



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319022

C 07 K 14/52

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19963552	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.12.27 PCT/JP95/02708
(22)	Inng.dag	1996.08.26	(85)	Videreføringsdag	1996.08.26
(24)	Løpedag	1995.12.27	(30)	Prioritet	1994.12.27, JP, 337885/94
(41)	Alm.tilgj	1996.10.28			
(45)	Meddelt	2005.06.06			
(73)	Innehaver	Daiichi Pharmaceutical Co Ltd , 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, 103-8234 TOKYO, JP			
(72)	Oppfinner	Kanji Higashio, Kawagoe-shi, Saitama, JP Kyoji Yamaguchi, Oomiya-shi, Saitama, JP Akihiko Murakami, Shimotsuga-gun, Tochigi, JP Masaaki Goto, Shimotsuga-gun, Tochigi, JP Masatsugu Ueda, Kawagoe-shi, Saitama, JP Fumie Kobayashi, Kawachi-gun, Tochigi, JP Masahiko Kinosaki, Shimotsuga-gun, Tochigi, JP Yasushi Yamashita, Shimotsuga-gun, Tochigi, JP			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Tumorcytotoksisk-faktor-II-mutanter			
(56)	Anførte publikasjoner	Biochemistry, Vol. 31, No. 4, 1992, side 1173-1180 Eur. J. Haematol, Vol. 47, No. 5, 1991, side 342-345 NUCLEIC ACIDS RES., VOL. 10, NO. 20, 1982, SIDE 6487-6500 WO 90 10651 WO 9323541			
(57)	Sammendrag				

TCF-mutant med en ny aminosyresekvens som er erholdt ved mutagenese av én eller flere aminosyrer mellom N-terminalen og den første kringel av aminosyresekvensen av nativ TCF, og har redusert affinitet for heparin og/eller forhøyet biologisk aktivitet. TCF-mutanten fremstilles ved genmanipulering av TCF. TCF-mutantene har proliferativ aktivitet og/eller vekststimulerende aktivitet i hepatocytter og er fordelaktige som et terapeutisk middel for forskjellige leversykdommer og som et antitumormiddel.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår TCF-mutanter omfattende en ny aminosyresekvens, nærmere bestemt TCF-mutanter
5 erholdt ved mutagenese av én eller flere aminosyrer i sekvensen fra N-terminalen til den første kringle i nativt TCF, og som oppviser redusert affinitet overfor heparin og/eller forhøyet biologisk aktivitet.

TCF-mutantene ifølge foreliggende oppfinnelse som
10 oppviser proliferativ aktivitet og vekststimulerende aktivitet i hepatocytter, er fordelaktige for behandling av forskjellige leversykdommer og som et antitumormiddel.

Oppfinnelsens bakgrunn

15 Tumorcytotoksisk faktor (TCF-II) produsert i humane fibroblastceller er et nytt antitumormiddel som er forskjellig fra alle hittil rapporterte antitumorproteiner. Ved foreliggende oppfinnelse har det lyktes å klonе cDNA som koder for proteinet ifølge foreliggende oppfinnelse, den totale
20 aminosyresekvens derav er bestemt og anvendeligheten derav er bekreftet (WO 90/10651). Molekylvekten av TCF ble bestemt til $78\ 000 \pm 2\ 000$, eller $74\ 000 \pm 2\ 000$, ifølge resultatene fra SDS-elektroforese under ikke-reduserende betingelser, mens resultatene under reduserende betingelser indikerte en A-
25 kjede med et felles bånd med molekylvekt $52\ 000 \pm 2\ 000$, en B-kjede på $30\ 000 \pm 2\ 000$ og/eller en C-kjede på $26\ 000 \pm 2\ 000$. TCF er et protein som har høy affinitet overfor heparin eller heparinlignende stoffer og oppviser høy antitumoraktivitet mot tumorceller og proliferativ aktivitet overfor
30 normale celler. Det ble videre bekreftet at TCF tilhører en bred familie av HGF som er hepatocyttevekstfaktorer. Fordi TCF ikke kun er en antitumorfaktor, men også en vekstfaktor for hepatocytter, er det kjent at den er fordelaktig for leverregenerering etter hepatektomi.

35 Omfattende forskning er hittil utført ut fra aspektene med forholdene struktur-funksjon for hepatocyttevekstfaktor (HGF). Ca. 20 typer delesjonsmutanter og ca. 50 typer punktmutanter er hittil rapportert

(K. Matsumoto, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 181, s. 691-699 (1991); G. Hartmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, s. 11574-11587 (1992); N. A. Lokker, et al., EMBO J. vol. 11, s. 2503-2510 (1992); M. Okigaki et al., Biochemistry, vol. 31, s. 9555-9561 (1992); N. A. Lokker, et al., Protein Engineering, vol. 7, s. 895-903 (1994)), men det foreligger i dag ikke noen mutant som klart oppviser en forhøyet biologisk aktivitet.

Halveringstiden for TCF *in vivo* er kjent for å være ekstremt kort, ca. 2 minutter. Det forventes derfor at en forholdsvis stor mengde av proteinet bør administreres for behandling av forskjellige sykdommer. Det er tenkelig at doseringsnivået for administrert TCF vil bli redusert ved forhøyelse av biologisk aktivitet derav eller ved forlengelse av halveringstiden derav *in vivo*. Selv om dette ble beskrevet for TCF-mutanter med forlenget halveringstid i patentpublikasjon WO 94/14845, foreligger det i dag ingen TCF-mutant med forhøyet biologisk aktivitet, slik som HGS beskrevet ovenfor.

Ved foreliggende oppfinnelse er det derfor utført undersøkelser for å erholde en TCF-mutant som oppviser forhøyet biologisk aktivitet eller forlenget halveringstid *in vivo*. Nærmere bestemt er det ved foreliggende oppfinnelse utført forskning for å erholde den ovennevnte mutant med forhøyet biologisk aktivitet eller med forlenget halveringstid *in vivo* som er forskjellig fra nativ TCF med hensyn til aminosyresekvens, ved endring av DNA-sekvensen som koder for aminosyresekvensen av nativ TCF og ekspresjon av det tilsvarende DNA. Et mål for foreliggende oppfinnelse er følgelig å tilveiebringe en TCF-mutant med forhøyet biologisk aktivitet eller med forlenget halveringstid *in vivo*, på grunn av redusert affinitet for heparin.

Ved foreliggende oppfinnelse er det utført omfattende forskning for å oppnå det ovennevnte mål og det er erholdt nye TCF-mutanter med aminosyresekvenser forskjellige fra sekvensene av TCF-mutanter funnet før foreliggende oppfinnelse, og som oppviser forhøyet biologisk aktivitet og/eller redusert affinitet for heparin. Foreliggende

oppfinnelse tilveiebringer TCF-mutanter som oppviser mer enn 10 ganger høyere spesifikk aktivitet (biologisk aktivitet pr. enhetsmengde protein) og/eller redusert affinitet for heparin.

- 5 Disse er de første mutanter med ekstremt forhøyet biologisk aktivitet erholdt ved mutagenisering av aminosyresekvensen for nativ TCF.

Oppsummering av oppfinnelsen

- 10 Et mål for foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en TCF-mutant med redusert affinitet for heparin og/eller med forhøyet biologisk aktivitet, erholdt ved mutagenese av én eller flere aminosyrerester i aminosyresekvensen fra N-terminalen til første kringel i nativ TCF.

15

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser SDS-elektroforeseprofiler for renset TCF og TCF-mutanter ifølge foreliggende oppfinnelse.

- 20 Figur 2 viser proliferativ virkning av renset TCF og TCF-mutanter ifølge foreliggende oppfinnelse på hepatocytter. Den relative aktivitet (%) på den vertikale akse er representert som den forhåndsmessige proliferative aktivitet av hver prøve basert på aktiviteten av 10 ng/ml TCF som 100 %.

- 25 Figur 3 viser en sammenligning av proliferativ virkning i hepatocytter mellom renset mutant RKRR2AAAA og TCF.

- 30 Figur 4 viser en sammenligning av proliferativ virkning i hepatocytter mellom renset mutant KIKTKK27AIATAA og TCF.

Figur 5 viser sammenligning av proliferativ virkning i nyreepitelceller mellom renset mutant RKRR2AAAA, mutant KIKTKK27AIATAA og TCF.

- 35 Figur 6 viser sammenligning av proliferativ virkning i benmargsceller mellom renset mutant RKRR2AAAA, mutant KIKTKK27AIATAA og TCF.

Figur 7 viser doseeffekter av renset TCF, mutant RKRR2AAAA og mutant KIKTKK27AIATAA på serumnivået av totalt

protein hos rotter.

Figur 8 viser doseeffekter av rensset TCF, mutant RKRR2AAAA og mutant KIKTKK27AIATAA på serumnivået av HDL-kolesterol hos rotter.

5

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen og foretrukne utførelsesformer

Ved å sammenligne egenskaper for nativt protein og en mutant erholdt ved mutagenese i en del av aminosyresekvensen for proteinet, kan funksjonen av denne del
10 vurderes. I tilfellet med protein hvis struktur ikke er klart kjent, har det ofte vært vanlig å erstatte en aminosyre, slik som Ala, som ikke vil påvirke den steriske struktur, med en polar aminosyre som antas å ligge på overflaten av et
15 protein, for å forhindre en strukturell endring av proteinet på grunn av mutagenese. For å utføre en sete-spesifikk endring av en aminosyresekvens av et protein til en annen, kan cDNA med sete-spesifikke mutasjoner fremstilles ved hjelp av PCR (polymerasekjedereaksjon) metoden ved anvendelse av cDNA
20 som koder for nativ TCF som templat og syntetiske oligonukleotider som koder for de andre aminosyrer.

cDNA erholdt som beskrevet ovenfor kan innføres i en vektor med en passende ekspressionspromotor (cytomegalovirus (CMV), SRα (Mole. Cell. Biol. vol. 8, nr. 1, s. 466-
25 472) og japansk patentsøknad 277489 (1989), og transfekteres i eukaryotiske celler, slik som pattedyrceller. Ved dyrkning av disse celler kan aktuelle TCF-mutanter isoleres fra dyrkningsløsningen.

Mange TCF-mutanter kan konstrueres ved å innføre
30 mutasjoner ved forskjellige seter eller rester. Ved foreliggende oppfinnelse ble det fremstilt 6 mutanter. Disse mutanter spesifiseres ved nummerering av aminosyresekvensen før mutagenese, antall aminosyrer ved N-terminalen av den mutageniserte del og endret aminosyresekvens etter
35 mutagenese, ved hjelp av en enbokstavkode for aminosyrer. Der som f.eks. hele sekvensen Arg-Lys-Arg-Arg i den andre posisjon fra N-terminalen erstattes med Ala, representeres mutanten som RKRR2AAAA. Som et annet eksempel representeres

mutanten hvis opprinnelige sekvens Lys-Ile-lys-Thr-Lys-lys ved den 27. posisjon fra N-terminalen erstattes med Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala, som KIKTKK27AIATAA.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en
 5 tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant, kjennetegnet ved at Arg2-Lys-Arg-Arg5 i villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala-Ala-Ala-Ala, en tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant, kjennetegnet ved at Lys27-Ile-Lys-Thr-Lys-Lys32 i villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-
 10 Ala, en tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant, kjennetegnet ved at Lys54 i villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala og en tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant, kjennetegnet ved at Arg42 i villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala.

15 Foreliggende oppfinnelse forklares i detalj ved hjelp av eksemplene. Rammen for foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset av disse eksempler.

Eksempel 1

20 Sete-spesifikk mutasjon ble utført ved hjelp av metoden beskrevet nedenfor ved anvendelse av 6,3 kb TCF-ekspresjonsplasmidet erholdt ved hjelp av metoden beskrevet i WO 92/01053. *E. coli* omfattende dette plasmid ble deponert som FERM BP-3479.

25

I. Fremstilling av templatplasmid pcD TCF001

I overensstemmelse med metoden beskrevet nedenfor ble en mutasjon innført ved PstI-spaltingssetet ved nukleotid nr. 34 for å forandre sekvensen til en nukleotidsekvens som
 30 ikke kunne spaltes. PCR ble utført ved anvendelse av 8 ng plasmid pUC TCF (plasmid hvori SalI/SphI-fragmentet av TCF cDNA ble innføyet i plasmid pUC18) som et templat i nærvær av en kombinasjon av mutagenisert primer Pst01 (SEKVENS.ID.nr.: 1) og en ikke-mutagenisert primer TCF415 R (SEKVENS.ID.nr.:
 35 2), og i nærvær av en kombinasjon av mutagenisert primer P002 (SEKVENS.ID.nr.: 3) og en ikke-mutagenisert primer TCFSal-77 (SEKVENS.ID.nr.: 4).

Etter at primerne var fjernet fra reaksjonsbland-

ingen ved molekylærfiltrering med mikrokon 100 (Amicon), ble produktene blandet. Den andre PCR ble utført ved anvendelse av primer TCFSal-77 og TCF415R. Det erholdte produkt ble spaltet med restriksjonsenzymmer BstPI og PstI. Ved anvendelse av et ligeringssett (Takara-shuzo) ble fragmentet ligert med det største Bst-PstI-fragment av pUC TCF BstPI/PstI fremstilt på forhånd. *E. coli* DH5α ble transformert ved anvendelse av en del av ligeringsreaksjonsblandingen.

Transformert *E. coli* DH5α ble dyrket i L-buljong inneholdende 50 µg/ml ampicillin og et aktuelt plasmid ble utvalgt fra ampicillinresistente kolonier. Dette plasmid ble spaltet med restriksjonsenzymmer SalI og SphI, blandet med nytt pcDNAI (hvori flerkloningssettet for pcDNAI var mutagenisert og det forelå et HindIII-SalI-BamHI-SphI-NotI-kloningssete) SalI/SphI-stort fragment fremstilt på forhånd, og innføyet ved anvendelse av et ligeringssett. Ved anvendelse av reaksjonsblandingen ble *E. coli* MC1061/P3 (Invitrogen) transformert. Transformert *E. coli* MC1061/P3 ble dyrket i L-buljong inneholdende 50 µg/ml ampicillin og 7,5 µg/ml tetrasyklin.

Plasmid-DNA ble fremstilt fra erholdte ampicillintetrasyklinresistente kolonier og nukleotidsekvensene derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat (Perkin-Elmer). Det ble erholdt plasmid pcD TCF001 med en aktuell struktur og TCF-mutanter ble fremstilt ved anvendelse av det erholdte plasmid.

II. Konstruksjon av en ekspresjonsvektor for TCF-mutanter og fremstilling av transformert *E. coli*

i. Konstruksjon av RKRR2AAAA-ekspresjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

En ekspresjonsvektor for cDNA som koder for RKRR2AAAA ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I det første trinn ble det anvendt en kombinasjon av mutagenisert primer 2RKRRF (SEKVEN.SID.nr.: 5) og ikke-mutagenisert primer TCF977 R (SEKVEN.SID.nr.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 2RKRR R (SEKVEN.SID.nr.: 7) og ikke-mutagenisert primer TCFSal-77 (SEKVEN.SID.nr.: 4).

4 ng pcD TCF001 ble anvendt som templat i begge reaksjoner. Etter reaksjonene ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100. 1/20 av blandingen ble anvendt som templat i den andre PCR. TCFSal-77 og TCF977 R ble anvendt som primere. Reaksjonsblandingen ble renset med mikrokon 100 og spaltet med restriksjonsenzymer BstPI og EcoRV. Ved anvendelse av ligeringssettet ble fragmentet innføyd i det store fragment av en SRα-inneholdende TCF-ekspressjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5α ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt fra de dannede ampicillin-resistente celler ved hjelp av den samme metode som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon og DNA-sekvensen derav ble bestemt ved hjelp av DNA-sekvenseringsapparatet (Perkin-Elmer). Dette plasmid ble spaltet med restriksjonsenzymer EcoRV og BstPI og innføyet i fragmentet av pUC TCF som på forhånd var spaltet med restriksjonsenzymer EcoRV og BstPI, etterfulgt av transformasjon av *E. coli* DH5α med dette.

E. coli omfattende dette plasmid ble deponert som pUC TCF2 ved National Institute of Bioscience and Human Technology 10. november 1994, og har deponeringsnummer FERM P-14624.

ii. Konstruksjon av KIKTKK27AIATAA-ekspressjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

Et ekspressjonsplasmid for cDNA som koder for KIKTKK27AIATAA-mutant ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I den første PCR ble det anvendt en kombinasjon av en mutagenisert primer 27KIKTKK F (SEKVENSI.D.NR.: 8) og en ikke-mutagenisert primer TCF977 R (SEKVENSI.D.NR.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 27KIKTKK R (SEKVENSI.D.NR.: 9) og en ikke-mutagenisert primer TCFSal-77 (SEKVENSI.D.NR.: 4). 4 ng pcD TCF001 ble anvendt som templat i begge reaksjoner. Etter reaksjonene ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100. 1/20 av blandingen ble anvendt som templat i den andre PCR. TCFSal-77 og TCF977 R ble anvendt som primere.

Reaksjonsblandingen ble renset med mikrokon 100 og spaltet med restriksjonsenzymer BstPI og EcoRV. Ved anvendelse av ligeringssett ble fragmentet innføyet i det store fragment av en SRa-inneholdende TCF-ekspresjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5a ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt fra de ampicillinresistente celler ved anvendelse av den samme metode som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon og DNA-sekvensen derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat. Dette plasmid ble spaltet med restriksjonsenzymer EcoRV og BstPI og inkorporert i fragmentet av pUC TCF spaltet med restriksjonsenzymer EcoRV og BstPI, etterfulgt av transformasjon av *E. coli* DH5a med dette. *E. coli* omfattende dette plasmid ble deponert ved National Institute of Bioscience and Human Technology 10. november 1994, og har deponeringsnummer FERM P-14623.

20 iii. Konstruksjon av K54A-ekspresjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

Et ekspresjonsplasmid for cDNA som koder for K54A-mutanten ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I den første PCR ble det anvendt en kombinasjon av mutagenisert primer 54K F (SEKVENS.ID.nr.: 10) og ikke-mutagenisert primer TCF977 R (SEKVENS.ID.nr.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 54K R (SEKVENS.ID.nr.: 11) og ikke-mutagenisert primer TCFSal-77 (SEKVENS.ID.nr.: 4). 4 ng pCD TCF001 ble anvendt som templat i begge reaksjoner. Etter reaksjonene ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100.

30 1/20 av blandingen ble anvendt som templat i den andre PCR. TCFSal-77 og TCF977 R ble anvendt som primere. Reaksjonsproduktet ble renset med mikrokon 100 og spaltet med restriksjonsenzymer BstPI og EcoRV. Ved anvendelse av et ligeringssett ble fragmentet innføyet i det store fragment av en SRa-inneholdende TCF-ekspresjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5a ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt fra de erholdte ampicillinresistente celler ved anvendelse av

den samme metode som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon og DNA-sekvensen derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat.

5 iv. Konstruksjon av RGKD132AGAA-ekspresjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

Et ekspresjonsplasmid for cDNA som koder for RGKD132AGAA-mutant ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I den første PCR ble det anvendt en kombinasjon av
10 mutagenisert primer 132RGKD F (SEKVEN.S.ID.nr.: 12) og ikke-mutagenisert primer TCF977R (SEKVEN.S.ID.nr.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 132RGKD R (SEKVEN.S.ID.nr.: 13) og primer TCFSal-77 (SEKVEN.S.ID.nr.: 4). 4 ng pCD TCF001 ble anvendt som templat i begge reaksjoner. Etter reaksjonen
15 ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100.

1/20 av blandingen ble anvendt som templat i den andre PCR. TCFSal-77 og TCF977 R ble anvendt som primere. Reaksjonsproduktet ble renset med mikrokon 100 og spaltet med
20 restriksjonsenzymer BstPI og EcoRV. Ved anvendelse av et ligeringssett ble fragmentet innføyset i det store fragment av den SRA-inneholdende TCF-ekspresjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5a ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt
25 fra de erholdte ampicillinresistente cellelinjer. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon på samme måte som beskrevet ovenfor, og basesekvensen derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat.

30 v. Konstruksjon av R142A-ekspresjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

Et ekspresjonsplasmid for cDNA som koder for R142A-mutanten ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I den første PCR ble det anvendt en kombinasjon av mutagenisert
35 primer 142R F (SEKVEN.S.ID.nr.: 14) og ikke-mutagenisert primer TCF977 R (SEKVEN.S.ID.nr.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 142R R (SEKVEN.S.ID.nr.: 15) og TCFSal-77 (SEKVEN.S.ID.nr.: 4). 4 ng pCD TCF ble anvendt som templat i

begge reaksjoner. Etter reaksjonene ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100.

1/20 av blandingen ble deretter anvendt som templat i den andre PCR. Reaksjonsproduktet ble renset med mikrokon 100 og spaltet med restriksjonsenzymer BstPI og EcoRV. Ved anvendelse av et ligeringssett ble fragmentet innføyet i det store fragment av en SRA-inneholdende TCF-ekspresjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5a ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt fra de erholdte ampicillinresistente cellelinjer på samme måte som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon og DNA-sekvensen derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat.

vi. Konstruksjon av R42A-ekspresjonsvektor og fremstilling av transformert *E. coli*

Et ekspresjonsplasmid for cDNA som koder for R42A-mutanten ble konstruert ved hjelp av to trinn med PCR. I den første PCR ble det anvendt en kombinasjon av mutagenisert primer 42R F (SEKVEN.S.ID.nr.: 16) og ikke-mutagenisert primer TCF977 R (SEKVEN.S.ID.nr.: 6), og en kombinasjon av mutagenisert primer 42R R (SEKVEN.S.ID.nr.: 17) og TCFSal-77 (SEKVEN.S.ID.nr.: 4). 4 ng pcD TCF001 ble anvendt som templat i begge reaksjoner.

Etter reaksjonen ble begge reaksjonsblandinger blandet og renset med mikrokon 100. 1/20 av blandingen ble deretter anvendt som templat i den andre PCR. TCFSal-78 og TCF977 R ble anvendt som primere. Reaksjonsblandingen ble renset med mikrokon 100 og spaltet med restriksjonsenzym BstPI/EcoRV. Ved anvendelse av et ligeringssett ble fragmentet innføyet i det store fragment av den SRA-inneholdende TCF-ekspresjonsvektor som på forhånd var spaltet med BstPI og EcoRV. *E. coli* DH5a ble transformert med ligeringsreaksjonsblandingen og et aktuelt klon ble erholdt fra ampicillinresistente cellelinjer på samme måte som beskrevet ovenfor. Plasmid-DNA ble fremstilt fra det erholdte klon og DNA-sekvensen derav ble bestemt ved hjelp av et DNA-sekvenseringsapparat.

III. Fremstilling og rensing av ekspresjonsplasmider for TCF-mutanter

Seks typer av transformert *E. coli* omfattende de ovenfor beskrevne ekspresjonsmidler ble dyrket i L-buljong (400 ml) inneholdende 50 µg/ml ampicillin, i en risteinkubator ved 37 °C over natten, fordi Spectinoycin (Sigma) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,3 mg/ml når OD600 i dyrkningsløsningen var 1,0. I overensstemmelse med metoden Maniatis (Molecular cloning 2. utg. s. 1.21-1.52 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory), plasmid-DNA isolert ved hjelp av den alkaliske SDS-metode, og seks typer av TCF-mutantekspresjonsplasmider ble rensset ved hjelp av cesium-tetthetsgradiententrifugeringsmetoden.

IV. Transfeksjon av TCF-mutantekspresjonsplasmid i dyreceller

Alle de mutante ekspresjonsplasmider ble transfektert i CHO-celler. CHO-celler (2×10^6) ble suspendert i 0,8 ml IMDM-medium (Gibco) inneholdende 10 % kalvefostereserum (Gibco), hvori det ytterligere ble suspendert en oppløsning av 200 µg ekspresjonsvektor og 10 µg Blastidicinresistent genekspresjonsplasmid pSV2 bsr (Funakoshi) på forhånd oppløst i 25 µl TE (10 mM tris-HCl (pH 8,0) - 1 mM EDTA). Denne suspensjon ble elektroporert under betingelsene 330V og 960 µF. Etter henstand ved romtemperatur i 10 minutter ble suspensjonen suspendert i 10 ml IMDM inneholdende 10 % FCS-medium, og dyrket ved 37 °C i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) i 2 dager. To dager etter ble supernatanten oppsamlet og mengden av den uttrykte TCF-mutant ble analysert ved hjelp av enzymimmunanalyse (EIA) (N. Shima, et al., Gastro-enterologia Japonica, vol. 26, nr. 4, s. 477-482 (1991)) ved anvendelse av anti-TCF-monoklonalt antistoff. Dette ble anvendt som en prøve for analysering av biologisk aktivitet. Cellene ble høstet fra bunnen av flaskene ved trypsin(Gibco)behandling, og antall levedyktige celler ble tallet. Ca. 10 000 celler/brønn ble plassert i 96-brønners plater (Nunc) og dyrket i 200 µl/brønn IMDM-medium inneholdende 10 % FCS og 5 µg/ml Blastidicin i 2-3 uker. Etter 2-3 uker ble 50 µl aliquoter tatt fra hver brønn og testet med hensyn til ekspresjon av TCF-mutant ved

hjelp av EIA. Cellekloner som uttrykker TCF-mutantene ble dyrket i 12-brønners plater og 25 cm² flaske. Cellelinjene som produserer TCF-mutant ble tilveiebrakt fra CHO-celler ved hjelp av den ovenfor angitte operasjon.

5

V. Dyrkning i stor skala av TCF-mutantproduserende celler

Mutantproduserende celler ble innhøstet fra 75 cm² flasker når kulturen ble sammenløpende, og cellene ble overført til 10 flasker 225 cm² inneholdende 100 ml medium og
10 dyrket i én uke. Kultursupernatanten ble deretter innsamlet. Ved å gjenta denne operasjon 1 eller 2 ganger ble 1-2 l av dyrkningsløsningen erholdt.

VI. Rensing av TCF-mutantene

15 Rensingen ble utført ved hjelp av tre trinn som beskrevet nedenfor.

i. Heparin-Sepharose CL-6B

Bunnfall ble fjernet fra 1-2 l dyrkningsmedium fra
20 CHO-celler som uttrykker forskjellige TCF-mutanter, ved sentrifugering (2 000 rpm x 10 minutter) av mediet, og ved filtrering av supernatanten gjennom et 0,45 µm filter (German Science) ble TCF-mutant absorbert ved 4 ml/minutt på en heparin-Sepharose CL-6B-kolonne (25 mm x 120 mm, pharmacia)
25 ekvilibrert med 10 mM tris-HCl (pH 7,5) inneholdende 0,3 M NaCl og 0,01 % Tween 20. Kolonnen ble vasket med ca. 500 ml ekvilibreringsbuffer og TCF-mutanten ble eluert med 10 mM tris-HCl (pH 7,5) inneholdende 2 M NaCl og 0,01 % Tween 20. Den eluerte løsning ble fraksjonert i 4 ml fraksjoner ved
30 hjelp av en fraksjonsoppsamler, og fraksjonene med absorpsjon ved 280 nm ble oppsamlet.

ii. Mono S FPLC

35 Fraksjonen inneholdende TCF-mutant eluert med 2 M NaCl ble dialysert mot 10 mM fosfatbuffer (pH 7,0) inneholdende 0,15 M NaCl, etterfulgt av sentrifugering (12 000 rpm x 90 minutter) for å fjerne bunnfall. Supernatanten inneholdende TCF-mutant ble passert gjennom en mono S-kolonne (5

mm x 50 mm, Pharmacia) ekvilibrert med 10 mM fosfatbuffer (pH 7,0) inneholdende 0,15 NaCl og 0,01 % Tween 20, ved en gjennomstrømningshastighet på 1 ml/minutt for å adsorbere TCF-mutant. Etter at kolonnen var vasket med ca. 30 ml

5 ekvilibreringsbuffer ble TCF-mutant eluert ved å endre gjennomstrømningshastigheten til 0,5 ml/minutt med en lineær gradient av NaCl opp til 1,0 M i 60 minutter. Den eluerte løsning ble fraksjonert i fraksjoner på 5 ml ved hjelp av en fraksjonsoppsamler, og fraksjoner inneholdende TCF-mutant ble

10 analysert ved absorpsjon ved 280 nm og EIA og oppsamlet.

iii. Heparin 5-PW FPLC

Fraksjonen inneholdende TCF-mutant erholdt ved anvendelse av mono S-kolonnekromatografi, ble tilsatt en 2-gangers mengde 10 mM tris-HCl (pH 7,5) inneholdende 0,01 %

15 Tween 20. Løsningen ble passert gjennom en heparin 5-PW-kolonne (5 mm x 75 mm TOSOH) 1 ml/minutt, ekvilibrert med 10 mM tris-HCl (pH 7,5) inneholdende 0,3 M NaCl og 0,01 % Tween 20, for å absorbere TCF-mutanten. Ved å endre gjennom-

20 strømningshastigheten til 0,5 ml/minutt ble TCF-mutanten eluert med en lineær gradient av NaCl opp til 2,0 M i 60 minutter.

Den eluerte løsning ble fraksjonert i fraksjoner på 5 ml ved hjelp av en fraksjonsoppsamler. Fraksjonen innehold-

25 ende TCF-mutant ble analysert ved absorpsjon ved 280 nm og EIA og oppsamlet. Erholdt TCF-mutantløsning ble dialysert mot PBS-inneholdende 0,01 % Tween 20 (TPBS), for å erholde det endelig rensede produkt. Mengden protein i det endelige rensede produkt ble bestemt ved hjelp av Lowry-metoden.

30 Aminosyresekvensen av TCF-mutant RKRR2AAAA og sekvensen av mutant KIKTKK27AIATAA ble angitt som hhv. SEKVENS.ID.nr.: 18 og SEKVENS.ID.nr.: 19.

VII. SDS-polyakrylamidgelelektroforese av renset TCF-mutant

35 Renset TCF-mutant (200 ng) ble underkastet et SDS-polyakrylamidgelelektroforese. En skjematisk fremstilling av elektroforesen av TCF-mutant RKRR2AAAA og KIKTKK27AIATAA som oppviste en 10-gangers økning i biologisk aktivitet som

beskrevet nedenfor, og nativt TCF, er vist i figur 1. Både resultatene under reduserende betingelser (i nærvær av β -merkapttoetanol) og ikke-reduserende betingelser (i fravær av β -merkapttoetanol) viste ingen forskjell mellom de tre prøver.

- 5 Det ble dessuten ikke observert noe bånd foruten de som var forventet ut fra strukturen av begge TCF-mutanter.

Eksempel 2

Affinitet av TCF og TCF-mutant for heparin

10 I. Heparin-sepharose CL-6B

- Bunnfall ble fjernet fra kulturmediet fra CHO-celler som uttrykker hver TCF-mutant, ved sentrifugering (1 200 x g, 10 minutter) av mediet og ved filtrering av supernatanten gjennom et 0,22 μ m filter. Den filtrerte supernatant
15 ble applisert på en heparin-Sepharose CL-6B-kolonne (5 mm x 5 mm; Pharmacia) ekvilibrert med TPBS, for å adsorbere TCF-mutant på kolonnen. Etter vask med 3 ml TPBS ble TCF-mutant eluert med 1 ml TPBS inneholdende 0,2-0,3 M NaCl, under
trinnsvis økning av saltkonsentrasjonen. Konsentrasjonen av
20 TCF-mutant i eluatet ble analysert ved hjelp av EIA og saltkonsentrasjonen i eluatet ble definert som affinitet av mutant for heparin.

25 II. Heparin 5-PW FPLC

- Kulturløsningen fra CHO-celler som uttrykker hver TCF-mutant (30-60 ml) ble sentrifugert (1 000 x g, 10 minutter), passert gjennom et 0,22 μ m filter for å fjerne bunnfall og applisert på en heparin 5-PW-kolonne ekvilibrert
30 med 20 mM tris-HCl-bufferløsning inneholdende 0,01 Tween 20 ved en gjennomstrømningshastighet på 1,0 ml/minutt, for å adsorbere TCF-mutant. Etter vask av kolonnen med ca. 20 ml ekvilibreringsbufferløsning og endring av gjennomstrømningshastigheten til 0,5 ml/minutt, ble TCF-mutant eluert med en
35 lineær gradient av NaCl opp til 1,5 i 45 minutter. Fraksjoner av 0,5 ml ble oppsamlet ved hjelp av en fraksjonsoppsamler og konsentrasjonen av TCF-mutant i hver fraksjon ble kvantifisert ved hjelp av EIA, og saltkonsentrasjonen i eluerings-

løsningen ble definert som affinitet av mutant for heparin.

Resultatene for bestemmelse av affinitet av disse TCF-mutanter for heparin er vist i tabell 1. Elueringskonsentrasjonen av NaCl fra heparin-Sepharose representerer

- 5 konsentrasjonen ved hvilken TCF-mutanten elueres i maksimal mengde. Det relative forhold mellom elueringskonsentrasjonene er definert som (elueringskonsentrasjonen av NaCl for mutant TCF/den tilsvarende konsentrasjon forativ TCF). n.d. betyr "ikke bestemt". Ved undersøkelsen med heparin-Sepharose opp-
- 10 viste RKRR2AAAA, KIKTKK27AIATAA og R42A betydelig redusert affinitet for heparin. Ved undersøkelsen med heparin 5-PW ble det dessuten observert at affinitet av mutantene for heparin ble redusert til ca. 70 % av affiniteten for TCF.

15

Tabell 1

	Heparin-Sepharose-elueringskonsentrasjon av NaCl (M)	Heparin 5-PW-elueringskonsentrasjon av NaCl (M)	Relativt forhold for elueringskonsentrasjon
TCF	0,9	1,14	1,00
RKRR2AAAA	0,6	0,78	0,68
KIKTKK27AIATAA	0,6	0,82	0,72
R42A	0,7	0,84	0,74
K54A	0,9	1,10	0,96
RGKD132AGAA	0,9	n.d.	n.d.
R142A	0,9	n.d.	n.d.

Eksempel 3

- 20 Proliferativ aktivitet av TCF og TCF-mutanter overfor hepatocytter in vitro

Proliferativ aktivitet ble undersøkt ved hjelp av den følgende metode:

- 25 I overensstemmelse med metoden ifølge Segren (Method in cell biology, vol. 13, s. 29 (1976) Academic Press, New York), ble hepatocytter isolert fra Wistar-rotter (ca. 200 g kroppsvekt). Cellene ($1,0 \times 10^4$ /50 μ l/brønn) ble

plassert i brønnene i 96-brønners plater (Falcon) og dyret ved 37 °C over natten ved anvendelse av Williams E-medium (Flow Laboratory) inneholdende 10 % kalvefosterserum og 10 µM deksametason (i det etterfølgende forkortet som basismedium).

5 Etter 24 timer ble 10 µl basismedium inneholdende TCF eller TCF-mutant tilsatt til hver brønn. Platene ble inkubert ved 37 °C i ytterligere 22 timer. Etter 22 timer ble ³H-tymidin (Amersham) tilsatt i en mengde av 1 µCi/brønn og kulturen ble opprettholdt i ytterligere 2 timer. Cellene ble deretter

10 vasket to ganger med PBS og innhøstet ved behandling med 0,5 % trypsin, etterfulgt av oppsamling av cellene i et glassfilter ved hjelp av et celleinnhøstingsapparat. Radioaktiviteten inkorporert i hver brønn ble målt ved hjelp av Matrix 96 (Packard) som mengde DNA-syntese. Resultatene er

15 vist i figur 2.

Mutant K54A, RGKD132AGAA og R142A hadde hhv. 1,4-ganger, 2,0-ganger og 1,6-ganger høyere biologisk aktivitet ennativ TCF ved en TCF-antigenkonsentrasjon på 2,5 ng/ml. Hver mutant med redusert affinitet for heparin ble videre be-

20 stemt ved hjelp av Lowry-metoden. Den biologiske aktivitet ble deretter sammenlignet med hensyn til den proteinkonsentrasjon som oppviste 50 % av den maksimale proliferative aktivitet (ED₅₀) (figurene 3 og 4).

Som resultat oppviste to typer protein, dvs.

25 RKRR2AAAA og KIKTKK27AIATAA, mer enn 10 ganger så høy biologisk aktivitet pr. enhetsmengde protein sammenlignet med aktiviteten av nativ TCF.

Eksempel 4

30 Proliferativ aktivitet av TCF og TCF-mutant i nyreepitelceller

Proliferativ aktivitet i nyreepitelceller ble bestemt ved hjelp av den følgende metode:

OK-celler avledet fra nyreepitelcellelinjen fra

35 amerikansk Opossum ble plassert i hver brønn i en 96-brønners plate, slik at antall celler var $1,0 \times 10^4/100 \mu\text{l/brønn}$, og dyrket i DMEM-medium inneholdende 10 % kalvefosterserum ved 37 °C over natten. Deretter ble hver brønn vasket 2-3 ganger

med DMEM-medium uten innhold av serum. Mediet i hver brønn ble erstattet med DMEM-medium uten innhold av serum, og kulturen ble opprettholdt ved 37 °C i ytterligere 2 dager. Mediet i hver brønn ble deretter på nytt erstattet med 50 µl

5 friskt DMEM-medium uten innhold av serum, og etter tilsetning av 50 µl TCF eller TCF-mutant fortynnet med DMED-medium inneholdende 0,2 % bovint serumalbumin, ble kulturen opprettholdt i ytterligere 24 timer. Etter 24 timer ble ³H-tymidin tilsatt for å gi en mengde på 1 µCi/brønn, og kulturen ble opprett-

10 holdt i ytterligere 2 timer. Cellene ble deretter vasket to ganger med PBS og innhøstet ved behandling med 0,5 % trypsin, etterfulgt av oppsamling av cellene i et glassfilter ved hjelp av et celleinnhøstingsapparat. Radioaktiviteten inkorporert i hver brønn ble målt ved hjelp av Matrix 96 og

15 bestemt som mengde DNA-syntese. Resultatene er vist i figur 5.

Som resultat ble det observert at biologiske aktiviteter pr. enhetsmengde protein RKRR2AAAA og KIKTKK27AIATAA i nyreepitelceller økte mer enn to ganger

20 sammenlignet med aktiviteten av nativ TCF.

Eksempel 5

Proliferativ aktivitet av TCF og TCF-mutant i benmargsceller in vitro

25 Proliferativ aktivitet i benmargsceller ble bestemt ved hjelp av den følgende metode:

NSF-60-celler fra en musebenmargscellelinje ble plassert i hver brønn i en 96-brønners plate for å gi en mengde på $5,0 \times 10^4$ celler/50 µl/brønn i RPMI-medium

30 inneholdende 10 % kalvefosterserum, og ble etter tilsetning av 50 µl TCF eller TCF-mutant fortynnet med mediet, dyrket ved 37 °C i 24 timer. Etter 24 timer ble 10 µl, 5 mg/ml MTT (Sigma) tilsatt til hver brønn og kulturen ble opprettholdt i ytterligere 24 timer. 100 µl 10 % SDS/10 mM ammoniumklorid

35 ble deretter tilsatt til hver brønn og de ble hensatt ved romtemperatur over natten. Optisk absorbans ved 590 nm ble deretter målt ved Immunoreader NJ-2 000 (Intermed) som proliferativ aktivitet.

Resultatene er vist i figur 6. Som resultat ble det observert at biologiske aktiviteter pr. enhetsmengde protein RKRR2AAAA og KIKTKK27AIATAA i benmargsceller ble redusert til 1/2-1/20 av aktiviteten av nativ TCF.

5

Eksempel 6

In vivo-biologisk aktivitet av TCF og TCF-mutanter

In vivo-biologisk aktivitet ble analysert ved hjelp av den følgende metode:

- 10 TCF eller TCF-mutant oppløst i PBS inneholdende 0,01 % Tween 20 ble administrert intravenøst gjennom halen (2 mg/kg x 2 ganger/dag) til 6 uker gamle Wistar-hannrotter i 4 dager. Dagen etter den siste administrering ble blodprøver
- 15 uttatt fra den kaudale vena cava under eteranestesi og serum ble innsamlet ved sentrifugering (3 000 rpm x 10 minutter) og umiddelbart etter blodprøveuttak, i tilfelle med plasma, ble natriumsitrat (sluttkonsentrasjon 0,38 %) tilsatt etterfulgt av sentrifugering (3 000 rpm x 10 minutter) for å gi plasma.
- 20 Etter at oppsamlet serum eller plasma ble oppbevart i en fryser ved -30 °C ble serumnivå for totalt protein, albumin, umettet jernbindingskapasitet, totalt kolesterol, fritt kolesterol, HDL-kolesterol og fosfolipid, analysert ved hjelp av en serum autoanalysator (Hitachi 7150 autoanalysator), og plasmanivå av protrombin og fibrinogen ble analysert ved
- 25 hjelp av en automatisk blodkoagulasjonsanalysator KC40 (Amerung). Ved disse analyser ble de følgende analysesett anvendt:

- Totalt protein: "Autosera" TP, albumin: "Autosera" ALB, umettet jernbindingskapasitet: "Clinimat" UIBC, totalt
- 30 kolesterol: "Autosera" CHO-2, fritt kolesterol: "Autosera" F-CHO-2, HDL-kolesterol: HDL-C-2 "DAIICHI", fosfolipid: "Autosera" PL-2 (alle de ovennevnte sett er produkter fra Daiichi-Pure Chemicals Co., Ltd.).

- Protrombintid: Ortobraintromboplastin (Ortho
- 35 Diagnostic Systems Inc.), fibrinogen: "Sun Assay Fib" (Nitto Bosseki Co., Ltd.). Som typiske eksempler er doseeffekter derav på serumnivå for totalt protein og på serumnivå for HDL-kolesterol vist i hhv. figur 7 og figur 8.

I overensstemmelse med resultatene fra statistisk analyse med parallelllinjeundersøkelse, med hensyn til økning av totalt protein, oppviste RKRR2AAAA 2,12 ganger spesifikk aktivitet og KIKIKTKK27AIARAA oppviste 1,37 ganger spesifikk aktivitet, sammenlignet med aktiviteten av nativt protein. Med hensyn til økning av HDL-kolesterol oppviste dessuten RKRR2AAAA 1,66 ganger spesifikk aktivitet og KIKTKK27AIATAA oppviste 1,62 ganger spesifikk aktivitet, sammenlignet med aktiviteten av nativt protein.

Industriell tilgjengelighet

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en ny TCF-mutant. TCF-mutanten ifølge foreliggende oppfinnelse har proliferativ aktivitet og vekststimulerende aktivitet i hepatocytter og er fordelaktige for behandling av forskjellige leversykdommer og som et antitumormiddel.

Sekvensliste

SEKVENNS.ID.nr.: 1
LENGDE: 31
TYPE: Nukleinsyre
5 TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer Pst01
SEKVENNS: GCCAG CCCTG CTGCT CCAGC ATGTC CTCCT G
10
SEKVENNS.ID.nr.: 2
LENGDE: 25
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
15 TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer TCF415 R
SEKVENNS: TGCCA CTCTT AGTGA TAGAT ACTGT
20 SEKVENNS.ID.nr.: 3
LENGDE: 34
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
25 MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer P002
SEKVENNS: TTTTA AAAGG AAGTC CTTTA TTCCT AGTAC ATCT
SEKVENNS.ID.nr.: 4
30 LENGDE: 32
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
35 KJENNETEGN: Primer TCFSal-77
SEKVENNS: GGTCT ACTAG GCACT GACTC CGAAC AGGAT TC

SEKVENS.ID.nr.: 5
LENGDE: 33
TYPE: Nukleinsyre
5 TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 2RKRR F
SEKVENS: CCCTA TGCAG AGGGA CAAGC GGCAG CTGCC ATT

10
SEKVENS.ID.nr.: 6
LENGDE: 23
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
15 TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer TCF977 R
SEKVENS: ATACC TGAGA ATCCC AACGC TGA

20 SEKVENS.ID.nr.: 7
LENGDE: 33
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
25 MOLEKYLTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 2RKRR R
SEKVENS: GAATT CATGA ATTGT ATTGG CAGCT GCCGC TTG

SEKVENS.ID.nr.: 8
30 LENGDE: 35
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
35 KJENNETEGN: Primer 27KIKTKK F
SEKVENS: GGCAA TAGCA ACCGC AGCTG TGAAT ACTGC AGACC

SEKVENNS.ID.nr.: 9
LENGDE: 38
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
5 TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 27KIKTKK R
SEKVENNS: CAGCT GCGGT TGCTA TTGCC AGTGC TGGAT CTATT TTG

10 SEKVENNS.ID.nr.: 10
LENGDE: 28
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
15 MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: 54K F
SEKVENNS: CCATT CACTT GCGCG GCTTT TGTTT TTG

SEKVENNS.ID.nr.: 11
20 LENGDE: 28
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
25 KJENNETEGN: 54K R
SEKVENNS: CAAAA AAAAA AGCCG CGCAA GTGAA TGG

SEKVENNS.ID.nr.: 12
LENGDE: 36
30 TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 132RGKD F
35 SEKVENNS: GAACA CAGCT ATGCG GGTGC AGCCC TACAG GAAAA C

SEKVENNS.ID.nr.: 13
LENGDE: 36
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
5 TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 132RGKD R
SEKVENNS: GTTTT CCTGT AGGGC TGCAC CCGCA TAGCT GTGTT C

10 SEKVENNS.ID.nr.: 14
LENGDE: 26
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
15 MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 142R F
SEKVENNS: GAAAA CTACT GTGCA AATCC TCGAG G

SEKVENNS.ID.nr.: 15
20 LENGDE: 26
TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
25 KJENNETEGN: Primer 142R F
SEKVENNS: CCTCG AGGAT TTGCA CAGTA GTTTT C

SEKVENNS.ID.nr.: 16
LENGDE: 27
30 TYPE: Nukleinsyre
TRÅD: 1
TOPOLOGI: Lineær
MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA
KJENNETEGN: Primer 42R F
35 SEKVENNS: CAATG TGCTA ATGCA TGTAC TAGGA AT

SEKVENNS.ID.nr.: 17

LENGDE: 27

TYPE: Nukleinsyre

TRÅD: 1

5 TOPOLOGI: Linear

MOLEKYLTTYPE: Nukleinsyre, syntetisk DNA

KJENNETEGN: Primer 42R R

SEKVENNS: ATTCC TAGTA CATGC ATTAG CACAT TG

10 SEKVENNS.ID.nr.: 18

LENGDE: 723

TYPE: Aminoyre

TRÅD: 1

MOLEKYLTTYPE: Protein

15 KJENNETEGN: R K R R 2 A A A A

SEKVENNS:

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu

-31 -30

-25

-20

20

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

-15

-10

-5

-1 1

25

Ala Ala Ala Ala Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

5

10

15

30

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val

20

25

30

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu

35

35

40

45

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys

50

55

60

65

25

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe

70

75

80

5 Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys

85

90

95

10 Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys

100

105

110

15 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His

115

120

125

20 Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg

130

135

140

145

25 Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg

150

155

160

30 Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr

165

170

175

35 Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly

180

185

190

40 Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe

195

200

205

45 Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg

210

215

220

225

	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	His
						230				235					240	
	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	Cys	Ala	Asp	Asn	Thr	Met
5				245					250					255		
	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln	Gly	Gln
10				260					265					270		
	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro
		275					280						285			
15	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	Glu	His	Asp	Met	Thr	Pro
	290					295					300				305	
20	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro
				310						315					320	
	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg
25				325						330					335	
	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys	Asp	Met	Ser	His	Gly	Gln
30			340						345						350	
	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Met	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln
		355						360					365			
35	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp	Asp	Lys	Asn	Met	Glu	Asp
	370						375					380			385	

Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu

400

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr

415

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys

430

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile

445

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg-Val Val Asn Gly Ile Pro Thr

465

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His

480

Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg

495

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly

510

Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu

525

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

545

Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile

550

555

560

Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser

565

570

575

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu

580

585

590

Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His

595

600

605

His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala

610

615

620

625

Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu

630

635

640

Val Cys Glu Glu His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro

645

650

655

Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val

660

665

670

Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val

675

680

685

Pro Glu Ser

690

692

SEKVENSI.D.nr.: 19

LENGDE: 723

TYPE: Aminoyre

TRÅD: 1

5 TOPOLOGI: Lineær

MOLEKYLTYP: Protein

KJENNETEGN: K I K T K K 2 7 A I A T A A

SEKVENSI:

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu

-31 -30

-25

-20

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

-15

-10

-5

-1 1

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

5

10

15

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Ala Ile Ala Thr Ala Ala Val

20

25

30

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu

35

40

45

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys

50

55

60

65

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe

70

75

80

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys

85

90

95

| 30

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys			
100	105	110	
Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His			
115	120	125	
Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg			
130	135	140	145
Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg			
150	155	160	
Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr			
165	170	175	
Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly			
180	185	190	
Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe			
195	200	205	
Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg			
210	215	220	225
Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His			
230	235	240	
Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met			
245	250	255	

	Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln		
	260	265	270
5	Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro		
	275	280	285
10	Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro		
	290	295	300 305
15	Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro		
	310	315	320
20	Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg		
	325	330	335
25	Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln		
	340	345	350
30	Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln		
	355	360	365
35	Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp		
	370	375	380 385
40	Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu		
	390	395	400
45	Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr		
	405	410	415

Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys

420

425

430

Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile

435

440

445

Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr

10

450

455

460

465

Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His

470

475

480

15

Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg

485

490

495

20

Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly

500

505

510

25

Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu

515

520

525

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

30

530

535

540

545

Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile

550

555

560

35

Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser

565

570

575

Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu

590

605

His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala

625

Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu

640

Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile-Val Pro

655

Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val

670

Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val

685

Pro Gln Ser

692

35

P a t e n t k r a v

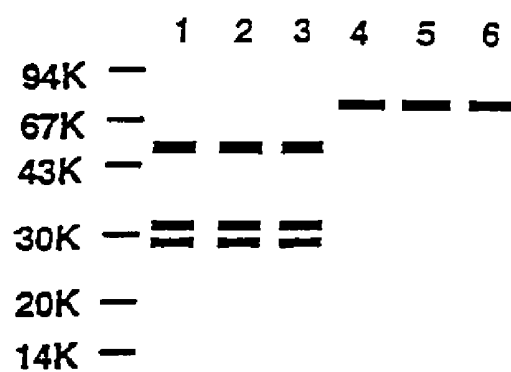
- 5 1. Tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t Arg2-Lys-Arg-Arg5 i
villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala-Ala-
Ala-Ala.
- 10 2. Tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t Lys27-Ile-Lys-Thr-Lys-
Lys32 i villtype-tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til
Ala-Ile-Ala-Thr-Ala-Ala.
- 15 3. Tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t Lys54 i villtype-
tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala.
4. Tumorcytotoksisk-faktor-II-mutant,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t Arg42 i villtype-
tumorcytotoksisk-faktor-II er mutert til Ala.

25

30

35

Fig. 1



1. Redusert TCF
2. Redusert RKRR2AAAA
3. Redusert KIKTKK27AIATAA
4. Ikke-redusert TCF
5. Ikke-redusert RKRR2AAAA
6. Ikke-redusert KIKTKK27AIATAA

Fig. 2

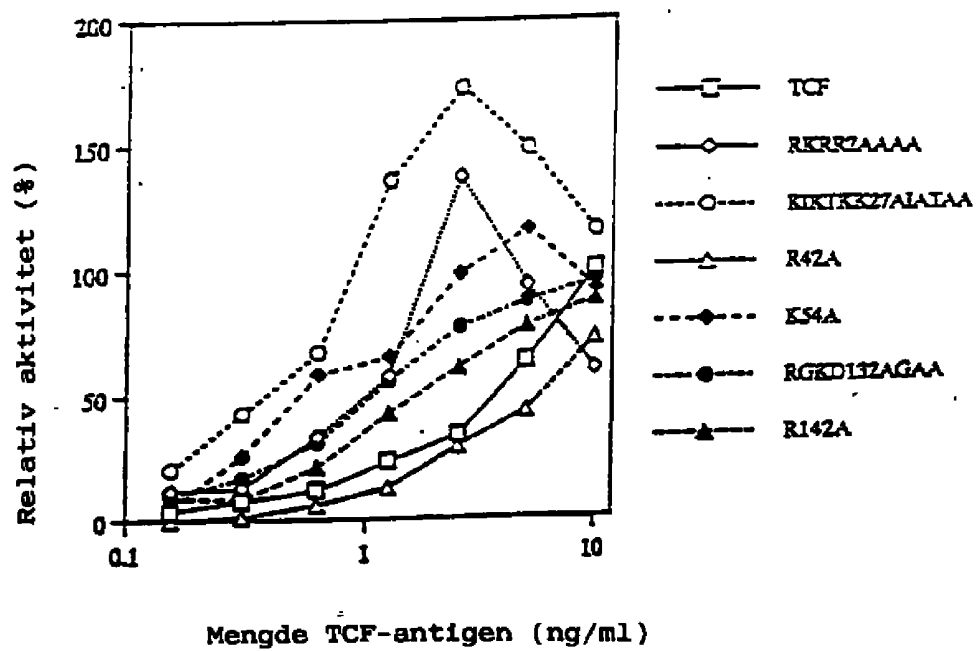


Fig. 3

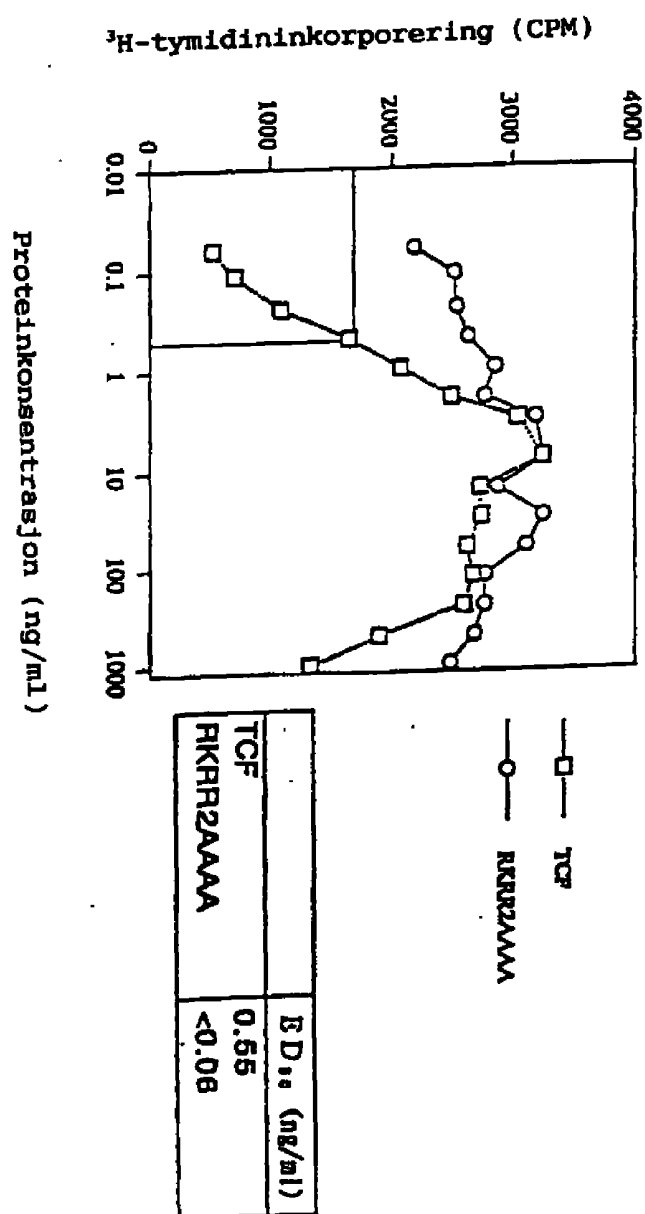


Fig.4

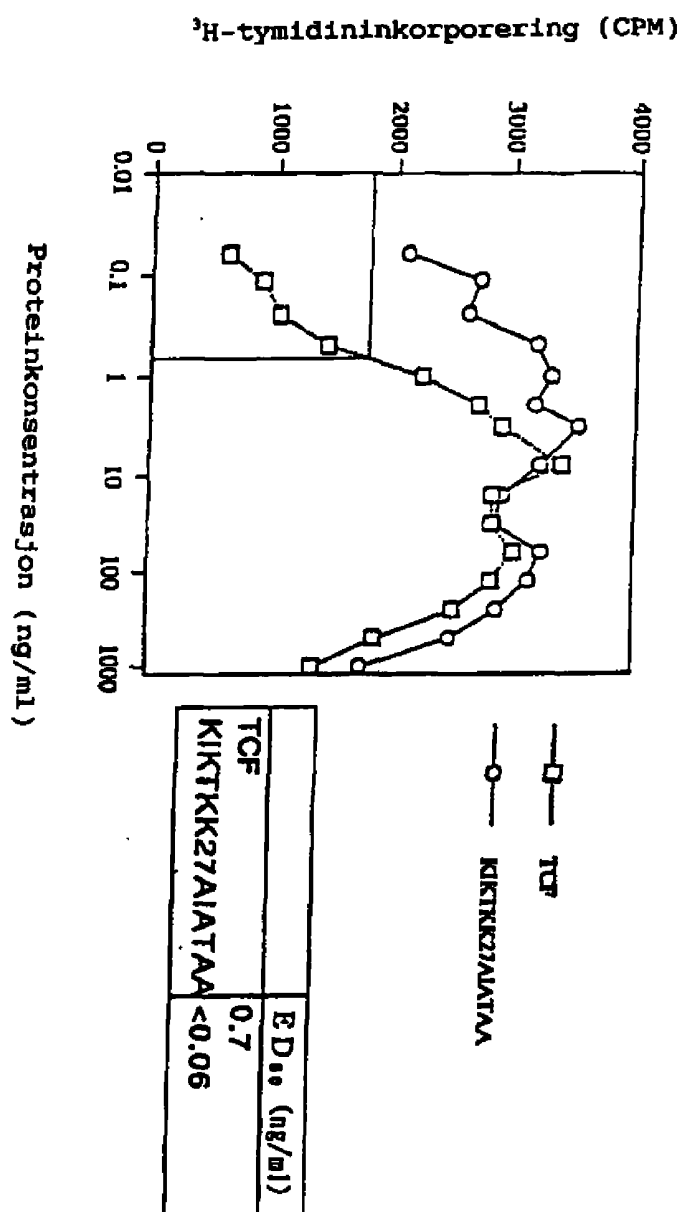


Fig. 5

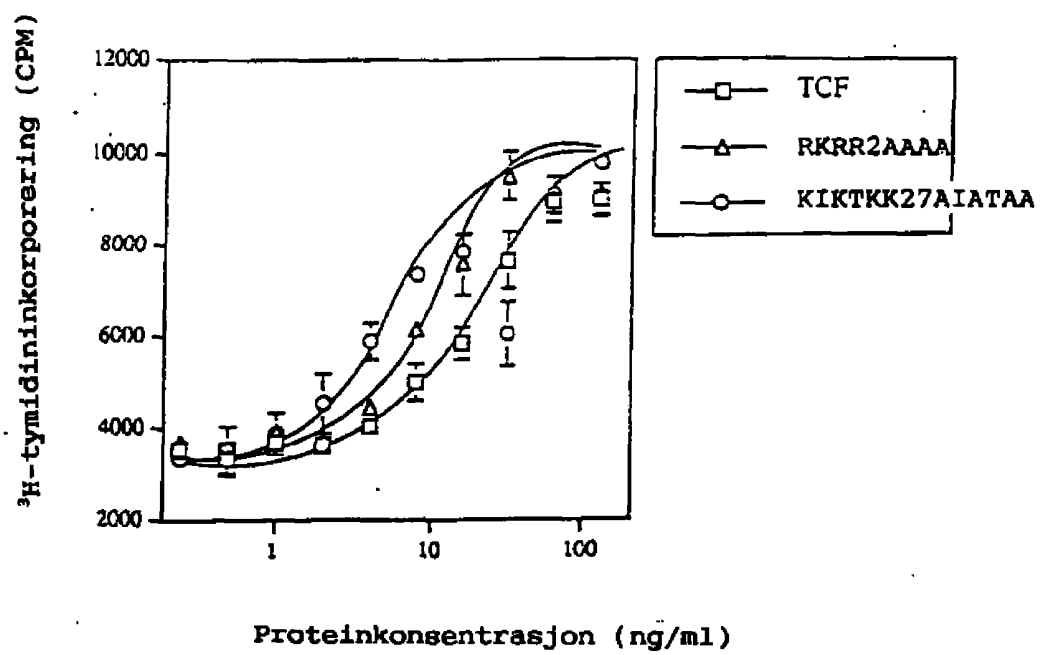


Fig. 6

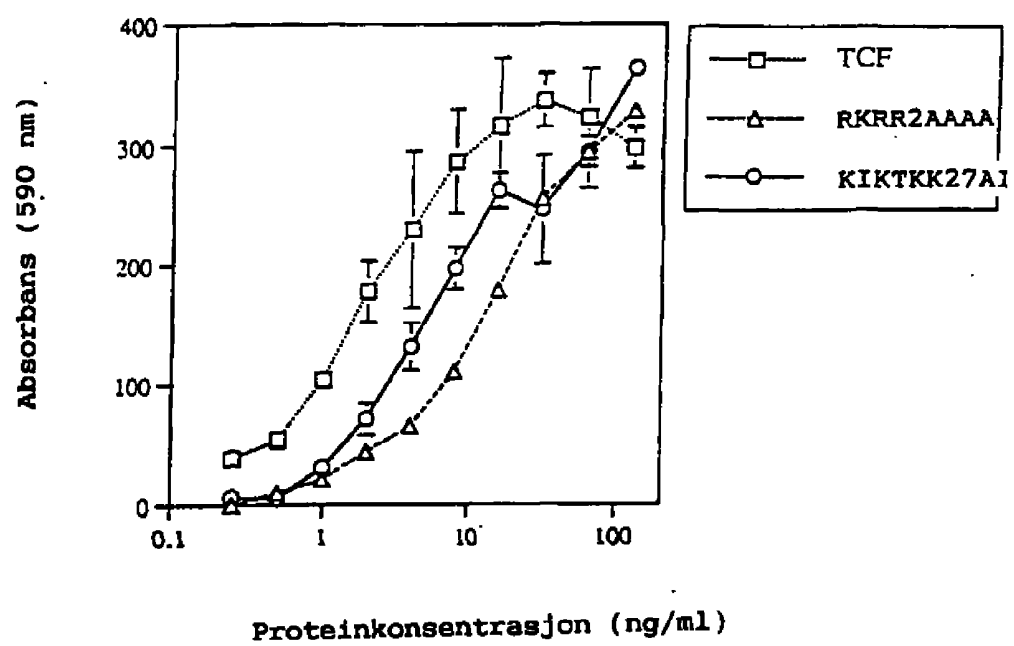


Fig. 7

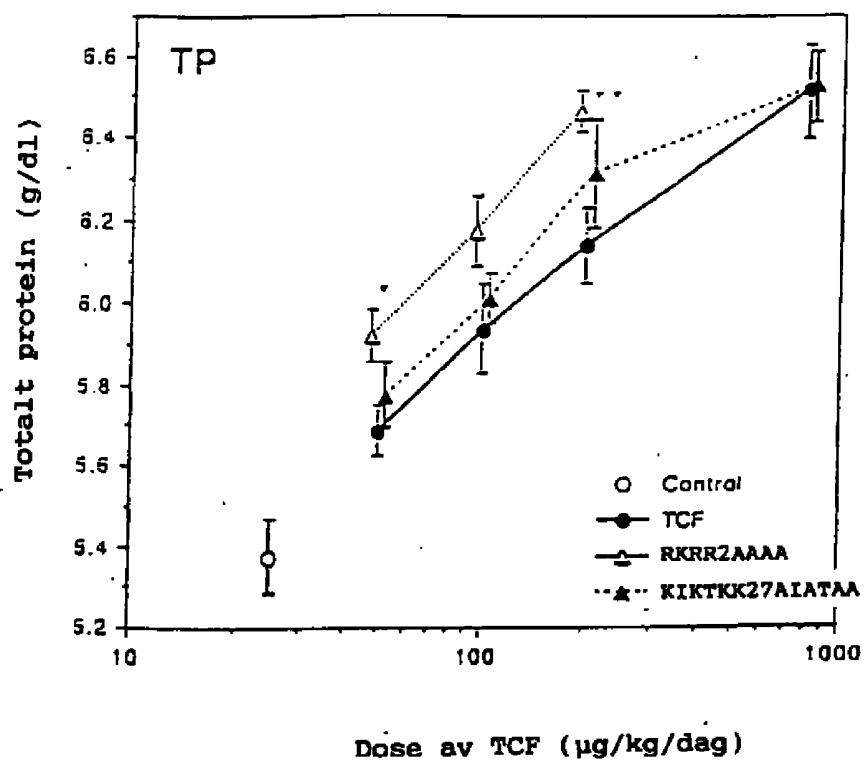


Fig. 8

