - 18329 (1991); Lesslauer, W. et al., Eur. J. Immunol. 21, 2883 - 2886 (1991)]. Kun oli blokeerattu blokeerauspuskurilla (50 mM Tris, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02 % NaN₃, 1 % rasvaton maitojauhe), mikrotiitterilevy pestiin PBS:llä ja sitä inkuboitiin niin, että läsnä oli 10 ng/ml ihmisen ¹²⁵I-TNF α -proteiinia [leimattu Iodogen-menetelmällä (Pierce Chemical Company) niin, että spesifinen aktiivisuus oli noin 30 μ Ci/ μ g] ja eri konsentraatiot muteiineja. Tilavuus oli 100 μ l/kuoppa ja kukin konsentraatio testattiin kolmena rinnakkaisena. Kun oli inkuboitu kolme tuntia huoneenlämpötilassa, kuopat pestiin perusteellisesti PBS:llä ja laskettiin gammalaskurissa.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä ihmisen kasvaimen nekroosifaktorireseptoriin p55 selektiivisen sitoutumisaffiniteetin sisältävän ihmisen kasvaimen nekroosifaktorimuteiinin tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, jolle muteiinille on ominaista se, että ihmisen kasvaimen nekroosifaktorin aminohapposekvenssi on muuttunut ainakin kohdassa 86, jossa on treoniini seriinitähteen tilalla, t u n n e t t u siitä, että menetelmä sisältää vaiheet, joissa viljellään isäntäsolua, joka on transformoitu ekspressiovektorilla, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koordittaa sellaista muteiinia, sopivassa alustassa ja eristetään tämä muteiini viljelmän supernatantista tai isäntäsolusta itsestään, ja jos halutaan, muutetaan tämä muteiini sen farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu aminohapposekvenssi on muuttunut yhdessä tai useammassa lisäkohdassa, suositeltavasti yhdessä tai kahdessa lisäkohdassa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu aminohapposekvenssi on muuttunut kohdissa 29 ja 86, 31 ja 86, 32 ja 86, 29, 32 ja 86, ja 31, 32 ja 86.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu muteiini on Thr⁸⁶-TNFα, Ser²⁹-Thr⁸⁶-TNFα, Glu³¹-Thr⁸⁶-TNFα, Trp³²-Thr⁸⁶-TNFα, Ser²⁹-Trp³²-Thr⁸⁶-TNFα tai Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶-TNFα.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on prokaryoottinen tai alempi eukaryoottinen isäntäsolu.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu isäntäsolu on E. coli.

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressiovektori on pDS-ryhmän vektori.

5 8. Yhdisteen käyttö farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että yhdiste on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisella menetelmällä.

10 9. DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa yhdistettä, joka on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisella menetelmällä.

15 10. Vektori, erikoisesti prokaryoottisessa tai alemmassa eukaryoottisessa isäntäsolussa ekspressoimista varten, t u n n e t t u siitä, että sellainen vektori sisältää patenttivaatimuksen 9 mukaisen DNA-sekvenssin.

11. Isäntäsolu, erikoisesti prokaryoottinen tai alempi eukaryoottinen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu patenttivaatimuksen 10 mukaisella vektorilla.

20 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli.

Fig. 1a

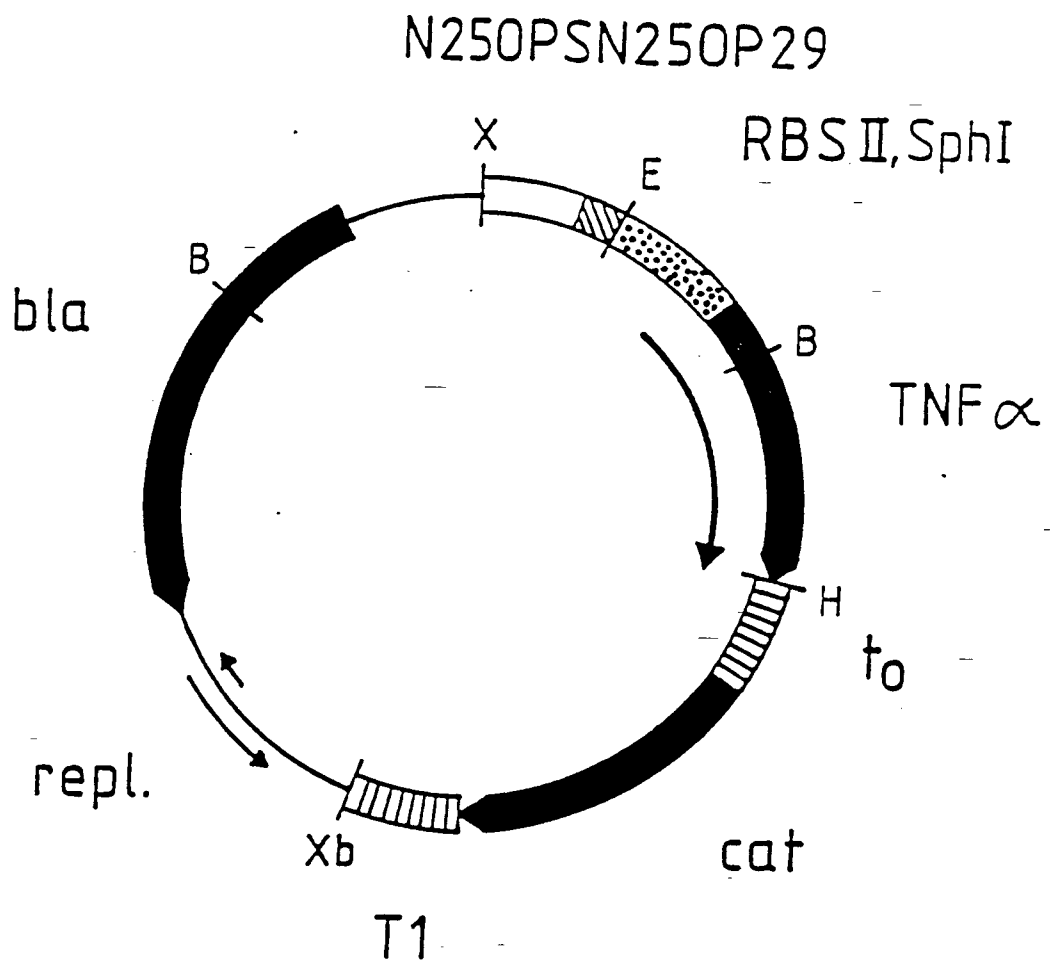


Fig. 1b

XhoI
1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI
51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
1 11
151 CCTGTAGCCC ATGTTGTGCG GAACCCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
21

BglI
201 GCTGAACCGC CGGGCCAATG CCCTCCTGGC CAATGGCGTG GAGCTGAGAG
pLeuAsnArg ArgAlaAsnA laLeuLeuAl aAsnGlyVal GluLeuArgA
31 41
251 ATAACCAGCT GGTGGTGCCA TCAGAGGGCC TGTACCTCAT CTACTCCCAG
spAsnGlnLe uValValPro SerGluGlyL euTyrLeuIl eTyrSerGln
51 61
301 GTCCTCTTCA AGGGCCAAGG CTGCCCCCTCC ACCCATGTGC TCCTCACCCA
ValLeuPheL ysGlyGlnGl yCysProSer ThrHisValL euLeuThrHi
71
351 CACCATCAGC CGCATCGCCG TCTCCTACCA GACCAAGGTC AACCTCCTCT
sThrIleSer ArgIleAlaV alSerTyrGl nThrLysVal AsnLeuLeuS
81 91
401 CTGCCATCAA GAGCCCCCTGC CAGAGGGAGA CCCAGAGGG GGCTGAGGCC
erAlaIleLy sSerProCys GlnArgGluT hrProGluGl yAlaGluAla
101 111
451 AAGCCCTGGT ATGAGCCCAT CTATCTGGGA GGGGTCTTCC AGCTGGAGAA
LysProTrpT yrGluProIl eTyrLeuGly GlyValPheG lnLeuGluLy
121
501 GGGTGACCGA CTCAGCGCTG AGATCAATCG GCCCGACTAT CTCGACTTTG
sGlyAspArg LeuSerAlaG luIleAsnAr gProAspTyr LeuAspPheA
131 141
551 CCGAGTCTGG GCAGGTCTAC TTTGGGATCA TTGCCCTGTG AGGAGGACGA
laGluSerGl yGlnValTyr PheGlyIleI leAlaLeu
151 157
601 ACATCCAACC TTCCCAAACG CCTCCCCTGC CCCAATCCCT TTATTACCCC
651 CTCCTTCAGA CACCCTCAAC CTCTTCTGGC TCAAAAAGAG AATTGGGGGC

HindIII
701 TTAGGGTCGG AACCCAAGCT TGGACTCCTG TTGATAGATC CAGTAATGAC
751 CTCAGAACTC CATCTGGATT TGTTCAGAAC GCTCGGTTGC CGCCGGGGCGT

Fig. 1b (jatk.)

801 TTTTATTGG TGAGAATCCA AGCTAGCTTG GCGAGATTTT CAGGAGCTAA
851 GGAAGCTAAA ATGGAGAAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT
901 CCCAATGGCA TCGTAAAGAA CATTITGAGG CATTTCAGTC AGTTGCTCAA
951 TGTACCTATA ACCAGACCGT TCAGCTGGAT ATTACGGCCT TTTTAAAGAC
1001 CGTAAAGAAA AATAAGCACA AGTTTTATCC GGCCTTTATT CACATTCTTG
1051 CCCGCCTGAT GAATGCTCAT CCGGAATTC GTATGGCAAT GAAAGACGGT
1101 GAGCTGGTGA TATGGGATAG TGTTCACCCT TGTTACACCG TTTTCCATGA
1151 GCAAAC TGAA ACCTTTTCAT CGCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC
1201 GGCAGTTTCT ACACATATAT TCGCAAGATG TGGCGTGTTA CCGTGAAAAC
1251 CTGGCCTATT TCCCTAAAGG GTTTATTGAG AATATGTTTT TCGTCTCAGC
1301 CAATCCCTGG GTGAGTTTCA CCAGTTTGA TTTAAACGTG GCCAATATGG
1351 ACAACTTCTT CGCCCCCGTT TTCACCATGG GCAAATATTA TACGCAAGGC
1401 GACAAGGTGC TGATGCCGCT GCGGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA
1451 TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCGATG
1501 AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
1551 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG
1601 CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCGTTTTA TCTGTGTGTT GTCCGGTGAAC
XbaI
1651 GCTCTCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT
1701 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
1751 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC TCAGGGCGCG
1801 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
1851 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
1901 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGTAAAGGA
1951 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG
2001 CGCTCGGTCT GTCCGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
2051 AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
2101 CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG

Fig. 1b (jatk.)

2151 TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC
 2201 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
 2251 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
 2301 GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG
 2351 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGCTTCGC TCCAAGCTGG
 2401 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTATTCGGT
 2451 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
 2501 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
 2551 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CTTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
 2601 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG
 2651 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG
 2701 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
 2751 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGAACGAAA ACTCACGTTA
 2801 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
 2851 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 2901 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT
 2951 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
 3001 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGCCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
 3051 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC

BglI

3101 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
 3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 3201 AGTTTGGCA ACGTTGTGTC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC
 3251 GTCGTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCTT
 3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
 3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

Fig. 1b (jatk.)

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGGAT GTAACCCACT
3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTGA
3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC

Fig. 2a

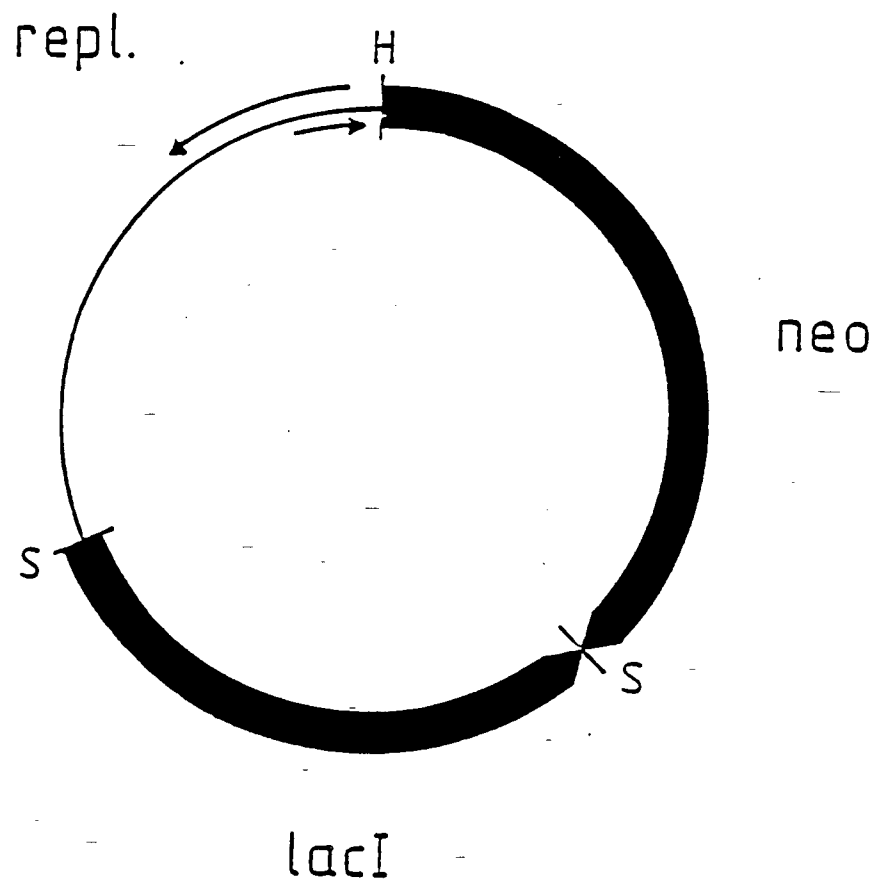


Fig. 2b

HindIII

```

1  AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAAGGAAG
51  CGGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGCAGAAA CGGTGCTGAC CCCGGATGAA
101 TGTGAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA
151 AGCAGGTAGC TTGCAGTGGG CTTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT
201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA
251 GGTGGAAG CCTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA
301 TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGACGGTCG
351 TTTCGCATGC TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG
401 GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
451 CTGATGCCGC CGTGTTCCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTTT
501 GTCAGACCG ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC
551 GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG
601 ACGTTGTAC TGAAGCGGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG
651 GGGCAGGATC TCCTGTCATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT
701 CATGGCTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
751 CATTCGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG
801 GAAGCCGGTC TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT
851 CGCGCCAGCC GAACTGTTCTG CCAGGCTCAA GGCGCGCATG CCCGACGGCG
901 AGGATCTCGT CGTGACCCAT GGCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG
951 GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC
1001 GCACCCCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1051 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTACGG TATCGCCGCT
1101 CCCGATTCGC AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG
1151 AGCGGGACTC TGGGGTTCTGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC
1201 ATCACGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
1251 GAATCGTTTT CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC
1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCCA CCCCAGGCTC GATCCCCTCG CGAGTTGGTT

```

Fig. 2b (jatk.)

1351 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACGACCTCGC GGAGTTCTAC CGGCAGTGCA
 1401 AATCCGTCGG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC
 1451 CCCGAAGTGC AGGAGTGGGG AGGCACGATG GCCGCTTTGG TCGACAATTC
 1501 GCGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCCGCT TTCCAGTCGG
 1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA
 1601 GGCGGTTTGC GTATTGGGCG CCAGGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA
 1651 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCCTGAGA GAGTTGCAGC
 1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCAGCAGG CGAAAATCCT GTTTGATGGT
 1751 GGTAAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
 1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGCGC
 1851 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
 1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
 1951 TCCAGTCGCC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAAITTGATT GCGAGTGAGA
 2001 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCCGAGACAG AACTTAATGG
 2051 GCGCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
 2101 CGCCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
 2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
 2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTCAATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCC
 2251 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG
 2301 ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
 2351 GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
 2401 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT
 2451 TGTGCCACGC GGTGGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
 2501 TTTTCCCGC GTTTTCGAG AAACGTGGCT GGCTGGTTT ACCACGCGGG
 2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
 2601 ACTGGTTTCA CATTCAACAC CCTGAATIGA CTCTCTTCCG GGCGCTATCA
 2651 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TCGCCATTC GATGGTGTC ACGTAAATGC

Fig. 2b (jatk.)

Sali

2701 ATGCCGCTTC GCCTTCGCGC GCGAATTGTC GACCCTGTCC CTCCTGTTC A
2751 GCTACTGACG GGGTGGTGGC TAACGGCAAA AGCACC GCCG GACATCAGCG
2801 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTAATATGTT GGCCTGATG AGGGTGTGAG
2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAAG GCTGCACCCG TGGTTCAGCA
2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTAC
2951 GCTCGGTTCG TCGACTGCGG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACCGGGCGGA
3001 GATTTCTCTG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC
3051 GCGGCAAAGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACA AGCATCACGA
3101 AATCTGACGC TCAAATCAGT GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
3151 ACCAGGCGTT TCCCCCTGGG GCTCCCTCGT GCGCTCTCTT GTTCTGCTT
3201 TTCGGTTTAC CGGTGTCAAT CCGCTGTAT GCGCGGCTTT GTCTCATTC
3251 ACGCCTGACA CTCAGTTCCG GGTAGGCAGT TCGCTCCAAG CTGGACTGTA
3301 TGCACGAACC CCCCCTTCAG TCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT
3351 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC
3401 CACTGGTAAT TGATTTAGAG GAGTTAGTCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA
3451 GGCTAAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TGGCTCCTC CAAGCCAGTT
3501 ACCTCGGTTC AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCCT
3551 GCAAGCGCGT TTTTCTGTT TCAGAGCAAG AGATTACGCG CAGACCAAAA
3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAAAATAT TCTAGATTT
3651 AGTGCAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAGC CCCATACGAT
3701 ATAAGTTGTT AATCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

Fig. 3

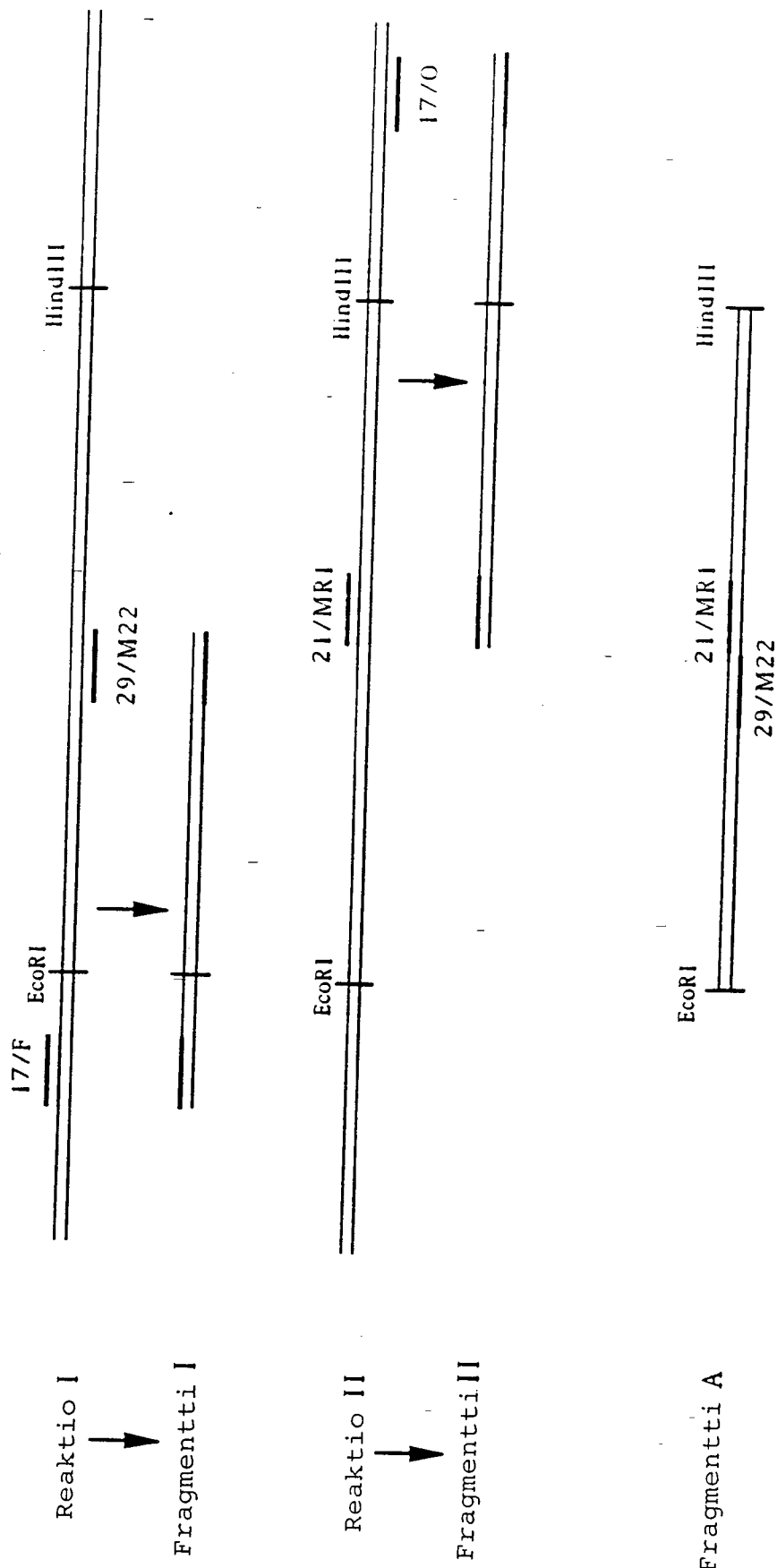


Fig. 4

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC

3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT

3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC

3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG

3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCCGGTCT

3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT

3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTATC GCCATCCGTA AGATGCTTTT

3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA

3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT

3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG

3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA

3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATA TTATTGAAGC

3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA

3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC

3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACTTA TAAAAATAGG

3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI

201 GCTGAACCGC TGGGCCAATG CCCTCCTGGC
 pLeuAsnArg TrpAlaAsnA laLeu
 31 36

Fig. 5

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC

3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT

3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACAGCTC

3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG

3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCCGTCCT

3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT

3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT

3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCCG

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA

3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT

3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG

3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGA ATAAGGGCGA

3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC

3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA

3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC

3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG

3951 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC--

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG

Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys

1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG

ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr

21

BglI

201 GTCCAACCGC CGGGCCAATG CCCTCCTGGC

pSerAsnArg ArgAlaAsnA laLeu

31 36

Fig. 6

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC

3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCCG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT

3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC

3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG

3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCGGTCTT

3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT

3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTATC GCCATCCGTA AGATGCTTTT

3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA

3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT

3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG

3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA

3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC

3801 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA

3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTCCAC

3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG

3951 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTGAACCCC GAGTGACAAG

Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys

1

11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG

ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr

21

BglI

201 GTCCAACCGC TGGGCCAATG CCTCCTGGC

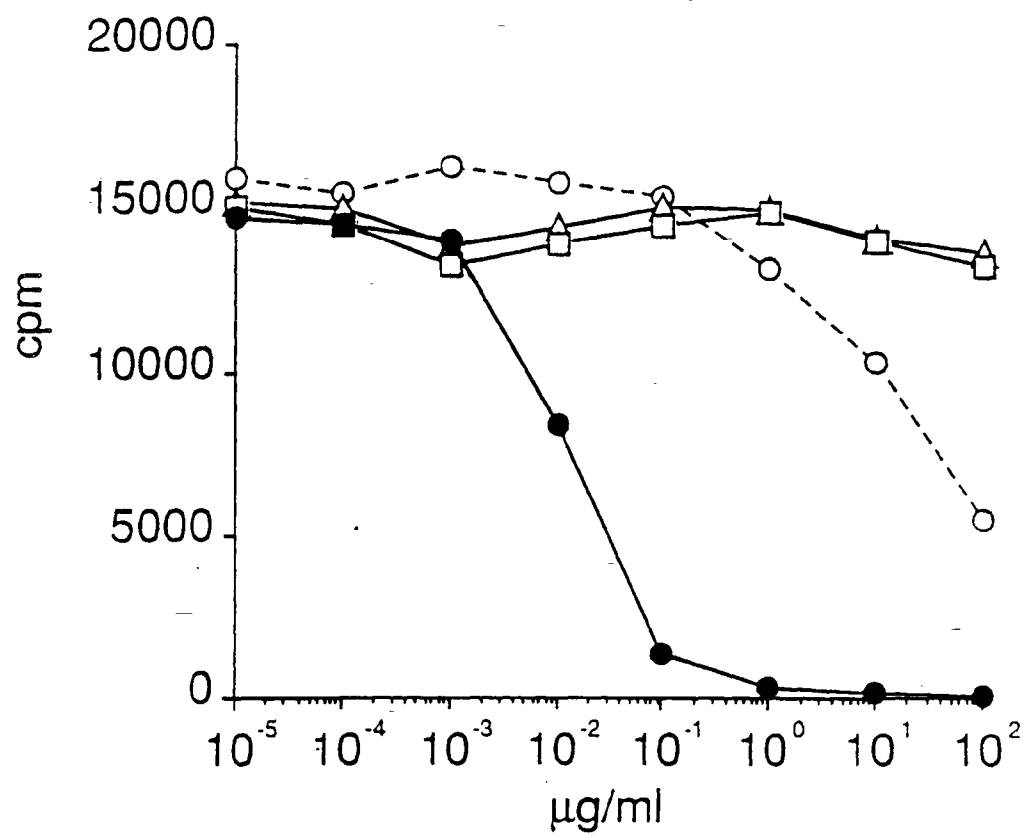
pSerAsnArg TrpAlaAsnA laLeu

31

36

Fig. 7

A



B

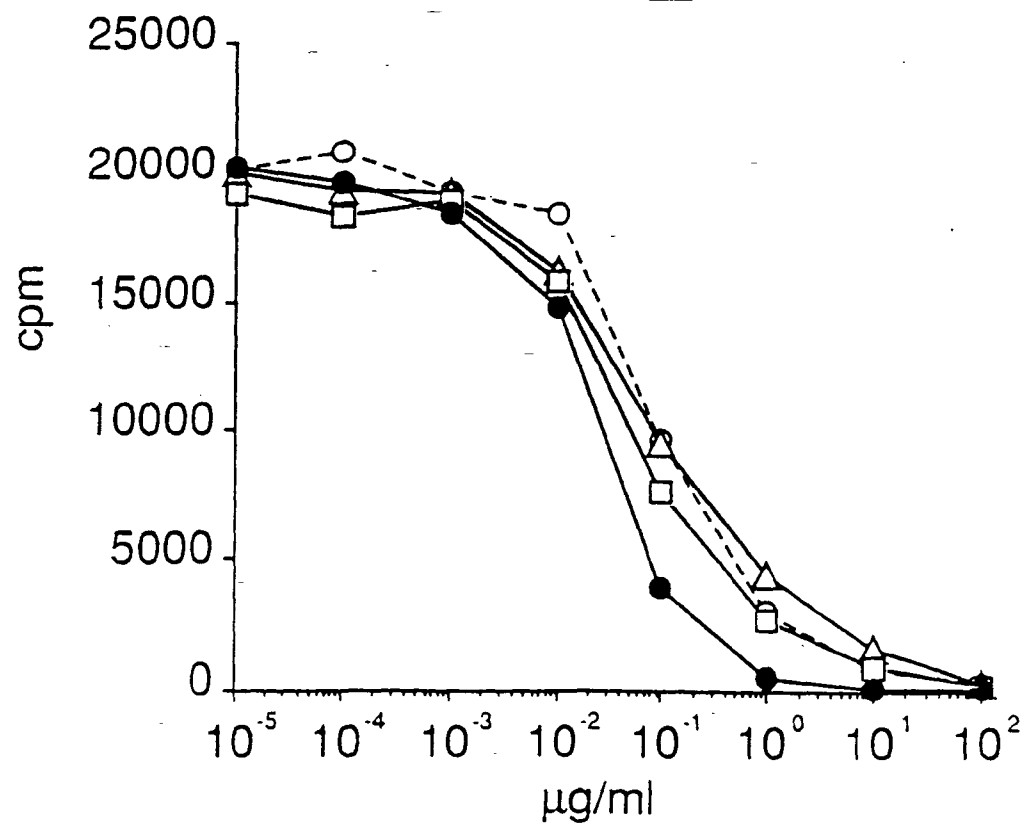


Fig. 8

